(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-552940
(P2022-552940A)
(43)公表日　令和4年12月21日(2022.12.21)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61K	*31/7088(2006.01)*	A61K	31/7088		4B065
C12N	*15/113(2010.01)*	C12N	15/113	120Z	4C076
A01K	*67/027(2006.01)*	C12N	15/113	Z ZNA	4C084
C12N	*5/10 (2006.01)*	A01K	67/027		4C086
C12N	*1/15 (2006.01)*	C12N	5/10		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全81頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-517729(P2022-517729)
(86)(22)出願日　令和2年9月18日(2020.9.18)
(85)翻訳文提出日　令和4年3月18日(2022.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/CN2020/116227
(87)国際公開番号　WO2021/052470
(87)国際公開日　令和3年3月25日(2021.3.25)
(31)優先権主張番号　201910891508.8
(32)優先日　令和1年9月20日(2019.9.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　521339315
ラクティゲン セラピューティクス
中華人民共和国 チャンスー ２２６４０
０ ナントン ルードン チュージャン ロード ８８８ ルードン ライフ アンド ヘルス インダストリー パーク ビルディング １８
(74)代理人　110000109
弁理士法人特許事務所サイクス
(72)発明者　リ ロンチョン
中華人民共和国 チャンスー ２２６４０
０ ナントン シティ ルードン チューガン アベニュー チュージャン ロード ８８８ ルードン ライフ アンド ヘルス インダストリー パーク ビルディング
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　血小板減少症を治療するための核酸分子及びその応用

(57)【要約】
本発明は、小分子活性化核酸分子、並びに血小板減少症などのTHPOたんぱく質の欠乏又は不足に関連する疾患や障害におけるその応用に関する。本発明はRNA活性化メカニズムに基づく小分子活性化核酸分子を提供し、Thpo/THPO遺伝子プロモーター領域に標的化する二本鎖又は一本鎖RNA分子であってもよく、第1核酸鎖と第2核酸鎖を含む。Thpo/THPO遺伝子プロモーター領域に標的化する二本鎖NA分子は16～35ヌクレオチド長さを有する2本の核酸鎖を含み、且つそのうち一方の核酸鎖がThpo/THPO遺伝子プロモーター領域から選ばれる標的とは少なくとも75%の相同性又は相補性を有する。また、本発明は、前記小分子活性化核酸分子を含む薬物組成物又は製剤に関し；前記小分子活性化核酸分子及び前記薬物組成物又は製剤を使用することで、細胞中でのThpo/THPO遺伝子の表現をアップレギュレーションする方法、及びTHPOたんぱく質の欠乏又は不足又に関連する疾患や障害又はさまざまな原因による血小板減少症を治療する方法にも関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＴＨＰＯプロモーターに標的化する小分子活性化核酸分子、前記小分子活性化核酸分子をコードする核酸分子、前記小分子活性化核酸分子を含む組成物又は製剤を治療有効量で個体に投与することを含む、個体の血小板減少症及び／又はＴＨＰＯタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は障害の治療方法。
【請求項２】
前記血小板減少症は様々な原因による血小板減少症を含み、例えば先天性（遺伝性）と後天性血小板減少症であり、好ましくは骨髄産生における血小板減少、末梢血血小板破壊増加及び脾臓の捕捉による血小板減少を含む、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。
【請求項３】
前記血小板減少症はＴＨＰＯタンパク質の発現不足又は減少に関連する血小板減少症、ほかのさまざまな原因による血小板減少症、例えば免疫性血小板減少症、薬剤性血小板減少症、血栓性血小板減少性紫斑及び遺伝性血小板減少症などを含むが、これらに限定されるものではない、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。
【請求項４】
前記個体は哺乳動物である、ことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５】
前記個体はヒトである、ことを特徴とする請求項4に記載の方法。
【請求項６】
前記小分子活性化核酸分子は第1核酸鎖と第2核酸鎖を有し、第1核酸鎖は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６０１～ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６０５のうちのいずれかの連続した１６～３５個のヌクレオチドとは少なくとも７５％、例えば少なくとも約７９％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９９％、又は約１００％の相同性又は相補性を有し、第1核酸鎖と第2核酸鎖は相補して二本鎖核酸構造を形成し、二本鎖核酸構造はＴＨＰＯ遺伝子の細胞での発現を活性化できる、ことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
【請求項７】
前記小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１０４８～ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１４８９のヌクレオチド配列を含むか、これらから選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列であり、且つ第2核酸鎖は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１４９０～ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９３１のヌクレオチド配列を含むか、これらから選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列である、ことを特徴とする請求項6に記載の方法。
【請求項８】
前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖は2本の異なる核酸鎖上に存在する、ことを特徴とする請求項6に記載の方法。
【請求項９】
前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖は同一の核酸鎖上に存在し、好ましくは、前記小分子活性化核酸分子はヘアピン型一本鎖核酸分子であり、前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖が二本鎖核酸構造を形成する相補領域を含む、ことを特徴とする請求項6に記載の方法。
【請求項１０】
前記小分子活性化核酸分子の少なくとも1本の鎖は3’末端に0～6個ヌクレオチドの突出を有する、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。
【請求項１１】
前記小分子活性化核酸分子の2本の鎖はいずれも3’末端に0～6個ヌクレオチドの突出を有し、好ましくは2個又は3個ヌクレオチドの突出を有する、ことを特徴とする請求項10に記載の方法。
【請求項１２】
前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖の長さはそれぞれ１６～３５個ヌクレオチドである、ことを特徴とする請求項6又は7に記載の方法。
【請求項１３】

前記小分子活性化核酸分子は、少なくとも1つの修飾を含み、好ましくは、前記修飾は化学修飾である、ことを特徴とする請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１４】
前記化学修飾は、下記修飾の少なくとも1種又は複数種を含むか、又はこれらから選ばれる、ことを特徴とする請求項13に記載の方法：
（1）前記小分子活性化核酸分子のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドと繋がるホスホジエステル結合に対する修飾、
（2）前記小分子活性化核酸分子のヌクレオチド配列におけるリボースの2’-OHに対する修飾、
（3）前記小分子活性化核酸分子のヌクレオチド配列における塩基に対する修飾、
（4）前記小分子活性化核酸分子のヌクレオチド配列における少なくとも1個のヌクレオチドは鎖核酸である。
【請求項１５】
前記化学修飾は、2’-フルオロ修飾、2’-オキシメチル修飾、2’-オキシエチレンメトキシ修飾、2,4’-ジニトロフェノール修飾、ロック核酸（LNA）、2’-アミノ修飾、2’-デオキシ修飾、5′-ブロモウラシル修飾、5′-ヨードウラシル修飾、N-メチルウラシル修飾、2,6-ジアミノプリン修飾、ホスホロチオエート修飾及びボラノホスフェート修飾の1種又は複数種を含むか、又はこれらから選ばれる、ことを特徴とする請求項13に記載の方法。
【請求項１６】
前記後天性血小板減少症は、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、白血病、薬物、感染、腫瘍疾患、放射線治療、骨髄移植、慢性肝疾患などによる血小板減少、免疫性血小板減少症を含むが、これらに限定されるものではなく、末梢血血小板破壊増加の原因は血栓性血小板減少、ヘパリン起因性血小板減少、薬剤性血小板減少、ITP及び血栓性血小板減少性紫斑病がある、ことを特徴とする請求項3に記載の方法。
【請求項１７】
本発明に係る小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物又は製剤を前記個体又は細胞に投与することを含む、THPO遺伝子の個体又は細胞での発現の活性化/アップレギュレーション方法。
【請求項１８】
請求項1～9のいずれか1項に記載の小分子活性化核酸分子をコードする核酸。
【請求項１９】
請求項1～9のいずれか1項に記載の小分子活性化核酸分子又は請求項1～9のいずれかに記載の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞。
【請求項２０】
請求項1～9のいずれか1項に記載の小分子活性化核酸分子を含む組成物。
【請求項２１】
リポソーム、好ましくはLNP封入の分子活性化核酸分子を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の小分子活性化核酸分子を含む製剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、核酸の技術分野に属し、具体的には、遺伝子活性化に関連する二本鎖核酸分子に関して、例えば小分子活性化核酸分子、小分子活性化核酸分子のトロンボポエチン（Thrombopoietin, THPO, TPO）遺伝子転写の活性化/アップレギュレーションにおける応用、並びに血小板減少症などのTHPOたんぱく質欠乏又は不足に関連する疾患や障害の治療における応用に関する。
【背景技術】
【０００２】
血小板（thrombocyte）は末梢血中の血液成分の1つであり、骨髄中の巨核球から由来

し、細胞核がない(Machlus, Thon, and Italiano 2014)。血小板の機能は、主に止血を促進し、血液凝固を促進することで、また血小板は毛細血管壁の完全性を維持する機能もあり、生理学的止血及び病理学的血栓の形成において重要な役割を果たす(Laki 1972)。

【０００３】

血小板減少症は、末梢血中の血小板数が異常に減少する疾患で、一般的な臨床的特徴は、皮膚斑状出血、粘膜出血、頭蓋内出血であり、重症の場合、命を脅かすこともある。血小板直接計数法により血小板濃度が100×10^9/L未満の場合、血小板減少症と考えられる(Kuter 2009)。血小板濃度が50×10^9/L未満の場合、自発性出血が頻繁に現れ、皮下紫斑として表現される。血小板濃度が20×10^9/L未満の場合、患者の命を脅かす可能性があり、特に外傷又は突然の頭蓋内出血、消化器出血などは患者の命を深刻に脅かすことがある。

【０００４】

血小板減少症は発症機序により、骨髄産生における血小板減少、末梢血血小板破壊増加及び脾臓の捕捉による血小板減少（splenic sequestration）の三種類に分けられる(Seo et al. 2017)。血小板産生減少の要因には先天性（遺伝性）と後天性血小板減少症がある。現在の研究により、少なくともMPL、GP1BA、GP1BB、GP9、MYH9、FLI1、NBEAL2、WAS、GATA1、PRKACG、GFI1b、STIM1、FYB、SLFN14、ETV6、DIAPH1及びSRCなど遺伝子の突然変異は遺伝性血小板減少につながる。後天性要因による血小板減少症は再生不良性貧血（aplastic anemia）、骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndromes）、白血病、薬物、感染、腫瘍疾患、放射線治療、骨髄移植、慢性肝疾患などによる血小板減少、免疫性血小板減少症（immune thrombocytopenia, ITP）を含む。過剰な血小板破壊の原因は血栓性血小板減少、ヘパリン起因性血小板減少、薬剤性血小板減少、ITP及び血栓性血小板減少性紫斑病（thrombotic thrombocytopenia purpur, TPP）などである(Hassan and Waller 2015)。脾臓肥大による血小板の捕捉、及び血小板含有量の少ない保存血液の輸血なども血小板減少症を引き起こすことがある。

【０００５】

トロンボポエチン（Thrombopoietin, THPO）は、巨核球増殖分化因子（megakaryocyte growth and development factor, MGDF）又はC-MPLリガンドとも言われ、人体内でTHPO遺伝子によってコードされるホルモンの一種であり、その化学的性質は糖タンパク質であり、主に肝臓と腎臓によって産生及び分泌される(de Sauvage et al. 1994)。人体内のTHPO遺伝子は第3番染色体の長腕にあり（3q26.3-3q27.2）、353個のアミノ酸分子量36 kDaを含む前駆体蛋白をコードする。21個のアミノ酸を含むシグナルペプチドを除去した後、残りの332個のアミノ酸がグリコシル化され、95 kDaの糖タンパク質を形成し、それから生体の循環に放出され、巨核球と血小板上のC-MPL受容体に結合して、巨核球の形成と分化を刺激し、さらに血小板の生成を促進する(Bartley et al. 1994)。マウスThpo遺伝子（Ml、Tpo、Mgdf、Mpllgとも言われる）はヒトTHPOの相同遺伝子であり、マウスのトロンボポエチンをコードする。C-MPLは、最初、骨髄増殖性白血病ウイルス（MPLV）に感染したマウスで発見され、それからヒトC-MPL遺伝子もクローン化された(Mignotte et al. 1994)。

【０００６】

血小板減少症の臨床治療の第一治療法は、主に糖質コルチコイド（大量のデキサメタゾン又はプレドニゾン）とガンマグロブリン（IVIg）の静脈内注射によるものである。第一治療法が失敗又は維持できない場合は、投薬や脾臓摘出術などの第二治療法を選択する。しかし、脾臓摘出術は感染されやすく、長期再発、長期入院、死亡リスクが高いため(Provan et al. 2010)、現在、薬物治療が一般的な治療法である。

【０００７】

現在、血小板減少症を治療する薬物は、主にTHPOの機能を補完又はシミュレートすることにより、巨核球の成長、成熟、血小板産生を刺激するトロンボポエチン薬であり、組換

えヒトトロンボポエチン（rhTHPO）とC-MPL受容体作動薬（C-MPL-RA）の2種類がある。初期に内因性THPOと相同性のペプチド（第一世代のトロンボポエチン剤）は初期臨床試験で血小板減少症患者に対して良好な効果が見られるが、後期の臨床試験で生体は内因性THPOと交差反応する中和抗体を産生し、持続性血小板減少に至ることがわかった(Basser 2002; Solberg 2005)。また、invitroで組換えのTHPOは完全にグリコシル化できないため、血小板産生を促進する機能は制限されている。第2世代のトロンボポエチン剤は主にC-MMPL-RAであり、2008年にITPの治療薬としてFDAに承認されたエルトロンボパグ（Eltrombopag）とロミプロスティム（Romiplostim）及び、2018年にITPの治療薬としてFDAに承認されたアバトロンボパグ（Avatrombopag）を含める。C-MPL作動薬類の薬物には一定の効果があるが、さまざまな合併症や薬物離脱反応がある。

【０００８】

THPOの補充、又はその機能をシミュレートすることにより血小板の産生を促進する上記の薬物は、臨床治療に一定の効果が見られるが、これらの薬物には欠陥があり、治療薬としていずれも第二の選択肢であり、また主としてITPの治療に使用される。さまざまな原因による血小板減少症を効果的に治療するために、新たなメカニズムに基づく治療法の開発も必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

本発明の1つの目的は、THPO遺伝子転写を活性化/アップレギュレーションして、THPOタンパク質の発現量を増加することで血小板の産生を促進し、又はTHPOたんぱく質欠乏又は不足に関連する疾患又は障害、若しくは薬剤性血小板減少症や免疫性血小板減少症などさまざまな原因による血小板減少症を治療する、RNA活性化メカニズムに基づく小分子活性化核酸分子を提供することである。

【００１０】

本発明のもう一つの目的は、小分子活性化核酸分子を含む組成物又は製剤を提供することである。

【００１１】

本発明のもう一つの目的は、小分子活性化核酸分子又はそれを含む組成物又は製剤の、THPO遺伝子の細胞での発現を活性化/アップレギュレーションする薬物の調製における応用を提供することである。

【００１２】

本発明のもう一つの目的は、Thpo/THPO遺伝子の細胞での発現の活性化/アップレギュレーションの方法を提供することである。

【００１３】

本発明のもう一つの目的は、小分子活性化核酸分子又はそれを含む組成物又は製剤の、血小板減少症及び／又はTHPOたんぱく質欠乏又は不足に関連する疾患又は障害の治療用の薬物の調製における応用、又は血小板減少症及び／又はTHPOたんぱく質欠乏又は不足に関連する疾患又は障害の治療方法を提供することである。

【００１４】

本発明のもう一つの目的は、SEQ ID NO：2～SEQ ID NO：4とSEQ ID NO：601～SEQ ID NO：605のいずれか1つの配列上の任意の連続した16～35個ヌクレオチドの配列、又は上記任意の連続した16～35個ヌクレオチドから形成される配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%又は100%の相同性を有する配列を含むか、これらから選ばれる、分離したThpo/THPO遺伝子小分子活性化核酸分子の標的部位を提供する。

技術案

【００１５】

本発明の一態様では、マウス細胞中のThpo遺伝子の発現を活性化又はアップレギュレー

ションする小分子活性化核酸分子例えば小分子活性化RNA（small activating RNA, saRNA）を提供し、前記小分子活性化核酸分子の1本の鎖はマウスThpo遺伝子プロモーター領域のいずれかの長さ16～35個ヌクレオチドの核酸配列とは少なくとも75%の相同性又は相補性を有し、前記遺伝子発現の活性化又はアップレギュレーションを実現する。プロモーター領域とは、転写開始部位の上流を含む500個のヌクレオチドである。具体的には、小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、Thpo遺伝子プロモーターのうち転写開始部位の上流から-493～-356領域（ホットスポット1、SEQ ID NO：2）、-273～-183（ホットスポット2, SEQ ID NO：3）又は-164～-80領域（ホットスポット3, SEQ ID NO：4）における連続した16～35個のヌクレオチドとは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%又は100%の相同性又は相補性を有する核酸配列を含むか、これらから選ばれる。より具体的には、本発明の小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、SEQ ID NO：200～SEQ ID NO：296 から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する。特定の一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、SEQ ID NO：200～SEQ ID NO：296から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する核酸配列を含む。別の一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、SEQ ID NO：200 ～SEQ ID NO：296から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する核酸配列からなる。さらに一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、SEQ ID NO：200～SEQ ID NO：296から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する核酸配列である。

【００１６】

本発明の小分子活性化核酸分子は、マウスThpo遺伝子プロモーター領域に標的化する二本鎖小分子活性化核酸分子例えば小分子活性化RNA（saRNA）分子を含み、第1核酸鎖と第2核酸鎖を含む。第1核酸鎖はThpo遺伝子プロモーターのうち転写開始部位から-493～-356領域（ホットスポット1, SEQ ID NO：2）、-273～-183（ホットスポット2, SEQ ID NO：3）又は-164～-80領域（ホットスポット3, SEQ ID NO：4）のうちのいずれかの連続した16～35個のヌクレオチドとは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する。第1核酸鎖と第2核酸鎖は相補して二本鎖核酸構造を形成し、二本鎖核酸構造はThpo遺伝子の細胞での発現を活性化させる。

【００１７】

本発明の別の一態様では、ヒト細胞中のTHPO遺伝子の発現を活性化又はアップレギュレーションする小分子活性化核酸分子例えば小分子活性化RNA（small activating RNA, saRNA）を提供し、前記小分子活性化核酸分子の1本の鎖はヒトTHPO遺伝子プロモーター領域のいずれかの長さ16～35個ヌクレオチドの核酸配列とは少なくとも75%の相同性又は相補性を有し、前記遺伝子発現の活性化又はアップレギュレーションを実現する。プロモーター領域とは、転写開始部位の上流を含む500個のヌクレオチドである。具体的には、小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、THPO遺伝子プロモーターのうち転写開始部位の上流から-1339～-1044領域（ホットスポット, SEQ ID NO：601）、-1027～-903領域（ホットスポット2, SEQ ID NO：602）、-861～-754（ホットスポット3, SEQ ID NO：603）、-728～-611（ホットスポット4, SEQ ID NO：604）又は-593～-1領域（ホットスポット5, SEQ ID NO：605）における連続した16～35個のヌクレオチドとは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%又は100%の相同性又は相補性を有する核酸配列を含むか、これらから選ばれる。より具体的には、本発明の小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、SEQ ID NO：

606～SEQ ID NO：1047から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する。特定の一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、SEQ ID NO：606～SEQ ID NO：1047から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する核酸配列を含む。別の一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、SEQ ID NO：606～SEQ ID NO：1047から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する核酸配列からなる。さらに一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の1本の鎖は、SEQ ID NO：606 ～SEQ ID NO：1047から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する核酸配列である。

【００１８】

本発明の小分子活性化核酸分子は、ヒトTHPO遺伝子プロモーター領域に標的化する二本鎖小分子活性化核酸分子例えば小分子活性化RNA（saRNA）分子を含み、第1核酸鎖と第2核酸鎖を含む。第1核酸鎖はTHPO遺伝子プロモーターのうち転写開始部位から-1339～-1044領域（H1，SEQ ID NO：601）、-1027～-903領域（H2，SEQ ID NO：602）、-861～-754領域（H3，SEQ ID NO：603）、-728～-611領域（H4，SEQ ID NO：604）又は-593～-1領域（H5，SEQ ID NO：605）のうちのいずれかの連続した16～35個のヌクレオチドとは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の相同性又は相補性を有する。第1核酸鎖と第2核酸鎖は相補して二本鎖核酸構造を形成し、二本鎖核酸構造はヒトTHPO遺伝子の細胞での発現を活性化させる。

【００１９】

本発明の小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖と第2核酸鎖は2本の異なる核酸鎖上に存在してもよく、同一の核酸鎖上に存在してもよい。第1核酸鎖と第2核酸鎖がそれぞれ2本鎖上にある場合、小分子活性化核酸分子の少なくとも1本鎖は、5’末端及び/又は3’末端に突出又はオーバーハングを有することができ、例えば3’末端に0～6ヌクレオチドの突出、0、1、2、3、4、5又は6ヌクレオチドの突出を有する。好ましくは、本発明の小分子活性化核酸分子の2本の鎖は全て突出を有し、より好ましくは、小分子活性化核酸分子の2本の鎖の3’末端のいずれにも0～6ヌクレオチドの突出を有し、例えば、0、1、2、3、4、5又は6ヌクレオチドの突出、最も好ましくは、2又は3ヌクレオチドの突出を有する。好ましくは、突出端のヌクレオチドはdTであってもよい。

【００２０】

本発明の小分子活性化核酸分子は、二本鎖領域ヘアピン構造を形成可能な小分子活性化核酸分子、例えば一本鎖小分子活性化RNA分子を含むことがある。一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子は、THPO遺伝子プロモーター領域に標的化する一本鎖小分子活性化RNA分子を含み、前記一本鎖小分子活性化核酸分子は二本鎖領域ヘアピン構造を形成することができる。第1核酸鎖と第2核酸鎖が同一の核酸鎖上に存在する場合、好ましくは、本発明の小分子活性化核酸分子はヘアピン型一本鎖核酸分子であってもよく、第1核酸鎖と第2核酸鎖は、二本鎖核酸構造を形成可能な相補領域を有し、前記二本鎖核酸構造は例えばRNA活性化メカニズムを通じてTHPO遺伝子の細胞での発現を促進することができる。

【００２１】

上記小分子活性化核酸分子では、第1核酸鎖と第2核酸鎖の長さは、それぞれ16～35個ヌクレオチド、例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34又は35個ヌクレオチドであってもよい。

【００２２】

一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖は、SEQ ID NO：6～102から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有し、且つ小分子活性化核酸分子の第2核酸鎖は、SEQ ID NO：103～199から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する。一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖は、SEQ ID NO：6～102から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する核酸配列を含むか、又はSEQ ID NO：6～142から選ばれるいずれかのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する核酸配列からなり、且つ本発明の小分子活性化核酸分子の第2核酸鎖は、SEQ ID NO：103～199から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する核酸配列を含むか、又はSEQ ID NO：103～199から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する核酸配列からなる。特定の実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖は、SEQ ID NO：6～102のヌクレオチド配列を含むか、これらから選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列であり、且つ第2鎖は、SEQ ID NO：103～199のヌクレオチド配列を含むか、これらから選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列である。一実施形態では、本明細書に記載の小分子活性化核酸分子は、合成するもの、インビトロで転写したもの又はベクターで発現させたものであってもよい。

【００２３】

一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖は、SEQ ID NO：1048～SEQ ID NO：1489ら選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有し、且つ小分子活性化核酸分子の第2核酸鎖は、SEQ ID NO：1490～SEQ ID NO：1931から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する。一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖は、SEQ ID NO：1048～SEQ ID NO：1489から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する核酸配列を含むか、又はSEQ ID NO：1048～SEQ ID NO：1489から選ばれるいずれかのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する核酸配列からなり、且つ本発明の小分子活性化核酸分子の第2核酸鎖は、SEQ ID NO：1490～SEQ ID NO：1931から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する核酸配列を含むか、又はSEQ ID NO：1490～SEQ ID NO：1931から選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列とは少なくとも75%、例えば少なくとも約79%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、又は約100%の同一性又は相同性を有する核酸配列からなる。特定の実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖は、SEQ ID NO：1048～SEQ ID NO：1489のヌクレオチド配列を含むか、これらから選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列であり、且つ第2鎖は、SEQ ID NO：1490～SEQ ID NO：1931のヌクレオチド配列を含むか、これらから選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列である。一実施形態では、本明細書に記載の小分子活性化核酸分子は、合成するもの、インビトロで転写したもの又はベクターで発現させたものであってもよい。

【００２４】
本明細書に記載の小分子活性化核酸分子における全てのヌクレオチドは、化学修飾を行われていない天然のヌクレオチドであってもよく、少なくとも1種の修飾を含んでもよい。一実施形態では、本明細書に記載の小分子活性化核酸分子における修飾は、化学修飾を含むことができ、たとえば、少なくとも1つのヌクレオチドに化学修飾を有することができ、本発明で使用される化学修飾は、下記修飾を含むか、これらから選ばれる1種又は複数種、又はこれらの任意の組み合わせであってもよい。
（1）前記小分子活性化核酸分子のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドのホスホジエステル結合に対する修飾、
（2）前記小分子活性化核酸分子のヌクレオチド配列におけるリボースの2’-OHに対する修飾、
（3）前記小分子活性化核酸分子のヌクレオチド配列における塩基に対する修飾、
（4）前記小分子活性化核酸分子のヌクレオチド配列における少なくとも1個のヌクレオチドは鎖核酸である。
【００２５】
前記化学修飾は、当業者に公知されるものであり。前記ホスホジエステル結合修飾とは、ホスホジエステル結合における酸素に対する修飾であり、ホスホロチオエート修飾及びボラノホスフェート修飾を含むが、これだけではないというものである。これらの2種類の修飾はいずれもsaRNA構造を安定させ、塩基対の高い特異性及び高い親和性を保持することができる。
【００２６】
リボース修飾とは、ヌクレオチドペントースにおける2’-OHに対する修飾であり、即ち、リボースのヒドロキシ位置にいくつかの置換基が導入され、例えば、2’-フルオロ修飾、2’-オキシメチル修飾、2’-オキシエチレンメトキシ修飾、2,4’-ジニトロフェノール修飾、ロック核酸（LNA）、2’-アミノ修飾、2’-デオキシ修飾などを含むが、これだけではないというものである。
【００２７】
塩基修飾とは、ヌクレオチドの塩基に対する修飾であり、例えば、5’-ブロモウラシル修飾、5’-ヨードウラシル修飾、N-メチルウラシル修飾、2,6-ジアミノプリン修飾などを含むが、これだけではないというものである。
【００２８】
これらの修飾は、小分子活性化核酸分子のバイオアベイラビリティを向上し、標的配列との親和性を高め、細胞内のヌクレアーゼ加水分解に対する耐性を向上させる。
【００２９】
さらに、小分子活性化核酸分子の細胞への取り込みを促進するために、以上の修飾に加えて、小分子活性化核酸分子の第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖の末端に例えばコレステロールなどの親油性基を引入することにより、脂質二重層からなる細胞膜及び核膜が細胞核内の遺伝子プロモーター領域と作用することに寄与する。
【００３０】
本発明に係る小分子活性化核酸分子は、細胞と接触する又は細胞に取り込まれると、細胞中のThpo/THPO遺伝子の発現を効果的に活性化又はアップレギュレーションでき、好ましくは、少なくとも発現を10％アップレギュレーションことができる。
【００３１】
本発明の別の態様は、本明細書に記載の小分子活性化核酸分子をコードする核酸に関する。一実施形態では、前記核酸はDNA分子であってもよい。
【００３２】
本発明の別の態様では、以上に記載の小分子活性化核酸分子又は本明細書に記載の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞を提供する。一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子は、Thpo/THPO遺伝子プロモーター領域に標的化する二本鎖小分子活性化核酸分子、例えば二本鎖小分子活性化RNA（saRNA）分子であってもよく、第1

核酸鎖と第2核酸鎖を含む。別の実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子は、Thpo/THPO遺伝子プロモーター領域に標的化する一本鎖小分子活性化核酸分子、例えばヘアピン型一本鎖核酸分子であってもよく、当該ヘアピン型一本鎖核酸が細胞に取り込まれると細胞内に二本鎖小分子活性化RNA（saRNA）分子を生成できる。

【００３３】

本発明の別の態様は、本発明の前記小分子活性化核酸分子又は本明細書に記載の小分子活性化核酸分子をコードする核酸と、必要に応じて薬学的に許容可能なベクターと、を含む組成物（例えば薬物組成物）を提供する。一実施形態では、前記薬学的に許容可能なベクターは、リポソーム、高分子ポリマー又はポリペプチドを含むか、これらから選ばれる。

【００３４】

本発明の別の態様は、本発明に記載の小分子活性化核酸分子、本発明に記載の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物を含む製剤を提供する。

【００３５】

本発明の別の態様は、本発明に係る小分子活性化核酸分子、本文に記載の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物を含むキットを提供する。

【００３６】

本発明の別の態様は、本発明に係る小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物の、Thpo/THPO遺伝子の細胞での発現を活性化/アップレギュレーションする薬物又は製剤の調製における応用に関する。

【００３７】

本発明の別の態様は、さらに、本発明の前記小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物又は製剤を細胞に投与することを含む、Thpo/THPO遺伝子の細胞での発現の活性化/アップレギュレーション方法に関する。一実施形態では、Thpo/THPO遺伝子の細胞での発現の活性化/アップレギュレーション方法は本発明の前記小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物を前記細胞に投与することを含む。上記細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒト又はマウス由来の細胞を含み、例えばヒト胚性肝細胞、HepG2細胞などのヒト肝癌細胞、ヒト肝細胞、胚性肝細胞系BNL.CL2などのマウス胚性肝細胞、肝癌細胞系LPC-H12-とマウス初代肝細胞などのマウス肝癌細胞などがあり、上記の細胞は、単離体であってもよく、又はマウスもしくはヒトなどの哺乳動物に存在することができる。

【００３８】

本発明の小分子活性化核酸分子は細胞に直接導入してもよく、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸配列を細胞に導入することで細胞内で産生するものであってもよく、前記細胞は、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはマウス又はヒト細胞である。上記細胞は、例えば細胞系や細胞株などのような単離体であってもよく、例えばマウスや人体などの哺乳動物体に存在していてもよい。更に具体的には、例えばマウスや人体の肝細胞に存在する。人体は、THPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は障害に罹患している患者であり、又は様々な原因で血小板減少症に罹患している患者であってもよい。本発明の前記小分子活性化核酸分子は、THPOタンパク質量の欠乏又はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は障害を治療するために十分な量で投与されることができる。具体的には、前記THPOタンパク質量の欠乏又はTHPO発現不足又は減少に関連する前記疾患又は障害は血小板減少症などを含むことができる。

【００３９】

本発明の別の態様は、分離したThpo/THPO遺伝子小分子活性化核酸分子の作用部位を提供する。該部位は、Thpo/THPO遺伝子のプロモーター領域上の任意の連続した16～35個ヌクレオチドの配列を含み、好ましくは、前記作用部位は、SEQ ID NO：2～4とSEQ ID NO：601～605のいずれか1つの配列上の任意の連続した16～35個ヌクレオチドの配列を含むか、これらから選ばれる。具体的には、前記作用部位は、SEQ ID NO：200～296とSEQ ID NO：606～1047ヌクレオチド配列を含むか、これらから選ばれるいずれか一つのヌクレオチド配列である。

【００４０】

本発明の別の態様は、本発明の小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物を治療有効量で例えばヒトやマウスなどの個体に投与することを含む、個体のTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は障害又は血小板減少症の治療方法に関する。一実施形態では、本発明の個体の血小板減少症及び／又はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は障害の治療方法は、本発明の前記小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物、及び例えば小分子化合物、抗体、ポリペプチド、タンパク質などを含む治療有効量のほかの薬剤を治療有効量で個体に投与することを含むことができる。前記個体は、例えばマウス又はヒトなどの哺乳動物であってもよい。本発明において、血小板減少症は様々な原因による血小板減少症を含み、骨髄産生における血小板減少、末梢血血小板破壊増加及び脾臓の捕捉による血小板減少（splenic sequestration）を含むが、これらに限定されるものではない。血小板産生減少の要因には先天性（遺伝性）と後天性血小板減少症がある。一実施形態では、後天性血小板減少症の原因は再生不良性貧血（aplastic anemia）、骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndromes）、白血病、薬物、感染、腫瘍疾患、放射線治療、骨髄移植、慢性肝疾患などによる血小板減少、免疫性血小板減少症（immune thrombocytopenia, ITP）を含むが、これらに限定されるものではない。過剰な血小板破壊の原因は血栓性血小板減少、ヘパリン起因性血小板減少、薬剤性血小板減少、ITP及び血栓性血小板減少性紫斑病などを含むが、これらに限定されるものではない。一の態様において、血小板減少症はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は障害と相関がある。別の態様において、血小板減少症はTHPOタンパク質の発現不足又は減少と相関はない。血小板減少症は薬剤性血小板減少症、免疫性血小板減少症及び血栓性血小板減少性紫斑などを含む本明細書に記載の血小板減少症は、例えば骨髄における血小板生成の減少、末梢血の過剰な破壊、又は脾臓肥大による血小板の捕捉、例えば腫瘍放射線治療、腫瘍化学治療、骨髄移植、慢性肝疾患、薬剤性血小板減少症、免疫性血小板減少症、血栓性血小板減少性紫斑、及び遺伝性血小板減少症など様々な原因で引きおこることができる。血小板減少症の一般的な臨床的特徴は、皮膚斑状出血、骨髄の巨核球の変化、粘膜出血又は頭蓋内出血であり、重症の場合、命を脅かすこともある。血小板直接計数法により血小板濃度が100×10^9/L未満の場合、血小板減少症と考えられる(Kuter 2009)。血小板濃度が50×10^9/L未満の場合、自発性出血が頻繁に現れ、一番よくみられるのは皮下紫斑である。血小板濃度が20×10^9/L未満の場合、患者は極めて危険な状況に陥り、特に外傷又は突然の頭蓋内出血、胃腸出血などは患者の命を深刻に脅かすことがある。本発明の方法において、前記個体の血小板減少症の特徴は、血小板直接計数法により表示するとき、血小板濃度が100×10^9/L未満、又は50×10^9/L未満、又は20×10^9/L未満である。一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物を治療有効量で個体に投与することで、個体のTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は障害は緩和、軽減又は完治される。

【００４１】

本発明の別の態様は、本発明の小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物を治療有効量で個体に投与することを含む、個体の血小板減少症の治療方法に関する。本発明の方法において、前記個体の血小板減少症の特徴は、血小板直接計数法により表示するとき、血小板濃度が100×10^9/L未満、又は50×10^9/L未満、又は20×10^9/L未満である。本発明の方法において、血小板減少症はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する血小板減少症、薬剤性血小板減少症、免疫性血小板減少症及び血栓性血小板減少性紫斑などを含むことができる。本明細書に記載の血小板減少症は、様々な原因で引き起こる骨髄における血小板生成の減少、末梢血の過剰な破壊、又は脾臓肥大による血小板の捕捉、例えば腫瘍放射線治療、腫瘍化学治療、骨髄移植、慢性肝疾患、薬剤性血小板減少症、免疫性血小板減少症、血栓性血小板減少性紫斑、及び遺伝性血小板減少症などであり得る。一実施形態では、本発明の血小板減少症の治療方法は、本発明の前記小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物及び／又は前記小分子活性化核酸分子、前記小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物と例えば小分子化合物、抗体、ポリペプチド、タンパク質などを含む治療有効量のほかの薬剤からなる組成物を治療有効量で個体に投与することを含む。前記個体は、例えばマウス又はヒトなどの哺乳動物であってもよい。上記方法において、血小板減少症は薬剤性血小板減少症、免疫性血小板減少症及び血栓性血小板減少性紫斑などを含むことができる。上記方法において、個体は、例えばマウスやヒトなどの哺乳動物を含む。一実施形態では、本発明の小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物を治療有効量で投与することで、個体の血小板減少症は緩和、軽減又は完治される。好ましくは、前記緩和、軽減又は完治は血小板直接計数法により表示するとき、血小板濃度が例えば100×10^9/L～300×10^9/Lの範囲内など、正常な生理水準に増加又は回復のことである。

【００４２】

本発明の別の態様は、本発明の前記小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物の、血小板減少症及び／又はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は障害治療用の薬物の調製における応用に関する。前記個体は、例えばヒトなどの哺乳動物であってもよい。本発明の応用において、血小板減少症は様々な原因による血小板減少症を含み、例えば骨髄産生における血小板減少、末梢血血小板破壊増加及び脾臓の捕捉による血小板減少（splenic sequestration）を含むが、これらに限定されるものではない。血小板産生減少の要因には先天性（遺伝性）と後天性血小板減少症がある。一実施形態では、後天性血小板減少症の原因は再生不良性貧血（aplastic anemia）、骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndromes）、白血病、薬物、感染、腫瘍疾患、放射線治療、骨髄移植、慢性肝疾患などによる血小板減少、免疫性血小板減少症（immune thrombocytopenia, ITP）を含むが、これらに限定されるものではない。過剰な血小板破壊の原因は血栓性血小板減少、ヘパリン起因性血小板減少、薬剤性血小板減少、ITP及び血栓性血小板減少性紫斑病などを含むが、これらに限定されるものではない。一実施形態では、血小板減少症は例えばTHPOタンパク質の発現不足又は減少と相関がある血小板減少症を含むことができる。好ましくは、血小板減少症はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する血小板減少症、薬剤性血小板減少症、免疫性血小板減少症及び血栓性血小板減少性紫斑などを含む、又はこれらから選ばれることができる。本明細書に記載の血小板減少症は例えば腫瘍放射線治療、腫瘍化学治療、骨髄移植、慢性肝疾患、脾臓肥大による血小板

の捕捉、血小板含有量の少ない保存血液の輸血、及び薬物による血小板消費の増加など様々な理由によって引き起こされるが可能である。一実施形態では、血小板減少症は、血小板直接計数法により表示するとき、血小板濃度が100×10^9/L未満、又は50×10^9/L未満、又は20×10^9/L未満であると表現できる。

【００４３】

一実施形態では、本発明の前記小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物の、血小板減少症及び／又はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患を治療できる薬物を提供する。一態様において、血小板減少症はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する血小板減少症を含むことができ、好ましくは血小板減少症は薬剤性血小板減少症、免疫性血小板減少症及び血栓性血小板減少性紫斑などを含むことができる。一実施形態では、血小板減少症は、血小板直接計数法により表示するとき、血小板濃度が100×10^9/L未満、又は50×10^9/L未満、又は20×10^9/L未満であると表現できる。

【００４４】

本発明の別の態様は、本発明の前記小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物又は製剤の、血小板減少症治療用の薬物又は薬物組成物の調製における応用に関する。好ましくは、血小板減少症はTHPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する血小板減少症又はほかのさまざまな原因による血小板減少症、例えば薬剤性血小板減少症、免疫性血小板減少症及び血栓性血小板減少性紫斑などを含む、又はこれらから選ばれることができる。本明細書に記載の血小板減少症は例えば腫瘍放射線治療、腫瘍化学治療、骨髄移植、慢性肝疾患、脾臓肥大による血小板の捕捉、血小板含有量の少ない保存血液の輸血、及び薬物による血小板消費の増加など様々な理由によって引き起こされるが可能である。一実施形態では、血小板減少症は、血小板直接計数法により表示するとき、血小板濃度が100×10^9/L未満、又は50×10^9/L未満、又は20×10^9/L未満であると表現できる。

【００４５】

一実施形態では、本発明の前記小分子活性化核酸分子、本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸、本発明の小分子活性化核酸分子又は本発明の小分子活性化核酸分子をコードする核酸を含む細胞、又は本発明の小分子活性化核酸分子を含む組成物又は製剤の、THPOタンパク質の発現不足又は減少に関連する疾患又は血小板減少症治療用の薬物または薬物組成物の調製における応用を提供する。

【発明の効果】

【００４６】

本発明により提供される内因性Thpo/THPO遺伝子の発現を活性化／アップレギュレーションできる例えば小分子活性化RNA（saRNA）分子の小分子活性化核酸分子は、Thpo/THPO遺伝子を特異的に活性化し、Thpo/THPO遺伝子とたんぱく質の発現をアップレギュレーション又は回復できる一方、毒性や副作用が低く、Thpo/THPOたんぱく質の発現不足及び様々な原因による血小板生成不足又は過剰な破壊による血小板減少症の治療に用いられ、又は血小板減少症を治療する薬物や製剤の調製に用いられる。

【図面の簡単な説明】

【００４７】

【図１】図1はマウスThpo saRNAを介するマウスThpo mRNA発現の変化を示す図である。マウスThpoプロモーターに標的化する322のsaRNAは10 nMの最終濃度でBNL.CL2細胞をトランスフェクションし、72時間後にワンステップ法RT-qPCRを利用し、Thpo mRNAの発現を分析した。図には、対照処理（Mock）に対するThpoのmRNA発現変化（$\log_2$）が降順で示されている。縦座標値は2つの重複処理の平均値±SDを表す。

【００４８】

【図２】図2はマウスThpo saRNAのマウスThpoプロモーターでのホットスポット領域

である。マウスThpoプロモーターに標的化する322のsaRNAは10 nMの最終濃度でBNL.CL2細胞を72時間トランスフェクションし、完成してからワンステップ法RT-qPCRを利用し、Thpo mRNAの発現を分析した。図には、対照処理（Mock）に対するThpo発現変化が示され、saRNAのThpoプロモーターでの標的位置で-500から-0まで並べられている。黒丸は機能性saRNAを表し、白丸は非機能性saRNAを表し、点線バーは3つの機能性saRNAが集まるホットスポット領域（H1～H3）を囲み示している。縦座標値は2つの重複処理の平均値を表す。

【００４９】

【図３】図3はツーステップ法RT-qPCRによりマウスThpo saRNA HTSスクリーニング結果を検証する図である。図3に示されるsaRNAを用いて10 nMの最終濃度でBNL.CL2を72時間トランスフェクションし、完成してからQiagen RNeasyキットを用いてRNAを抽出し、逆転写後、ABI 7500 FastリアルタイムPCRシステムを用いてqPCR増幅を行い、同時に、Tbp遺伝子を増幅して内部参照とした。図には、1つのsaRNA処理の後Thpo mRNAの相対発現値が示される。Mock、dsCon2及びDS03-432iはそれぞれブランクトランスフェクション、無関係な配列の二本鎖RNAトランスフェクション及び低分子干渉RNA対照トランスフェクションである。縦座標値は2つの重複処理の平均値±SDを表す。

【００５０】

【図４】図4はツーステップ法RT-qPCRによりマウスThpo saRNA HTSスクリーニング結果を検証する図である。図4に示されるsaRNAを用いて10 nMの最終濃度でLPC-H12を72時間トランスフェクションし、完成してからQiagen RNeasyキットを用いてRNAを抽出し、逆転写後、ABI 7500 FastリアルタイムPCRシステムを用いてqPCR増幅を行い、同時に、Tbp遺伝子を増幅して内部参照とした。図には、1つのsaRNA処理の後Thpo mRNAの相対発現値が示される。Mock、dsCon2及びDS03-432iはそれぞれブランクトランスフェクション、無関係な配列の二本鎖RNAトランスフェクション及び低分子干渉RNA対照トランスフェクションである。縦座標値は2つの重複処理の平均値±SDを表す。

【００５１】

【図５】図5はツーステップ法RT-qPCRにより初代マウス肝細胞においてマウスThpo saRNA HTSスクリーニング結果を検証する図である。図5に示されるsaRNAを用いて10 nMの最終濃度で初代マウス肝細胞を72時間トランスフェクションし、完成してからQiagen RNeasyキットを用いてRNAを抽出し、逆転写後、ABI 7500 FastリアルタイムPCRシステムを用いてqPCR増幅を行い、同時に、Tbp遺伝子を増幅して内部参照とした。図には、1つのsaRNA処理の後Thpo mRNAの相対発現値が示される。Mock、dsCon2及びDS03-432iはそれぞれブランクトランスフェクション、無関係な配列の二本鎖RNAトランスフェクション及び低分子干渉RNA対照トランスフェクションである。縦座標値は2つの重複処理の平均値±SDを表す。

【００５２】

【図６】図6は、マウスThpo saRNAがマウス血清Thpoの濃度を増加させることを示す図である。15匹のオスのBalb/cマウスをランダムに3つの群に分け、各群に5匹ずつがおり、PBS、LNP封入のThpo-siRNA（DS03-432i, 5 mg/kg）及びLNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024, 5 mg/kg）の尾静脈注射を実施し、72時間後、血液サンプルを収集し、血清を分離し、マウス血清中のThpoタンパク質含有量をマウスThpo ELISAキットで検出した。PBSとDS03-432iはそれぞれブランク対照と低分子干渉RNA対照である。***P ＜ 0.001。

【００５３】

【図７】図7は、マウスThpo saRNAがマウス血清Thpoの濃度を増加させることを示す図である。32匹のオスのBalb/cマウスをランダムに4つの群に分け、各群に8匹ずつがおり、PBSとLNP封入のDS03-0024（1 mg/kg, 3 mg/kg及び6 mg/kg）の尾静脈注射を実施し、投与の前日及び投与してからの2日間はそれぞれ血液サンプルを収集し、

血清を分離し、マウス血清中のThpoタンパク質含有量をマウスThpo ELISAキットで検出した。****P ＜ 0.0001。

【００５４】

【図８】図8は、マウスThpo saRNAがマウスの血小板数を増加させることを示す図である。32匹のオスのBalb/cマウスをランダムに4つの群に分け、各群に8匹ずつがおり、PBSとLNP封入のDS03-0024（1 mg/kg, 3 mg/kg及び6 mg/kg）の尾静脈注射を実施し、投与の6日間後に血液サンプルを収集し、マウスの末梢血血小板分離キットで血小板を収集し、CD41a-FITC抗体特異性により血小板を表記し、フローサイトメーターでカウントした。*P ＜ 0.05。

【００５５】

【図９】図9は、マウスThpo saRNAを九日間投与してからのマウスの血小板変化を示す図である。32匹のオスのBalb/cマウスをランダムに4つの群に分け、各群に8匹ずつがおり、PBSとLNP封入のDS03-0024（1 mg/kg, 3 mg/kg及び6 mg/kg）の尾静脈注射を実施し、投与の17日間後に血液サンプルを収集し、マウスの末梢血血小板分離キットで血小板を収集し、CD41a-FITC抗体特異性により血小板を表記し、フローサイトメーターでカウントした。*P ＜ 0.05。

【００５６】

【図１０】図10はヒトTHPO saRNAを介するヒトTHPO mRNA発現の変化を示す図である。ヒトTHPOプロモーターに標的化する候補のsaRNAは25 nMの最終濃度でHepG2細胞をトランスフェクションし、72時間後にワンステップ法RT-qPCRを利用し、ヒトTHPO mRNAの発現を分析した。図には、対照処理（Mock）に対するTHPOのmRNA発現変化（$\log_2$）が降順で示されている。縦座標値は2つの重複処理の平均値±SDを表す。

【００５７】

【図１１】図11はヒトTHPOsaRNAのヒトTHPOプロモーターでのホットスポット領域である。ヒトTHPOプロモーターに標的化する候補のsaRNAは25 nMの最終濃度でHepG2細胞を72時間トランスフェクションし、完成してからワンステップ法RT-qPCRを利用し、ヒトTHPO mRNAの発現を分析した。図には、対照処理（Mock）に対するTHPO発現変化が示され、saRNAのTHPOプロモーターでの標的位置により並べられている。黒丸は機能性saRNAを表し、白丸は非機能性saRNAを表し、点線バーは機能性saRNAが集まるホットスポット領域を囲み示している。縦座標値は2つの重複処理の平均値±SDを表す。

【００５８】

【図１２】図12はツーステップ法RT-qPCRによりヒトTHPO saRNA HTSスクリーニング結果を検証する図である。図12に示されるsaRNAを用いて25 nMの最終濃度でHepG2細胞を72時間トランスフェクションし、完成してからQiagen RNeasyキットを用いてRNAを抽出し、逆転写後、ABI 7500 FastリアルタイムPCRシステムを用いてqPCR増幅を行い、同時に、TBPとHPRT1遺伝子を増幅して内部参照とした。図には、1つのsaRNA処理の後mRNAに対するTHPOの発現値が示される。Mock、dsCon2及びsiTHPO（DS3A-365i）はそれぞれブランクトランスフェクション、無関係な配列の二本鎖RNAトランスフェクション及び低分子干渉RNA対照トランスフェクションである。縦座標値は2つの重複処理の平均値±SDを表す。

【００５９】

【図１３】図13はELISA法によりヒトTHPO saRNAがヒトTHPOたんぱく質発現に対する作用を示す図である。図13に示されるsaRNAを用いて25 nMの最終濃度でHepG2細胞を72時間トランスフェクションし、完成してから培養液を取り、遠心分離して死んだ細胞の破片を取り除き、上澄液を取りELISAキット（R&D Systems, DTP00B）により、厳密に説明書に従い操作し、培養液に分泌されたTHPOたんぱく質のレベルを検出した。図には、1つのsaRNA処理の後THPOの発現値が示される。Mock、dsCon2及びsiTHPO（DS3A-365i）はそれぞれブランクトランスフェクション、無関係な配列の二

本鎖RNAトランスフェクション及び低分子干渉RNA対照トランスフェクションである。縦座標値は2つの重複処理の平均値±SDを表す。

【発明を実施するための形態】

【００６０】

本発明では、関連用語は、以下のように定義される。

【００６１】

本明細書で使用される「相補」という用語は、2本のオリゴヌクレオチド鎖が互いに塩基対を形成する能力を意味する。塩基対は、通常、逆方向に平行となるオリゴヌクレオチド鎖におけるヌクレオチド同士が水素結合により形成されるものである。相補オリゴヌクレオチド鎖は、ワトソン・クリック（Watson-Crick）方式で塩基ペアリング（例えば、A-T、A-U、C-G）を行うか、又は二本鎖体を形成させ得る任意のほかの方式（例えばHoogsteen型又は逆Hoogsteen型塩基ペアリング）で塩基ペアリングを行うことができる。

【００６２】

相補は、完全相補及び不完全相補の2種類を含む。完全相補又は100％相補は、二本鎖オリゴヌクレオチド分子の二本鎖領域における第1オリゴヌクレオチド鎖からの各ヌクレオチドが第2オリゴヌクレオチド鎖の対応する位置のヌクレオチドと「ミスマッチ」無しに水素結合を形成できることを意味する。不完全相補とは、二本鎖のヌクレオチドユニットが全て水素結合で互いに接合することができないことを意味する。例えば、二本鎖領域の長さが20個ヌクレオチドである2本のオリゴヌクレオチド鎖に対しては、各鎖における2つの塩基対のみが互いに水素結合で接合することが可能であると、オリゴヌクレオチド鎖は10％の相補性を有する。同じ実施例では、各鎖における18個の塩基対が互いに水素結合で接合することが可能であると、オリゴヌクレオチド鎖は90％の相補性を有する。実質的な相補とは、少なくとも約75％、約79％、約80％、約85％、約90％、約95％、約99％、又は約100％相補することを意味する。

【００６３】

本明細書で使用される用語「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの重合体を意味し、DNA、RNA又はDNA/RNAハイブリッドの一本鎖又は二本鎖分子を含むが、これらに制限されず、規則的・非規則的に交互するデオキシリボシル部分とリボシル部分のオリゴヌクレオチド鎖、並びにこれらの種類のオリゴヌクレオチドの修飾、天然に存在する、又は天然に存在しない骨格を含む。本発明に記載の標的遺伝子転写を活性化させるためのオリゴヌクレオチドは、小分子活性化核酸分子である。

【００６４】

本明細書で使用される用語「オリゴヌクレオチド鎖」と「オリゴヌクレオチド配列」は交換可能に使用することができ、35個以下の塩基を有する短鎖ヌクレオチドの総称（デオキシリボ核酸DNA又はリボ核酸RNA内のヌクレオチドを含む）である。本発明では、オリゴヌクレオチド鎖の長さは、16～35個ヌクレオチドの任意の長さであってもよい。

【００６５】

本明細書で示される用語「第1核酸鎖」はセンス鎖であってもよいし、アンチセンス鎖であってもよい。小分子活性化RNAのセンス鎖とは、小分子活性化RNA二本鎖体に標的遺伝子のプロモーターDNA配列のコード鎖とは同一性を有する核酸鎖を含むことをいい、アンチセンス鎖とは、小分子活性化RNA二本鎖体においてセンス鎖と相補する核酸鎖をいう。

【００６６】

本明細書で示される用語「第2核酸鎖」はセンス鎖又はアンチセンス鎖であってもよい。第1オリゴヌクレオチド鎖がセンス鎖である場合、第2オリゴヌクレオチド鎖はアンチセンス鎖である。一方、第1オリゴヌクレオチド鎖がアンチセンス鎖である場合、第2オリゴヌクレオチド鎖はセンス鎖である。

【００６７】

本明細書で使用される「遺伝子」という用語は、1本のポリペプチド鎖のコード又は1本

の機能RNAの転写に必要な全てのヌクレオチド配列を意味する。「遺伝子」は、宿主細胞に対して内因性、あるいは完全又は部分的に組換えられた遺伝子であってもよい（例えば、コードプロモーターを導入した外因性オリゴヌクレオチド及びコード配列、又は内因性コード配列に隣接する異種プロモーターを宿主細胞に導入したもの）。例えば、「遺伝子」は、エクソン及びイントロンで構成される核酸配列を含む。タンパク質をコードする配列は、例えば、開始コドンと終止コドンとの間のオープンリーディングフレームにおけるエクソンに含まれる配列であり、本発明では、「遺伝子」は、他の遺伝子がコード配列又は非コード配列を含むか否かを問わず、例えばプロモーター、エンハンサーなどのような遺伝子制御配列及び本分野で知られている他の遺伝子の転写、発現又は活性を制御する他の全ての配列を含むことができる。1つの場合、例えば、「遺伝子」は、例えばプロモーターやエンハンサーなどの制御配列を含む機能性核酸の説明に用いることができる。組換え遺伝子の発現は、一種又は多種の異種制御配列により制御することができる。

【００６８】

本明細書で用いられる「標的遺伝子」は、生体内に天然に存在する核酸配列、組換え遺伝子、ウイルス又は細菌配列、染色体又は染色体外及び/又は細胞及び/又はその染色質に一時的又は安定的にトランスフェクション又は混入したものである。標的遺伝子は、タンパク質コード遺伝子であってもよいし、非タンパク質コード遺伝子であってもよい（例えば、マイクロRNA遺伝子、長鎖非コードRNA遺伝子）。標的遺伝子は、通常、プロモーター配列を含み、プロモーター配列と同一性（相同性とも言われる）を有する小分子活性化核酸分子を設計することにより、標的遺伝子に対する正調節を実現することができ、標的遺伝子の発現のアップレギュレーションとして表現される。「標的遺伝子プロモーター配列」とは、標的遺伝子の非コード配列を意味し、本発明において「標的遺伝子プロモーター配列と相補する」における標的遺伝子プロモーター配列とは、当該配列のコード鎖（非鋳型鎖とも言われる）、すなわち、当該遺伝子コード配列と同一の核酸配列である。「標的」又は「標的配列」とは、標的遺伝子プロモーター配列のうち小分子活性化核酸分子のセンスオリゴヌクレオチド鎖又はアンチセンスオリゴヌクレオチドと相同又は相補となる配列断片を意味する。

【００６９】

本明細書で使用される用語「センス鎖」、「センス核酸鎖」は交換可能に使用され、小分子活性化核酸分子のセンスオリゴヌクレオチド鎖とは、小分子活性化核酸分子の二本鎖体に標的遺伝子のプロモーター配列のコード鎖と同一性を有する第1核酸鎖が含まれることを意味する。

【００７０】

本明細書で使用される用語「アンチセンス鎖」、「アンチセンス核酸鎖」は交換可能に使用され、小分子活性化核酸分子のアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖とは、小分子活性化核酸分子の二本鎖体においてセンスオリゴヌクレオチド鎖と相補する第2核酸鎖を指す。

【００７１】

本明細書で使用される「コード鎖」は、標的遺伝子における転写が不可能な1本のDNA鎖を指し、該鎖のヌクレオチド配列は、転写により生成されたRNAの配列と一致する（RNAではUでDNAにおけるTを置換した）。本発明に記載の標的遺伝子プロモーターの二本鎖DNA配列のコード鎖は、標的遺伝子DNAコード鎖と同一のDNA鎖に存在するプロモーター配列を意味する。

【００７２】

本明細書で使用される「鋳型鎖」とは、標的遺伝子の二本鎖DNAのうちコード鎖に相補的な他本の鎖であって、鋳型としてRNAに転写可能な鎖を意味し、当該鎖は、転写したRNA塩基と相補的なものである（A-U、G-C）。転写過程において、RNAポリメラーゼは、鋳型鎖に結合し、鋳型鎖の3’→5’方向に沿って移動し、5’→3’方向に従ってRNAの合成を触媒する。本発明に記載の標的遺伝子プロモーターの二本鎖DNA配列の鋳型鎖は、標的遺伝子DNA鋳型鎖と同一のDNA鎖に存在するプロモーター配列を意味する。

【００７３】

本明細書で使用される「プロモーター」とは、タンパク質コード又はRNAコード核酸配列と位置的に関連付けることによりそれらの転写に対して調節作用を果たす配列である。通常、真核遺伝子プロモーターは、100～5,000個の塩基対を含むが、この長さの範囲は、本明細書で使用される「プロモーター」を限定する趣旨ではない。プロモーター配列は、一般的にタンパク質コード又はRNAコード配列の5’末端に位置するが、エクソン及びイントロン配列にも存在する。

【００７４】

本明細書で使用される「転写開始部位」という用語は、遺伝子の鋳型鎖に転写開始を標識するためのヌクレオチドを意味する。転写開始部位は、プロモーター領域の鋳型鎖に出現することができる。1つの遺伝子は、1つ以上の転写開始部位を有することができる。

【００７５】

本明細書で使用される「同一性」又は「相同性」という用語は、小分子活性化RNAのうちの1本のオリゴヌクレオチド鎖（センス鎖又はアンチセンス鎖）が標的遺伝子のプロモーター配列のある領域のコード鎖又は鋳型鎖と類似性を有することを意味する。本明細書では、前記「同一性」又は「相同性」は、少なくとも約75％、約79％、約80％、約85％、約90％、約95％、約99％又は約100％であってもよい。

【００７６】

本明細書で使用される用語「突出」、「overhang」、「オーバーハング」は交換可能に使用され、オリゴヌクレオチド鎖の末端（5'又は3'）の非塩基対ヌクレオチドを意味し、二本鎖オリゴヌクレオチド内の一方の鎖から延出する他方の鎖から産生するものである。二本鎖体の3'及び/又は5'末端からはみ出した一本鎖領域は、「突出」と称される。

【００７７】

本明細書で使用される用語「遺伝子活性化」又は「活性化遺伝子」又は「遺伝子のアップレギュレーション」又は「アップレギュレーションされた遺伝子」は交換可能に使用され、遺伝子の転写レベル、mRNAレベル、タンパク質レベル、酵素活性、メチル化状態、染色質状態又は立体配置、翻訳レベル、又は細胞又は生物系でのこの活性又は状態を測定することで、ある核酸の転写、翻訳、発現又は活性の増加を測定することを意味する。これらの活動又は状態は、直接的又は間接的に測定することができる。また、「遺伝子活性化」、「活性化遺伝子」、「遺伝子のアップレギュレーション」、「アップレギュレーションされた遺伝子」は、このような活性化のメカニズムによらず、核酸配列に相関する活性が増加したことを意味し、例えば、調節配列として調節作用を発揮したり、RNAに転写されたり、タンパク質に翻訳されてタンパク質の発現を増加させたりする。

【００７８】

本明細書で使用される用語「小分子活性化RNA」、「saRNA」、「小分子活性化核酸分子」は交換可能に使用され、遺伝子発現を促進できる核酸分子を指し、且つ標的遺伝子の非コード核酸配列（例えばプロモーター、エンハンサー等）とは配列同一性又は相同性を有するヌクレオチド配列を含む第1核酸断片（アンチセンス核酸鎖；アンチセンスオリゴヌクレオチド鎖ともいう）と、第1核酸断片と相補するヌクレオチド配列を含む第2核酸断片（センス核酸鎖；センス鎖又はセンスオリゴヌクレオチド鎖ともいう）からなり、そのうち、前記第1核酸断片と第2核酸断片は二本鎖体を形成する。小分子活性化核酸分子は、合成され又はベクターで発現されるとともに二本鎖領域のヘアピン構造を形成できる一本鎖RNA分子で構成されてもよい。そのうち、第1領域は、遺伝子のプロモーター標的配列と配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、第2領域に含まれるヌクレオチド配列は、第1領域と相補的なものである。小分子活性化核酸分子の二本鎖体領域の長さは、通常は約10個～約50個の塩基対、約12個～約48個の塩基対、約14個～約46個の塩基対、約16個～約44個の塩基対、約18個～約42個の塩基対、約20個～約40個の塩基対、約22個～約38個の塩基対、約24個～約36個の塩基対、約26個～約34個の塩基対、約28個～約32個の塩基対であり、通常、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約45個、約50個の塩基対である。また、「saRNA」、「小分子活性化RNA」、「小分子活性化核酸分子」には、リボヌクレオチド部分以外の核酸も含ま

れ、修飾されたヌクレオチド又はその類似物が含まれるが、これに限定されるものではない。

【００７９】

本明細書で使用される「ホットスポット」という用語は、長さが少なくとも30 bpである遺伝子プロモーター領域を意味する。これらの領域では、機能性小分子活性化核酸分子標的の凝集が現われ、即ち、これらのホットスポット領域を標的とする小分子活性化核酸分子の少なくとも30％は、標的遺伝子mRNAの発現が1.1倍～2.89倍になるまで誘導することができる。

【００８０】

本明細書で使用される「合成」とは、オリゴヌクレオチドの合成方式を意味し、例えば化学合成、人体外転写、ベクター表現などのRNAを合成可能な任意の方式が含まれる。

【００８１】

本発明では、RNA活性化方式によりThpo/THPO遺伝子の発現をアップレギュレーションし、THPOタンパク質の発現量を増加することで、関連疾患、特に血小板減少症を治療する。本発明では、Thpo/THPO遺伝子は標的遺伝子ともいう。

【００８２】

本発明が提供する小分子活性化核酸分子の製造方法は、配列設計と配列合成を含む。

【００８３】

本発明の小分子活性化核酸分子配列の合成は、化学合成方法を用いるか、又は核酸合成の専門バイオテクノロジー企業に委託する。

【００８４】

一般的には、化学合成の方法には、以下の4つの工程が含まれる：（1）オリゴリボヌクレオチドの合成；（2）脱保護；（3）精製分離；（4）脱塩及びアニール。

【００８５】

例えば、本発明にかかるsaRNAの化学合成の具体的なステップは下記の通りである。

（1）オリゴリボヌクレオチドの合成

自動DNA/RNA合成機（例えば、Applied Biosystems EXPEDITE8909）にて1ミクロモルRNAの合成を設置するとともに、1サイクルのカップリングタイムを10～15分間に設定する。固相連結の5’‐O‐パラジメトキシトリチル‐チミジン支持物を開始剤とし、1回目のサイクルで固相支持物に塩基を連結し、n回目（19≧n≧2）のサイクルでn‐1回目のサイクルで連結された塩基に更に塩基を連結する。このように、全ての核酸配列の合成を完了するまでサイクルを繰り返す。

【００８６】

（2）脱保護

saRNAに連結された固相支持物を試験管に入れ、更にこの試験管にエタノール／アンモニア水溶液（体積比1：3）を1 mL入れた後に、栓をした状態で25‐70℃のインキュベータに置き、2‐30時間インキュベーションする。saRNAの固相支持物が含む溶液をろ過してろ過液を集め、再蒸留水で固相支持物を2回溶出して（1回1 mL）ろ過液を集める。集めた溶出液を合わせて、真空条件で1‐12時間乾燥させる。その後、テトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン溶液（1 M）を1 mL入れて、室温で4～12時間静置し、更にn－ブタノールを2 mL入れて、高速遠心分離により沈殿物を集め、saRNA一本鎖の粗産物を得た。

（3）精製分離

【００８７】

得られたsaRNAの粗産物を濃度1モル/リットルの酢酸トリエチルアミン溶液2 mLに溶解し、次に、高速液体クロマトグラフィー逆相C18カラムにより分離して、精製saRNA一本鎖産物を得る。

（4）脱塩及びアニール

【００８８】

サイズ排除ゲルろ過法で塩分を除去し、センス鎖及びアンチセンス鎖のオリゴリボ核酸一

本鎖を同じモル比で1‐2 mLの緩衝液（10 mM Tris, pH＝7.5‐8.0、50 mM NaCl）に混ぜる。この溶液を95℃まで加熱した後、室温までゆっくりと冷却させて、saRNAが含む溶液を得た。

【００８９】

本研究から、上記saRNAを細胞に導入すると、Thpo/THPO mRNAとTHPOタンパク質の発現を効果的に増加できることを見出した。

【００９０】

以下、具体的な実施例及び図面を参照しながら、本発明をさらに説明する。なお、これらの実施例は本発明を説明するためのものだけであり、本発明の範囲を限定するものではない。以下の実施例では、具体的な条件が明記されていない実験方法は、通常、一般的な条件、例えばSambrookら、分子クローニング：実験室ハンドバック（New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989）に記載の条件、又はメーカーが推薦する条件を用いる。

【００９１】

実施例1 マウスThpo遺伝子プロモーターに標的化するsaRNAの設計及び合成

Thpo遺伝子の発現を活性化可能な機能性saRNAをスクリーニングするために、Thpo 500 bpのプロモーター配列をテンプレートとし、TSSより上流の－500bpから大きさが19bpの標的を選択した。その後、標的配列をフィルタリング処理し、1）GC含有量が35％～65％の間であり、2）5個以上の連続的に同一のヌクレオチドを含まなく、3）3個より多いジヌクレオチド反復配列を含まなく、4）3個より多いトリヌクレオチド反復配列を含まないことを基準として標的配列を保留した。フィルタリング後、残りの322個の標的配列は候補としてスクリーニングプロセスに移行した。これらの候補配列により、対応する二本鎖saRNAを化学合成した。

【００９２】

該実験に使用される二本鎖saRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖のいずれの長さも21ヌクレオチドであり、前記二本鎖saRNAの第1リボ核酸鎖（センス鎖）の5’領域の19個のヌクレオチドはプロモーターの標的配列とは100％の同一性を有し、その3’末端にはTT配列を有し、第2リボ核酸鎖の5’領域の19個のヌクレオチドは第1リボ核酸鎖配列と相補し、その3’末端にはTT配列を有する。前記二本鎖saRNAの2本の鎖を同量のモル数で混合し、アニーリング後に二本鎖saRNAを形成した。

【００９３】

マウスThpoプロモーター配列は以下に示され、配列表のSEQ ID No：1の5’～3’の位置1～位置500に対応する。

-500 taatataggc aatacctact ttgccagttg gaaaggggaa atgccaggaa
-450 agacactcct ctggagcagg ggaatataga aggaaaagca agcaagccag
-400 catgctgtca gaattcagca gcaggtatac tgttcaggga aaagaaattt
-350 ggagagccag gaactgagac ttcatccatc taaaacaaga cctctctttc
-300 ccagagagaa ccgtattctg ccagatttct cctggactaa ccctcttctc
-250 tctctcactt aggtcccagg ttctcatgtc gccaggacat gagacagttc
-200 ccgctataca aattctctct agagtgtgtg tgggtggagg agctgggctc
-150 tattcatgga ccatggtcca gccatgggct ctagtcccag tagacaggaa
-100 aagaagtcgt catttccggg ggagccttca cctgggcttg gtggctctct
 -50 gctctctgat tgggcggaag tggcctgggc aggcttgtga ccctactaca

【００９４】

実施例2 マウスThpoプロモーターに標的化するsaRNAのハイスループットスクリーニング

（1）細胞培養及びトランスフェクション

マウス胚性肝細胞（BNL.CL2）（中国科学院上海生命科学研究院から購入、GNM22）を10％子牛血清（Sigma-Aldrich）と1％ペニシリン/ストレプトマイシン（Gibco）を含有するDMEM培地（Gibco）で培養した。細胞を5％のCO_2、37℃の条件下で培養し

た。BNL.CL2細胞を3500／ウェルで96ウェルプレートに敷き、メーカーの指示に従って、RNAiMax（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて10 nM（断らない限り）の濃度で小分子活性化RNAをトランスフェクションし、トランスフェクション時間が72時間であり、処理ごとに2つの重複ウェルを利用した。

（2）ワンステップ法RT-qPCR

【００９５】

トランスフェクション終了後、培地を捨てて、1ウェルあたりPBS 150 μlを加えて1回洗浄し、PBSを捨てて、1ウェルあたり細胞溶解液50 μlを加え、室温で5分間インキュベートした。ウェルあたり細胞溶解液を1 μl取り、ワンステップ法TB Green™ PrimeScrip™ RT-PCR キット II（Takara,RR086A）を使用した。ABI 7500 高速リアルタイム（Fast Real-time）PCRシステム（Applied Biosystems）にてqPCR分析を行い、サンプルごとに3個のウェルを繰り返して増幅させ、PCR反応条件を表1に示す。

表1. PCR反応製造

試薬	体積
2×ワンステップ法TB Green RT-PCR 緩衝液4	2.5 μl
PrimeScript 1 step 酵素混合物2	0.2 μl
正方向及び逆方向プライマー混合物（5 μM）	0.4 μl
RNaseフリー dH_2O	1.4 μl
粗製溶解物（RNA）	0.5 μl
合計	5 μl

【００９６】

反応条件としては、段階1 逆転写反応：42℃、5分間；95℃ 10秒；段階2 PCR反応：95℃ 5秒、60℃ 20 秒、増幅45サイクル。Sdha及びTbpを内部参照遺伝子とする。Thpo、Sdha及びTbpに使用されるPCRプライマーを表2に示し、そのうち、ThpoはThpo F1/R1プライマー対で増幅される。

表2. RT-qPCR解析のプライマー配列

プライマー名	配列番号	配列（5'-3'）
Thpo F1	SEQ ID NO:297	TGGAGCTGACTGATTTGCTCCTG
Thpo R1	SEQ ID NO:298	AACAGGGATAGACAAAGGGTCG
Sdha F	SEQ ID NO:299	ATGGTCACTAGGGCTGGTTTG
Sdha R	SEQ ID NO:300	ACGACACCCTTCTGTGATGAG
Tbp F	SEQ ID NO:301	CCGTGAATCTTGGCTGTAAACT
Tbp R	SEQ ID NO:302	TGTCCGTGGCTCTCTTATTC

【００９７】

あるsaRNAトランスフェクションサンプルのThpo（目標遺伝子）の、対照処理（Mock）に対する発現値（Erel）を計算するために、式1に目標遺伝子及び2個の内部参照遺伝子のCt値を代入して計算した。

$$E_{rel} = 2^{(CtT_m - CtT_s)} / ((2^{(Ct\mathrm{R}1_m - Ct\mathrm{R}1_s)} * 2^{(Ct\mathrm{R}2_m - CtR2_s)})^{(1/2)}) \quad (式1)$$

【００９８】

そのうち、CtTmは、対照処理（Mock）サンプルに由来する目的遺伝子のCt値、CtTsは、saRNA処理サンプルに由来する目的遺伝子のCt値、CtR1mは、Mock処理サンプルに由来する内部参照遺伝子1のCt値、CtR1sは、saRNA処理サンプルに由来する内部参

照遺伝子1のCt値、CtR2mは、対照処理サンプルに由来する内部参照遺伝子2のCt値、CtR2sは、saRNA処理サンプルに由来する内部参照遺伝子2のCt値である。

（3）マウス機能性saRNAのスクリーニング

【００９９】

活性化Thpoで転写させたsaRNAを得るために、上記322個のsaRNAを用いて10 nMのトランスフェクション濃度でそれぞれBNL.CL2細胞をトランスフェクションし、72時間後、前記と同様な方法により、細胞を溶解し、ワンステップ法RT-qPCRにより分析し、各saRNA処理サンプルのThpo遺伝子の相対（対照処理群と比較して）発現値を得た。表3に示されるように、18（5.6%）個のsaRNAは高度活性化作用を示し、79（24.5%）個のsaRNAは軽度活性化作用を示し、142（69.9%）個のsaRNAは、Thpoの発現に影響しない。活性化の最大程度は2.89倍、最大抑制程度は0.26倍であり、これら活性化活性を有するsaRNAは活性化saRNAと呼ばれる。

表3. マウスThpo saRNAハイスループットスクリーニング結果のまとめ

saRNAの活性の分類	Thpo mRNAの変化幅のlog_2値（倍数）	saRNA数	パーセンテージ
高度活性化	≥ 0.58 (1.50) ~ ≤1.53（2.89）	18	5.6%
軽度活性化	≥ 0.13 (1.10）~ < 0.58 (1.50)	79	24.5%
活性化作用無し	< 0.13 (1.10）	225	69.9%
合計		322	100%

【０１００】

図1に、更にマウスThpo saRNAのThpo発現変化が降順で示されている。そのうち、Thpo活性saRNA配列、活性標的配列、及びThpo mRNA発現変化は表4に示されている。

表4. マウス活性saRNA配列、その標的配列、及びそれによるマウスThpo mRNA発現変化

saRNA	標的配列 (5'-3')	saRNAセンス配列 (5' -3')	saRNAアンチセンス配列 (5' -3')	Thpo mRNA相対発現変化倍数
RAG3-493	GGCAATACCTACTTTGCCA (SEQ ID NO:200)	GGCAAUACCUACUUUGCCATT (SEQ ID NO:6)	UGGCAAAGUAGGUAUUGCCTT (SEQ ID NO:103)	1.17
RAG3-490	AATACCTACTTTGCCAGTT (SEQ ID NO:201)	AAUACCUACUUUGCCAGUUTT (SEQ ID NO:7)	AACUGGCAAAGUAGGUAUUTT (SEQ ID NO:104)	1.21
RAG3-486	CCTACTTTGCCAGTTGGAA (SEQ ID NO:202)	CCUACUUUGCCAGUUGGAATT (SEQ ID NO:8)	UUCCAACUGGCAAAGUAGGTT (SEQ ID NO:105)	1.76
RAG3-484	TACTTTGCCAGTTGGAAAG (SEQ ID NO:203)	UACUUUGCCAGUUGGAAAGTT (SEQ ID NO:9)	CUUUCCAACUGGCAAAGUATT (SEQ ID NO:106)	1.13
RAG3-483	ACTTTGCCAGTTGGAAAGG (SEQ ID NO:204)	ACUUUGCCAGUUGGAAAGGTT (SEQ ID NO:10)	CCUUUCCAACUGGCAAAGUTT (SEQ ID NO:107)	1.24
RAG3-479	TGCCAGTTGGAAAGGGGAA (SEQ ID NO:205)	UGCCAGUUGGAAAGGGGAATT (SEQ ID NO:11)	UUCCCCUUUCCAACUGGCATT (SEQ ID NO:108)	1.25
RAG3-474	GTTGGAAAGGGGAAATGCC (SEQ ID NO:206)	GUUGGAAAGGGGAAAUGCCTT (SEQ ID NO:12)	GGCAUUUCCCCUUUCCAACTT (SEQ ID NO:109)	1.22
RAG3-472	TGGAAAGGGGAAATGCCAG (SEQ ID NO:207)	UGGAAAGGGGAAAUGCCAGTT (SEQ ID NO:13)	CUGGCAUUUCCCCUUUCCATT (SEQ ID NO:110)	1.41
RAG3-471	GGAAAGGGGAAATGCCAGG (SEQ ID NO:208)	GGAAAGGGGAAAUGCCAGGTT (SEQ ID NO:14)	CCUGGCAUUUCCCCUUUCCTT (SEQ ID NO:111)	1.81
RAG3-466	GGGGAAATGCCAGGAAAGA (SEQ ID NO:209)	GGGGAAAUGCCAGGAAAGATT (SEQ ID NO:15)	UCUUUCCUGGCAUUUCCCCTT (SEQ ID NO:112)	1.64
RAG3-465	GGGAAATGCCAGGAAAGAC (SEQ ID NO:210)	GGGAAAUGCCAGGAAAGACTT (SEQ ID NO:16)	GUCUUUCCUGGCAUUUCCCTT (SEQ ID NO:113)	1.29
RAG3-461	AATGCCAGGAAAGACACTC (SEQ ID NO:211)	AAUGCCAGGAAAGACACUCTT (SEQ ID NO:17)	GAGUGUCUUUCCUGGCAUUTT (SEQ ID NO:114)	1.48
RAG3-460	ATGCCAGGAAAGACACTCC (SEQ ID NO:212)	AUGCCAGGAAAGACACUCCTT (SEQ ID NO:18)	GGAGUGUCUUUCCUGGCAUTT (SEQ ID NO:115)	1.14

RAG3-459	TGCCAGGAAAGACACTCCT (SEQ ID NO:213)	UGCCAGGAAAGACACUCCUTT (SEQ ID NO:19)	AGGAGUGUCUUUCCUGGCATT (SEQ ID NO:116)	1.10
RAG3-454	GGAAAGACACTCCTCTGGA (SEQ ID NO:214)	GGAAAGACACUCCUCUGGATT (SEQ ID NO:20)	UCCAGAGGAGUGUCUUUCCTT (SEQ ID NO:117)	1.24
RAG3-453	GAAAGACACTCCTCTGGAG (SEQ ID NO:215)	GAAAGACACUCCUCUGGAGTT (SEQ ID NO:21)	CUCCAGAGGAGUGUCUUUCTT (SEQ ID NO:118)	1.49
RAG3-450	AGACACTCCTCTGGAGCAG (SEQ ID NO:216)	AGACACUCCUCUGGAGCAGTT (SEQ ID NO:22)	CUGCUCCAGAGGAGUGUCUTT (SEQ ID NO:119)	1.24
RAG3-449	GACACTCCTCTGGAGCAGG (SEQ ID NO:217)	GACACUCCUCUGGAGCAGGTT (SEQ ID NO:23)	CCUGCUCCAGAGGAGUGUCTT (SEQ ID NO:120)	1.14
RAG3-448	ACACTCCTCTGGAGCAGGG (SEQ ID NO:218)	ACACUCCUCUGGAGCAGGGTT (SEQ ID NO:24)	CCCUGCUCCAGAGGAGUGUTT (SEQ ID NO:121)	1.54
RAG3-446	ACTCCTCTGGAGCAGGGGA (SEQ ID NO:219)	ACUCCUCUGGAGCAGGGGATT (SEQ ID NO:25)	UCCCCUGCUCCAGAGGAGUTT (SEQ ID NO:122)	1.36
RAG3-441	TCTGGAGCAGGGGAATATA (SEQ ID NO:220)	UCUGGAGCAGGGGAAUAUATT (SEQ ID NO:26)	UAUAUUCCCCUGCUCCAGATT (SEQ ID NO:123)	1.15
RAG3-440	CTGGAGCAGGGGAATATAG (SEQ ID NO:221)	CUGGAGCAGGGGAAUAUAGTT (SEQ ID NO:27)	CUAUAUUCCCCUGCUCCAGTT (SEQ ID NO:124)	1.14
RAG3-439	TGGAGCAGGGGAATATAGA (SEQ ID NO:222)	UGGAGCAGGGGAAUAUAGATT (SEQ ID NO:28)	UCUAUAUUCCCCUGCUCCATT (SEQ ID NO:125)	1.10
RAG3-437	GAGCAGGGGAATATAGAAG (SEQ ID NO:223)	GAGCAGGGGAAUAUAGAAGTT (SEQ ID NO:29)	CUUCUAUAUUCCCCUGCUCTT (SEQ ID NO:126)	1.12
RAG3-436	AGCAGGGGAATATAGAAGG (SEQ ID NO:224)	AGCAGGGGAAUAUAGAAGGTT (SEQ ID NO:30)	CCUUCUAUAUUCCCCUGCUTT (SEQ ID NO:127)	1.99
RAG3-435	GCAGGGGAATATAGAAGGA (SEQ ID NO:225)	GCAGGGGAAUAUAGAAGGATT (SEQ ID NO:31)	UCCUUCUAUAUUCCCCUGCTT (SEQ ID NO:128)	1.83
RAG3-434	CAGGGGAATATAGAAGGAA (SEQ ID NO:226)	CAGGGGAAUAUAGAAGGAATT (SEQ ID NO:32)	UUCCUUCUAUAUUCCCCUGTT (SEQ ID NO:129)	1.47
RAG3-433	AGGGGAATATAGAAGGAAA (SEQ ID NO:227)	AGGGGAAUAUAGAAGGAAATT (SEQ ID NO:33)	UUUCCUUCUAUAUUCCCCUTT (SEQ ID NO:130)	1.13
RAG3-432	GGGGAATATAGAAGGAAAA (SEQ ID NO:228)	GGGGAAUAUAGAAGGAAAATT (SEQ ID NO:34)	UUUUCCUUCUAUAUUCCCCTT (SEQ ID NO:131)	1.10
RAG3-430	GGAATATAGAAGGAAAAGC (SEQ ID NO:229)	GGAAUAUAGAAGGAAAAGCTT (SEQ ID NO:35)	GCUUUUCCUUCUAUAUUCCTT (SEQ ID NO:132)	1.20

RAG3-426	TATAGAAGGAAAAGCAAGC (SEQ ID NO:230)	UAUAGAAGGAAAAGCAAGCTT (SEQ ID NO:36)	GCUUGCUUUUCCUUCUAUATT (SEQ ID NO:133)	1.18
RAG3-425	ATAGAAGGAAAAGCAAGCA (SEQ ID NO:231)	AUAGAAGGAAAAGCAAGCATT (SEQ ID NO:37)	UGCUUGCUUUUCCUUCUAUTT (SEQ ID NO:134)	1.57
RAG3-424	TAGAAGGAAAAGCAAGCAA (SEQ ID NO:232)	UAGAAGGAAAAGCAAGCAATT (SEQ ID NO:38)	UUGCUUGCUUUUCCUUCUATT (SEQ ID NO:135)	1.79
RAG3-421	AAGGAAAAGCAAGCAAGCC (SEQ ID NO:233)	AAGGAAAAGCAAGCAAGCCTT (SEQ ID NO:39)	GGCUUGCUUGCUUUUCCUUTT (SEQ ID NO:136)	1.11
RAG3-420	AGGAAAAGCAAGCAAGCCA (SEQ ID NO:234)	AGGAAAAGCAAGCAAGCCATT (SEQ ID NO:40)	UGGCUUGCUUGCUUUUCCUTT (SEQ ID NO:137)	1.25
RAG3-419	GGAAAAGCAAGCAAGCCAG (SEQ ID NO:235)	GGAAAAGCAAGCAAGCCAGTT (SEQ ID NO:41)	CUGGCUUGCUUGCUUUUCCTT (SEQ ID NO:138)	1.51
RAG3-418	GAAAAGCAAGCAAGCCAGC (SEQ ID NO:236)	GAAAAGCAAGCAAGCCAGCTT (SEQ ID NO:42)	GCUGGCUUGCUUGCUUUUCTT (SEQ ID NO:139)	1.12
RAG3-417	AAAAGCAAGCAAGCCAGCA (SEQ ID NO:237)	AAAAGCAAGCAAGCCAGCATT (SEQ ID NO:43)	UGCUGGCUUGCUUGCUUUUTT (SEQ ID NO:140)	1.19
RAG3-414	AGCAAGCAAGCCAGCATGC (SEQ ID NO:238)	AGCAAGCAAGCCAGCAUGCTT (SEQ ID NO:44)	GCAUGCUGGCUUGCUUGCUTT (SEQ ID NO:141)	1.27
RAG3-410	AGCAAGCCAGCATGCTGTC (SEQ ID NO:239)	AGCAAGCCAGCAUGCUGUCTT (SEQ ID NO:45)	GACAGCAUGCUGGCUUGCUTT (SEQ ID NO:142)	1.39
RAG3-409	GCAAGCCAGCATGCTGTCA (SEQ ID NO:240)	GCAAGCCAGCAUGCUGUCATT (SEQ ID NO:46)	UGACAGCAUGCUGGCUUGCTT (SEQ ID NO:143)	1.38
RAG3-408	CAAGCCAGCATGCTGTCAG (SEQ ID NO:241)	CAAGCCAGCAUGCUGUCAGTT (SEQ ID NO:47)	CUGACAGCAUGCUGGCUUGTT (SEQ ID NO:144)	2.09
RAG3-405	GCCAGCATGCTGTCAGAAT (SEQ ID NO:242)	GCCAGCAUGCUGUCAGAAUTT (SEQ ID NO:48)	AUUCUGACAGCAUGCUGGCTT (SEQ ID NO:145)	1.53
RAG3-404	CCAGCATGCTGTCAGAATT (SEQ ID NO:243)	CCAGCAUGCUGUCAGAAUUTT (SEQ ID NO:49)	AAUUCUGACAGCAUGCUGGTT (SEQ ID NO:146)	1.18
RAG3-397	GCTGTCAGAATTCAGCAGC (SEQ ID NO:244)	GCUGUCAGAAUUCAGCAGCTT (SEQ ID NO:50)	GCUGCUGAAUUCUGACAGCTT (SEQ ID NO:147)	1.34
RAG3-396	CTGTCAGAATTCAGCAGCA (SEQ ID NO:245)	CUGUCAGAAUUCAGCAGCATT (SEQ ID NO:51)	UGCUGCUGAAUUCUGACAGTT (SEQ ID NO:148)	1.17
RAG3-378	AGGTATACTGTTCAGGGAA (SEQ ID NO:246)	AGGUAUACUGUUCAGGGAATT (SEQ ID NO:52)	UUCCCUGAACAGUAUACCUTT (SEQ ID NO:149)	1.36

RAG3-377	GGTATACTGTTCAGGGAAA (SEQ ID NO:247)	GGUAUACUGUUCAGGGAAATT (SEQ ID NO:53)	UUUCCCUGAACAGUAUACCTT (SEQ ID NO:150)	1.32
RAG3-376	GTATACTGTTCAGGGAAAA (SEQ ID NO:248)	GUAUACUGUUCAGGGAAAATT (SEQ ID NO:54)	UUUUCCCUGAACAGUAUACTT (SEQ ID NO:151)	1.67
RAG3-375	TATACTGTTCAGGGAAAAG (SEQ ID NO:249)	UAUACUGUUCAGGGAAAAGTT (SEQ ID NO:55)	CUUUUCCCUGAACAGUAUATT (SEQ ID NO:152)	1.11
RAG3-360	AAAGAAATTTGGAGAGCCA (SEQ ID NO:250)	AAAGAAAUUUGGAGAGCCATT (SEQ ID NO:56)	UGGCUCUCCAAAUUUCUUUTT (SEQ ID NO:153)	1.12
RAG3-337	CTGAGACTTCATCCATCTA (SEQ ID NO:251)	CUGAGACUUCAUCCAUCUATT (SEQ ID NO:57)	UAGAUGGAUGAAGUCUCAGTT (SEQ ID NO:154)	1.15
RAG3-290	CCGTATTCTGCCAGATTTC (SEQ ID NO:252)	CCGUAUUCUGCCAGAUUUCTT (SEQ ID NO:58)	GAAAUCUGGCAGAAUACGGTT (SEQ ID NO:155)	1.14
RAG3-273	TCTCCTGGACTAACCCTCT (SEQ ID NO:253)	UCUCCUGGACUAACCCUCUTT (SEQ ID NO:59)	AGAGGGUUAGUCCAGGAGATT (SEQ ID NO:156)	2.89
RAG3-272	CTCCTGGACTAACCCTCTT (SEQ ID NO:254)	CUCCUGGACUAACCCUCUUTT (SEQ ID NO:60)	AAGAGGGUUAGUCCAGGAGTT (SEQ ID NO:157)	1.89
RAG3-271	TCCTGGACTAACCCTCTTC (SEQ ID NO:255)	UCCUGGACUAACCCUCUUCTT (SEQ ID NO:61)	GAAGAGGGUUAGUCCAGGATT (SEQ ID NO:158)	1.17
RAG3-244	ACTTAGGTCCCAGGTTCTC (SEQ ID NO:256)	ACUUAGGUCCCAGGUUCUCTT (SEQ ID NO:62)	GAGAACCUGGGACCUAAGUTT (SEQ ID NO:159)	1.17
RAG3-243	CTTAGGTCCCAGGTTCTCA (SEQ ID NO:257)	CUUAGGUCCCAGGUUCUCATT (SEQ ID NO:63)	UGAGAACCUGGGACCUAAGTT (SEQ ID NO:160)	1.45
RAG3-242	TTAGGTCCCAGGTTCTCAT (SEQ ID NO:258)	UUAGGUCCCAGGUUCUCAUTT (SEQ ID NO:64)	AUGAGAACCUGGGACCUAATT (SEQ ID NO:161)	1.27
RAG3-239	GGTCCCAGGTTCTCATGTC (SEQ ID NO:259)	GGUCCCAGGUUCUCAUGUCTT (SEQ ID NO:65)	GACAUGAGAACCUGGGACCTT (SEQ ID NO:162)	1.10
RAG3-229	TCTCATGTCGCCAGGACAT (SEQ ID NO:260)	UCUCAUGUCGCCAGGACAUTT (SEQ ID NO:66)	AUGUCCUGGCGACAUGAGATT (SEQ ID NO:163)	1.12
RAG3-227	TCATGTCGCCAGGACATGA (SEQ ID NO:261)	UCAUGUCGCCAGGACAUGATT (SEQ ID NO:67)	UCAUGUCCUGGCGACAUGATT (SEQ ID NO:164)	1.39
RAG3-226	CATGTCGCCAGGACATGAG (SEQ ID NO:262)	CAUGUCGCCAGGACAUGAGTT (SEQ ID NO:68)	CUCAUGUCCUGGCGACAUGTT (SEQ ID NO:165)	1.30
RAG3-219	CCAGGACATGAGACAGTTC (SEQ ID NO:263)	CCAGGACAUGAGACAGUUCTT (SEQ ID NO:69)	GAACUGUCUCAUGUCCUGGTT (SEQ ID NO:166)	1.24

RAG3-215	GACATGAGACAGTTCCCGC (SEQ ID NO:264)	GACAUGAGACAGUUCCCGCTT (SEQ ID NO:70)	GCGGGAACUGUCUCAUGUCTT (SEQ ID NO:167)	1.32
RAG3-214	ACATGAGACAGTTCCCGCT (SEQ ID NO:265)	ACAUGAGACAGUUCCCGCUTT (SEQ ID NO:71)	AGCGGGAACUGUCUCAUGUTT (SEQ ID NO:168)	1.28
RAG3-206	CAGTTCCCGCTATACAAAT (SEQ ID NO:266)	CAGUUCCCGCUAUACAAAUTT (SEQ ID NO:72)	AUUUGUAUAGCGGGAACUGTT (SEQ ID NO:169)	1.31
RAG3-205	AGTTCCCGCTATACAAATT (SEQ ID NO:267)	AGUUCCCGCUAUACAAAUUTT (SEQ ID NO:73)	AAUUUGUAUAGCGGGAACUTT (SEQ ID NO:170)	1.14
RAG3-204	GTTCCCGCTATACAAATTC (SEQ ID NO:268)	GUUCCCGCUAUACAAAUUCTT (SEQ ID NO:74)	GAAUUUGUAUAGCGGGAACTT (SEQ ID NO:171)	1.65
RAG3-203	TTCCCGCTATACAAATTCT (SEQ ID NO:269)	UUCCCGCUAUACAAAUUCUTT (SEQ ID NO:75)	AGAAUUUGUAUAGCGGGAATT (SEQ ID NO:172)	1.42
RAG3-202	TCCCGCTATACAAATTCTC (SEQ ID NO:270)	UCCCGCUAUACAAAUUCUCTT (SEQ ID NO:76)	GAGAAUUUGUAUAGCGGGATT (SEQ ID NO:173)	1.31
RAG3-164	GAGGAGCTGGGCTCTATTC (SEQ ID NO:271)	GAGGAGCUGGGCUCUAUUCTT (SEQ ID NO:77)	GAAUAGAGCCCAGCUCCUCTT (SEQ ID NO:174)	1.13
RAG3-158	CTGGGCTCTATTCATGGAC (SEQ ID NO:272)	CUGGGCUCUAUUCAUGGACTT (SEQ ID NO:78)	GUCCAUGAAUAGAGCCCAGTT (SEQ ID NO:175)	1.17
RAG3-153	CTCTATTCATGGACCATGG (SEQ ID NO:273)	CUCUAUUCAUGGACCAUGGTT (SEQ ID NO:79)	CCAUGGUCCAUGAAUAGAGTT (SEQ ID NO:176)	1.17
RAG3-152	TCTATTCATGGACCATGGT (SEQ ID NO:274)	UCUAUUCAUGGACCAUGGUTT (SEQ ID NO:80)	ACCAUGGUCCAUGAAUAGATT (SEQ ID NO:177)	1.10
RAG3-151	CTATTCATGGACCATGGTC (SEQ ID NO:275)	CUAUUCAUGGACCAUGGUCTT (SEQ ID NO:81)	GACCAUGGUCCAUGAAUAGTT (SEQ ID NO:178)	1.44
RAG3-150	TATTCATGGACCATGGTCC (SEQ ID NO:276)	UAUUCAUGGACCAUGGUCCTT (SEQ ID NO:82)	GGACCAUGGUCCAUGAAUATT (SEQ ID NO:179)	1.24
RAG3-147	TCATGGACCATGGTCCAGC (SEQ ID NO:277)	UCAUGGACCAUGGUCCAGCTT (SEQ ID NO:83)	GCUGGACCAUGGUCCAUGATT (SEQ ID NO:180)	1.31
RAG3-146	CATGGACCATGGTCCAGCC (SEQ ID NO:278)	CAUGGACCAUGGUCCAGCCTT (SEQ ID NO:84)	GGCUGGACCAUGGUCCAUGTT (SEQ ID NO:181)	1.44
RAG3-142	GACCATGGTCCAGCCATGG (SEQ ID NO:279)	GACCAUGGUCCAGCCAUGGTT (SEQ ID NO:85)	CCAUGGCUGGACCAUGGUCTT (SEQ ID NO:182)	1.26
RAG3-134	TCCAGCCATGGCTCTAGT (SEQ ID NO:280)	UCCAGCCAUGGGCUCUAGUTT (SEQ ID NO:86)	ACUAGAGCCCAUGGCUGGATT (SEQ ID NO:183)	1.41

RAG3-133	CCAGCCATGGGCTCTAGTC (SEQ ID NO:281)	CCAGCCAUGGGCUCUAGUCTT (SEQ ID NO:87)	GACUAGAGCCCAUGGCUGGTT (SEQ ID NO:184)	1.11
RAG3-129	CCATGGGCTCTAGTCCCAG (SEQ ID NO:282)	CCAUGGGCUCUAGUCCCAGTT (SEQ ID NO:88)	CUGGGACUAGAGCCCAUGGTT (SEQ ID NO:185)	1.30
RAG3-122	CTCTAGTCCCAGTAGACAG (SEQ ID NO:283)	CUCUAGUCCCAGUAGACAGTT (SEQ ID NO:89)	CUGUCUACUGGGACUAGAGTT (SEQ ID NO:186)	1.51
RAG3-121	TCTAGTCCCAGTAGACAGG (SEQ ID NO:284)	UCUAGUCCCAGUAGACAGGTT (SEQ ID NO:90)	CCUGUCUACUGGGACUAGATT (SEQ ID NO:187)	1.72
RAG3-111	GTAGACAGGAAAAGAAGTC (SEQ ID NO:285)	GUAGACAGGAAAAGAAGUCTT (SEQ ID NO:91)	GACUUCUUUUCCUGUCUACTT (SEQ ID NO:188)	1.26
RAG3-110	TAGACAGGAAAAGAAGTCG (SEQ ID NO:286)	UAGACAGGAAAAGAAGUCGTT (SEQ ID NO:92)	CGACUUCUUUUCCUGUCUATT (SEQ ID NO:189)	1.25
RAG3-101	AAAGAAGTCGTCATTTCCG (SEQ ID NO:287)	AAAGAAGUCGUCAUUUCCGTT (SEQ ID NO:93)	CGGAAAUGACGACUUCUUUTT (SEQ ID NO:190)	1.14
RAG3-100	AAGAAGTCGTCATTTCCGG (SEQ ID NO:288)	AAGAAGUCGUCAUUUCCGGTT (SEQ ID NO:94)	CCGGAAAUGACGACUUCUUTT (SEQ ID NO:191)	1.15
RAG3-099	AGAAGTCGTCATTTCCGGG (SEQ ID NO:289)	AGAAGUCGUCAUUUCCGGGTT (SEQ ID NO:95)	CCCGGAAAUGACGACUUCUTT (SEQ ID NO:192)	1.12
RAG3-078	AGCCTTCACCTGGGCTTGG (SEQ ID NO:290)	AGCCUUCACCUGGGCUUGGTT (SEQ ID NO:96)	CCAAGCCCAGGUGAAGGCUTT (SEQ ID NO:193)	1.10
RAG3-071	ACCTGGGCTTGGTGGCTCT (SEQ ID NO:291)	ACCUGGGCUUGGUGGCUCUTT (SEQ ID NO:97)	AGAGCCACCAAGCCCAGGUTT (SEQ ID NO:194)	1.10
RAG3-047	CTCTGATTGGGCGGAAGTG (SEQ ID NO:292)	CUCUGAUUGGGCGGAAGUGTT (SEQ ID NO:98)	CACUUCCGCCCAAUCAGAGTT (SEQ ID NO:195)	1.66
RAG3-046	TCTGATTGGCGGAAGTGG (SEQ ID NO:293)	UCUGAUUGGCGGAAGUGGTT (SEQ ID NO:99)	CCACUUCCGCCCAAUCAGATT (SEQ ID NO:196)	1.15
RAG3-044	TGATTGGGCGGAAGTGGCC (SEQ ID NO:294)	UGAUUGGGCGGAAGUGGCCTT (SEQ ID NO:100)	GGCCACUUCCGCCCAAUCATT (SEQ ID NO:197)	1.20
RAG3-023	GGCAGGCTTGTGACCCTAC (SEQ ID NO:295)	GGCAGGCUUGUGACCCUACTT (SEQ ID NO:101)	GUAGGGUCACAAGCCUGCCTT (SEQ ID NO:198)	1.27
RAG3-022	GCAGGCTTGTGACCCTACT (SEQ ID NO:296)	GCAGGCUUGUGACCCUACUTT (SEQ ID NO:102)	AGUAGGGUCACAAGCCUGCTT (SEQ ID NO:199)	1.11

【０１０１】

３２２個のｓａＲＮＡの活性をＴｈｐｏプロモーターにおける位置に従って並んでおり、機能性ｓａＲＮＡの分布が集中し、すなわち、あるプロモーター領域において活性化ｓａＲＮＡが特定の「ホットスポット（ｈｏｔ ｓｐｏｔ）」領域に集中するという現象が顕著に認められる（図２）。図２に示されるように、プロモーターの-４９３/-３５６領域（Ｈ１）、-２７３/-１８３領域（Ｈ２）、及び-１６４/-８０領域（Ｈ３）のそれぞれには、３個のホットスポット領域が現れ、活性化用ｓａＲＮＡが高度に集まるように見られる。この分析結果から明らかなように、活性化用ｓａＲＮＡはプロモーター上でランダムに分布するものではなく、特定のホットスポット領域に集まるということである。

【０１０２】

配列表のSEQ ID NO：2の５’～３’の位置1～位置138に対応するホットスポットH1（５’～３’：-493～-356）配列：

```
   1 ggcaatacct actttgccag ttggaaaggg gaaatgccag gaaagacact
  51 cctctggagc aggggaatat agaaggaaaa gcaagcaagc cagcatgctg
 101 tcagaattca gcagcaggta tactgttcag ggaaaaga
```

配列表のSEQ ID NO：3 の５’～３’の位置1～位置91に対応するホットスポットH2（５’～３’：-273～-183）配列：

```
   1 tctcctggac taaccctctt ctctctctca cttaggtccc aggttctcat
  51 gtcgccagga catgagacag ttcccgctat acaaattctc t
```

配列表のSEQ ID NO：4 の５’～３’の位置1～位置85に対応するホットスポットH3（５’～３’：-164～-80）配列：

```
   1 gaggagctgg gctctattca tggaccatgg tccagccatg ggctctagtc
  51 ccagtagaca ggaaaagaag tcgtcatttc cgggg
```

【０１０３】

実施例3 saRNAによるマウス肝細胞中Thpo mRNA発現の促進

（1）細胞培養及びトランスフェクション

細胞培養は実施例2に記載されるように、マウス胚性肝細胞（BNL.CL2）を1×10^5細胞／ウェルで6ウェルプレートに敷き、メーカーの指示に従って、RNAiMax（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて10 nMの濃度でマウスThpo saRNAをトランスフェクションし、トランスフェクション時間が72時間であり、処理ごとに2つの重複ウェルを利用した。

【０１０４】

（2）ツーステップ法RT-qPCR

トランスフェクション終了後、培地を捨てて、1ウェルあたり細胞溶解液を500 μl加え、室温で5分間インキュベートした。Qiagen RNeasyキットでRNAを抽出し、逆転写後、ABI 7500 高速リアルタイム（Fast Real-time）PCRシステム（Applied Biosystems）にてqPCR分析を行い、サンプルごとに3個のウェルを繰り返して増幅させ、PCR反応条件を表5及び表6に示す。

表5. RT反応の調製

試料（RT反応1）	体積
5 × gDNA Eraser緩衝液	2 μl
gDNA Eraser	1 μl
総量RNA（1 μg）+ D.W	7 μl
最終体積	10 μl
42℃ 2 min、4℃で保存	

試料（RT反応2）	体積
5 × PrimeScript 緩衝液2	4 μl
PrimeScript RT酵素混合物1	1 μl
RT プライマー混合物	1 μl
RNaseフリー dH_2O	4 μl
RT反応1	10 μl
最終体積	20 μl
37℃ 15 min、85℃ 5 sec、4℃で保存	

表6. RT-qPCR反応の調整

試薬	体積
SYBR Premix Ex Taq II (2 ×)	5 μl
ROX リファレンス染料 II（50 ×）	0.2 μl
正方向及び逆方向プライマー混合物（5 μM）	0.8 μl
cDNA（RT産物）	4 μl
合計	10 μl

【０１０５】
反応条件は：95℃30秒、95℃5秒、60℃30秒、40サイクル増幅である。同時にTbp遺伝子を増幅し内部参照とし、そのうちThpoをThpo F1/R1プライマー対で増幅し、増幅プライマーは表2に示されている。
【０１０６】
あるsaRNAトランスフェクションサンプルのThpo（目標遺伝子）の、対照処理（Mock）に対する発現値（Erel）を計算するために、式2に目標遺伝子及び1個の内部参照遺伝子のCt値を代入して計算した。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / 2^{(CtRm-CtRs)} \quad (式2)$$

【０１０７】
図3には、異なるマウスがsaRNA処理後の細胞中のmRNAに対するThpoの発現値が示される。対照群（Mock）をブランクトランスフェクション対照とし、対照群と比べて、マウスThpo低分子干渉RNA（siRNA）DS03-432i 群のmRNA相対発現値は53.5％低下したことから、siRNAが低分子干渉RNA対照トランスフェクションとして成功であることがわかる。DS03-0007（RAG3-424）、DS03-0014（RAG3-425）、DS03-0022（RAG3-243）及びDS03-0024（RAG3-151）を含め、異なるsaRNAであっても、群のmRNA相対発現値がいずれも対照群より高く、それぞれ25.5％、16.5％、16％と41％上昇した。これから、ランダムに選択した活性化saRNAがBNL.CL2細胞において、Thpo mRNAの発現を促進できることがわかる。
【０１０８】
実施例4 マウスThpo saRNAによるLPC-H12細胞中Thpo mRNA発現の促進
細胞培養は実施例2に記載されるように、マウス肝がん細胞（LPC-H12）（北京北納創聯生物科技有限公司から購入、BNCC101945）を2×10^5細胞／ウェルで6ウェルプレートに敷き、メーカーの指示に従って、RNAiMax（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて10 nMの濃度でマウスThpo saRNAをトランスフェクションし、トランスフェクション時間が72時間であり、処理ごとに2つの重複ウェルを利用した。ツーステップ法RT-qPCRは実施例3に記載の通りである。
【０１０９】
図4には、異なるsaRNA処理後の細胞中のmRNAに対するThpoの発現値が示される。対照処理をブランクトランスフェクション対照とし、対照群と比べて、マウスsiRNA（DS03-432i）群のmRNA相対発現値は47％低下したことから、siRNAが低分子干渉RNA対照トランスフェクションとして成功であることがわかる。DS03-0007（RAG3-424）、DS03-0019（RAG3-453）、DS03-0022（RAG3-243）、DS03-0024（RAG3-151）、DS03-0027（RAG3-134）群のmRNA相対発現値がいずれも対照群より高く、そのmRNA相対発現値がそれぞれ52％、90％、30.5％、11.5％と34％上昇し、DS03-0019の活性化効果（90％）が特に顕著である。これから、ランダムに選択した活性化saRNAがLPC-H12細胞において、Thpo mRNAの発現を異なる程度で促進できることがわかる。
【０１１０】
実施例5 マウスThpo saRNAによる初代マウス肝細胞中Thpo mRNA発現の促進
（1）初代マウス肝細胞の培養及びトランスフェクション
C57雌マウス（6～8週齢、体重約25 g、揚州大学比較医学センターから購入）をマウス動物室で3日間適応させ、二段階灌流法を用いて初代マウス肝細胞（Primary mouse liver cells）を分離した。二段階灌流法の具体的操作は以下のようである。イソフルランを使用して麻酔したマウスを維持し、アルコールで消毒してはさみでマウスの腹腔を開け、肝門脈及び下大静脈を暴露した；針頭を肝門脈に挿入し、37℃で予熱した前洗浄液（HBSS+HEPES+EGTA）を蠕動ポンプで 1～2 ml/min の速度で灌流し、マウスの肝臓が膨張し白くなることは挿管が成功したことを示す；下大静脈を切開し、次第に灌流速度を7～9 ml/minまで増加し、10～15 min灌流した；コラゲナーゼ溶液を加えて約 15 min消化し、灌流速度を5～8 ml/minとした。消化が完了してから、肝臓をペトリ皿

に移し、肝細胞を回収し、200メッシュのフィルターを通過した後、DMEM培地で3回洗浄し、4℃で5 min遠心分離（100g）した。細胞を2×10^5 /ウェル（コラーゲンコートウェルプレート）で10% 血清を含むDMEM-L培地に培養し、4～6 時間培養してから血清を含まないDMEM-L培養地を交換し、5% CO_2、37℃の条件で一晩培養した。翌日、メーカーの指示に従って、RNAiMax（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて、10 nMの濃度でマウスThpo saRNAをトランスフェクションし、トランスフェクション時間が72時間あり、処理ごとに2つの重複ウェルを利用した。ツーステップ法RT-qPCRは実施例3に記載の通りである。

【０１１１】

図5には、異なるマウスsaRNA処理後のmRNAに対するThpoの発現値が示される。対照処理をブランクトランスフェクション対照とし、対処群と比べて、DS03-0007（RAG3-424）、DS03-0012（RAG3-204）、DS03-0014（RAG3-425）、DS03-0019（RAG3-453）、DS03-0022（RAG3-243）、DS03-0024（RAG3-151）及びDS03-0027（RAG3-134）群のmRNA相対発現値は異なる程度で対照群より高く、それぞれ33.5%、25.5%、51.5%、44.5%、28.5%、26%及び34.5%上昇した。ランダムに選出した活性化saRNAが初代マウス肝細胞においてThpo mRNAの発現を促進できることがわかる。

【０１１２】

実施例6 マウス体内でThpo saRNAのThpo遺伝子に対する活性化作用の検出

（1）オリゴヌクレオチド製剤の調製

すでに公開された脂質ナノ粒子（Lipid Nanoparticle, LNP）の調製方法に基づき（改良された脂質製剤を参照、授権公告番号：CN 104873464B；改良された脂質製剤、授権公告番号：CN 102625696B；脂質製剤、特許番号：US 9394234B2；改良された脂質製剤、特許番号：WO 2010/144740A1；脂質製剤、特許番号：US 8158601B2；脂質製剤、US 8802644B2）改良しLNPを調製した。得られたLNPでオリゴヌクレオチドをカプセル化した。具体的な方法は以下のようである。

【０１１３】

Thpo siRNA（DS03-432i）とsaRNA（RAG3-151/DS03-0024）保存液の調製：siRNA（DS03-432i）とsaRNA（RAG3-151/DS03-0024）をDEPC水で溶解させ、理論最終濃度が5 mg/mlであるsiRNA（DS03-432i）とsaRNA（RAG3-151/DS03-0024）保存液を調製した。適量のsiRNA（DS03-432i）とsaRNA（RAG3-151/DS03-0024）保存液をとり、PBSで200倍希釈し、siRNA（DS03-432i）とsaRNA（DS03-0024）の濃度検出に利用した。

表7. siRNA（DS03-432i）とsaRNA（DS03-0024）のRNA濃度

サンプル	RNA測定濃度（ng/μl）	希釈倍数	RNA保存液濃度（mg/ml）
DS03-432i	41	200	8.2
DS03-0024	41	200	8.2

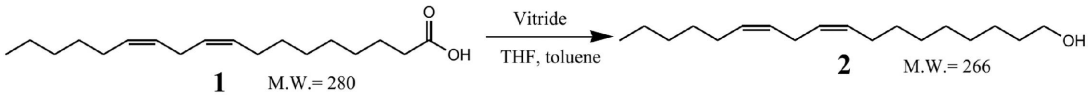
【０１１４】

表8. dsCon2とsiRNA（DS03-432i）配列

RNA二本鎖体	センス配列（5’-3’）	アンチセンス配列（5’-3’）
dsCon2	ACUACUGAGUGACAGUAGATT（SEQ ID NO:303）	UCUACUGUCACUCAGUAGUTT（SEQ ID NO:304）
DS03-432i	GGACUUUAGCCUGGGAGAATT（SEQ ID NO:305）	UUCUCCCAGGCUAAAGUCCTT（SEQ ID NO:306）

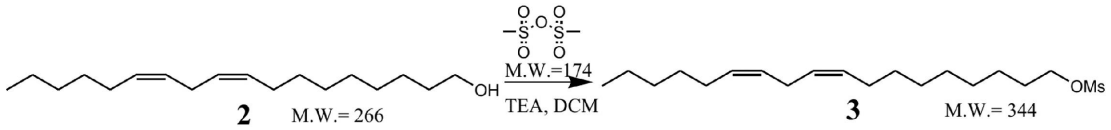
【０１１５】

D-Lin-MC3脂質の調製：特許公開方法（脂質製剤を参照、公開番号：US 2010/0324120 A1）に基づき、化学方法で以下のようにD-Lin-MC3脂質を合成した。



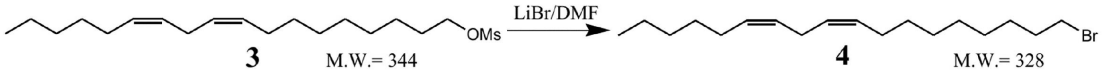
【０１１６】

乾燥した1 Lのガラスの反応器に乾燥したアルゴンガスを通し、アセトン -ドライアイスで 0度まで冷却した。反応物1（リノール酸）25 g及びTHF 300 mlを加えた。赤色アルミニウム溶液 60 ml（70% wt/ vol）のトルエン溶液を反応器にゆっくりと滴下した。滴下が終わってから、室温で2時間反応した。少量のサンプルを採取し、TLCによって原材料の反応度を監視した。反応が完成してから、飽和な硫酸ナトリウム溶液をゆっくり加えた。滴下が終わってから、30分間内に酢酸エチル を130 ml滴下し、激しく攪拌した。反応液をろ過し、固体を90 mlの酢酸エチルで洗浄し、有機相を合併し、濃縮した。産物を80 mlの酢酸エチルに溶解させ、水で二回洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過して、有機相を濃縮して真空ポンプで有機溶剤を除去し、産物2（17.49 g）を得た。



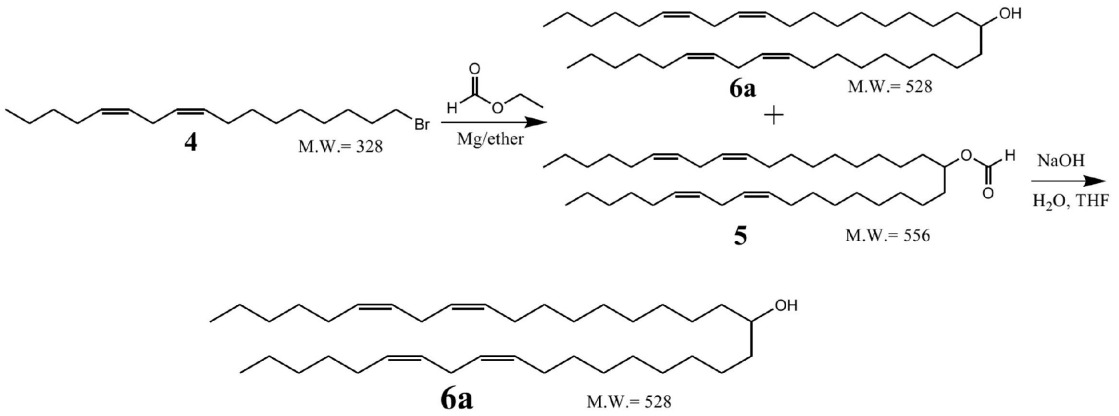
【０１１７】

乾燥した1 Lのガラスの反応器に乾燥したアルゴンガスを通し、それから17 gの産物2及び150 mlのジクロロメタンを加え、そして、40 mlのトリエチルアミン及び1 gの4-ジメチルアミノピリジンを加え、溶液をアセトン-ドライアイスで-10度まで冷却した。30 gのメタンスルホン酸無水物を45 ml のジクロロメタンに溶解させ、ゆっくり反応器に加えた。反応液の滴下が終わって、0 ℃で保持し1時間反応した。TLCによって原材料の反応度を監視した。反応が終わってから80 mlの氷水を反応液に入れ、溶液を分層し、水相を40 mlのジクロロメタンで精製した。有機相を合併し、有機相をそれぞれ希塩酸、水及び飽和NaCl溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。ろ過して、有機相を濃縮して真空ポンプで有機溶剤を除去し、産物3（22.3 g）を得た。



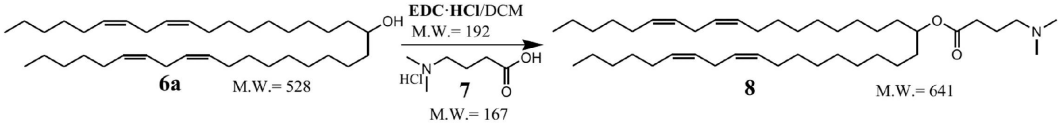
【０１１８】

乾燥した1 Lのガラスの反応器に乾燥したアルゴンガスを通し、100 ml のDMF及び22 gの産物3を加え、溶液をアセトン-ドライアイスで-10 ℃まで冷却した。8.5 g LiBrを80 mlのDMFに溶解させ、攪拌しゆっくり反応器に加えた。滴下が終わってから、反応液を45 ℃まで昇温し、18-20時間攪拌し反応した。TLCによって原材料の反応度を監視した。反応が終わってから300 mlの水を加え、240 mlのn-ヘキサンにより精製し、水相を引き続きn-ヘキサンにより精製した。有機相を合併し、有機相を水及びNaCl溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。ろ過して、有機相を濃縮して真空ポンプで有機溶剤を除去し、粗製品16.76 gを得た。60-120 メッシュのシリカゲルにより精製し（n-ヘキサンが流動相）、産物4を約13.86 g得た。



【０１１９】

乾燥した1 Lの乾燥した三口フラスコにアルゴンガスを通し、還流装置を取り付けた。反応器に2gのマグネシウムチップと12 mlの無水エーテルを加えた。13 gの産物4を40 mlの無水エーテルに溶解させた。アルゴンガスの保護で、8 mlの当該溶液を反応器に滴下し、引き続き0.2 mlのジブロモメタンを入れた。反応器を水浴で40 ℃まで昇温した。反応が始まってから、加熱を止め、残りの32 mlの溶液を反応器に滴下し、混合物をわずか還流する状態で保持した。滴下が終わってから、還流する（45 ℃）ように加熱し1時間反応した。少量のサンプルを採取し、水でクエンチしてTLCによって原材料の反応度を監視した。原材料の反応が終わってから、反応液を氷浴で10 ℃以下まで冷却し、そしてギ酸エチルのエーテル溶液をゆっくり加えた。滴下が終わってから、室温で1時間反応した。そして56 mlの氷水及び10 %の硫酸溶液を加え、有機相を分離し、水相をエーテルで精製した。有機相を合併し、飽和NaCl溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。ろ過して、有機相を濃縮して真空ポンプで有機溶剤を除去し、粗製品13 gを得た。粗製品を100 ml 85%のエタノールで溶解させ、7 gのNaOH固体を加え、室温で24時間攪拌し、TLCによって原材料の反応度を監視した。反応が完了してから、エーテルにより精製し、有機相を合併し、飽和NaCl溶液で洗浄した。無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。ろ過して、有機相を濃縮した。粗製品を60-120 メッシュのシリカゲルにより精製し（4 %エーテル/n-ヘキサン）、産物6を10.4 g得た。

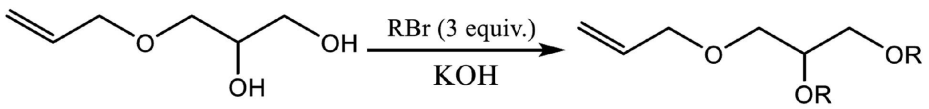


【０１２０】

100 mlのフラスコに反応産物6（3 g）を加え、ジクロロメタン（24 ml）に溶解させ、反応物7（4-（ジメチルアミノ）酪酸塩酸塩）（1.1 g）を加え、そしてジイソプロピルエチルアミン（1.5 ml）及び4-ジメチルアミノピリジン（0.09 g）を加えた。室温で5 min攪拌して、溶液にEDC・HCl（1.7 g）を加え、室温で一晩攪拌した。TLCによって原材料の反応度を監視した。反応が完了してから、溶液を20 mlのジクロロメタンで希釈した。飽和$NaHCO_3$、水及び飽和NaCl溶液で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥し、ろ過し、有機相を濃縮して、粗製品を約3.3 g得た。クロマトグラフ法（1%-5% メタノール/ジクロロメタンで勾配溶出）により分離し、純の産物8（Dlin-MC3-DMA, 2.9 g）を得た。^{1}H-NMR（$CDCl_3$, 400 MHz）, δ=5.44-5.22 (m, 8H), 4.95-4.79 (m, 1H), 2.81-2.63 (m, 4H),2.36-2.21 (m, 4H), 2.12-1.92 (m, 9H), 1.84-1.67 (m, 2H), 1.48 (d, J=5.4, 4H), 1.36-1.14 (m, 39H), 0.91-0.81 (m, 6H)。

PEG-c-DMAの調製

化学方法で以下のようにPEG-c-DMAを調製した：

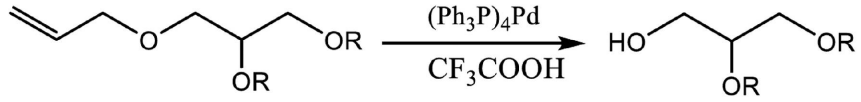


1 R = $C_{14}H_{29}$ 2

【０１２１】

産物2の調製

乾燥した1 Lのガラスの反応器に乾燥したアルゴンガスを通し、9 gの反応物1（3-アリルオキシ-1,2-プロパンジオール）、60 g 1-ブロモテトラデカン及び15.5 gの水酸化カリウムの混合物を500 mLの無水ベンゼンに入れ、一晩還流させて、Dean-Stark分流装置で水を除去した。混合物を室温まで冷却してから200 mLの無水ベンゼンで希釈した。有機相をそれぞれ水とNaCl溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムにより乾燥した。真空ポンプで有機溶剤を除去し、53gの透明な黄色い油状物が得られた。シリカゲルカラムにより精製し（粒径230-400 mesh, 使用量1300 mL）、0-5% 酢酸エチル/n-ヘキサンを流動相として勾配溶出した。産物2は33gであった。

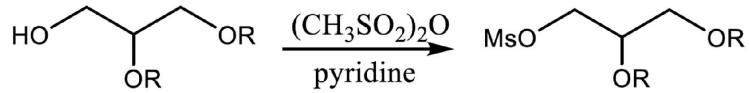


2 3

【０１２２】

産物3の調製

乾燥した1 Lのガラスの反応器に乾燥したアルゴンガスを通し、45 mLのトリフルオロ酢酸を産物2のエタノール溶液に加えた（33 gの産物2を500 mLのエタノールに溶解した）。10 gのテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウムを加えた後、光を避けて一晩還流した。反応が終わってから、真空ポンプで有機溶剤を除去し、茶色の油状物が得られた。粗製品をシリカゲルカラムにより精製し（粒径230-400 mesh, 使用量1500 mL）、0-1% メタノール/ジクロロメタンを流動相として勾配溶出した。最終産物3は黄色のワックス状物で、19 g得られた。

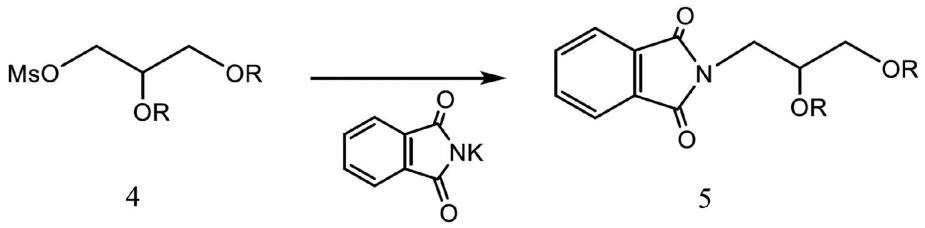


3 4

【０１２３】

産物4の調製

乾燥した1 Lのガラスの反応器に乾燥したアルゴンガスを通し、反応器において、13.8 gのメタンスルホン酸無水物を150 mLのジクロロメタンに溶解させた。6.4 mLのピリジンを反応器に滴下した。19 gの産物3を150 mLのジクロロメタンに溶解させ、反応システムに入れた。反応混合物をアルゴンガスの保護で室温で一晩攪拌した。反応が完了してから産物を200 mLのジクロロメタンで希釈し、それぞれ水とNaCl溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムにより乾燥した。回転蒸発により有機溶剤を除去し、22.1 gの黄色のワックス状粗製品産物4 を得た。

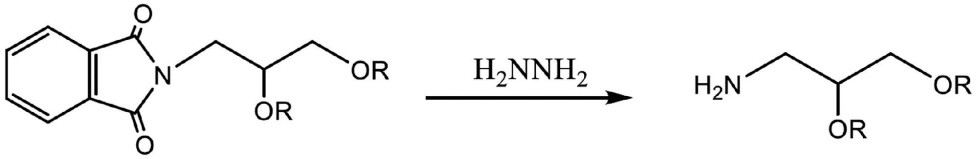


4 5

【０１２４】

産物5の調製

乾燥した1 Lのガラスの反応器に乾燥したアルゴンガスを通し、22 gの産物4と19 gのフタルイミドカリウムを混合して400 mLのDMF溶液に溶解させ、70℃まで昇温して一晩攪拌し、黄色の懸濁液を得た。溶液を室温まで冷却して、800 mLの氷水に入れた。水相を酢酸エチルで洗浄した。有機相を合併し、それぞれ水とNaCl溶液で洗浄し、そして無水硫酸マグネシウムにより乾燥した。真空ポンプで有機溶剤を除去した。混合物を500 mlのn-ヘキサンに溶解させ、ろ過してから100 mLのヘキサンで洗浄した。回転蒸発により有機溶剤を除去し、20.7 gののワックス状粗製品を得た。粗製品をシリカゲルカラムにより精製し（粒径230-400 mesh，使用量600 mL）、0-5% 酢酸エチル/n-ヘキサンを流動相として勾配溶出した。純品の白色のワックス状の産物5を13.4 g得た。

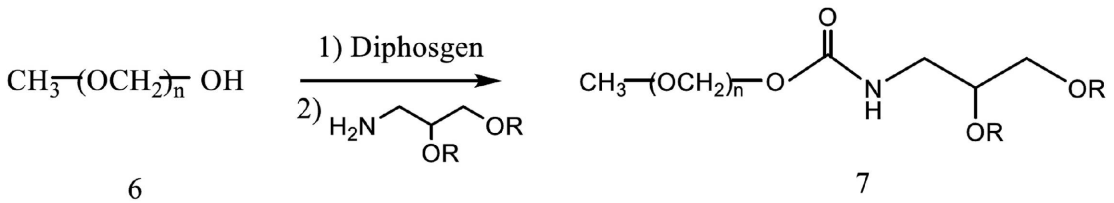


5 6

【０１２５】

産物6の調製

13.4 gの産物5と15.8 mLのヒドラジン水和物を300 mLのエタノール溶液に溶解させ、一晩還流して、白色の固体を得た。反応液を室温まで冷却して、ろ過した。固体をエタノール（100 mL）で二回洗浄した。有機相を合併し、回転蒸発により有機溶剤を除去し、500 mLのクロロホルムに溶解させ、ろ過した。固体を100 mLのクロロホルムで一回洗浄した。有機相を合併し、それぞれ水とNaCl溶液で洗浄し、そして無水硫酸マグネシウムにより乾燥した。真空ポンプで有機溶剤を除去し、浅色の油状粗製品を10.6 g得た。シリカゲルカラムにより精製し（粒径230-400 mesh，使用量300 mL）、0-10% メタノール/クロロホルムを流動相として勾配溶出した。浅色の油状粗製品を10 g得た。



6 7

【０１２６】

産物7の調製

29.5 gのモノメトキシポリエチレングリコール2000を150 mLの無水ベンゼンに溶解させ、回転蒸発により有機溶剤を除去した。産物を250 mLの無水ジクロロメタンに溶解させ、乾燥した1 Lのガラス反応器に入れて、アルゴンガスを通した。7.3 gのクロロぎ酸トリクロロメチルを加え、室温で3時間攪拌した。回転蒸発により有機溶剤を除去し、150 mlの無水ベンゼンを加え、回転蒸発により有機溶剤を除去した。10 gの産物6を

150 mLのジクロロメタンに溶解させ、3.2 mLのトリエチルアミンを加え、アルゴンガスの保護で1 Lの反応システムに加え、室温で一晩攪拌した。反応産物を200 mLのジクロロメタンで希釈した。有機相を1% のHCl溶液で洗浄し、そしてそれぞれ水、0.1%の炭酸ナトリウム溶液、水と飽和NaCl溶液で洗浄し、最後に無水硫酸マグネシウムにより乾燥した。真空で有機溶剤を除去し後、浅色のスラリー状粗製品を46 g得た。粗製品をシリカゲルカラムにより精製し（粒径230-400 mesh，使用量1600 mL）た。0-10%のメタノール/クロロホルムを流動相として勾配溶出し、製品PEG-c-DMAと残りの反応物を得、白色又は淡黄色のワックス状物であった。ワックス状混合物を150 mlのエーテルに入れて、未反応の反応物を溶解させた。ろ過し、エーテルにより固体を二回洗浄し、固体を真空乾燥し、32.2 gの産物7を得た。^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ:5.15 (1H, m, NH), 4.21 (2H, m, CH2), 3.80-3.1 (8H, m), 3.60 (130H, s, OCH2CH2O), 3.34 (3H, s, OCH3), 2.42 (2H, m, NCH2), 1.49 (4H, m, 2 x CH2), 1.21 (44H, s, 22 x CH2), 0.84 (6H, t, 2 x CH3) ppm。

【0127】

脂質の保存液の調製：D-Lin-MC3脂質、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、つまりDSPC（Avanti Polar Lipid, 850365）、コレステロール（Sigma, C3045）、PEG-c-DMAを室温で約30 min放置してから秤量した。D-Lin-MC3脂質を100%のエタノールで40 mg/mlの保存液を調製し、コレステロールを100%のエタノールで20 mg/mlの保存液を調製し、DSPCを100%のエタノールで20 mg/mlの保存液を調製した。長時間作用型脂質を100%のエタノールで50 mg/mlの保存液を調製した。

【0128】

予め形成された小胞（pre-formed vesicles, PFV）の調製：D-Lin-MC3、コレステロール、DSPC、PEG-c-DMAを40：40：10：10のモル比で無水エタノールにより脂質エタノール溶液に調製し、各脂質の必要量を表9に示す。全ての脂質が溶解した後、攪拌しながら、エタノールの最終濃度が30%（v/v）になるように上記の脂質エタノール溶液を製剤緩衝液（50 mMクエン酸、pH 3.0）に入れた。室温で、ニュークリポアメンブレン（Nuclepore Membrane）層を備えたAvantiリポソーム押出機により繰り返し押し出し、粒子サイズが均一なPFVを得た。押出機を通過したPFVは、粒径分析装置で粒径を測定した。

【0129】

表9. F113製剤における各脂質の必要量

総体積:10 ml		
エタノール体積:3 ml、エタノールの濃度が30%(v/v)		
脂質	濃度 (mg/ml)	必要量 (ml)
D-Lin-MC3	40	1.25
DSPC	20	0.462
コレステロール	20	0.904
PEG-c-DMA	50	0.596
追加エタノール		0.286

【0130】

siRNA（DS03-432i）とsaRNA（RAG3-151/DS03-0024）リポソーム製剤の調製：必要な体積のPFVを15 ml Falcon管に入れて、35度の水浴中に5 minプレバランスした。それぞれ200 μl（8.2 mg/ml）のsiRNA（DS03-432i）とsaRNA（DS03-0024）の保存液をRNA保存液/製剤緩衝液/エタノール溶液=200 μl/100 μl/100 μlの比例で0.4 mlのsiRNA/製剤緩衝液/エタノール溶液とsaRNA/製剤緩衝液/エタノール溶液を調製し、そしてsiRNA（DS03-432i）又はsaRNA（RAG3-151/DS03-0024）/製剤緩衝液/エタノール溶液を上記PFVにゆっくり入れて、35℃で30 minインキ

ュベートした。透析バッグMD24で上記siRNA（DS03-432i）とsaRNA（RAG3-151/DS03-0024）リポソーム製剤を透析し、1×リン酸塩緩衝液（phosphate-buffered saline, PBS）を一晩透析して、透析後の産物を回収し、本実験で使用されるLNP封入のオリゴヌクレオチドを得た。0.2 μmシリンジフィルターを使用してLNP封入したオリゴヌクレオチドをろ過し滅菌し、封入率を検出するために20 μlの滅菌済み産物を取った。

【０１３１】

（2）マウスにLNP封入のオリゴヌクレオチドの尾静脈注射を実施

6～8週齢で、体重が約25 gの雄Balb/cマウス（北京斯貝福生物技術有限公司）を15匹準備した。マウス動物室で3日間適応させ、体重により3つの群に分け、各群に5匹ずつがおり、それぞれ対照群（PBS）、LNP封入群Thpo-siRNA（DS03-432i, 5 mg/kg）群とLNP封入Thpo-saRNA（RAG3-151/DS03-0024, 5 mg/kg）群であった。20 ml/kg の使用量で尾静脈注射により投与した。投与72時間後、マウスをイソフルランで麻酔し、血清THPOタンパク質濃度の分析のために心臓穿刺により200μlの血液を採取した。マウスの採血が完了した後、二酸化炭素吸入窒息法によりマウスを死なせた。操作方法は、安楽死させる実験用マウスを密閉可能な実験用ボックスに入れ、大量の二酸化炭素を放出し、実験用マウスを窒息死させることである。

（3）ELISAによりマウスの血清THPOたんぱく質を検出

【０１３２】

マウス全血40 μlを取り、室温で30分間放置し、遠心分離（4℃, 13000 rpm, 15 min）により血清を収集した。マウスTHPO ELISA キット（R&D Systems, MTP00）により血清中のTHPO含有量を検出した。キットに同封された説明書により操作し、操作過程は以下のようである。十分なスラット（キットに付属）を用意して、各群に二つの重複ウェルを設けて、ウェルごとに先に50 μlのRD1-23を入れて、更にそれぞれ50 μlの標準品、対照品とサンプルを入れて、スラットを軽く叩き均一にさせて、室温で 2時間放置した。液体を放棄し400 μlの洗浄緩衝液で4回洗浄し、ウェルごとに100 μlのマウスThpoのカップリング物を入れ、室温で 2時間放置した。液体を放棄し400 μlの洗浄緩衝液で4回洗浄し、ウェルごとに100 μlの基質反応液を入れ、光を避けて室温で30分間放置した。反応が終わったら、ウェル毎に100 μlの停止液を加え、スラットを軽く叩き均一にさせて、マイクロプレートリーダー（Infinite M200 Pro）により450 nmでの吸光度を測定した。既知の標準濃度（4000 pg/ml、キットに付属）を使用して、保証曲線を作成した。試験サンプルの吸光度からブランク対照（0 pg/ml）の吸光値を差し引いた後、検量線に従ってTHPOタンパク質濃度（pg/ml）を計算した。

（4）統計学分析

【０１３３】

連続変数群間の差異は一元配置分散分析（ANOVA）によって比較され、複数の群間の比較はTukey’sの多重比較分析によって行われた。P値が0.05未満の場合は有意差あるとする。

【０１３４】

図6は、異なる処理群のマウスの血清Thpoタンパク質濃度を示している。対照群（PBS）と比較して、LNP封入Thpo-siRNA（DS03-432i）群のThpoタンパク質含有量は16.1％減少し、統計的に有意であった（P〈0.001）。これは、LNP封入のThpo-siRNA（DS03-432i）がThpo-siRNAをマウス体内に効果的に送達でき、マウス体内のThpo-siRNAタンパク質の含有量を大幅に減らすことができることを示し、これは、想定と一致し、invitro細胞実験の結果と一致している。LNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024）群のThpoたんぱく質含有量が対照群と比べ32.9％し、両方とも顕著な統計的有意性（P〈0.001）を持っている。これは、LNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024）がThpo-saRNAをマウス体内に効果的に送達でき、マウス体内のThpoタンパク質の含有量を大幅に増加できることを示している。N（サンプル数）=5； ***はP〈0.001を表す。

【０１３５】

実施例7 マウスの尾静脈によるsaRNAの送達が血清Thpoのレベル及び末梢血血小板の数量を増加

（1）6～8週齢で、体重が28-30 gの雄Balb/cマウス（揚州大学比較医学センター）を32匹準備した。マウス動物室で7日間適応させ、体重により4つの群に分け、各群に8匹ずつがおり、それぞれ対照群（PBS）及び3つの使用量が異なるLNP封入Thpo-saRNA（DS03-0024, 1 mg/kg、DS03-0024, 3 mg/kg とDS03-0024, 6 mg/kg）群であった。10 ml/kg の用量で尾静脈注射により投与した。投与の1日前と投与後2、4、6、9日目に、血清Thpo濃度と末梢血小板数を分析するよう、それぞれ尾静脈から40 μlの血液を採取し、投与後 17日目に末梢血血小板数を分析するよう、イソフルランでマウスを麻酔して心臓穿刺により約800 μl採血した。マウスの採血が完了した後、二酸化炭素吸入窒息法によりマウスを死なせた。操作方法は、安楽死させる実験用マウスを密閉可能な実験用ボックスに入れ、大量の二酸化炭素を放出し、実験用マウスを窒息死させることである。

【0136】

（2）マウス末梢血の血小板検出

5 μlの全血を取り、5 μlの 0.01%のヘパリンと混合し、さらに 90 μlの生理食塩水を加えて100 μl（1：20希釈）まで希釈し、軽く均一に混合してから、200 μlの血小板分離液（ Solarbio, P1620）の上層に加え250 ×g室温で15分間遠心して、20 μlの最上層の血小板濃縮層を収集した。上記で収集した上澄に80 μlの1× FASC standing buffer（R&D Systems, FC001）を加え、さらに1 μlの CD41a抗体（ThermoFisher, 11-0411-82）を加え、血小板と結合し、均一に混合し、室温で光を避けて30分間放置した。結合が完了してから、室温（800 g, 5 min）で遠心し、沈殿物を200 μlのPBSで再懸濁させ、酵素標識検出プレートに移して血小板含有量を検出した。オリゴヌクレオチド製剤の調製とマウスにLNP封入のオリゴヌクレオチドの尾静脈注射方法は実施例6に記載のとおりである。

【0137】

図7は、異なる処理群のThpo saRNAがマウス血清Thpoのタンパク質濃度を増加させる図である。図Aに示されるように、投与前日のマウス血清Thpoたんぱく質のベースライン濃度は、4つの群でマウス血清Thpo蛋白レベルに有意差はなかった。図Bは、投与後2日目のマウス血清Thpo濃度を示している。対照群（ PBS）と比べ、DS03-0024-3 mg/kg群の血清THPOレベルは上昇傾向を示したが、統計学的有意性はなかった。一方、DS03-0024-6 mg/kg群のThpo蛋白濃度は23.9%上昇し、極めて顕著な統計学有意性を表した（P〈0.0001）。これは、LNP封入のThpo-saRNAがThpo-saRNAを迅速で効果的に送達でき、マウス血清のThpoタンパク質の濃度を大幅に増加できることを示している。

【0138】

図8にはThpo saRNA投与後6日目のマウス血小板数の増加を示す。対照群（PBS）と比べ、LNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024, 1 mg/kgとDS03-0024, 3 mg/kg）の2つの群は統計学有意性がなかったが、顕著な上昇傾向が見られ、特にLNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024, 3 mg/kg）群であり、血小板の数量は88.6%増加した。LNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024, 6 mg/kg）群の血小板の数量は138.7%増加し、統計学有意性（P〈0.05）を持っている。これは、投与後6日目のLNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024, 6 mg/kg）が血小板を数量を増加できることを示している。

【0139】

図9にはThpo saRNA投与後17日目のマウス血小板数の増加を示す。投与後17日目に血小板の数量を検出し、対照群（PBS）と比べて、そのうちの2つの群のLNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024, 1 mg/kgとDS03-0024, 3mg/kg）の血小板の数量はいずれも明らかに上昇し、血小板の数量はそれぞれ53.8%と53.9%増加し、統計学有意性（P〈0.05）を持っている。LNP封入のThpo-saRNA（DS03-0024, 6 mg/kg）群の血小板の数量は上昇傾向であった。これはsaRNAによる血小板数量の増加が少なくとも17

日間持続できることを示唆している。

【０１４０】

実施例8 ヒトTHPO遺伝子プロモーターに標的化するsaRNAの設計及び合成

ヒトTHPO遺伝子発現を活性化できる機能性saRNAをスクリーンするため、THPO 1382 bpのプロモーター配列をテンプレートとし、TSS上流-1382 bpの位置から大きさが19 bpの標的を選定する。その後、標的配列をフィルタリング処理し、1）GC含有量が40％～65％の間であり、2）5個以上の連続的に同一のヌクレオチドを含まなく、3）3個より多いジヌクレオチド反復配列を含まなく、4）3個より多いトリヌクレオチド反復配列を含まないことを基準として標的配列を保留する。フィルタリング後、残りの833個の標的配列は候補としてスクリーニングプロセスに移行した。これらの候補配列により、対応する二本鎖saRNAを化学合成した。

【０１４１】

該実験に使用されるsaRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖のいずれの長さも21ヌクレオチドであり、前記saRNAの第1リボ核酸鎖（センス鎖）の5’領域の19個のヌクレオチドはプロモーターの標的配列とは100％の同一性を有し、その3’末端にはTT配列を有し、第2リボ核酸鎖の5’領域の19個のヌクレオチドは第1リボ核酸鎖配列と相補し、その3’末端にはTT配列を有する。前記saRNAの2本の鎖を同量のモル数で混合し、アニーリング後に二本鎖saRNAを形成した。

【０１４２】

ヒトTHPOプロモーター配列は以下に示され、配列表のSEQ ID No：600の5’～3’の位置1～位置-1382に対応する。

-1382 gtccatcagc cgatctcccc ctgcctgggc ccacagcgcc ccccaaaccc
-1332 tcaccaccct ctctcactgc ctagcctgcc tccctacctt ctctctgagg
-1282 tcgctcctca ttcttgtgtt acccaggaca gggacctagc cagaaaccgg
-1232 cagcattccc ccttctgtgg agtgacagta tctccctctc attgtaactt
-1182 atcctcaggc gcattcgaca gtcccctctt gctttctcac ccccttcctt
-1132 cacccaaggg accctctgcc tctccagccc actcccagcc tcctttctct
-1082 tggttccctg gtcatgcctg cctccctgtc tcctgtctct ccctcccaca
-1032 cacacccact atcctcccag ctatcccagc accctccttc ctaatcttgg
-982 gagacatctc gtctggctgg acgggaaaat tccaggatct aggccacact
-932 tctcagcaga catgcccatc cttggggagg aggaacagga gagagcctga
-882 ggaagttctg ggggacaggg ggatgatggg atcaaggtca ggccaggaag
-832 cccctgagga cagagactgt gggggagactg ggactgggaa gaaagcaaag
-782 gagctagagc cagggccaaa ggaaaagggg ggccagcagg gaggtatttg
-732 cgggggaggt ccagcagctg tctttcctaa gacagggaca catgggcctg
-682 gttattcctc ttgtcacatg tggaacggta ggagatggaa gacggagaca
-632 gaacaagcaa aggagggccc tgggcacaga ggtctgtgtg tgtagccatc
-582 taagccactg gaccccagca gacgagcacc taagctcagg cttaacccag
-532 tgcacgtgtg cgcacataca tgtgccccgc acctgacagt ccactcaacc
-482 cgtccaaacc ctttccccat aacaccaacc cataacagga gatttctctc
-432 atgtgggcaa tatccgtgtt cccacttcga aaggggggaat gacaagatag
-382 gactccctag gggattacag aaagaaaagc aggaaagcaa gcatcctgtt
-332 ggatttcagc agcaggtatg atgtccaggg aaaagaaatt tggatagcca
-282 gggagtgaaa accccaccaa tcttaaacaa gacctctgtg cttcttcccc
-232 agcaacacaa atgtcctgcc agattcctcc tggaaaaaaa cttctgctcc
-182 tgtccccctc caggtcccag gttgcccatg tccaggaaaa gatggatccc
-132 cctatccaaa tcttctccgt ggtgtgtgtg ggtggaggag tggaccctgg
-82 tccaggcagg ggctccaggg aagagaaggc gtcacttccg ggggccttca
-32 ccagtgtctg gtggctccct tctctgattg gg

【０１４３】

実施例9 ヒトTHPOプロモーターに標的化するsaRNAのハイスループットスクリーニング
（1）細胞培養及びトランスフェクション
ヒト肝癌細胞HepG2（ATCC）を10%子牛血清（Sigma-Aldrich）と1%ペニシリン/ストレプトマイシン（Gibco）を含有するMEM培地（Gibco）で培養した。細胞を5% CO_2、37℃の条件下で培養した。HepG2細胞を5000／ウェルで96ウェルプレートに敷き、メーカーの指示に従って、RNAiMax（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて25 nMの濃度で小分子活性化RNAをトランスフェクションし、トランスフェクション時間が72時間であり、処理ごとに2つの重複ウェルを利用した。

【０１４４】

（2）ワンステップ法RT-qPCR
トランスフェクション終了後、培地を捨てて、1ウェルあたりPBS 150 μlを加えて1回洗浄し、PBSを捨てて、1ウェルあたり細胞溶解液50 μlを加え、室温で5分間インキュベートした。ウェルあたり細胞溶解液を1 μl取り、ワンステップ法TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR キット II（Takara,RR086A）を使用した。
ABI 7500 高速リアルタイム（Fast Real-time）PCRシステム（Applied Biosystems）にてqPCR分析を行い、サンプルごとに3個のウェルを繰り返して増幅させ、PCR反応条件を表1に示す。

【０１４５】

表10. PCR反応の調製

試薬	体積
2×ワンステップ法TB Green RT-PCR 緩衝液4	2.5 μl
PrimeScript 1 step 酵素混合物2	0.2 μl
正方向及び逆方向プライマー混合物（5 μM）	0.4 μl
RNaseフリー dH_2O	1.4 μl
粗製溶解物（RNA）	0.5 μl
合計	5 μl

【０１４６】

反応条件としては、段階1 逆転写反応：42℃、5分間；95℃ 10秒；段階2 PCR反応：95℃ 5秒、60℃ 20 秒、増幅45サイクルである。TBPを内部参照遺伝子とする。THPO及びTBP用のPCRプライマーは、表10に示す。そのうち、THPOは、THPO F1/R1プライマー対で増幅される。

表11. RT-qPCR解析のプライマー配列

プライマー名	配列番号	配列（5'-3'）
THPO F	SEQ ID NO:309	TCGTGACTCCCATGTCCTTC
THPO R	SEQ ID NO:310	TGCCTTGGTCTCCTCCATCT
TBP F	SEQ ID NO:311	TGCTCACCCACCAACAATTTAG
TBP R	SEQ ID NO:312	TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG
HPRT1 F	SEQ ID NO:313	AAAGATGGTCAAGGTCGCAAG
HPRT1 R	SEQ ID NO:314	TAGTCAAGGGCATATCCTACAAC

【０１４７】

あるsaRNAトランスフェクションサンプルのTHPO（目標遺伝子）の、対照処理（Mock）に対する発現値（Erel）を計算するために、実施例3の式2に目標遺伝子及び1個の内部参照遺伝子のCt値を代入して計算した。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / 2^{(CtRm-CtRs)} \quad （式2）$$

【０１４８】

式中、CtTmはMockサンプルからの目的遺伝子のCt値であり、CtTsはsaRNA処理サンプルからの目的遺伝子のCt値であり、CtRmはMock処理サンプルからの内部参照遺伝子のCt値であり、CtRsはsaRNA処理サンプルからの内部参照遺伝子のCt値である。

（3）機能性saRNAのスクリーニング

【０１４９】

活性化THPOで転写させたsaRNAを得るために、上記833個のsaRNAを用いて25 nMのトランスフェクション濃度でそれぞれHepG2細胞をトランスフェクションし、72時間後、前記と同様な方法により、細胞を溶解し、ワンステップ法RT-qPCRにより分析し、各saRNA処理サンプルのTHPO遺伝子の相対（対照処理群と比較して）発現値を得た。表11に示されるように、158（19 %）個のsaRNAは高度活性化作用を示し、243（29.2 %）個のsaRNAは軽度活性化作用を示し、432（51.8 %）個のsaRNAは、THPOの発現に影響しない。活性化の最大程度は5.15倍、最大抑制程度は0.09倍であり、これら活性化活性を有するsaRNAは活性化saRNAと呼ばれる。

表12. ヒトTHPO saRNAハイスループットスクリーニング結果のまとめ

saRNAの活性の分類	THPO mRNAの変化幅の$\log_2$値（倍数）	saRNA数	パーセンテージ
高度活性化	≥ 0.58 (1.50) ~ ≤ 2.36（5.15）	158	19 %
軽度活性化	≥ 0.13 (1.10)~＜0.58 (1.50)	243	29.2 %
活性化作用無し	＜0.13 (1.10)	432	51.8 %
合計		833	100%

【０１５０】

図10に、更にヒトTHPO saRNA的THPO発現変化が降順で示されている。そのうち、THPO活性saRNA配列及びTHPOmRNA発現変化は表13に示されている。

表13. ヒト活性saRNA配列、その標的配列、及びそれによるTHPO mRNA発現変化

saRNA	標的配列(5'-3')	saRNAセンス配列(5'-3')	saRNAアンチセンス配列(5'-3')	THPO mRNA 相対発現変化倍数
RAG3A-889	AGCCTGAGGAAGTTCTGGG (SEQ ID NO:606)	AGCCUGAGGAAGUUCUGGGTT (SEQ ID NO:1048)	CCCAGAACUUCCUCAGGCUTT (SEQ ID NO:1490)	5.1
RAG3A-723	TCCAGCAGCTGTCTTTCCT (SEQ ID NO:607)	UCCAGCAGCUGUCUUUCCUTT (SEQ ID NO:1049)	AGGAAAGACAGCUGCUGGATT (SEQ ID NO:1491)	4.1
RAG3A-1069	ATGCCTGCCTCCCTGTCTC (SEQ ID NO:608)	AUGCCUGCCUCCCUGUCUCTT (SEQ ID NO:1050)	GAGACAGGGAGGCAGGCAUTT (SEQ ID NO:1492)	4
RAG3A-541	TTAACCCAGTGCACGTGTG (SEQ ID NO:609)	UUAACCCAGUGCACGUGUGTT (SEQ ID NO:1051)	CACACGUGCACUGGGUUAATT (SEQ ID NO:1493)	3.4
RAG3A-480	TCCAAACCCTTTCCCCATA (SEQ ID NO:610)	UCCAAACCCUUUCCCCAUATT (SEQ ID NO:1052)	UAUGGGGAAAGGGUUUGGATT (SEQ ID NO:1494)	3.1
RAG3A-980	GACATCTCGTCTGGCTGGA (SEQ ID NO:611)	GACAUCUCGUCUGGCUGGATT (SEQ ID NO:1053)	UCCAGCCAGACGAGAUGUCTT (SEQ ID NO:1495)	3.1
RAG3A-462	AACACCAACCCATAACAGG (SEQ ID NO:612)	AACACCAACCCAUAACAGGTT (SEQ ID NO:1054)	CCUGUUAUGGGUUGGUGUUTT (SEQ ID NO:1496)	3
RAG3A-787	CAAAGGAGCTAGAGCCAGG (SEQ ID NO:613)	CAAAGGAGCUAGAGCCAGGTT (SEQ ID NO:1055)	CCUGGCUCUAGCUCCCUUUGTT (SEQ ID NO:1497)	2.9
RAG3A-232	AGCAACACAAATGTCCTGC (SEQ ID NO:614)	AGCAACACAAAUGUCCUGCTT (SEQ ID NO:1056)	GCAGGACAUUUGUGUUGCUTT (SEQ ID NO:1498)	2.9
RAG3A-727	GAGGTCCAGCAGCTGTCTT (SEQ ID NO:615)	GAGGUCCAGCAGCUGUCUUTT (SEQ ID NO:1057)	AAGACAGCUGCUGGACCUCTT (SEQ ID NO:1499)	2.9
RAG3A-542	CTTAACCCAGTGCACGTGT (SEQ ID NO:616)	CUUAACCCAGUGCACGUGUTT (SEQ ID NO:1058)	ACACGUGCACUGGGUUAAGTT (SEQ ID NO:1500)	2.8
RAG3A-748	AGCAGGGAGGTATTTGCGG (SEQ ID NO:617)	AGCAGGGAGGUAUUUGCGGTT (SEQ ID NO:1059)	CCGCAAAUACCUCCCUGCUTT (SEQ ID NO:1501)	2.8
RAG3A-540	TAACCCAGTGCACGTGTGC (SEQ ID NO:618)	UAACCCAGUGCACGUGUGCTT (SEQ ID NO:1060)	GCACACGUGCACUGGGUUATT (SEQ ID NO:1502)	2.8
RAG3A-1219	TCTGTGGAGTGACAGTATC (SEQ ID NO:619)	UCUGUGGAGUGACAGUAUCTT (SEQ ID NO:1061)	GAUACUGUCACUCCACAGATT (SEQ ID NO:1503)	2.8
RAG3A-487	CAACCCGTCCAAACCCTTT (SEQ ID NO:620)	CAACCCGUCCAAACCCUUUTT (SEQ ID NO:1062)	AAAGGGUUUGGGACGGGUUGTT (SEQ ID NO:1504)	2.7
RAG3A-559	GAGCACCTAAGCTCAGGCT (SEQ ID NO:621)	GAGCACCUAAGCUCAGGCUTT (SEQ ID NO:1063)	AGCCUGAGCUUAGGUGCUCTT (SEQ ID NO:1505)	2.7

RAG3A-1308	CCTGCCTCCCTACCTTCTC (SEQ ID NO:622)	CCUGCCUCCCUACCUUCUCTT (SEQ ID NO:1064)	GAGAAGGUAGGGAGGCAGGTT (SEQ ID NO:1506)	2.7
RAG3A-24	TGGTGGCTCCCTTCTCTGA (SEQ ID NO:623)	UGGUGGCUCCCUUCUCUGATT (SEQ ID NO:1065)	UCAGAGAAGGGAGCCACCATT (SEQ ID NO:1507)	2.6
RAG3A-1169	TTCGACAGTCCCCTCTTGC (SEQ ID NO:624)	UUCGACAGUCCCCUCUUGCTT (SEQ ID NO:1066)	GCAAGAGGGACUGUCGAATT (SEQ ID NO:1508)	2.6
RAG3A-1256	GACAGGGACCTAGCCAGAA (SEQ ID NO:625)	GACAGGGACCUAGCCAGAATT (SEQ ID NO:1067)	UUCUGGCUAGGUCCCUGUCTT (SEQ ID NO:1509)	2.6
RAG3A-522	CGCACATACATGTGCCCCG (SEQ ID NO:626)	CGCACAUACAUGUGCCCCGTT (SEQ ID NO:1068)	CGGGGCACAUGUAUGUGCGTT (SEQ ID NO:1510)	2.6
RAG3A-851	TCAAGGTCAGGCCAGGAAG (SEQ ID NO:627)	UCAAGGUCAGGCCAGGAAGTT (SEQ ID NO:1069)	CUUCCUGGCCUGACCUUGATT (SEQ ID NO:1511)	2.6
RAG3A-1096	AGCCTCCTTTCTCTTGGTT (SEQ ID NO:628)	AGCCUCCUUUCUCUUGGUUTT (SEQ ID NO:1070)	AACCAAGAGAAAGGAGGCUTT (SEQ ID NO:1512)	2.5
RAG3A-227	CACAAATGTCCTGCCAGAT (SEQ ID NO:629)	CACAAAUGUCCUGCCAGAUTT (SEQ ID NO:1071)	AUCUGGCAGGACAUUUGUGTT (SEQ ID NO:1513)	2.5
RAG3A-1178	TCAGGCGCATTCGACAGTC (SEQ ID NO:630)	UCAGGCGCAUUCGACAGUCTT (SEQ ID NO:1072)	GACUGUCGAAUGCGCCUGATT (SEQ ID NO:1514)	2.5
RAG3A-544	GGCTTAACCCAGTGCACGT (SEQ ID NO:631)	GGCUUAACCCAGUGCACGUTT (SEQ ID NO:1073)	ACGUGCACUGGGUUAAGCCTT (SEQ ID NO:1515)	2.5
RAG3A-836	GAAGCCCCTGAGGACAGAG (SEQ ID NO:632)	GAAGCCCCUGAGGACAGAGTT (SEQ ID NO:1074)	CUCUGUCCUCAGGGGCUUCTT (SEQ ID NO:1516)	2.4
RAG3A-569	CCCAGCAGACGAGCACCTA (SEQ ID NO:633)	CCCAGCAGACGAGCACCUATT (SEQ ID NO:1075)	UAGGUGCUCGUCUGCUGGGTT (SEQ ID NO:1517)	2.4
RAG3A-1320	CTCACTGCCTAGCCTGCCT (SEQ ID NO:634)	CUCACUGCCUAGCCUGCCUTT (SEQ ID NO:1076)	AGGCAGGCUAGGCAGUGAGTT (SEQ ID NO:1518)	2.4
RAG3A-1319	TCACTGCCTAGCCTGCCTC (SEQ ID NO:635)	UCACUGCCUAGCCUGCCUCTT (SEQ ID NO:1077)	GAGGCAGGCUAGGCAGUGATT (SEQ ID NO:1519)	2.3
RAG3A-290	GATAGCCAGGGAGTGAAAA (SEQ ID NO:636)	GAUAGCCAGGGAGUGAAAATT (SEQ ID NO:1078)	UUUUCACUCCCUGGCUAUCTT (SEQ ID NO:1520)	2.3
RAG3A-1074	TGGTCATGCCTGCCTCCCT (SEQ ID NO:637)	UGGUCAUGCCUGCCUCCCUTT (SEQ ID NO:1079)	AGGGAGGCAGGCAUGACCATT (SEQ ID NO:1521)	2.2
RAG3A-279	AGTGAAAACCCCACCAATC (SEQ ID NO:638)	AGUGAAAACCCCACCAAUCTT (SEQ ID NO:1080)	GAUUGGUGGGGUUUUCACUTT (SEQ ID NO:1522)	2.2
RAG3A-521	GCACATACATGTGCCCCGC (SEQ ID NO:639)	GCACAUACAUGUGCCCCGCTT (SEQ ID NO:1081)	GCGGGGCACAUGUAUGUGCTT (SEQ ID NO:1523)	2.2

RAG3A-25	CTGGTGGCTCCCTTCTCTG (SEQ ID NO:640)	CUGGUGGCUCCCUUCUCUGTT (SEQ ID NO:1082)	CAGAGAAGGGAGCCACCAGTT (SEQ ID NO:1524)	2.1
RAG3A-62	AAGAGAAGGCGTCACTTCC (SEQ ID NO:641)	AAGAGAAGGCGUCACUUCCTT (SEQ ID NO:1083)	GGAAGUGACGCCUUCUCUUTT (SEQ ID NO:1525)	2.1
RAG3A-852	ATCAAGGTCAGGCCAGGAA (SEQ ID NO:642)	AUCAAGGUCAGGCCAGGAATT (SEQ ID NO:1084)	UUCCUGGCCUGACCUUGAUTT (SEQ ID NO:1526)	2.1
RAG3A-931	CTCAGCAGACATGCCCATC (SEQ ID NO:643)	CUCAGCAGACAUGCCCAUCTT (SEQ ID NO:1085)	GAUGGGCAUGUCUGCUGAGTT (SEQ ID NO:1527)	2.1
RAG3A-892	GAGAGCCTGAGGAAGTTCT (SEQ ID NO:644)	GAGAGCCUGAGGAAGUUCUTT (SEQ ID NO:1086)	AGAACUUCCUCAGGCUCUCTT (SEQ ID NO:1528)	2
RAG3A-235	CCCAGCAACACACAAATGTCC (SEQ ID NO:645)	CCCAGCAACACACAAAUGUCCTT (SEQ ID NO:1087)	GGACAUUUGUGUUGCUGGGTT (SEQ ID NO:1529)	2
RAG3A-1246	TAGCCAGAAACCGGCAGCA (SEQ ID NO:646)	UAGCCAGAAACCGGCAGCATT (SEQ ID NO:1088)	UGCUGCCGGUUUCUGGCUATT (SEQ ID NO:1530)	2
RAG3A-19	GCTCCCTTCTCTGATTGGG (SEQ ID NO:647)	GCUCCCUUCUCUGAUUGGGTT (SEQ ID NO:1089)	CCCAAUCAGAGAAGGGAGCTT (SEQ ID NO:1531)	2
RAG3A-1322	CTCTCACTGCCTAGCCTGC (SEQ ID NO:648)	CUCUCACUGCCUAGCCUGCTT (SEQ ID NO:1090)	GCAGGCUAGGCAGUGAGAGTT (SEQ ID NO:1532)	2
RAG3A-795	GAAGAAAGCAAAGGAGCTA (SEQ ID NO:649)	GAAGAAAGCAAAGGAGCUATT (SEQ ID NO:1091)	UAGCUCCUUUGCUUUCUUCTT (SEQ ID NO:1533)	2
RAG3A-515	ACATGTGCCCCCGCACCTGA (SEQ ID NO:650)	ACAUGUGCCCCCGCACCUGATT (SEQ ID NO:1092)	UCAGGUGCGGGGCACAUGUTT (SEQ ID NO:1534)	2
RAG3A-128	TCCAAATCTTCTCCGTGGT (SEQ ID NO:651)	UCCAAAUCUUCUCCGUGGUTT (SEQ ID NO:1093)	ACCACGGAGAAGAUUUGGATT (SEQ ID NO:1535)	2
RAG3A-661	GGAACGGTAGGAGATGGAA (SEQ ID NO:652)	GGAACGGUAGGAGAUGGAATT (SEQ ID NO:1094)	UUCCAUCUCCUACCGUUCCTT (SEQ ID NO:1536)	2
RAG3A-125	AAATCTTCTCCGTGGTGTG (SEQ ID NO:653)	AAAUCUUCUCCGUGGUGUGTT (SEQ ID NO:1095)	CACACCACGGAGAAGAUUUTT (SEQ ID NO:1537)	2
RAG3A-1241	AGAAACCGGCAGCATTCCC (SEQ ID NO:654)	AGAAACCGGCAGCAUUCCCTT (SEQ ID NO:1096)	GGGAAUGCUGCCGGUUUCUTT (SEQ ID NO:1538)	2
RAG3A-463	TAACACCAACCCATAACAG (SEQ ID NO:655)	UAACACCAACCCAUAACAGTT (SEQ ID NO:1097)	CUGUUAUGGGUUGGUGUUATT (SEQ ID NO:1539)	2
RAG3A-434	TCATGTGGGCAATATCCGT (SEQ ID NO:656)	UCAUGUGGGCAAUAUCCGUTT (SEQ ID NO:1098)	ACGGAUAUUGCCCACAUGATT (SEQ ID NO:1540)	1.9
RAG3A-520	CACATACATGTGCCCCGCA (SEQ ID NO:657)	CACAUACAUGUGCCCCGCATT (SEQ ID NO:1099)	UGCGGGGCACAUGUAUGUGTT (SEQ ID NO:1541)	1.9

RAG3A-499	TGACAGTCCACTCAACCCG (SEQ ID NO:658)	UGACAGUCCACUCAACCCGTT (SEQ ID NO:1100)	CGGGUUGAGUGGACUGUCATT (SEQ ID NO:1542)	1.9
RAG3A-668	CACATGTGGAACGGTAGGA (SEQ ID NO:659)	CACAUGUGGAACGGUAGGATT (SEQ ID NO:1101)	UCCUACCGUUCCACAUGUGTT (SEQ ID NO:1543)	1.9
RAG3A-591	GTAGCCATCTAAGCCACTG (SEQ ID NO:660)	GUAGCCAUCUAAGCCACUGTT (SEQ ID NO:1102)	CAGUGGCUUAGAUGGCUACTT (SEQ ID NO:1544)	1.9
RAG3A-1209	GACAGTATCTCCCTCTCAT (SEQ ID NO:661)	GACAGUAUCUCCCUCUCAUTT (SEQ ID NO:1103)	AUGAGAGGGAGAUACUGUCTT (SEQ ID NO:1545)	1.9
RAG3A-1257	GGACAGGGACCTAGCCAGA (SEQ ID NO:662)	GGACAGGGACCUAGCCAGATT (SEQ ID NO:1104)	UCUGGCUAGGUCCCUGUCCTT (SEQ ID NO:1546)	1.9
RAG3A-1170	ATTCGACAGTCCCCTCTTG (SEQ ID NO:663)	AUUCGACAGUCCCCUCUUGTT (SEQ ID NO:1105)	CAAGAGGGGACUGUCGAAUTT (SEQ ID NO:1547)	1.9
RAG3A-39	GCCTTCACCAGTGTCTGGT (SEQ ID NO:664)	GCCUUCACCAGUGUCUGGUTT (SEQ ID NO:1106)	ACCAGACACUGGUGAAGGCTT (SEQ ID NO:1548)	1.9
RAG3A-431	TGTGGGCAATATCCGTGTT (SEQ ID NO:665)	UGUGGGCAAUAUCCGUGUUTT+B50 (SEQ ID NO:1107)	AACACGGAUAUUGCCCACATT (SEQ ID NO:1549)	1.9
RAG3A-1080	GTTCCCTGGTCATGCCTGC (SEQ ID NO:666)	GUUCCCUGGUCAUGCCUGCTT (SEQ ID NO:1108)	GCAGGCAUGACCAGGGAACTT (SEQ ID NO:1550)	1.9
RAG3A-1266	TGTTACCCAGGACAGGGAC (SEQ ID NO:667)	UGUUACCCAGGACAGGGACTT (SEQ ID NO:1109)	GUCCCUGUCCUGGGUAACATT (SEQ ID NO:1551)	1.9
RAG3A-1202	TCTCCCTCTCATTGTAACT (SEQ ID NO:668)	UCUCCCUCUCAUUGUAACUTT (SEQ ID NO:1110)	AGUUACAAUGAGAGGGAGATT (SEQ ID NO:1552)	1.9
RAG3A-979	ACATCTCGTCTGGCTGGAC (SEQ ID NO:669)	ACAUCUCGUCUGGCUGGACTT (SEQ ID NO:1111)	GUCCAGCCAGACGAGAUGUTT (SEQ ID NO:1553)	1.9
RAG3A-343	AGCATCCTGTTGGATTTCA (SEQ ID NO:670)	AGCAUCCUGUUGGAUUUCATT (SEQ ID NO:1112)	UGAAAUCCAACAGGAUGCUTT (SEQ ID NO:1554)	1.9
RAG3A-430	GTGGGCAATATCCGTGTTC (SEQ ID NO:671)	GUGGGCAAUAUCCGUGUUCTT (SEQ ID NO:1113)	GAACACGGAUAUUGCCCACTT (SEQ ID NO:1555)	1.9
RAG3A-319	AGGTATGATGTCCAGGGAA (SEQ ID NO:672)	AGGUAUGAUGUCCAGGGAATT (SEQ ID NO:1114)	UUCCCUGGACAUCAUACCUTT (SEQ ID NO:1556)	1.8
RAG3A-612	TGGGCACAGAGGTCTGTGT (SEQ ID NO:673)	UGGGCACAGAGGUCUGUGUTT (SEQ ID NO:1115)	ACACAGACCUCUGUGCCCATT (SEQ ID NO:1557)	1.8
RAG3A-454	CCCATAACAGGAGATTTCT (SEQ ID NO:674)	CCCAUAACAGGAGAUUUCUTT (SEQ ID NO:1116)	AGAAAUCUCCUGUUAUGGGTT (SEQ ID NO:1558)	1.8
RAG3A-1312	CTAGCCTGCCTCCCTACCT (SEQ ID NO:675)	CUAGCCUGCCUCCCUACCUTT (SEQ ID NO:1117)	AGGUAGGGAGGCAGGCUAGTT (SEQ ID NO:1559)	1.8

RAG3A-342	GCATCCTGTTGGATTTCAG (SEQ ID NO:676)	GCAUCCUGUUGGAUUUCAGTT (SEQ ID NO:1118)	CUGAAAUCCAACAGGAUGCTT (SEQ ID NO:1560)	1.8
RAG3A-1118	TCTGCCTCTCCAGCCCACT (SEQ ID NO:677)	UCUGCCUCUCCAGCCCACUTT (SEQ ID NO:1119)	AGUGGGCUGGAGAGGCAGATT (SEQ ID NO:1561)	1.8
RAG3A-970	CTGGCTGGACGGGAAAATT (SEQ ID NO:678)	CUGGCUGGACGGGAAAAUUTT (SEQ ID NO:1120)	AAUUUUCCCGUCCAGCCAGTT (SEQ ID NO:1562)	1.8
RAG3A-1133	TCACCCAAGGGACCCTCTG (SEQ ID NO:679)	UCACCCAAGGGACCCUCUGTT (SEQ ID NO:1121)	CAGAGGGUCCCUUGGGUGATT (SEQ ID NO:1563)	1.8
RAG3A-689	GGGCCTGGTTATTCCTCTT (SEQ ID NO:680)	GGGCCUGGUUAUUCCUCUUTT (SEQ ID NO:1122)	AAGAGGAAUAACCAGGCCCTT (SEQ ID NO:1564)	1.8
RAG3A-1321	TCTCACTGCCTAGCCTGCC (SEQ ID NO:681)	UCUCACUGCCUAGCCUGCCTT (SEQ ID NO:1123)	GGCAGGCUAGGCAGUGAGATT (SEQ ID NO:1565)	1.8
RAG3A-662	TGGAACGGTAGGAGATGGA (SEQ ID NO:682)	UGGAACGGUAGGAGAUGGATT (SEQ ID NO:1124)	UCCAUCUCCUACCGUUCCATT (SEQ ID NO:1566)	1.8
RAG3A-817	ACTGTGGGGAGACTGGGAC (SEQ ID NO:683)	ACUGUGGGGAGACUGGGACTT (SEQ ID NO:1125)	GUCCCAGUCUCCCCACAGUTT (SEQ ID NO:1567)	1.8
RAG3A-1242	CAGAAACCGGCAGCATTCC (SEQ ID NO:684)	CAGAAACCGGCAGCAUUCCTT (SEQ ID NO:1126)	GGAAUGCUGCCGGUUUCUGTT (SEQ ID NO:1568)	1.8
RAG3A-278	GTGAAAACCCCACCAATCT (SEQ ID NO:685)	GUGAAAACCCCACCAAUCUTT (SEQ ID NO:1127)	AGAUUGGUGGGGUUUUCACTT (SEQ ID NO:1569)	1.8
RAG3A-1210	TGACAGTATCTCCCTCTCA (SEQ ID NO:686)	UGACAGUAUCUCCCUCUCATT (SEQ ID NO:1128)	UGAGAGGGAGAUACUGUCATT (SEQ ID NO:1570)	1.8
RAG3A-1084	CTTGGTTCCCTGGTCATGC (SEQ ID NO:687)	CUUGGUUCCCUGGUCAUGCTT (SEQ ID NO:1129)	GCAUGACCAGGGAACCAAGTT (SEQ ID NO:1571)	1.8
RAG3A-1166	GACAGTCCCCTCTTGCTTT (SEQ ID NO:688)	GACAGUCCCCUCUUGCUUUTT (SEQ ID NO:1130)	AAAGCAAGAGGGGACUGUCTT (SEQ ID NO:1572)	1.8
RAG3A-982	GAGACATCTCGTCTGGCTG (SEQ ID NO:689)	GAGACAUCUCGUCUGGCUGTT (SEQ ID NO:1131)	CAGCCAGACGAGAUGUCUCTT (SEQ ID NO:1573)	1.8
RAG3A-171	AGGTCCCAGGTTGCCCATG (SEQ ID NO:690)	AGGUCCCAGGUUGCCCAUGTT (SEQ ID NO:1132)	CAUGGGCAACCUGGGACCUTT (SEQ ID NO:1574)	1.8
RAG3A-256	ACAAGACCTCTGTGCTTCT (SEQ ID NO:691)	ACAAGACCUCUGUGCUUCUTT (SEQ ID NO:1133)	AGAAGCACAGAGGUCUUGUTT (SEQ ID NO:1575)	1.7
RAG3A-563	AGACGAGCACCTAAGCTCA (SEQ ID NO:692)	AGACGAGCACCUAAGCUCATT (SEQ ID NO:1134)	UGAGCUUAGGUGCUCGUCUTT (SEQ ID NO:1576)	1.7
RAG3A-1176	AGGCGCATTCGACAGTCCC (SEQ ID NO:693)	AGGCGCAUUCGACAGUCCCTT (SEQ ID NO:1135)	GGGACUGUCGAAUGCGCCUTT (SEQ ID NO:1577)	1.7

RAG3A-707	CCTAAGACAGGGACACATG (SEQ ID NO:694)	CCUAAGACAGGGACACAUGTT (SEQ ID NO:1136)	CAUGUGUCCCUGUCUUAGGTT (SEQ ID NO:1578)	1.7
RAG3A-561	ACGAGCACCTAAGCTCAGG (SEQ ID NO:695)	ACGAGCACCUAAGCUCAGGTT (SEQ ID NO:1137)	CCUGAGCUUAGGUGCUCGUTT (SEQ ID NO:1579)	1.7
RAG3A-504	GCACCTGACAGTCCACTCA (SEQ ID NO:696)	GCACCUGACAGUCCACUCATT (SEQ ID NO:1138)	UGAGUGGACUGUCAGGUGCTT (SEQ ID NO:1580)	1.7
RAG3A-195	AAACTTCTGCTCCTGTCCC (SEQ ID NO:697)	AAACUUCUGCUCCUGUCCCTT (SEQ ID NO:1139)	GGGACAGGAGCAGAAGUUUTT (SEQ ID NO:1581)	1.7
RAG3A-850	CAAGGTCAGGCCAGGAAGC (SEQ ID NO:698)	CAAGGUCAGGCCAGGAAGCTT (SEQ ID NO:1140)	GCUUCCUGGCCUGACCUUGTT (SEQ ID NO:1582)	1.7
RAG3A-388	AGATAGGACTCCCTAGGGG (SEQ ID NO:699)	AGAUAGGACUCCCUAGGGGTT (SEQ ID NO:1141)	CCCCUAGGGAGUCCUAUCUTT (SEQ ID NO:1583)	1.7
RAG3A-1079	TTCCCTGGTCATGCCTGCC (SEQ ID NO:700)	UUCCCUGGUCAUGCCUGCCTT (SEQ ID NO:1142)	GGCAGGCAUGACCAGGGAATT (SEQ ID NO:1584)	1.7
RAG3A-1263	TACCCAGGACAGGGACCTA (SEQ ID NO:701)	UACCCAGGACAGGGACCUATT (SEQ ID NO:1143)	UAGGUCCCUGUCCUGGGUATT (SEQ ID NO:1585)	1.7
RAG3A-531	GCACGTGTGCGCACATACA (SEQ ID NO:702)	GCACGUGUGCGCACAUACATT (SEQ ID NO:1144)	UGUAUGUGCGCACACGUGCTT (SEQ ID NO:1586)	1.7
RAG3A-254	AAGACCTCTGTGCTTCTTC (SEQ ID NO:703)	AAGACCUCUGUGCUUCUUCTT (SEQ ID NO:1145)	GAAGAAGCACAGAGGUCUUTT (SEQ ID NO:1587)	1.7
RAG3A-421	ATCCGTGTTCCCACTTCGA (SEQ ID NO:704)	AUCCGUGUUCCCACUUCGATT (SEQ ID NO:1146)	UCGAAGUGGGAACACGGAUTT (SEQ ID NO:1588)	1.7
RAG3A-473	CCTTTCCCCATAACACCAA (SEQ ID NO:705)	CCUUUCCCCAUAACACCAATT (SEQ ID NO:1147)	UUGGUGUUAUGGGGAAAGGTT (SEQ ID NO:1589)	1.7
RAG3A-292	TGGATAGCCCAGGGAGTGAA (SEQ ID NO:706)	UGGAUAGCCCAGGGAGUGAATT (SEQ ID NO:1148)	UUCACUCCCUGGCUAUCCATT (SEQ ID NO:1590)	1.7
RAG3A-283	AGGGAGTGAAAACCCCACC (SEQ ID NO:707)	AGGGAGUGAAAACCCCACCTT (SEQ ID NO:1149)	GGUGGGGUUUUCACUCCCUTT (SEQ ID NO:1591)	1.7
RAG3A-786	AAAGGAGCTAGAGCCAGGG (SEQ ID NO:708)	AAAGGAGCUAGAGCCAGGGTT (SEQ ID NO:1150)	CCCUGGCUCUAGCUCCUUUTT (SEQ ID NO:1592)	1.7
RAG3A-582	TAAGCCACTGGACCCCAGC (SEQ ID NO:709)	UAAGCCACUGGACCCCAGCTT (SEQ ID NO:1151)	GCUGGGGUCCAGUGGGCUUATT (SEQ ID NO:1593)	1.7
RAG3A-933	TTCTCAGCAGACATGCCCA (SEQ ID NO:710)	UUCUCAGCAGACAUGCCCATT (SEQ ID NO:1152)	UGGGCAUGUCUGCUGAGAATT (SEQ ID NO:1594)	1.7
RAG3A-472	CTTTCCCCATAACACCAAC (SEQ ID NO:711)	CUUUCCCCAUAACACCAACTT (SEQ ID NO:1153)	GUUGGUGUUAUGGGGAAAGTT (SEQ ID NO:1595)	1.7

RAG3A-646	GGAAGACGGAGACAGAACA (SEQ ID NO:712)	GGAAGACGGAGACAGAACATT (SEQ ID NO:1154)	UGUUCUGUCUCCGUCUUCCTT (SEQ ID NO:1596)	1.6
RAG3A-389	AAGATAGGACTCCCTAGGG (SEQ ID NO:713)	AAGAUAGGACUCCCUAGGGTT (SEQ ID NO:1155)	CCCUAGGGAGUCCUAUCUUTT (SEQ ID NO:1597)	1.6
RAG3A-971	TCTGGCTGGACGGGAAAAT (SEQ ID NO:714)	UCUGGCUGGACGGGAAAAUTT (SEQ ID NO:1156)	AUUUUCCCGUCCAGCCAGATT (SEQ ID NO:1598)	1.6
RAG3A-751	GCCAGCAGGGAGGTATTTG (SEQ ID NO:715)	GCCAGCAGGGAGGUAUUUGTT (SEQ ID NO:1157)	CAAAUACCUCCCUGCUGGCTT (SEQ ID NO:1599)	1.6
RAG3A-299	AGAAATTTGGATAGCCAGG (SEQ ID NO:716)	AGAAAUUUGGAUAGCCAGGTT (SEQ ID NO:1158)	CCUGGCUAUCCAAAUUUCUTT (SEQ ID NO:1600)	1.6
RAG3A-750	CCAGCAGGGAGGTATTTGC (SEQ ID NO:717)	CCAGCAGGGAGGUAUUUGCTT (SEQ ID NO:1159)	GCAAAUACCUCCCUGCUGGTT (SEQ ID NO:1601)	1.6
RAG3A-671	TGTCACATGTGGAACGGTA (SEQ ID NO:718)	UGUCACAUGUGGAACGGUATT (SEQ ID NO:1160)	UACCGUUCCACAUGUGACATT (SEQ ID NO:1602)	1.6
RAG3A-749	CAGCAGGGAGGTATTTGCG (SEQ ID NO:719)	CAGCAGGGAGGUAUUUGCGTT (SEQ ID NO:1161)	CGCAAAUACCUCCCUGCUGTT (SEQ ID NO:1603)	1.6
RAG3A-547	TCAGGCTTAACCCAGTGCA (SEQ ID NO:720)	UCAGGCUUAACCCAGUGCATT (SEQ ID NO:1162)	UGCACUGGGUUAAGCCUGATT (SEQ ID NO:1604)	1.6
RAG3A-655	GTAGGAGATGGAAGACGGA (SEQ ID NO:721)	GUAGGAGAUGGAAGACGGATT (SEQ ID NO:1163)	UCCGUCUUCCAUCUCCUACTT (SEQ ID NO:1605)	1.6
RAG3A-170	GGTCCCAGGTTGCCCATGT (SEQ ID NO:722)	GGUCCCAGGUUGCCCAUGUTT (SEQ ID NO:1164)	ACAUGGGCAACCUGGGACCTT (SEQ ID NO:1606)	1.6
RAG3A-629	CAAGCAAAGGAGGGCCCTG (SEQ ID NO:723)	CAAGCAAAGGAGGGCCCUGTT (SEQ ID NO:1165)	CAGGGCCCUCCCUUUGCUUGTT (SEQ ID NO:1607)	1.6
RAG3A-253	AGACCTCTGTGCTTCTTCC (SEQ ID NO:724)	AGACCUCUGUGCUUCUUCCTT (SEQ ID NO:1166)	GGAAGAAGCACAGAGGUCUTT (SEQ ID NO:1608)	1.6
RAG3A-695	ACACATGGGCCTGGTTATT (SEQ ID NO:725)	ACACAUGGGCCUGGUUAUUTT (SEQ ID NO:1167)	AAUAACCAGGCCCAUGUGUTT (SEQ ID NO:1609)	1.6
RAG3A-788	GCAAAGGAGCTAGAGCCAG (SEQ ID NO:726)	GCAAAGGAGCUAGAGCCAGTT (SEQ ID NO:1168)	CUGGCUCUAGCUCCUUUGCTT (SEQ ID NO:1610)	1.6
RAG3A-688	GGCCTGGTTATTCCTCTTG (SEQ ID NO:727)	GGCCUGGUUAUUCCUCUUGTT (SEQ ID NO:1169)	CAAGAGGAAUAACCAGGCCTT (SEQ ID NO:1611)	1.6
RAG3A-728	GGAGGTCCAGCAGCTGTCT (SEQ ID NO:728)	GGAGGUCCAGCAGCUGUCUTT (SEQ ID NO:1170)	AGACAGCUGCUGGACCUCCTT (SEQ ID NO:1612)	1.6
RAG3A-519	ACATACATGTGCCCCGCAC (SEQ ID NO:729)	ACAUACAUGUGCCCCGCACTT (SEQ ID NO:1171)	GUGCGGGGCACAUGUAUGUTT (SEQ ID NO:1613)	1.6

RAG3A-272	ACCCCACCAATCTTAAACA (SEQ ID NO:730)	ACCCCACCAAUCUUAAACATT (SEQ ID NO:1172)	UGUUUAAGAUUGGUGGGGUTT (SEQ ID NO:1614)	1.6
RAG3A-318	GGTATGATGTCCAGGGAAA (SEQ ID NO:731)	GGUAUGAUGUCCAGGGAAATT (SEQ ID NO:1173)	UUUCCCUGGACAUCAUACCTT (SEQ ID NO:1615)	1.6
RAG3A-1338	AAACCCTCACCACCCTCTC (SEQ ID NO:732)	AAACCCUCACCACCCUCUCTT (SEQ ID NO:1174)	GAGAGGGUGGUGAGGGUUUTT (SEQ ID NO:1616)	1.6
RAG3A-539	AACCCAGTGCACGTGTGCG (SEQ ID NO:733)	AACCCAGUGCACGUGUGCGTT (SEQ ID NO:1175)	CGCACACGUGCACUGGGUUTT (SEQ ID NO:1617)	1.6
RAG3A-826	AGGACAGAGACTGTGGGGA (SEQ ID NO:734)	AGGACAGAGACUGUGGGGATT (SEQ ID NO:1176)	UCCCCACAGUCUCUGUCCUTT (SEQ ID NO:1618)	1.6
RAG3A-337	CTGTTGGATTTCAGCAGCA (SEQ ID NO:735)	CUGUUGGAUUUCAGCAGCATT (SEQ ID NO:1177)	UGCUGCUGAAAUCCAACAGTT (SEQ ID NO:1619)	1.6
RAG3A-273	AACCCCACCAATCTTAAAC (SEQ ID NO:736)	AACCCCACCAAUCUUAAAACTT (SEQ ID NO:1178)	GUUUAAGAUUGGUGGGGUUTT (SEQ ID NO:1620)	1.6
RAG3A-478	CAAACCCTTTCCCCATAAC (SEQ ID NO:737)	CAAACCCUUUCCCCAUAACTT (SEQ ID NO:1179)	GUUAUGGGGAAAGGGUUUGTT (SEQ ID NO:1621)	1.6
RAG3A-963	GACGGGAAAATTCCAGGAT (SEQ ID NO:738)	GACGGGAAAAUUCCAGGAUTT (SEQ ID NO:1180)	AUCCUGGAAUUUUCCCGUCTT (SEQ ID NO:1622)	1.6
RAG3A-248	TCTGTGCTTCTTCCCCAGC (SEQ ID NO:739)	UCUGUGCUUCUUCCCCAGCTT (SEQ ID NO:1181)	GCUGGGGAAGAAGCACAGATT (SEQ ID NO:1623)	1.6
RAG3A-35	TCACCAGTGTCTGGTGGCT (SEQ ID NO:740)	UCACCAGUGUCUGGUGGCUTT (SEQ ID NO:1182)	AGCCACCAGACACUGGUGATT (SEQ ID NO:1624)	1.5
RAG3A-613	CTGGGCACAGAGGTCTGTG (SEQ ID NO:741)	CUGGGCACAGAGGUCUGUGTT (SEQ ID NO:1183)	CACAGACCUCUGUGCCCAGTT (SEQ ID NO:1625)	1.5
RAG3A-1141	CCCTTCCTTCACCCAAGGG (SEQ ID NO:742)	CCCUUCCUUCACCCAAGGGTT (SEQ ID NO:1184)	CCCUUGGGUGAAGGAAGGGTT (SEQ ID NO:1626)	1.5
RAG3A-477	AAACCCTTTCCCCATAACA (SEQ ID NO:743)	AAACCCUUUCCCCAUAACATT (SEQ ID NO:1185)	UGUUAUGGGGAAAGGGUUUTT (SEQ ID NO:1627)	1.5
RAG3A-634	CAGAACAAGCAAAGGAGGG (SEQ ID NO:744)	CAGAACAAGCAAAGGAGGGTT (SEQ ID NO:1186)	CCCUCCUUUGCUUGUUCUGTT (SEQ ID NO:1628)	1.5
RAG3A-1280	GCTCCTCATTCTTGTGTTA (SEQ ID NO:745)	GCUCCUCAUUCUUGUGUUATT (SEQ ID NO:1187)	UAACACAAGAAUGAGGAGCTT (SEQ ID NO:1629)	1.5
RAG3A-1062	CCTCCCTGTCTCCTGTCTC (SEQ ID NO:746)	CCUCCCUGUCUCCUGUCUCTT (SEQ ID NO:1188)	GAGACAGGAGACAGGGAGGAGGTT (SEQ ID NO:1630)	1.5
RAG3A-778	TAGAGCCAGGGCCAAAGGA (SEQ ID NO:747)	UAGAGCCAGGGCCAAAGGATT (SEQ ID NO:1189)	UCCUUUGGCCCUGGCUCUATT (SEQ ID NO:1631)	1.5

RAG3A-939	CCACACTTCTCAGCAGACA (SEQ ID NO:748)	CCACACUUCUCAGCAGACATT (SEQ ID NO:1190)	UGUCUGCUGAGAAGUGUGGTT (SEQ ID NO:1632)	1.5
RAG3A-779	CTAGAGCCAGGGCCAAAGG (SEQ ID NO:749)	CUAGAGCCAGGGCCAAAGGTT (SEQ ID NO:1191)	CCUUUGGCCCUGGCUCUAGTT (SEQ ID NO:1633)	1.5
RAG3A-803	GGGACTGGGAAGAAAGCAA (SEQ ID NO:750)	GGGACUGGGAAGAAAGCAATT (SEQ ID NO:1192)	UUGCUUUCUUCCCAGUCCCTT (SEQ ID NO:1634)	1.5
RAG3A-1382	GTCCATCAGCCGATCTCCC (SEQ ID NO:751)	GUCCAUCAGCCGAUCUCCCTT (SEQ ID NO:1193)	GGGAGAUCGGCUGAUGGACTT (SEQ ID NO:1635)	1.5
RAG3A-97	AGGAGTGGACCCTGGTCCA (SEQ ID NO:752)	AGGAGUGGACCCUGGUCCATT (SEQ ID NO:1194)	UGGACCAGGGUCCACUCCUTT (SEQ ID NO:1636)	1.5
RAG3A-543	GCTTAACCCAGTGCACGTG (SEQ ID NO:753)	GCUUAACCCAGUGCACGUGTT (SEQ ID NO:1195)	CACGUGCACUGGGUUAAGCTT (SEQ ID NO:1637)	1.5
RAG3A-556	CACCTAAGCTCAGGCTTAA (SEQ ID NO:754)	CACCUAAGCUCAGGCUUAATT (SEQ ID NO:1196)	UUAAGCCUGAGCUUAGGUGTT (SEQ ID NO:1638)	1.5
RAG3A-60	GAGAAGGCGTCACTTCCGG (SEQ ID NO:755)	GAGAAGGCGUCACUUCCGGTT (SEQ ID NO:1197)	CCGGAAGUGACGCCUUCUCTT (SEQ ID NO:1639)	1.5
RAG3A-647	TGGAAGACGGAGACAGAACTT (SEQ ID NO:756)	UGGAAGACGGAGACAGAACTT (SEQ ID NO:1198)	GUUCUGUCUCCGUCUUCCATT (SEQ ID NO:1640)	1.5
RAG3A-243	GCTTCTTCCCCAGCAACAC (SEQ ID NO:757)	GCUUCUUCCCCAGCAACACTT (SEQ ID NO:1199)	GUGUUGCUGGGGAAGAAGCTT (SEQ ID NO:1641)	1.5
RAG3A-533	GTGCACGTGTGCGCACATA (SEQ ID NO:758)	GUGCACGUGUGCGCACAUATT (SEQ ID NO:1200)	UAUGUGCGCACACGUGCACTT (SEQ ID NO:1642)	1.5
RAG3A-628	AAGCAAAGGAGGGCCCTGG (SEQ ID NO:759)	AAGCAAAGGAGGGCCCUGGTT (SEQ ID NO:1201)	CCAGGGCCCUCCUUUGCUUTT (SEQ ID NO:1643)	1.5
RAG3A-849	AAGGTCAGGCCAGGAAGCC (SEQ ID NO:760)	AAGGUCAGGCCAGGAAGCCTT (SEQ ID NO:1202)	GGCUUCCUGGCCUGACCUUTT (SEQ ID NO:1644)	1.5
RAG3A-1307	CTGCCTCCCTACCTTCTCT (SEQ ID NO:761)	CUGCCUCCCUACCUUCUCUTT (SEQ ID NO:1203)	AGAGAAGGUAGGGGAGGCAGTT (SEQ ID NO:1645)	1.5
RAG3A-293	TTGGATAGCCCAGGGAGTGA (SEQ ID NO:762)	UUGGAUAGCCCAGGGAGUGATT (SEQ ID NO:1204)	UCACUCCCUGGCUAUCCAATT (SEQ ID NO:1646)	1.5
RAG3A-1285	AGGTCGCTCCCTCATTCTTG (SEQ ID NO:763)	AGGUCGCUCCCUCAUUCUUGTT (SEQ ID NO:1205)	CAAGAAUGAGGGAGCGACCUTT (SEQ ID NO:1647)	1.5
RAG3A-1223	CCCTTCTGTGGAGTGACAG (SEQ ID NO:764)	CCCUUCUGUGGAGUGACAGTT (SEQ ID NO:1206)	CUGUCACUCCCACAGAAGGGTT (SEQ ID NO:1648)	1.5
RAG3A-1177	CAGGCGCATTCGACAGTCC (SEQ ID NO:765)	CAGGCGCAUUCGACAGUCCTT (SEQ ID NO:1207)	GGACUGUCGAAUGCGCCUGTT (SEQ ID NO:1649)	1.5

RAG3A-226	ACAAATGTCCTGCCAGATT (SEQ ID NO:766)	ACAAAUGUCCUGCCAGAUUTT (SEQ ID NO:1208)	AAUCUGGCAGGACAUUUGUTT (SEQ ID NO:1650)	1.5
RAG3A-1097	CAGCCTCCTTTCTCTTGGT (SEQ ID NO:767)	CAGCCUCCUUUCUCUUGGUTT (SEQ ID NO:1209)	ACCAAGAGAAAGGAGGCUGTT (SEQ ID NO:1651)	1.5
RAG3A-1188	TAACTTATCCTCAGGCGCA (SEQ ID NO:768)	UAACUUAUCCUCAGGCGCATT (SEQ ID NO:1210)	UGCGCCUGAGGAUAAGUUATT (SEQ ID NO:1652)	1.5
RAG3A-593	GTGTAGCCATCTAAGCCAC (SEQ ID NO:769)	GUGUAGCCAUCUAAGCCACTT (SEQ ID NO:1211)	GUGGCUUAGAUGGCUACACTT (SEQ ID NO:1653)	1.5
RAG3A-670	GTCACATGTGGAACGGTAG (SEQ ID NO:770)	GUCACAUGUGGAACGGUAGTT (SEQ ID NO:1212)	CUACCGUUCCACAUGUGACTT (SEQ ID NO:1654)	1.5
RAG3A-503	CACCTGACAGTCCACTCAA (SEQ ID NO:771)	CACCUGACAGUCCACUCAATT (SEQ ID NO:1213)	UUGAGUGGACUGUCAGGUGTT (SEQ ID NO:1655)	1.5
RAG3A-1167	CGACAGTCCCCTCTTGCTT (SEQ ID NO:772)	CGACAGUCCCCUCUUGCUUTT (SEQ ID NO:1214)	AAGCAAGAGGGGACUGUCGTT (SEQ ID NO:1656)	1.5
RAG3A-583	CTAAGCCACTGGACCCCAG (SEQ ID NO:773)	CUAAGCCACUGGACCCCAGTT (SEQ ID NO:1215)	CUGGGGUCCAGUGGCUUAGTT (SEQ ID NO:1657)	1.5
RAG3A-706	CTAAGACAGGGACACATGG (SEQ ID NO:774)	CUAAGACAGGGACACAUGGTT (SEQ ID NO:1216)	CCAUGUGUCCCUGUCUUAGTT (SEQ ID NO:1658)	1.5
RAG3A-983	GGAGACATCTCGTCTGGCT (SEQ ID NO:775)	GGAGACAUCUCGUCUGGCUTT (SEQ ID NO:1217)	AGCCAGACGAGAUGUCUCCTT (SEQ ID NO:1659)	1.5
RAG3A-718	CAGCTGTCTTTCCTAAGAC (SEQ ID NO:776)	CAGCUGUCUUUCCUAAGACTT (SEQ ID NO:1218)	GUCUUAGGAAAGACAGCUGTT (SEQ ID NO:1660)	1.5
RAG3A-378	CCCTAGGGGATTACAGAAA (SEQ ID NO:777)	CCCUAGGGGAUUACAGAAATT (SEQ ID NO:1219)	UUUCUGUAAUCCCCUAGGGTT (SEQ ID NO:1661)	1.5
RAG3A-1095	GCCTCCTTTCTCTTGGTTC (SEQ ID NO:778)	GCCUCCUUUCUCUUGGUUCTT (SEQ ID NO:1220)	GAACCAAGAGAAAGGAGGCTT (SEQ ID NO:1662)	1.4
RAG3A-698	GGGACACATGGGCCTGGTT (SEQ ID NO:779)	GGGACACAUGGGCCUGGUUTT (SEQ ID NO:1221)	AACCAGGCCCAUGUGUCCCTT (SEQ ID NO:1663)	1.4
RAG3A-277	TGAAAACCCCACCAATCTT (SEQ ID NO:780)	UGAAAACCCCACCAAUCUUTT (SEQ ID NO:1222)	AAGAUUGGUGGGGUUUUCATT (SEQ ID NO:1664)	1.4
RAG3A-644	AAGACGGAGACAGAACAAG (SEQ ID NO:781)	AAGACGGAGACAGAACAAGTT (SEQ ID NO:1223)	CUUGUUCUGUCUCCGUCUUTT (SEQ ID NO:1665)	1.4
RAG3A-941	GGCCACACTTCTCAGCAGA (SEQ ID NO:782)	GGCCACACUUCUCAGCAGATT (SEQ ID NO:1224)	UCUGCUGAGAAGUGUGGCCTT (SEQ ID NO:1666)	1.4
RAG3A-794	AAGAAAGCAAAGGAGCTAG (SEQ ID NO:783)	AAGAAAGCAAAGGAGCUAGTT (SEQ ID NO:1225)	CUAGCUCCUUUGCUUUCUUTT (SEQ ID NO:1667)	1.4

RAG3A-890	GAGCCTGAGGAAGTTCTGG (SEQ ID NO:784)	GAGCCUGAGGAAGUUCUGGTT (SEQ ID NO:1226)	CCAGAACUUCCUCAGGCUCTT (SEQ ID NO:1668)	1.4
RAG3A-1310	AGCCTGCCTCCCTACCTTC (SEQ ID NO:785)	AGCCUGCCUCCCUACCUUCTT (SEQ ID NO:1227)	GAAGGUAGGGAGGCAGGCUTT (SEQ ID NO:1669)	1.4
RAG3A-27	GTCTGGTGGCTCCCTTCTC (SEQ ID NO:786)	GUCUGGUGGCUCCCUUCUCTT (SEQ ID NO:1228)	GAGAAGGGAGCCACCAGACTT (SEQ ID NO:1670)	1.4
RAG3A-38	CCTTCACCAGTGTCTGGTG (SEQ ID NO:787)	CCUUCACCAGUGUCUGGUGTT (SEQ ID NO:1229)	CACCAGACACUGGUGAAGGTT (SEQ ID NO:1671)	1.4
RAG3A-532	TGCACGTGTGCGCACATAC (SEQ ID NO:788)	UGCACGUGUGCGCACAUACTT (SEQ ID NO:1230)	GUAUGUGCGCACACGUGCATT (SEQ ID NO:1672)	1.4
RAG3A-1023	TATCCTCCCAGCTATCCCA (SEQ ID NO:789)	UAUCCUCCCAGCUAUCCCATT (SEQ ID NO:1231)	UGGGAUAGCUGGGAGGAUATT (SEQ ID NO:1673)	1.4
RAG3A-797	GGGAAGAAAGCAAAGGAGC (SEQ ID NO:790)	GGGAAGAAAGCAAAGGAGCTT (SEQ ID NO:1232)	GCUCCUUUGCUUUCUUCCCTT (SEQ ID NO:1674)	1.4
RAG3A-399	GGGGAATGACAAGATAGGA (SEQ ID NO:791)	GGGGAAUGACAAGAUAGGATT (SEQ ID NO:1233)	UCCUAUCUUGUCAUUCCCCTT (SEQ ID NO:1675)	1.4
RAG3A-945	TCTAGGCCACACTTCTCAG (SEQ ID NO:792)	UCUAGGCCACACUUCUCAGTT (SEQ ID NO:1234)	CUGAGAAGUGUGGCCUAGATT (SEQ ID NO:1676)	1.4
RAG3A-344	AAGCATCCTGTTGGATTTC (SEQ ID NO:793)	AAGCAUCCUGUUGGAUUUCTT (SEQ ID NO:1235)	GAAAUCCAACAGGAUGCUUTT (SEQ ID NO:1677)	1.4
RAG3A-1255	ACAGGGACCTAGCCAGAAA (SEQ ID NO:794)	ACAGGGACCUAGCCAGAAATT (SEQ ID NO:1236)	UUUCUGGCUAGGUCCCUGUTT (SEQ ID NO:1678)	1.4
RAG3A-524	TGCGCACATACATGTGCCC (SEQ ID NO:795)	UGCGCACAUACAUGUGCCCTT (SEQ ID NO:1237)	GGGCACAUGUAUGUGCGCATT (SEQ ID NO:1679)	1.4
RAG3A-244	TGCTTCTTCCCCAGCAACA (SEQ ID NO:796)	UGCUUCUUCCCCAGCAACATT (SEQ ID NO:1238)	UGUUGCUGGGGAAGAAGCATT (SEQ ID NO:1680)	1.4
RAG3A-340	ATCCTGTTGGATTTCAGCA (SEQ ID NO:797)	AUCCUGUUGGAUUUCAGCATT (SEQ ID NO:1239)	UGCUGAAAUCCAACAGGAUTT (SEQ ID NO:1681)	1.4
RAG3A-687	GCCTGGTTATTCCTCTTGT (SEQ ID NO:798)	GCCUGGUUAUUCCUCUUGUTT (SEQ ID NO:1240)	ACAAGAGGAAUAACCAGGCTT (SEQ ID NO:1682)	1.4
RAG3A-568	CCAGCAGACGAGCACCTAA (SEQ ID NO:799)	CCAGCAGACGAGCACCUAATT (SEQ ID NO:1241)	UUAGGUGCUCGUCUGCUGGTT (SEQ ID NO:1683)	1.4
RAG3A-804	TGGGACTGGGAAGAAAGCA (SEQ ID NO:800)	UGGGACUGGGAAGAAAGCATT (SEQ ID NO:1242)	UGCUUUCUUCCCAGUCCCATT (SEQ ID NO:1684)	1.4
RAG3A-496	CAGTCCACTCAACCCGTCC (SEQ ID NO:801)	CAGUCCACUCAACCCGUCCTT (SEQ ID NO:1243)	GGACGGGUUGAGUGGGACUGTT (SEQ ID NO:1685)	1.4

RAG3A-810	GGAGACTGGGACTGGGAAG (SEQ ID NO:802)	GGAGACUGGGACUGGGAAGTT (SEQ ID NO:1244)	CUUCCCAGUCCCAGUCUCCTT (SEQ ID NO:1686)	1.4
RAG3A-356	AAGCAGGAAAGCAAGCATC (SEQ ID NO:803)	AAGCAGGAAAGCAAGCAUCTT (SEQ ID NO:1245)	GAUGCUUGCUUUCCUGCUUTT (SEQ ID NO:1687)	1.4
RAG3A-1248	CCTAGCCAGAAACCGGCAG (SEQ ID NO:804)	CCUAGCCAGAAACCGGCAGTT (SEQ ID NO:1246)	CUGCCGGUUUCUGGCUAGGTT (SEQ ID NO:1688)	1.4
RAG3A-1015	CAGCTATCCCAGCACCCTC (SEQ ID NO:805)	CAGCUAUCCCAGCACCCUCTT (SEQ ID NO:1247)	GAGGGUGCUGGGAUAGCUGTT (SEQ ID NO:1689)	1.4
RAG3A-645	GAAGACGGAGACAGAACAA (SEQ ID NO:806)	GAAGACGGAGACAGAACAATT (SEQ ID NO:1248)	UUGUUCUGUCUCCGUCUUCTT (SEQ ID NO:1690)	1.4
RAG3A-517	ATACATGTGCCCCGCACCT (SEQ ID NO:807)	AUACAUGUGCCCCGCACCUTT (SEQ ID NO:1249)	AGGUGCGGGGGCACAUGUAUTT (SEQ ID NO:1691)	1.4
RAG3A-194	AACTTCTGCTCCTGTCCCC (SEQ ID NO:808)	AACUUCUGCUCCUGUCCCCTT (SEQ ID NO:1250)	GGGGACAGGAGCAGAAGUUTT (SEQ ID NO:1692)	1.4
RAG3A-927	GCAGACATGCCCATCCTTG (SEQ ID NO:809)	GCAGACAUGCCCAUCCUUGTT (SEQ ID NO:1251)	CAAGGAUGGGCAUGUCUGCTT (SEQ ID NO:1693)	1.4
RAG3A-271	CCCCACCAATCTTAAACAA (SEQ ID NO:810)	CCCCACCAAUCUUAAACAATT (SEQ ID NO:1252)	UUGUUUAAGAUUGGUGGGGGTT (SEQ ID NO:1694)	1.4
RAG3A-398	GGGAATGACAAGATAGGAC (SEQ ID NO:811)	GGGAAUGACAAGAUAGGACTT (SEQ ID NO:1253)	GUCCUAUCUUGUCAUUCCCTT (SEQ ID NO:1695)	1.4
RAG3A-230	CAACACAAATGTCCTGCCA (SEQ ID NO:812)	CAACACAAAUGUCCUGCCATT (SEQ ID NO:1254)	UGGCAGGACAUUUGUGUUGTT (SEQ ID NO:1696)	1.4
RAG3A-1104	CCACTCCCAGCCTCCTTTC (SEQ ID NO:813)	CCACUCCCAGCCUCCUUUCTT (SEQ ID NO:1255)	GAAAGGAGGCUGGGAGUGGTT (SEQ ID NO:1697)	1.4
RAG3A-1254	CAGGGACCTAGCCAGAAAC (SEQ ID NO:814)	CAGGGACCUAGCCAGAAACTT (SEQ ID NO:1256)	GUUUCUGGCUAGGUCCCUGTT (SEQ ID NO:1698)	1.4
RAG3A-288	TAGCCAGGGAGTGAAAACC (SEQ ID NO:815)	UAGCCAGGGAGUGAAAACCTT (SEQ ID NO:1257)	GGUUUUCACUCCCUGGCUATT (SEQ ID NO:1699)	1.4
RAG3A-837	GGAAGCCCCTGAGGACAGA (SEQ ID NO:816)	GGAAGCCCCUGAGGACAGATT (SEQ ID NO:1258)	UCUGUCCCUCAGGGGCUUCCTT (SEQ ID NO:1700)	1.4
RAG3A-935	ACTTCTCAGCAGACATGCC (SEQ ID NO:817)	ACUUCUCAGCAGACAUGCCTT (SEQ ID NO:1259)	GGCAUGUCUGCUGAGAAGUTT (SEQ ID NO:1701)	1.4
RAG3A-476	AACCCTTTCCCCATAACAC (SEQ ID NO:818)	AACCCUUUCCCCCAUAACACTT (SEQ ID NO:1260)	GUGUUAUGGGGAAAGGGUUTT (SEQ ID NO:1702)	1.4
RAG3A-589	AGCCATCTAAGCCACTGGA (SEQ ID NO:819)	AGCCAUCUAAGCCACUGGATT (SEQ ID NO:1261)	UCCAGUGGCUUAGAUGGCUTT (SEQ ID NO:1703)	1.4

RAG3A-1207	CAGTATCTCCCTCTCATTG (SEQ ID NO:820)	CAGUAUCUCCCUCUCAUUGTT (SEQ ID NO:1262)	CAAUGAGAGGGAGAUACUGTT (SEQ ID NO:1704)	1.4
RAG3A-1284	GGTCGCTCCTCATTCTTGT (SEQ ID NO:821)	GGUCGCUCCUCAUUCUUGUTT (SEQ ID NO:1263)	ACAAGAAUGAGGAGCGACCTT (SEQ ID NO:1705)	1.4
RAG3A-956	AAATTCCAGGATCTAGGCC (SEQ ID NO:822)	AAAUUCCAGGAUCUAGGCCTT (SEQ ID NO:1264)	GGCCUAGAUCCUGGAAUUUTT (SEQ ID NO:1706)	1.4
RAG3A-557	GCACCTAAGCTCAGGCTTA (SEQ ID NO:823)	GCACCUAAGCUCAGGCUUATT (SEQ ID NO:1265)	UAAGCCUGAGCUUAGGUGCTT (SEQ ID NO:1707)	1.4
RAG3A-500	CTGACAGTCCACTCAACCC (SEQ ID NO:824)	CUGACAGUCCACUCAACCCTT (SEQ ID NO:1266)	GGGUUGAGUGGACUGUCAGTT (SEQ ID NO:1708)	1.4
RAG3A-1208	ACAGTATCTCCCTCTCATT (SEQ ID NO:825)	ACAGUAUCUCCCUCUCAUUTT (SEQ ID NO:1267)	AAUGAGAGGGAGAUACUGUTT (SEQ ID NO:1709)	1.4
RAG3A-686	CCTGGTTATTCCTCTTGTC (SEQ ID NO:826)	CCUGGUUAUUCCUCUUGUCTT (SEQ ID NO:1268)	GACAAGAGGAAUAACCAGGTT (SEQ ID NO:1710)	1.4
RAG3A-1168	TCGACAGTCCCCTCTTGCT (SEQ ID NO:827)	UCGACAGUCCCCUCUUGCUTT (SEQ ID NO:1269)	AGCAAGAGGGGACUGUCGATT (SEQ ID NO:1711)	1.4
RAG3A-218	CCTGCCAGATTCCTCCTGG (SEQ ID NO:828)	CCUGCCAGAUUCCUCCUGGTT (SEQ ID NO:1270)	CCAGGAGGAAUCUGGCAGGTT (SEQ ID NO:1712)	1.4
RAG3A-835	AAGCCCCTGAGGACAGAGA (SEQ ID NO:829)	AAGCCCCUGAGGACAGAGATT (SEQ ID NO:1271)	UCUCUGUCCUCAGGGGCUUTT (SEQ ID NO:1713)	1.4
RAG3A-291	GGATAGCCAGGGAGTGAAA (SEQ ID NO:830)	GGAUAGCCAGGGAGUGAAATT (SEQ ID NO:1272)	UUUCACUCCCUGGCUAUCCTT (SEQ ID NO:1714)	1.3
RAG3A-1222	CCTTCTGTGGAGTGACAGT (SEQ ID NO:831)	CCUUCUGUGGAGUGACAGUTT (SEQ ID NO:1273)	ACUGUCACUCCACAGAAGGTT (SEQ ID NO:1715)	1.3
RAG3A-276	GAAAACCCCACCAATCTTA (SEQ ID NO:832)	GAAAACCCCACCAAUCUUATT (SEQ ID NO:1274)	UAAGAUUGGUGGGGUUUUCTT (SEQ ID NO:1716)	1.3
RAG3A-156	CATGTCCAGGAAAAGATGG (SEQ ID NO:833)	CAUGUCCAGGAAAAGAUGGTT (SEQ ID NO:1275)	CCAUCUUUUCCUGGACAUGTT (SEQ ID NO:1717)	1.3
RAG3A-937	ACACTTCTCAGCAGACATG (SEQ ID NO:834)	ACACUUCUCAGCAGACAUGTT (SEQ ID NO:1276)	CAUGUCUGCUGAGAAGUGUTT (SEQ ID NO:1718)	1.3
RAG3A-1262	ACCCAGGACAGGGACCTAG (SEQ ID NO:835)	ACCCAGGACAGGGACCUAGTT (SEQ ID NO:1277)	CUAGGUCCCUGUCCUGGGUTT (SEQ ID NO:1719)	1.3
RAG3A-1139	CTTCCTTCACCCAAGGGAC (SEQ ID NO:836)	CUUCCUUCACCCAAGGGACTT (SEQ ID NO:1278)	GUCCCUUGGGUGAAGGAAGTT (SEQ ID NO:1720)	1.3
RAG3A-535	CAGTGCACGTGTGCGCACA (SEQ ID NO:837)	CAGUGCACGUGUGCGCACATT (SEQ ID NO:1279)	UGUGCGCACACGUGCACUGTT (SEQ ID NO:1721)	1.3

RAG3A-719	GCAGCTGTCTTTCCTAAGA (SEQ ID NO:838)	GCAGCUGUCUUUCCUAAGATT (SEQ ID NO:1280)	UCUUAGGAAAGACAGCUGCTT (SEQ ID NO:1722)	1.3
RAG3A-726	AGGTCCAGCAGCTGTCTTT (SEQ ID NO:839)	AGGUCCAGCAGCUGUCUUUTT (SEQ ID NO:1281)	AAAGACAGCUGCUGGACCUTT (SEQ ID NO:1723)	1.3
RAG3A-384	AGGACTCCCTAGGGGATTA (SEQ ID NO:840)	AGGACUCCCUAGGGGAUUATT (SEQ ID NO:1282)	UAAUCCCCUAGGGAGUCCUTT (SEQ ID NO:1724)	1.3
RAG3A-834	AGCCCCTGAGGACAGAGAC (SEQ ID NO:841)	AGCCCCUGAGGACAGAGACTT (SEQ ID NO:1283)	GUCUCUGUCCUCAGGGGCUTT (SEQ ID NO:1725)	1.3
RAG3A-562	GACGAGCACCTAAGCTCAG (SEQ ID NO:842)	GACGAGCACCUAAGCUCAGTT (SEQ ID NO:1284)	CUGAGCUUAGGUGCUCGUCTT (SEQ ID NO:1726)	1.3
RAG3A-940	GCCACACTTCTCAGCAGAC (SEQ ID NO:843)	GCCACACUUCUCAGCAGACTT (SEQ ID NO:1285)	GUCUGCUGAGAAGUGUGGCTT (SEQ ID NO:1727)	1.3
RAG3A-632	GAACAAGCAAAGGAGGGCCTT (SEQ ID NO:844)	GAACAAGCAAAGGAGGGCCTT (SEQ ID NO:1286)	GGCCCUCCUUUGCUUGUUCTT (SEQ ID NO:1728)	1.3
RAG3A-746	CAGGGAGGTATTTGCGGGG (SEQ ID NO:845)	CAGGGAGGUAUUUGCGGGGTT (SEQ ID NO:1287)	CCCCGCAAAUACCUCCCUGTT (SEQ ID NO:1729)	1.3
RAG3A-1309	GCCTGCCTCCCCTACCTTCT (SEQ ID NO:846)	GCCUGCCUCCCCUACCUUCUTT (SEQ ID NO:1288)	AGAAGGUAGGGGAGGCAGGCTT (SEQ ID NO:1730)	1.3
RAG3A-780	GCTAGAGCCAGGGCCAAAG (SEQ ID NO:847)	GCUAGAGCCAGGGCCAAAGTT (SEQ ID NO:1289)	CUUUGGCCCUGGCUCUAGCTT (SEQ ID NO:1731)	1.3
RAG3A-693	ACATGGGCCTGGTTATTCC (SEQ ID NO:848)	ACAUGGGCCUGGUUAUUCCTT (SEQ ID NO:1290)	GGAAUAACCAGGCCCAUGUTT (SEQ ID NO:1732)	1.3
RAG3A-636	GACAGAACAAGCAAAGGAG (SEQ ID NO:849)	GACAGAACAAGCAAAGGAGTT (SEQ ID NO:1291)	CUCCUUUGCUUGUUCUGUCTT (SEQ ID NO:1733)	1.3
RAG3A-258	AAACAAGACCTCTGTGCTT (SEQ ID NO:850)	AAACAAGACCUCUGUGCUUTT (SEQ ID NO:1292)	AAGCACAGAGGUCUUGUUUTT (SEQ ID NO:1734)	1.3
RAG3A-1022	ATCCTCCCAGCTATCCCAG (SEQ ID NO:851)	AUCCUCCCAGCUAUCCCAGTT (SEQ ID NO:1293)	CUGGGAUAGCUGGGAGGAUTT (SEQ ID NO:1735)	1.3
RAG3A-381	ACTCCCTAGGGGATTACAG (SEQ ID NO:852)	ACUCCCUAGGGGAUUACAGTT (SEQ ID NO:1294)	CUGUAAUCCCCUAGGGAGUTT (SEQ ID NO:1736)	1.3
RAG3A-379	TCCCTAGGGGATTACAGAA (SEQ ID NO:853)	UCCCUAGGGGAUUACAGAATT (SEQ ID NO:1295)	UUCUGUAAUCCCCUAGGGATT (SEQ ID NO:1737)	1.3
RAG3A-663	GTGGAACGGTAGGAGATGG (SEQ ID NO:854)	GUGGAACGGUAGGAGAUGGTT (SEQ ID NO:1296)	CCAUCUCCUACCGUUCCACTT (SEQ ID NO:1738)	1.3
RAG3A-1099	CCCAGCCTCCTTTCTCTTG (SEQ ID NO:855)	CCCAGCCUCCUUUCUCUUGTT (SEQ ID NO:1297)	CAAGAGAAAGGAGGCUGGGTT (SEQ ID NO:1739)	1.3

RAG3A-855	GGGATCAAGGTCAGGCCAG (SEQ ID NO:856)	GGGAUCAAGGUCAGGCCAGTT (SEQ ID NO:1298)	CUGGCCUGACCUUGAUCCCTT (SEQ ID NO:1740)	1.3
RAG3A-1279	CTCCTCATTCTTGTGTTAC (SEQ ID NO:857)	CUCCUCAUUCUUGUGUUACTT (SEQ ID NO:1299)	GUAACACAAGAAUGAGGAGTT (SEQ ID NO:1741)	1.3
RAG3A-34	CACCAGTGTCTGGTGGCTC (SEQ ID NO:858)	CACCAGUGUCUGGUGGCUCTT (SEQ ID NO:1300)	GAGCCACCAGACACUGGUGTT (SEQ ID NO:1742)	1.3
RAG3A-633	AGAACAAGCAAAGGAGGGCTT (SEQ ID NO:859)	AGAACAAGCAAAGGAGGGCTT (SEQ ID NO:1301)	GCCCUCCUUUGCUUGUUCUTT (SEQ ID NO:1743)	1.3
RAG3A-453	CCATAACAGGAGATTTCTC (SEQ ID NO:860)	CCAUAACAGGAGAUUUCUCTT (SEQ ID NO:1302)	GAGAAAUCUCCUGUUAUGGTT (SEQ ID NO:1744)	1.3
RAG3A-246	TGTGCTTCTTCCCCAGCAA (SEQ ID NO:861)	UGUGCUUCUUCCCCAGCAATT (SEQ ID NO:1303)	UUGCUGGGGAAGAAGCACATT (SEQ ID NO:1745)	1.3
RAG3A-592	TGTAGCCATCTAAGCCACT (SEQ ID NO:862)	UGUAGCCAUCUAAGCCACUTT (SEQ ID NO:1304)	AGUGGCUUAGAUGGCUACATT (SEQ ID NO:1746)	1.3
RAG3A-270	CCCACCAATCTTAAACAAG (SEQ ID NO:863)	CCCACCAAUCUUAAACAAGTT (SEQ ID NO:1305)	CUUGUUUAAGAUUGGUGGGTT (SEQ ID NO:1747)	1.3
RAG3A-630	ACAAGCAAAGGAGGGCCCT (SEQ ID NO:864)	ACAAGCAAAGGAGGGCCCUTT (SEQ ID NO:1306)	AGGGCCCUCCUUUGCUUGUTT (SEQ ID NO:1748)	1.3
RAG3A-685	CTGGTTATTCCTCTTGTCA (SEQ ID NO:865)	CUGGUUAUUCCUCUUGUCATT (SEQ ID NO:1307)	UGACAAGAGGAAUAACCAGTT (SEQ ID NO:1749)	1.3
RAG3A-1103	CACTCCCAGCCTCCTTTCT (SEQ ID NO:866)	CACUCCCAGCCUCCUUUCUTT (SEQ ID NO:1308)	AGAAAGGAGGCUGGGAGUGTT (SEQ ID NO:1750)	1.3
RAG3A-1065	CTGCCTCCCTGTCTCCTGT (SEQ ID NO:867)	CUGCCUCCCUGUCUCCUGUTT (SEQ ID NO:1309)	ACAGGAGACAGGGAGGCAGTT (SEQ ID NO:1751)	1.3
RAG3A-523	GCGCACATACATGTGCCCC (SEQ ID NO:868)	GCGCACAUACAUGUGCCCCTT (SEQ ID NO:1310)	GGGGCACAUGUAUGUGCGCTT (SEQ ID NO:1752)	1.3
RAG3A-590	TAGCCATCTAAGCCACTGG (SEQ ID NO:869)	UAGCCAUCUAAGCCACUGGTT (SEQ ID NO:1311)	CCAGUGGCUUAGAUGGCUATT (SEQ ID NO:1753)	1.3
RAG3A-505	CGCACCTGACAGTCCACTC (SEQ ID NO:870)	CGCACCUGACAGUCCACUCTT (SEQ ID NO:1312)	GAGUGGACUGUCAGGUGCGTT (SEQ ID NO:1754)	1.3
RAG3A-1247	CTAGCCAGAAACCGGCAGC (SEQ ID NO:871)	CUAGCCAGAAACCGGCAGCTT (SEQ ID NO:1313)	GCUGCCGGUUUCUGGCUAGTT (SEQ ID NO:1755)	1.3
RAG3A-1281	CGCTCCTCATTCTTGTGTT (SEQ ID NO:872)	CGCUCCUCAUUCUUGUGUUTT (SEQ ID NO:1314)	AACACAAGAAUGAGGAGCGTT (SEQ ID NO:1756)	1.3
RAG3A-747	GCAGGGAGGTATTTGCGGG (SEQ ID NO:873)	GCAGGGAGGUAUUUGCGGGTT (SEQ ID NO:1315)	CCCGCAAAUACCUCCCCUGCTT (SEQ ID NO:1757)	1.3

RAG3A-1220	TTCTGTGGAGTGACAGTAT (SEQ ID NO:874)	UUCUGUGGAGUGACAGUAUTT (SEQ ID NO:1316)	AUACUGUCACUCCACAGAATT (SEQ ID NO:1758)	1:3
RAG3A-1268	TGTGTTACCCAGGACAGGG (SEQ ID NO:875)	UGUGUUACCCAGGACAGGGTT (SEQ ID NO:1317)	CCCUGUCCUGGGUAACACATT (SEQ ID NO:1759)	1:3
RAG3A-782	GAGCTAGAGCCAGGGCCAA (SEQ ID NO:876)	GAGCUAGAGCCAGGGCCAATT (SEQ ID NO:1318)	UUGGCCCUGGCUCUAGCUCTT (SEQ ID NO:1760)	1:3
RAG3A-107	GTGTGGGTGGAGGAGTGGA (SEQ ID NO:877)	GUGUGGGUGGAGGAGUGGATT (SEQ ID NO:1319)	UCCACUCCUCCCACCCACACTT (SEQ ID NO:1761)	1:3
RAG3A-923	ACATGCCCCATCCTTGGGGA (SEQ ID NO:878)	ACAUGCCCAUCCUUGGGGATT (SEQ ID NO:1320)	UCCCCAAGGAUGGGGCAUGUTT (SEQ ID NO:1762)	1:3
RAG3A-349	AAAGCAAGCATCCTGTTGG (SEQ ID NO:879)	AAAGCAAGCAUCCUGUUGGTT (SEQ ID NO:1321)	CCAACAGGAUGCUUGCUUUTT (SEQ ID NO:1763)	1:3
RAG3A-1085	TCTTGGTTCCCTGGTCATG (SEQ ID NO:880)	UCUUGGUUCCCUGGUCAUGTT (SEQ ID NO:1322)	CAUGACCAGGGAACCAAGATT (SEQ ID NO:1764)	1:3
RAG3A-432	ATGTGGGCAATATCCGTGT (SEQ ID NO:881)	AUGUGGGCAAUAUCCGUGUTT (SEQ ID NO:1323)	ACACGGAUAUUGCCCACAUTT (SEQ ID NO:1765)	1:3
RAG3A-129	ATCCAAATCTTCTCCGTGG (SEQ ID NO:882)	AUCCAAAUCUUCUCCGUGGTT (SEQ ID NO:1324)	CCACGGAGAAGAUUUGGAUTT (SEQ ID NO:1766)	1:3
RAG3A-830	CCTGAGGACAGAGACTGTG (SEQ ID NO:883)	CCUGAGGACAGAGACUGUGTT (SEQ ID NO:1325)	CACAGUCUCUGUCCUCAGGTT (SEQ ID NO:1767)	1:3
RAG3A-74	GGGGCTCCAGGGAAGAGAA (SEQ ID NO:884)	GGGGCUCCAGGGAAGAGAATT (SEQ ID NO:1326)	UUCUCUUCCCUGGAGCCCCTT (SEQ ID NO:1768)	1:3
RAG3A-856	TGGGATCAAGGTCAGGCCA (SEQ ID NO:885)	UGGGAUCAAGGUCAGGCCATT (SEQ ID NO:1327)	UGGCCUGACCUUGAUCCCATT (SEQ ID NO:1769)	1:3
RAG3A-435	CTCATGTGGGCAATATCCG (SEQ ID NO:886)	CUCAUGUGGGCAAUAUCCGTT (SEQ ID NO:1328)	CGGAUAUUGCCCACAUGAGTT (SEQ ID NO:1770)	1:3
RAG3A-564	CAGACGAGCACCTAAGCTC (SEQ ID NO:887)	CAGACGAGCACCUAAGCUCTT (SEQ ID NO:1329)	GAGCUUAGGUGCUCGUCUGTT (SEQ ID NO:1771)	1:3
RAG3A-1251	GGACCTAGCCAGAAACCGG (SEQ ID NO:888)	GGACCUAGCCAGAAACCGGTT (SEQ ID NO:1330)	CCGGUUUCUGGCUAGGUCCTT (SEQ ID NO:1772)	1:3
RAG3A-1291	TCTCTGAGGTCGCTCCTCA (SEQ ID NO:889)	UCUCUGAGGUCGCUCCUCATT (SEQ ID NO:1331)	UGAGGAGCGACCUCAGAGATT (SEQ ID NO:1773)	1:3
RAG3A-781	AGCTAGAGCCAGGGCCAAA (SEQ ID NO:890)	AGCUAGAGCCAGGGCCAAATT (SEQ ID NO:1332)	UUUGGCCCUGGCUCUAGCUTT (SEQ ID NO:1774)	1:3
RAG3A-261	CTTAAACAAGACCTCTGTG (SEQ ID NO:891)	CUUAAACAAGACCUCUGUGTT (SEQ ID NO:1333)	CACAGAGGUCUUGUUUAAGTT (SEQ ID NO:1775)	1:3

RAG3A-1098	CCAGCCTCCTTTCTCTTGG (SEQ ID NO:892)	CCAGCCUCCUUUCUCUUGGTT (SEQ ID NO:1334)	CCAAGAGAAAGGAGGCUGGTT (SEQ ID NO:1776)	1.3
RAG3A-565	GCAGACGAGCACCTAAGCT (SEQ ID NO:893)	GCAGACGAGCACCUAAGCUTT (SEQ ID NO:1335)	AGCUUAGGUGCUCGUCUGCTT (SEQ ID NO:1777)	1.2
RAG3A-930	TCAGCAGACATGCCCATCC (SEQ ID NO:894)	UCAGCAGACAUGCCCAUCCTT (SEQ ID NO:1336)	GGAUGGGCAUGUCUGCUGATT (SEQ ID NO:1778)	1.2
RAG3A-422	TATCCGTGTTCCCACTTCG (SEQ ID NO:895)	UAUCCGUGUUCCCACUUCGTT (SEQ ID NO:1337)	CGAAGUGGGAACACGGAUATT (SEQ ID NO:1779)	1.2
RAG3A-516	TACATGTGCCCCCGCACCTG (SEQ ID NO:896)	UACAUGUGCCCCCGCACCUGTT (SEQ ID NO:1338)	CAGGUGCGGGGCACAUGUATT (SEQ ID NO:1780)	1.2
RAG3A-1190	TGTAACTTATCCTCAGGCG (SEQ ID NO:897)	UGUAACUUAUCCUCAGGCGTT (SEQ ID NO:1339)	CGCCUGAGGAUAAGUUACATT (SEQ ID NO:1781)	1.2
RAG3A-360	AGAAAAGCAGGAAAGCAAG (SEQ ID NO:898)	AGAAAAGCAGGAAAGCAAGTT (SEQ ID NO:1340)	CUUGCUUUCCUGCUUUUCUTT (SEQ ID NO:1782)	1.2
RAG3A-126	CAAATCTTCTCCGTGGTGT (SEQ ID NO:899)	CAAAUCUUCUCCGUGGUGUTT (SEQ ID NO:1341)	ACACCACGGAGAAGAUUUGTT (SEQ ID NO:1783)	1.2
RAG3A-938	CACACTTCTCAGCAGACAT (SEQ ID NO:900)	CACACUUCUCAGCAGACAUTT (SEQ ID NO:1342)	AUGUCUGCUGAGAAGUGUGTT (SEQ ID NO:1784)	1.2
RAG3A-853	GATCAAGGTCAGGCCAGGA (SEQ ID NO:901)	GAUCAAGGUCAGGCCAGGATT (SEQ ID NO:1343)	UCCUGGCCUGACCUUGAUCTT (SEQ ID NO:1785)	1.2
RAG3A-716	GCTGTCTTTCCTAAGACAG (SEQ ID NO:902)	GCUGUCUUUCCUAAGACAGTT (SEQ ID NO:1344)	CUGUCUUAGGAAAGACAGCTT (SEQ ID NO:1786)	1.2
RAG3A-1027	CCACTATCCTCCCAGCTAT (SEQ ID NO:903)	CCACUAUCCUCCCAGCUAUTT (SEQ ID NO:1345)	AUAGCUGGGAGGAUAGUGGTT (SEQ ID NO:1787)	1.2
RAG3A-640	CGGAGACAGAACAAGCAAA (SEQ ID NO:904)	CGGAGACAGAACAAGCAAATT (SEQ ID NO:1346)	UUUGCUUGUUCUGUCUCCGTT (SEQ ID NO:1788)	1.2
RAG3A-284	CAGGGAGTGAAAACCCCAC (SEQ ID NO:905)	CAGGGAGUGAAAACCCCACTT (SEQ ID NO:1347)	GUGGGGUUUUCACUCCCUGTT (SEQ ID NO:1789)	1.2
RAG3A-705	TAAGACAGGGACACATGGG (SEQ ID NO:906)	UAAGACAGGGACACAUGGGTT (SEQ ID NO:1348)	CCCAUGUGUCCCUGUCUUATT (SEQ ID NO:1790)	1.2
RAG3A-1315	TGCCTAGCCTGCCTCCCTA (SEQ ID NO:907)	UGCCUAGCCUGCCUCCCUATT (SEQ ID NO:1349)	UAGGGAGGCAGGCUAGGCATT (SEQ ID NO:1791)	1.2
RAG3A-1381	TCCATCAGCCGATCTCCCC (SEQ ID NO:908)	UCCAUCAGCCGAUCUCCCCTT (SEQ ID NO:1350)	GGGGAGAUCGGCUGAUGGATT (SEQ ID NO:1792)	1.2
RAG3A-558	AGCACCTAAGCTCAGGCTT (SEQ ID NO:909)	AGCACCUAAGCUCAGGCUUTT (SEQ ID NO:1351)	AAGCCUGAGCUUAGGUGCUTT (SEQ ID NO:1793)	1.2

RAG3A-498	GACAGTCCACTCAACCCGT (SEQ ID NO:910)	GACAGUCCACUCAACCCGUTT (SEQ ID NO:1352)	ACGGGUUGAGUGGACUGUCTT (SEQ ID NO:1794)	1:2
RAG3A-581	AAGCCACTGGACCCCAGCA (SEQ ID NO:911)	AAGCCACUGGACCCCAGCATT (SEQ ID NO:1353)	UGCUGGGGUCCAGUGGCUUTT (SEQ ID NO:1795)	1:2
RAG3A-1135	CTTCACCCAAGGGACCCTC (SEQ ID NO:912)	CUUCACCCAAGGGACCCUCTT (SEQ ID NO:1354)	GAGGGUCCCUUGGGUGAAGTT (SEQ ID NO:1796)	1:2
RAG3A-1070	CATGCCTGCCTCCCTGTCT (SEQ ID NO:913)	CAUGCCUGCCUCCCUGUCUTT (SEQ ID NO:1355)	AGACAGGGAGGCAGGCAUGTT (SEQ ID NO:1797)	1:2
RAG3A-1181	TCCTCAGGCGCATTCGACA (SEQ ID NO:914)	UCCUCAGGCGCAUUCGACATT (SEQ ID NO:1356)	UGUCGAAUGCGCCUGAGGATT (SEQ ID NO:1798)	1:2
RAG3A-1206	AGTATCTCCCTCTCATTGT (SEQ ID NO:915)	AGUAUCUCCCUCUCAUUGUTT (SEQ ID NO:1357)	ACAAUGAGAGGGAGAUACUTT (SEQ ID NO:1799)	1:2
RAG3A-461	ACACCAACCCATAACAGGA (SEQ ID NO:916)	ACACCAACCCAUAACAGGATT (SEQ ID NO:1358)	UCCUGUUAUGGGUUGGUGUTT (SEQ ID NO:1800)	1:2
RAG3A-242	CTTCTTCCCCAGCAACACA (SEQ ID NO:917)	CUUCUUCCCCAGCAACACATT (SEQ ID NO:1359)	UGUGUUGCUGGGGAAGAAGTT (SEQ ID NO:1801)	1:2
RAG3A-1127	AAGGGACCCTCTGCCTCTC (SEQ ID NO:918)	AAGGGACCCUCUGCCUCUCTT (SEQ ID NO:1360)	GAGAGGCAGAGGGUCCCUUTT (SEQ ID NO:1802)	1:2
RAG3A-419	CCGTGTTCCCACTTCGAAA (SEQ ID NO:919)	CCGUGUUCCCACUUCGAAATT (SEQ ID NO:1361)	UUUCGAAGUGGGAACACGGTT (SEQ ID NO:1803)	1:2
RAG3A-790	AAGCAAAGGAGCTAGAGCC (SEQ ID NO:920)	AAGCAAAGGAGCUAGAGCCTT (SEQ ID NO:1362)	GGCUCUAGCUCCUUUGCUUTT (SEQ ID NO:1804)	1:2
RAG3A-635	ACAGAACAAGCAAAGGAGG (SEQ ID NO:921)	ACAGAACAAGCAAAGGAGGTT (SEQ ID NO:1363)	CCUCCUUUGCUUGUUCUGUTT (SEQ ID NO:1805)	1:2
RAG3A-673	CTTGTCACATGTGGAACGG (SEQ ID NO:922)	CUUGUCACAUGUGGAACGGTT (SEQ ID NO:1364)	CCGUUCCACAUGUGACAAGTT (SEQ ID NO:1806)	1:2
RAG3A-1001	CCCTCCTTCCTAATCTTGG (SEQ ID NO:923)	CCCUCCUUCCUAAUCUUGGTT (SEQ ID NO:1365)	CCAAGAUUAGGAAGGAGGGTT (SEQ ID NO:1807)	1:2
RAG3A-1005	AGCACCCTCCTTCCTAATC (SEQ ID NO:924)	AGCACCCUCCUUCCUAAUCTT (SEQ ID NO:1366)	GAUUAGGAAGGAGGGUGCUTT (SEQ ID NO:1808)	1:2
RAG3A-1064	TGCCTCCCTGTCTCCTGTC (SEQ ID NO:925)	UGCCUCCCUGUCUCCUGUCTT (SEQ ID NO:1367)	GACAGGAGACAGGGAGGCATT (SEQ ID NO:1809)	1:2
RAG3A-801	GACTGGGAAGAAAGCAAAG (SEQ ID NO:926)	GACUGGGAAGAAAGCAAAGTT (SEQ ID NO:1368)	CUUUGCUUUCUUCCCCAGUCTT (SEQ ID NO:1810)	1:2
RAG3A-486	AACCCGTCCAAACCCTTTC (SEQ ID NO:927)	AACCCGUCCAAACCCUUUCTT (SEQ ID NO:1369)	GAAAGGGUUUGGGACGGGUUTT (SEQ ID NO:1811)	1:2

RAG3A-555	ACCTAAGCTCAGGCTTAAC (SEQ ID NO:928)	ACCUAAGCUCAGGCUUAACTT (SEQ ID NO:1370)	GUUAAGCCUGAGCUUAGGUTT (SEQ ID NO:1812)	1:2
RAG3A-854	GGATCAAGGTCAGGCCAGG (SEQ ID NO:929)	GGAUCAAGGUCAGGCCAGGTT (SEQ ID NO:1371)	CCUGGCCUGACCUUGAUCCTT (SEQ ID NO:1813)	1:2
RAG3A-1267	GTGTTACCCAGGACAGGGA (SEQ ID NO:930)	GUGUUACCCAGGACAGGGATT (SEQ ID NO:1372)	UCCCUGUCCUGGGUAACACTT (SEQ ID NO:1814)	1:2
RAG3A-1264	TTACCCAGGACAGGGACCT (SEQ ID NO:931)	UUACCCAGGACAGGGACCUTT (SEQ ID NO:1373)	AGGUCCCUGUCCUGGGUAATT (SEQ ID NO:1815)	1:2
RAG3A-513	ATGTGCCCCCGCACCTGACA (SEQ ID NO:932)	AUGUGCCCCGCACCUGACATT (SEQ ID NO:1374)	UGUCAGGUGCGGGGCACAUTT (SEQ ID NO:1816)	1:2
RAG3A-1286	GAGGTCGCTCCTCATTCTT (SEQ ID NO:933)	GAGGUCGCUCCUCAUUCUUTT (SEQ ID NO:1375)	AAGAAUGAGGAGCGACCUCTT (SEQ ID NO:1817)	1:2
RAG3A-653	AGGAGATGGAAGACGGAGATT (SEQ ID NO:934)	AGGAGAUGGAAGACGGAGATT (SEQ ID NO:1376)	UCUCCGUCUUCCAUCUCCUTT (SEQ ID NO:1818)	1:2
RAG3A-1014	AGCTATCCCAGCACCCTCC (SEQ ID NO:935)	AGCUAUCCCAGCACCCUCCTT (SEQ ID NO:1377)	GGAGGGUGCUGGGAUAGCUTT (SEQ ID NO:1819)	1:2
RAG3A-61	AGAGAAGGCGTCACTTCCG (SEQ ID NO:936)	AGAGAAGGCGUCACUUCCGTT (SEQ ID NO:1378)	CGGAAGUGACGCCUUCUCUTT (SEQ ID NO:1820)	1:2
RAG3A-666	CATGTGGAACGGTAGGAGA (SEQ ID NO:937)	CAUGUGGAACGGUAGGAGATT (SEQ ID NO:1379)	UCUCCUACCGUUCCACAUGTT (SEQ ID NO:1821)	1:2
RAG3A-348	AAGCAAGCATCCTGTTGGA (SEQ ID NO:938)	AAGCAAGCAUCCUGUUGGATT (SEQ ID NO:1380)	UCCAACAGGAUGCUUGCUUTT (SEQ ID NO:1822)	1:2
RAG3A-545	AGGCTTAACCCAGTGCACG (SEQ ID NO:939)	AGGCUUAACCCAGUGCACGTT (SEQ ID NO:1381)	CGUGCACUGGGUUAAGCCUTT (SEQ ID NO:1823)	1:2
RAG3A-584	TCTAAGCCACTGGACCCCA (SEQ ID NO:940)	UCUAAGCCACUGGACCCCATT (SEQ ID NO:1382)	UGGGGUCCAGUGGCUUAGATT (SEQ ID NO:1824)	1:2
RAG3A-1162	GTCCCCTCTTGCTTTCTCA (SEQ ID NO:941)	GUCCCCUCUUGCUUUCUCATT (SEQ ID NO:1383)	UGAGAAAGCAAGAGGGGACTT (SEQ ID NO:1825)	1:2
RAG3A-308	CCAGGGAAAAGAAATTTGG (SEQ ID NO:942)	CCAGGGAAAAGAAAUUUGGTT (SEQ ID NO:1384)	CCAAAUUUCUUUUCCCUGGTT (SEQ ID NO:1826)	1:2
RAG3A-158	CCCATGTCCAGGAAAAGAT (SEQ ID NO:943)	CCCAUGUCCAGGAAAAGAUTT (SEQ ID NO:1385)	AUCUUUUCCUGGACAUGGGTT (SEQ ID NO:1827)	1:2
RAG3A-161	TTGCCCATGTCCAGGAAAA (SEQ ID NO:944)	UUGCCCAUGUCCAGGAAAATT (SEQ ID NO:1386)	UUUUCCUGGACAUGGGCAATT (SEQ ID NO:1828)	1:2
RAG3A-1253	AGGGACCTAGCCAGAAACC (SEQ ID NO:945)	AGGGACCUAGCCAGAAACCTT (SEQ ID NO:1387)	GGUUUCUGGCUAGGUCCCUTT (SEQ ID NO:1829)	1:2

RAG3A-926	CAGACATGCCCATCCTTGG (SEQ ID NO:946)	CAGACAUGCCCAUCCUUGGTT (SEQ ID NO:1388)	CCAAGGAUGGGCAUGUCUGTT (SEQ ID NO:1830)	1.2
RAG3A-1191	TTGTAACTTATCCTCAGGC (SEQ ID NO:947)	UUGUAACUUAUCCUCAGGCTT (SEQ ID NO:1389)	GCCUGAGGAUAAGUUACAATT (SEQ ID NO:1831)	1.2
RAG3A-697	GGACACATGGGCCTGGTTA (SEQ ID NO:948)	GGACACAUGGGCCUGGUUATT (SEQ ID NO:1390)	UAACCAGGCCCAUGUGUCCTT (SEQ ID NO:1832)	1.2
RAG3A-1224	CCCCTTCTGTGGAGTGACA (SEQ ID NO:949)	CCCCUUCUGUGGAGUGACATT (SEQ ID NO:1391)	UGUCACUCCACAGAAGGGGTT (SEQ ID NO:1833)	1.2
RAG3A-964	GGACGGGAAAATTCCAGGA (SEQ ID NO:950)	GGACGGGAAAAUUCCAGGATT (SEQ ID NO:1392)	UCCUGGAAUUUUCCCGUCCTT (SEQ ID NO:1834)	1.2
RAG3A-791	AAAGCAAAGGAGCTAGAGC (SEQ ID NO:951)	AAAGCAAAGGAGCUAGAGCTT (SEQ ID NO:1393)	GCUCUAGCUCCUUUGCUUUTT (SEQ ID NO:1835)	1.2
RAG3A-526	TGTGCGCACATACATGTGC (SEQ ID NO:952)	UGUGCGCACAUACAUGUGCTT (SEQ ID NO:1394)	GCACAUGUAUGUGCGCACATT (SEQ ID NO:1836)	1.2
RAG3A-972	GTCTGGCTGGACGGGAAAA (SEQ ID NO:953)	GUCUGGCUGGACGGGAAAATT (SEQ ID NO:1395)	UUUUCCCGUCCAGCCAGACTT (SEQ ID NO:1837)	1.2
RAG3A-289	ATAGCCAGGGAGTGAAAAC (SEQ ID NO:954)	AUAGCCAGGGAGUGAAAACTT (SEQ ID NO:1396)	GUUUUCACUCCCUGGCUAUTT (SEQ ID NO:1838)	1.2
RAG3A-255	CAAGACCTCTGTGCTTCTT (SEQ ID NO:955)	CAAGACCUCUGUGCUUCUUTT (SEQ ID NO:1397)	AAGAAGCACAGAGGUCUUGTT (SEQ ID NO:1839)	1.2
RAG3A-1000	CCTCCTTCCTAATCTTGGG (SEQ ID NO:956)	CCUCCUUCCUAAUCUUGGGTT (SEQ ID NO:1398)	CCCAAGAUUAGGAAGGAGGTT (SEQ ID NO:1840)	1.2
RAG3A-694	CACATGGGCCTGGTTATTC (SEQ ID NO:957)	CACAUGGGCCUGGUUAUUCTT (SEQ ID NO:1399)	GAAUAACCAGGCCCAUGUGTT (SEQ ID NO:1841)	1.2
RAG3A-549	GCTCAGGCTTAACCCAGTG (SEQ ID NO:958)	GCUCAGGCUUAACCCAGUGTT (SEQ ID NO:1400)	CACUGGGUUAAGCCUGAGCTT (SEQ ID NO:1842)	1.2
RAG3A-1240	GAAACCGGCAGCATTCCCC (SEQ ID NO:959)	GAAACCGGCAGCAUUCCCCTT (SEQ ID NO:1401)	GGGGAAUGCUGCCGGUUUCTT (SEQ ID NO:1843)	1.2
RAG3A-978	CATCTCGTCTGGCTGGACG (SEQ ID NO:960)	CAUCUCGUCUGGCUGGACGTT (SEQ ID NO:1402)	CGUCCAGCCAGACGAGAUGTT (SEQ ID NO:1844)	1.2
RAG3A-1290	CTCTGAGGTCGCTCCTCAT (SEQ ID NO:961)	CUCUGAGGUCGCUCCUCAUTT (SEQ ID NO:1403)	AUGAGGAGCGACCUCAGAGTT (SEQ ID NO:1845)	1.2
RAG3A-1006	CAGCACCCTCCTTCCTAAT (SEQ ID NO:962)	CAGCACCCUCCUUCCUAAUTT (SEQ ID NO:1404)	AUUAGGAAGGAGGGGUGCUGTT (SEQ ID NO:1846)	1.2
RAG3A-1311	TAGCCTGCCTCCCCTACCTT (SEQ ID NO:963)	UAGCCUGCCUCCCCUACCUUTT (SEQ ID NO:1405)	AAGGUAGGGAGGCAGGCUATT (SEQ ID NO:1847)	1.2

RAG3A-42	GGGGCCTTCACCAGTGTCT (SEQ ID NO:964)	GGGGCCUUCACCAGUGUCUTT (SEQ ID NO:1406)	AGACACUGGUGAAGGCCCCTT (SEQ ID NO:1848)	1:2
RAG3A-21	TGGCTCCCCTTCTCTGATTG (SEQ ID NO:965)	UGGCUCCCCUUCUCUGAUUGTT (SEQ ID NO:1407)	CAAUCAGAGAAGGGAGCCATT (SEQ ID NO:1849)	1:2
RAG3A-59	AGAAGGCGTCACTTCCGGG (SEQ ID NO:966)	AGAAGGCGUCACUUCCGGGTT (SEQ ID NO:1408)	CCCGGAAGUGACGCCUUCUTT (SEQ ID NO:1850)	1:2
RAG3A-1187	AACTTATCCTCAGGCGCAT (SEQ ID NO:967)	AACUUAUCCUCAGGCGCAUTT (SEQ ID NO:1409)	AUGCGCCUGAGGAUAAGUUTT (SEQ ID NO:1851)	1:2
RAG3A-576	ACTGGACCCCAGCAGACGA (SEQ ID NO:968)	ACUGGACCCCAGCAGACGATT (SEQ ID NO:1410)	UCGUCUGCUGGGGUCCAGUTT (SEQ ID NO:1852)	1:1
RAG3A-639	GGAGACAGAACAAGCAAAG (SEQ ID NO:969)	GGAGACAGAACAAGCAAAGTT (SEQ ID NO:1411)	CUUUGCUUGUUCUGUCUCCTT (SEQ ID NO:1853)	1:1
RAG3A-815	TGTGGGGAGACTGGGACTG (SEQ ID NO:970)	UGUGGGGAGACUGGGACUGTT (SEQ ID NO:1412)	CAGUCCCAGUCUCCCCCACATT (SEQ ID NO:1854)	1:1
RAG3A-957	AAAATTCCAGGATCTAGGC (SEQ ID NO:971)	AAAAUUCCAGGAUCUAGGCTT (SEQ ID NO:1413)	GCCUAGAUCCUGGAAUUUUTT (SEQ ID NO:1855)	1:1
RAG3A-1217	TGTGGAGTGACAGTATCTC (SEQ ID NO:972)	UGUGGAGUGACAGUAUCUCTT (SEQ ID NO:1414)	GAGAUACUGUCACUCCACATT (SEQ ID NO:1856)	1:1
RAG3A-1165	ACAGTCCCCCTCTTGCTTTC (SEQ ID NO:973)	ACAGUCCCCCUCUUGCUUUCTT (SEQ ID NO:1415)	GAAAGCAAGAGGGGGACUGUTT (SEQ ID NO:1857)	1:1
RAG3A-1134	TTCACCCAAGGGACCCTCT (SEQ ID NO:974)	UUCACCCAAGGGACCCUCUTT (SEQ ID NO:1416)	AGAGGGUCCCUUGGGUGAATT (SEQ ID NO:1858)	1:1
RAG3A-667	ACATGTGGAACGGTAGGAG (SEQ ID NO:975)	ACAUGUGGAACGGUAGGAGTT (SEQ ID NO:1417)	CUCCUACCGUUCCACAUGUTT (SEQ ID NO:1859)	1:1
RAG3A-1339	CAAACCCTCACCACCCTCT (SEQ ID NO:976)	CAAACCCUCACCACCCUCUTT (SEQ ID NO:1418)	AGAGGGUGGUGAGGGUUUGTT (SEQ ID NO:1860)	1:1
RAG3A-676	CCTCTTGTCACATGTGGAA (SEQ ID NO:977)	CCUCUUGUCACAUGUGGAATT (SEQ ID NO:1419)	UUCCACAUGUGACAAGAGGTT (SEQ ID NO:1861)	1:1
RAG3A-153	GTCCAGGAAAAGATGGATC (SEQ ID NO:978)	GUCCAGGAAAAGAUGGAUCTT (SEQ ID NO:1420)	GAUCCAUCUUUUCCUGGACTT (SEQ ID NO:1862)	1:1
RAG3A-320	CAGGTATGATGTCCAGGGA (SEQ ID NO:979)	CAGGUAUGAUGUCCAGGGATT (SEQ ID NO:1421)	UCCCUGGACAUCAUACCUGTT (SEQ ID NO:1863)	1:1
RAG3A-1010	ATCCCAGCACCCTCCTTCC (SEQ ID NO:980)	AUCCCAGCACCCUCCUUCCTT (SEQ ID NO:1422)	GGAAGGAGGGUGCUGGGAUTT (SEQ ID NO:1864)	1:1
RAG3A-999	CTCCTTCCTAATCTTGGGA (SEQ ID NO:981)	CUCCUUCCUAAUCUUGGGATT (SEQ ID NO:1423)	UCCCAAGAUUAGGAAGGAGTT (SEQ ID NO:1865)	1:1

RAG3A-567	CAGCAGACGAGCACCTAAG (SEQ ID NO:982)	CAGCAGACGAGCACCUAAGTT (SEQ ID NO:1424)	CUUAGGUGCUCGUCUGCUGTT (SEQ ID NO:1866)	1.1
RAG3A-862	GGATGATGGGATCAAGGTC (SEQ ID NO:983)	GGAUGAUGGGAUCAAGGUCTT (SEQ ID NO:1425)	GACCUUGAUCCCAUCAUCCTT (SEQ ID NO:1867)	1.1
RAG3A-460	CACCAACCCATAACAGGAG (SEQ ID NO:984)	CACCAACCCAUAACAGGAGTT (SEQ ID NO:1426)	CUCCUGUUAUGGGUUGGUGTT (SEQ ID NO:1868)	1.1
RAG3A-921	ATGCCCATCCTTGGGGAGG (SEQ ID NO:985)	AUGCCCAUCCUUGGGGAGGTT (SEQ ID NO:1427)	CCUCCCCAAGGAUGGGCAUTT (SEQ ID NO:1869)	1.1
RAG3A-704	AAGACAGGGACACATGGGC (SEQ ID NO:986)	AAGACAGGGACACAUGGGCTT (SEQ ID NO:1428)	GCCCAUGUGUCCCUGUCUUTT (SEQ ID NO:1870)	1.1
RAG3A-233	CAGCAACACAAATGTCCTG (SEQ ID NO:987)	CAGCAACACAAAUGUCCUGTT (SEQ ID NO:1429)	CAGGACAUUUGUGUUGCUGTT (SEQ ID NO:1871)	1.1
RAG3A-1203	ATCTCCCTCTCATTGTAAC (SEQ ID NO:988)	AUCUCCCUCUCAUUGUAACTT (SEQ ID NO:1430)	GUUACAAUGAGAGGGGAGAUTT (SEQ ID NO:1872)	1.1
RAG3A-247	CTGTGCTTCTTCCCCAGCA (SEQ ID NO:989)	CUGUGCUUCUUCCCCAGCATT (SEQ ID NO:1431)	UGCUGGGGAAGAAGCACAGTT (SEQ ID NO:1873)	1.1
RAG3A-721	CAGCAGCTGTCTTTCCTAA (SEQ ID NO:990)	CAGCAGCUGUCUUUCCUAATT (SEQ ID NO:1432)	UUAGGAAAGACAGCUGCUGTT (SEQ ID NO:1874)	1.1
RAG3A-391	ACAAGATAGGACTCCCTAG (SEQ ID NO:991)	ACAAGAUAGGACUCCCUAGTT (SEQ ID NO:1433)	CUAGGGAGUCCCUAUCUUGUTT (SEQ ID NO:1875)	1.1
RAG3A-159	GCCCATGTCCAGGAAAAAGA (SEQ ID NO:992)	GCCCAUGUCCAGGAAAAAGATT (SEQ ID NO:1434)	UCUUUUCCUGGACAUGGGCTT (SEQ ID NO:1876)	1.1
RAG3A-437	CTCTCATGTGGGCAATATC (SEQ ID NO:993)	CUCUCAUGUGGGCAAUAUCTT (SEQ ID NO:1435)	GAUAUUGCCCACAUGAGAGTT (SEQ ID NO:1877)	1.1
RAG3A-29	GTGTCTGGTGGCTCCCTTC (SEQ ID NO:994)	GUGUCUGGUGGCUCCCUUCTT (SEQ ID NO:1436)	GAAGGGAGCCACCAGACACTT (SEQ ID NO:1878)	1.1
RAG3A-63	GAAGAGAAGGCGTCACTTC (SEQ ID NO:995)	GAAGAGAAGGCGUCACUUCTT (SEQ ID NO:1437)	GAAGUGACGCCUUCUCUUCTT (SEQ ID NO:1879)	1.1
RAG3A-996	CTTCCTAATCTTGGGAGAC (SEQ ID NO:996)	CUUCCUAAUCUUGGGAGACTT (SEQ ID NO:1438)	GUCUCCCAAGAUUAGGAAGTT (SEQ ID NO:1880)	1.1
RAG3A-1083	TTGGTTCCCTGGTCATGCC (SEQ ID NO:997)	UUGGUUCCCUGGUCAUGCCTT (SEQ ID NO:1439)	GGCAUGACCAGGGAACCAATT (SEQ ID NO:1881)	1.1
RAG3A-1128	CAAGGGACCCTCTGCCTCT (SEQ ID NO:998)	CAAGGGACCCUCUGCCUCUTT (SEQ ID NO:1440)	AGAGGCAGAGGGUCCCUUGTT (SEQ ID NO:1882)	1.1
RAG3A-1094	CCTCCTTTCTCTTGGTTCC (SEQ ID NO:999)	CCUCCUUUCUCUUGGUUCCTT (SEQ ID NO:1441)	GGAACCAAGAGAAAGGAGGTT (SEQ ID NO:1883)	1.1

RAG3A-771	AGGGCCAAAGGAAAAGGGG (SEQ ID NO:1000)	AGGGCCAAAGGAAAAGGGGTT (SEQ ID NO:1442)	CCCCUUUUCCUUUGGCCCUTT (SEQ ID NO:1884)	1.1
RAG3A-287	AGCCAGGGAGTGAAAACCC (SEQ ID NO:1001)	AGCCAGGGAGUGAAAACCCTT (SEQ ID NO:1443)	GGGUUUUCACUCCCUGGCUTT (SEQ ID NO:1885)	1.1
RAG3A-981	AGACATCTCGTCTGGCTGG (SEQ ID NO:1002)	AGACAUCUCGUCUGGCUGGTT (SEQ ID NO:1444)	CCAGCCAGACGAGAUGUCUTT (SEQ ID NO:1886)	1.1
RAG3A-23	GGTGGCTCCCTTCTCTGAT (SEQ ID NO:1003)	GGUGGCUCCCUUCUCUGAUTT (SEQ ID NO:1445)	AUCAGAGAAGGGAGCCACCTT (SEQ ID NO:1887)	1.1
RAG3A-1072	GTCATGCCTGCCTCCCTGT (SEQ ID NO:1004)	GUCAUGCCUGCCUCCCUGUTT (SEQ ID NO:1446)	ACAGGGAGGCAGGCAUGACTT (SEQ ID NO:1888)	1.1
RAG3A-415	GTTCCCACTTCGAAAGGGG (SEQ ID NO:1005)	GUUCCCACUUCGAAAGGGGTT (SEQ ID NO:1447)	CCCCUUUCGAAGUGGGGAACTT (SEQ ID NO:1889)	1.1
RAG3A-1287	TGAGGTCGCTCCTCATTCT (SEQ ID NO:1006)	UGAGGUCGCUCCUCAUUCUTT (SEQ ID NO:1448)	AGAAUGAGGAGCGACCUCATT (SEQ ID NO:1890)	1.1
RAG3A-1201	CTCCCTCTCATTGTAACTT (SEQ ID NO:1007)	CUCCCUCUCAUUGUAACUUTT (SEQ ID NO:1449)	AAGUUACAAUGAGAGGGAGTT (SEQ ID NO:1891)	1.1
RAG3A-772	CAGGGCCAAAGGAAAAGGG (SEQ ID NO:1008)	CAGGGCCAAAGGAAAAGGGTT (SEQ ID NO:1450)	CCCUUUUCCUUUGGCCCUGTT (SEQ ID NO:1892)	1.1
RAG3A-1249	ACCTAGCCAGAAACCGGCA (SEQ ID NO:1009)	ACCUAGCCAGAAACCGGCATT (SEQ ID NO:1451)	UGCCGGUUUCUGGCUAGGUTT (SEQ ID NO:1893)	1.1
RAG3A-546	CAGGCTTAACCCAGTGCAC (SEQ ID NO:1010)	CAGGCUUAACCCAGUGCACTT (SEQ ID NO:1452)	GUGCACUGGGUUAAGCCUGTT (SEQ ID NO:1894)	1.1
RAG3A-160	TGCCCATGTCCAGGAAAAG (SEQ ID NO:1011)	UGCCCAUGUCCAGGAAAAGTT (SEQ ID NO:1453)	CUUUUCCUGGACAUGGGCATT (SEQ ID NO:1895)	1.1
RAG3A-64	GGAAGAGAAGGCGTCACTT (SEQ ID NO:1012)	GGAAGAGAAGGCGUCACUUTT (SEQ ID NO:1454)	AAGUGACGCCUUCUCUUCCTT (SEQ ID NO:1896)	1.1
RAG3A-1002	ACCCTCCTTCCTAATCTTG (SEQ ID NO:1013)	ACCCUCCUUCCUAAUCUUGTT (SEQ ID NO:1455)	CAAGAUUAGGAAGGAGGGUTT (SEQ ID NO:1897)	1.1
RAG3A-1288	CTGAGGTCGCTCCTCATTC (SEQ ID NO:1014)	CUGAGGUCGCUCCUCAUUCTT (SEQ ID NO:1456)	GAAUGAGGAGCGACCUCAGTT (SEQ ID NO:1898)	1.1
RAG3A-891	AGAGCCTGAGGAAGTTCTG (SEQ ID NO:1015)	AGAGCCUGAGGAAGUUCUGTT (SEQ ID NO:1457)	CAGAACUUCCUCAGGCUCUTT (SEQ ID NO:1899)	1.1
RAG3A-231	GCAACACAAATGTCCTGCC (SEQ ID NO:1016)	GCAACACAAAUGUCCUGCCTT (SEQ ID NO:1458)	GGCAGGACAUUUGUGUUGCTT (SEQ ID NO:1900)	1.1
RAG3A-669	TCACATGTGGAACGGTAGG (SEQ ID NO:1017)	UCACAUGUGGAACGGUAGGTT (SEQ ID NO:1459)	CCUACCGUUCCACAUGUGATT (SEQ ID NO:1901)	1.1

RAG3A-1009	TCCCAGCACCCTCCTTCCT (SEQ ID NO:1018)	UCCCAGCACCCUCCUUCCUTT (SEQ ID NO:1460)	AGGAAGGAGGGUGCUGGGATT (SEQ ID NO:1902)	1.1
RAG3A-656	GGTAGGAGATGGAAGACGG (SEQ ID NO:1019)	GGUAGGAGAUGGAAGACGGTT (SEQ ID NO:1461)	CCGUCUUCCAUCUCCUACCTT (SEQ ID NO:1903)	1.1
RAG3A-229	AACACAAATGTCCTGCCAG (SEQ ID NO:1020)	AACACAAAUGUCCUGCCAGTT (SEQ ID NO:1462)	CUGGCAGGACAUUUGUGUUTT (SEQ ID NO:1904)	1.1
RAG3A-484	CCCGTCCAAACCCTTTCCC (SEQ ID NO:1021)	CCCGUCCAAACCCUUUCCCTT (SEQ ID NO:1463)	GGGAAAGGGUUUGGACGGGTT (SEQ ID NO:1905)	1.1
RAG3A-799	CTGGGAAGAAAGCAAAGGA (SEQ ID NO:1022)	CUGGGAAGAAAGCAAAGGATT (SEQ ID NO:1464)	UCCUUUGCUUUCUUCCCAGTT (SEQ ID NO:1906)	1.1
RAG3A-296	AATTTGGATAGCCAGGGAG (SEQ ID NO:1023)	AAUUUGGAUAGCCAGGGAGTT (SEQ ID NO:1465)	CUCCCUGGCUAUCCAAAUUTT (SEQ ID NO:1907)	1.1
RAG3A-1183	TATCCTCAGGCGCATTCGA (SEQ ID NO:1024)	UAUCCUCAGGCGCAUUCGATT (SEQ ID NO:1466)	UCGAAUGCGCCUGAGGAUATT (SEQ ID NO:1908)	1.1
RAG3A-380	CTCCCTAGGGGATTACAGA (SEQ ID NO:1025)	CUCCCUAGGGGAUUACAGATT (SEQ ID NO:1467)	UCUGUAAUCCCCUAGGGAGTT (SEQ ID NO:1909)	1.1
RAG3A-157	CCATGTCCAGGAAAAAGATG (SEQ ID NO:1026)	CCAUGUCCAGGAAAAAGAUGTT (SEQ ID NO:1468)	CAUCUUUUCCUGGACAUGGTT (SEQ ID NO:1910)	1.1
RAG3A-1185	CTTATCCTCAGGCGCATTC (SEQ ID NO:1027)	CUUAUCCUCAGGCGCAUUCTT (SEQ ID NO:1469)	GAAUGCGCCUGAGGAUAAGTT (SEQ ID NO:1911)	1.1
RAG3A-1244	GCCAGAAACCGGCAGCATT (SEQ ID NO:1028)	GCCAGAAACCGGCAGCAUUTT (SEQ ID NO:1470)	AAUGCUGCCGGUUUCUGGCTT (SEQ ID NO:1912)	1.1
RAG3A-588	GCCATCTAAGCCACTGGAC (SEQ ID NO:1029)	GCCAUCUAAGCCACUGGACTT (SEQ ID NO:1471)	GUCCAGUGGCUUAGAUGGCTT (SEQ ID NO:1913)	1.1
RAG3A-436	TCTCATGTGGGCAATATCC (SEQ ID NO:1030)	UCUCAUGUGGGCAAUAUCCTT (SEQ ID NO:1472)	GGAUAUUGCCCACAUGAGATT (SEQ ID NO:1914)	1.1
RAG3A-1029	ACCCACTATCCTCCCAGCT (SEQ ID NO:1031)	ACCCACUAUCCUCCCAGCUTT (SEQ ID NO:1473)	AGCUGGGAGGAUAGUGGGUTT (SEQ ID NO:1915)	1.1
RAG3A-28	TGTCTGGTGGCTCCCTTCT (SEQ ID NO:1032)	UGUCUGGUGGCUCCCUUCUTT (SEQ ID NO:1474)	AGAAGGGAGCCACCAGACATT (SEQ ID NO:1916)	1.1
RAG3A-234	CCAGCAACACACAAATGTCCT (SEQ ID NO:1033)	CCAGCAACACACAAAUGUCCUTT (SEQ ID NO:1475)	AGGACAUUUGUGUUGCUGGTT (SEQ ID NO:1917)	1.1
RAG3A-249	CTCTGTGCTTCTTCCCCAG (SEQ ID NO:1034)	CUCUGUGCUUCUUCCCCAGTT (SEQ ID NO:1476)	CUGGGGAAGAAGCACACAGAGTT (SEQ ID NO:1918)	1.1
RAG3A-775	AGCCAGGGCCAAAGGAAAA (SEQ ID NO:1035)	AGCCAGGGCCAAAGGAAAATT (SEQ ID NO:1477)	UUUUCCUUUGGCCCUGGCUTT (SEQ ID NO:1919)	1.1

RAG3A-951	CCAGGATCTAGGCCACACT (SEQ ID NO:1036)	CCAGGAUCUAGGCCACACUTT (SEQ ID NO:1478)	AGUGUGGCCUAGAUCCUGGTT (SEQ ID NO:1920)	1.1
RAG3A-861	GATGATGGGATCAAGGTCA (SEQ ID NO:1037)	GAUGAUGGGAUCAAGGUCATT (SEQ ID NO:1479)	UGACCUUGAUCCCAUCAUCTT (SEQ ID NO:1921)	1.1
RAG3A-259	TAAACAAGACCTCTGTGCT (SEQ ID NO:1038)	UAAACAAGACCUCUGUGCUTT (SEQ ID NO:1480)	AGCACAGAGGUCUUGUUUATT (SEQ ID NO:1922)	1.1
RAG3A-394	ATGACAAGATAGGACTCCC (SEQ ID NO:1039)	AUGACAAGAUAGGACUCCCTT (SEQ ID NO:1481)	GGGAGUCCUAUCUUGUCAUTT (SEQ ID NO:1923)	1.1
RAG3A-534	AGTGCACGTGTGCGCACAT (SEQ ID NO:1040)	AGUGCACGUGUGCGCACAUTT (SEQ ID NO:1482)	AUGUGCGCACACGUGCACUTT (SEQ ID NO:1924)	1.1
RAG3A-316	TATGATGTCCAGGGAAAAG (SEQ ID NO:1041)	UAUGAUGUCCAGGGAAAAGTT (SEQ ID NO:1483)	CUUUUCCCUGGACAUCAUATT (SEQ ID NO:1925)	1.1
RAG3A-560	CGAGCACCTAAGCTCAGGC (SEQ ID NO:1042)	CGAGCACCUAAGCUCAGGCTT (SEQ ID NO:1484)	GCCUGAGCUUAGGUGCUCGTT (SEQ ID NO:1926)	1.1
RAG3A-1105	CCCACTCCCAGCCTCCTTT (SEQ ID NO:1043)	CCCACUCCCAGCCUCCUUUTT (SEQ ID NO:1485)	AAAGGAGGCUGGGAGUGGGTT (SEQ ID NO:1927)	1.1
RAG3A-709	TTCCTAAGACAGGGACACA (SEQ ID NO:1044)	UUCCUAAGACAGGGACACATT (SEQ ID NO:1486)	UGUGUCCCUGUCUUAGGAATT (SEQ ID NO:1928)	1.1
RAG3A-948	GGATCTAGGCCACACTTCT (SEQ ID NO:1045)	GGAUCUAGGCCACACUUCUTT (SEQ ID NO:1487)	AGAAGUGUGGCCUAGAUCCTT (SEQ ID NO:1929)	1.1
RAG3A-998	TCCTTCCTAATCTTGGGAG (SEQ ID NO:1046)	UCCUUCCUAAUCUUGGGAGTT (SEQ ID NO:1488)	CUCCCAAGAUUAGGAAGGATT (SEQ ID NO:1930)	1.1
RAG3A-387	GATAGGACTCCCTAGGGGA (SEQ ID NO:1047)	GAUAGGACUCCCUAGGGGATT (SEQ ID NO:1489)	UCCCCUAGGGAGUCCUAUCTT (SEQ ID NO:1931)	1.1

【０１５１】

８３３個のｓａＲＮＡの活性をＴＨＰＯプロモーターにおける位置に従って並んでおり、機能性ｓａＲＮＡの分布が集中し、すなわち、あるプロモーター領域において活性化ｓａＲＮＡが特定の「ホットスポット（ｈｏｔ ｓｐｏｔ）」領域に集中するという現象が明らかに確認できる（図１１）。図１１に示されるように、プロモーターの-１３３９/-１０４４領域（Ｈ１）、-１０２７/-９０３領域（Ｈ２）、-８６１/-７５４（Ｈ３）、-７２８/-６１１（Ｈ４）及び-５９３/-１領域（Ｈ５）のそれぞれには、５個のホットスポット領域が現れ、活性化用ｓａＲＮＡが高度に集まるように見られる。この分析結果から明らかなように、活性化用ｓａＲＮＡはプロモーター上でランダムに分布するものではなく、特定のホットスポット領域に集まるということであ

る。

【０１５２】

配列表のSEQ ID NO：601の5’～3’の位置1～位置296に対応するホットスポットH1（5’～3’：-1339～-1044）配列：

1 caaaccctca ccaccctctc tcactgccta gcctgcctcc ctaccttctc
51 tctgaggtcg ctcctcattc ttgtgttacc caggacaggg acctagccag
101 aaaccggcag cattcccccc tctgtggagt gacagtatct ccctctcatt
151 gtaacttatc ctcaggcgca ttcgacagtc ccctcttgct ttctcacccc
201 cttccttcac ccaagggacc ctctgcctct ccagcccact cccagcctcc
251 tttctcttgg ttccctggtc atgcctgcct ccctgtctcc tgtctc

【０１５３】

配列表のSEQ ID NO：602の5’～3’の位置1～位置125に対応するホットスポットH2（5’～3’：-1027～-903）配列：

1 ccactatcct cccagctatc ccagcaccct ccttcctaat cttgggagac
51 atctcgtctg gctggacggg aaaattccag gatctaggcc acacttctca
101 gcagacatgc ccatccttgg ggagg

【０１５４】

配列表のSEQ ID NO：603の5’～3’の位置1～位置108に対応するホットスポットH3（5’～3’：-861～-754）配列：

1 gatgatggga tcaaggtcag gccaggaagc ccctgaggac agagactgtg
51 gggagactgg gactgggaag aaagcaaagg agctagagcc agggccaaag
101 gaaaaggg

【０１５５】

配列表のSEQ ID NO：604の5’～3’の位置1～位置118に対応するホットスポットH4（5’～3’：-728～-611）配列：

1 ggaggtccag cagctgtctt tcctaagaca gggacacatg ggcctggtta
51 ttcctcttgt cacatgtgga acggtaggag atggaagacg gagacagaac
101 aagcaaagga gggccctg

【０１５６】

配列表のSEQ ID NO：605の5’～3’の位置1～位置593に対応するホットスポットH5（5’～3’：-593～-1）配列：

1 gtgtagccat ctaagccact ggaccccagc agacgagcac ctaagctcag
51 gcttaaccca gtgcacgtgt gcgcacatac atgtgccccg cacctgacag
101 tccactcaac ccgtccaaac cctttcccca taacaccaac ccataacagg
151 agatttctct catgtgggca atatccgtgt tcccacttcg aaaggggggaa
201 tgacaagata ggactcccta ggggattaca gaaagaaaag caggaaagca
251 agcatcctgt tggatttcag cagcaggtat gatgtccagg gaaaagaaat
301 ttggatagcc agggagtgaa aaccccacca atcttaaaca agacctctgt
351 gcttcttccc cagcaacaca aatgtcctgc cagattcctc ctggaaaaaa
401 acttctgctc ctgtcccccc ccaggtccca ggttgcccat gtccaggaaa
451 agatggatcc ccctatccaa atcttctccg tggtgtgtgt gggtggagga
501 gtggaccctg gtccaggcag gggctccagg gaagagaagg cgtcacttcc
551 gggggccttc accagtgtct ggtggctccc ttctctgatt ggg

【０１５７】

実施例10 ヒトTHPO saRNAによるヒト肝がん細胞（HepG2）THPO mRNA発現の促進

（1）細胞培養及びトランスフェクション

細胞培養は実施例9に記載されるように、HepG2細胞（中国科学院上海生命科学研究院，TCHu119）を2×10^5／ウェルで6ウェルプレートに敷き、メーカーの指示に従って、RNAiMax（Invitrogen，Carlsbad，CA）を用いて25 nMの（断らない限り）濃度でヒトTHPO saRNAをトランスフェクションし、トランスフェクション時間が72時間で

あり、処理ごとに2つの重複ウェルを利用した。

【０１５８】

（２）ツーステップ法RT-qPCR

トランスフェクション終了後、培地を捨てて、1ウェルあたり細胞溶解液を500 μl加え、室温で5分間インキュベートした。Qiagen RNeasyキットでRNAを抽出し、逆転写後、ABI 7500 高速リアルタイム（Fast Real-time）PCRシステム（Applied Biosystems）にてqPCR分析を行い、サンプルごとに3個のウェルを繰り返して増幅させ、RT-PCR とqPCR反応システムは実施例5の表5及び表6に示されるようで、増幅プライマーは表11に示される。同時にTBPとHPRT1を増幅し内部参照とし、そのうちTHPOをTHPO F1/R1プライマー対で増幅した。

【０１５９】

反応条件は：95℃30秒、95℃5秒、60℃30 秒、40サイクル増幅である。

あるsaRNAトランスフェクションサンプルのTHPO（目標遺伝子）の、対照処理（Mock）に対する発現値（Erel）を計算するために、実施例3の式2に目標遺伝子及び2個の内部参照遺伝子のCt値を代入して計算した。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / 2^{(CtRm-CtRs)} \quad （式2）$$

【０１６０】

図12には、異なるsaRNA処理後の細胞中のmRNAに対するTHPOの発現値が示される。対照処理（Mock）をブランクトランスフェクション対照とし、対照群と比べて、siRNA（RAG3A-365i）群のmRNA相対発現値は85%低下したことから、siRNAが低分子干渉RNA対照トランスフェクションとして成功であることがわかる。RAG3A-1219、RAG3A-1096、RAG3A-1308、RAG3A-1069及びRAG3A-851群のmRNA相対発現値はいずれも対照群よりも高く、そのmRNA相対発現値はそれぞれ1.8、1.8、1.6、1.7及び1.9倍上昇した。RAG3A-541、RAG3A-1319、RAG3A-62、RAG3A-889及びRAG3A-787群のmRNA相対発現値も対照群よりも高く、それぞれ2.5、2.1、2.9、2.0及び2.0倍増加した。RAG3A-62の活性化効果が特に顕著で、そのmRNA相対発現値は3倍近く増加した。これから、ランダムに選択した活性化saRNAが効果的にHepG2細胞にトランスフェクションできTHPO mRNAの発現を顕著に促進できることがわかる。

【０１６１】

実施例11 ヒトTHPO saRNAによるヒト肝がん細胞（HepG2）THPOタンパク質レベル発現の促進

細胞の培養は実施例9のとおりであり、細胞のトランスフェクションは実施例10のとおりである。ELISA KitでHepG2細胞培養液中のTHPOたんぱく質レベルを検出した

1） ヒトTHPOたんぱく質標準品を脱イオン水又は蒸留水で溶解した。溶解して、20,000 pg/mLタンパク質標準品の保存液を生成した。100 μLのTHPOタンパク質標準品保存液を取り、900μLのキャリブレーション希釈液RD6-11（希釈率1：5）（細胞培養の上清サンプル用）又はキャリブレーション希釈液RD6-11（血清/血漿サンプル用）に加え、2000 pg/mLの標準品溶液を取得し、これに基づいて7つの勾配希釈をし、適切なキャリブレーション希釈液（0 pg/mL）をゼロ標準とした。

2） サンプルの細胞上澄液を取り、死んだ細胞と破片を遠心で除去した。

3） マイクロプレートフレームから適量のマイクロプレートテープを取り出した。

4） ウェルごとに50 μLの分析希釈液RD1-1を加えた。

5） ウェルごとに200 μLの標準品、対照又は処理サンプルを入れた。メンブレンを覆い、室温で3時間インキュベートした。

6） ウェルごとに液体を取り除き、400 μLの洗浄緩衝液で4回洗浄した。

7） ウェルごとに200 μLのヒトTHPO抗体を加え、メンブレンで覆い、室温で1時間インキュベートした。

8）手順5を繰り返した。

9） ウェル毎に200 μLの基質溶液（発色試薬（Color Regent）AとBを同体積で混合し、15分以内に使用完了）を加え、室温で光を避けて30分間インキュベートした。

10）ウェルごとに50 μLの停止液を加え、軽く均一に混合した。
11）多機能マイクロプレートリーダーにより450 nMでの吸光度（30分間内）を検出した。

【０１６２】

図13には、異なるsaRNA処理後の細胞の培養液中のタンパク質レベルに対するTHPOの発現値が示される。対照処理（Mock）をブランクトランスフェクション対照とし、対照群と比べて、siRNA（DS3A-365i）群のたんぱく質相対発現値は81%低下したことから、siRNAが低分子干渉RNA対照トランスフェクションとして成功であることがわかる。RAG3A-723、RAG3A-892、RAG3A-62、RAG3A-1178、RAG3A-889、RAG3A-563、RAG3A-487及びRAG3A-787群のTHPOたんぱく質レベル相対発現値はいずれも対照群よりも高く、そのたんぱく質レベル相対発現値はそれぞれ1.46、1.26、1.44、1.31、1.29、1.32、1.42及び1.40倍上昇した。これから、ランダムに選択した活性化saRNAがHepG2細胞において、THPOたんぱく質レベルの発現を異なる程度で促進できることがわかる。

【０１６３】

上記結果から分かるように、出願者は、ヒトとマウスTHPO/Thpo遺伝子プロモーターに標的化するsaRNAをハイスループットスクリーニングすることにより、THPO/Thpo遺伝子発現を有意に活性化できる複数のヒトとマウスsaRNAを見つけた。出願者は大量の研究を通じて、マウスのそのThpo遺伝子に標的化する活性saRNAとヒトのそのTHPOに標的化するTHPO遺伝子の活性saRNAはいずれも本発明で使用したリポソームシステムにより効果的に細胞内に送達でき、且つmRNAとたんぱく質発現レベルで細胞内のThpo/THPO遺伝子と蛋白質の発現を著しく高めることができることを見出した。特にマウスThpo遺伝子の活性saRNAは、マウスの体内でThpo mRNAとたんぱく質の発現を著しく増加させ、血小板の数量も顕著にアップレギュレーション又は増加する。従い、本発明のマウスThpo活性saRNAとヒトTHPO活性saRNAはThpo/THPOたんぱく質低下又は不足に関連する疾患又は状況、若しくは血小板減少症などさまざまな原因で引き起こした疾患又は障害を治療でき、又は上記疾患や障害を治療するための薬物の製造に用いられる。

【０１６４】

参照文献

Bartley, T. D., J. Bogenberger, P. Hunt, Y. S. Li, H. S. Lu, F. Martin, M. S. Chang, B. Samal, J. L. Nichol, S. Swift, and et al. 1994. 'Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl', Cell, 77: 1117-24.
Basser, R. 2002. 'The impact of thrombopoietin on clinical practice', Curr Pharm Des, 8: 369-77.
de Sauvage, F. J., P. E. Hass, S. D. Spencer, B. E. Malloy, A. L. Gurney, S. A. Spencer, W. C. Darbonne, W. J. Henzel, S. C. Wong, W. J. Kuang, and et al. 1994. 'Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand', Nature, 369: 533-8.
Hassan, M. N., and E. K. Waller. 2015. 'Treating chemotherapy-induced thrombocytopenia: is it time for oncologists to use thrombopoietin agonists?', Oncology (Williston Park), 29: 295-6.
Kaushansky, K. 2006. 'Lineage-specific hematopoietic growth factors', N Engl J Med, 354: 2034-45.
Kuter, D. J. 2009. 'Thrombopoietin and thrombopoietin mimetics in the treatment of thrombocytopenia', Annu Rev Med, 60: 193-206.
Laki, K. 1972. 'Our ancient heritage in blood clotting and some of its consequences', Ann N Y Acad Sci, 202: 297-307.
Machlus, K. R., J. N. Thon, and J. E. Italiano, Jr. 2014. 'Interpreting the

developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation', Br J Haematol, 165: 227-36.
Mignotte, V., I. Vigon, E. Boucher de Crevecoeur, P. H. Romeo, V. Lemarchandel, and S. Chretien. 1994. 'Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL)', Genomics, 20: 5-12.
Provan, D., R. Stasi, A. C. Newland, V. S. Blanchette, P. Bolton-Maggs, J. B. Bussel, B. H. Chong, D. B. Cines, T. B. Gernsheimer, B. Godeau, J. Grainger, I. Greer, B. J. Hunt, P. A. Imbach, G. Lyons, R. McMillan, F. Rodeghiero, M. A. Sanz, M. Tarantino, S. Watson, J. Young, and D. J. Kuter. 2010. 'International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia', Blood, 115: 168-86.
Seo, A., M. Ben-Harosh, M. Sirin, J. Stein, O. Dgany, J. Kaplelushnik, M. Hoenig, U. Pannicke, M. Lorenz, K. Schwarz, C. Stockklausner, T. Walsh, S. Gulsuner, M. K. Lee, A. Sendamarai, M. Sanchez-Bonilla, M. C. King, H. Cario, A. E. Kulozik, K. M. Debatin, A. Schulz, H. Tamary, and A. Shimamura. 2017. 'Bone marrow failure unresponsive to bone marrow transplant is caused by mutations in thrombopoietin', Blood, 130: 875-80.
Solberg, L. A., Jr. 2005. 'Biologic aspects of thrombopoietins and the development of therapeutic agents', Curr Hematol Rep, 4: 423-8.

【図面】

【図１】

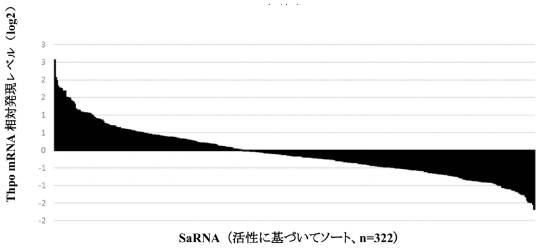


図1

【図２】

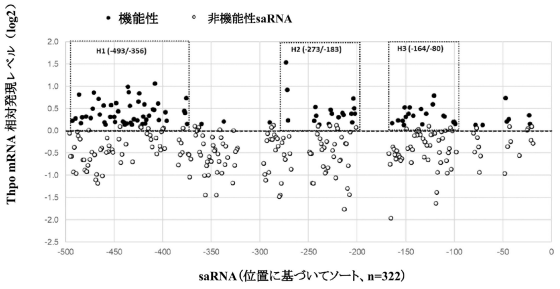


図2

【図３】

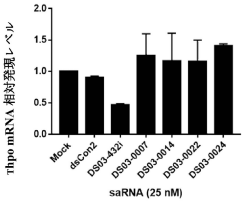


図3

【図４】

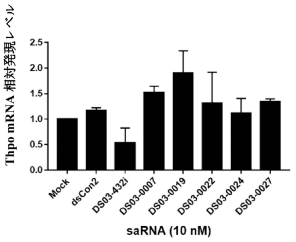


図4

【図５】

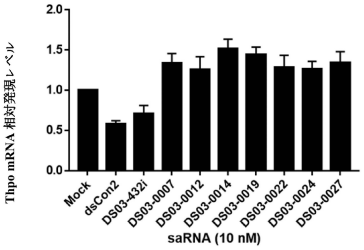


図5

【図６】

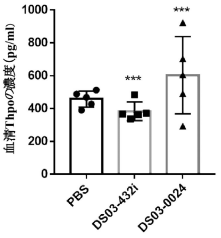


図6

【図７】

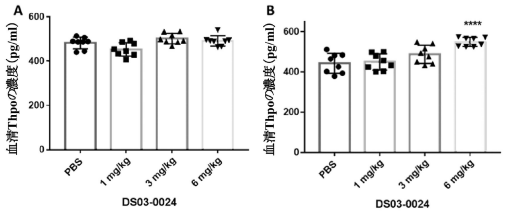


図7

【図８】

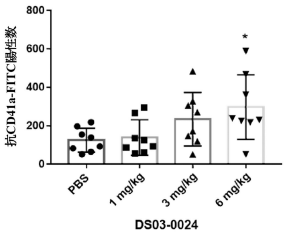


図8

【図９】

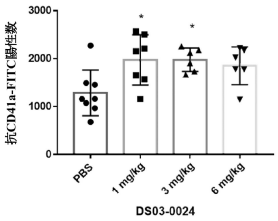


図9

【図１０】

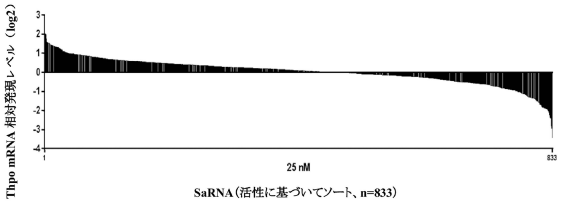


図10

【図１１】

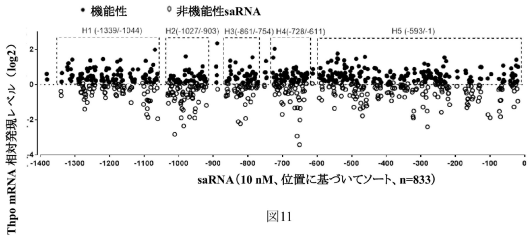


図11

【図１２】

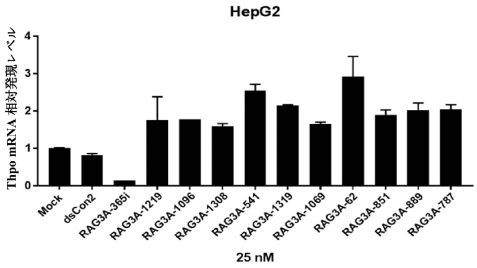


図12

【図１３】

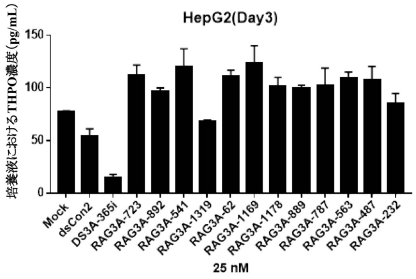


図13

【配列表】

2022552940000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/116227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61P 7/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

数据库: CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, PUBMED, 百度学术, EMBL+GenBank+DDBJ, 中国专利生物序列检索系统; 关键词: 促血小板生成素, Thrombopoietin, THPO, TPO, 血小板, thrombocyte, 激活, 上调, 巨核细胞生长和发育因子, megakaryocyte growth and development factor, MGDF, C-MPL配体, 小激活核酸分子, 小激活RNA, 活化RNA, saRNA , RNAa, 高通量, 筛选, 对说明书中人THPO启动子序列的检索

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103842508 A (MINA THERAPEUTICS LTD.) 04 June 2014 (2014-06-04) see claims 1-13	18-21
Y	CN 106032532 A (PEKING UNION MEDICAL COLLEGE HOSPITAL, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 19 October 2016 (2016-10-19) see claims 1-3	18-21
Y	CN 106480028 A (SHANGHAI SEVENTH PEOPLE'S HOSPITAL) 08 March 2017 (2017-03-08) see description, paragraphs [0008] to [0020]	18-21
A	CN 1141061 A (GENENTECH INC.) 22 January 1997 (1997-01-22) see entire document	18-21
Y	Dordelmann C et al. "accession number: NG_012136.1" *GenBank*, 04 August 2019 (2019-08-04), see sequence list, and related information	18-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 December 2020	**24 February 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China**	Authorized officer
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/116227

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **1-17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Relating to a method for treatment of the living human or animal body, and thus belonging to subject matter which does not require a search under PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/116227

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103842508	A	04 June 2014	CN	103842508	B	24 February 2016
				JP	2019115345	A	18 July 2019
				US	10704044	B2	07 July 2020
				US	2018201932	A1	19 July 2018
				US	9284553	B2	15 March 2016
				US	9944930	B2	17 April 2018
				EP	3456828	A1	20 March 2019
				US	9745579	B2	29 August 2017
				EP	2723862	B1	19 September 2018
				US	2014228424	A1	14 August 2014
				JP	2017035083	A	16 February 2017
				JP	5993002	B2	14 September 2016
				JP	2014519838	A	21 August 2014
				KR	20140039307	A	01 April 2014
				JP	6742459	B2	19 August 2020
				KR	20190125504	A	06 November 2019
				EP	2723862	A1	30 April 2014
				US	2016145618	A1	26 May 2016
				WO	2012175958	A1	27 December 2012
				JP	6483645	B2	13 March 2019
				KR	102039315	B1	04 November 2019
				US	2017321215	A1	09 November 2017
CN	106032532	A	19 October 2016		None		
CN	106480028	A	08 March 2017	CN	106480028	B	05 April 2019
CN	1141061	A	22 January 1997	CA	2178482	A1	13 July 1995
				JP	H10113186	A	06 May 1998
				DK	149194	A	04 July 1995
				IT	TO950002	D0	02 January 1995
				NL	9500010	A	01 August 1995
				GB	2285446	B	28 July 1999
				LU	88573	A1	01 June 1995
				AU	704266	B2	15 April 1999
				GB	2285446	A	12 July 1995
				IE	72517	B1	23 April 1997
				SG	47030	A1	20 March 1998
				CZ	192296	A3	14 May 1997
				NO	962783	L	03 September 1996
				PT	101627	B	29 November 1996
				SK	282265	B6	03 December 2001
				NO	962783	A	03 September 1996
				CN	1134539	C	14 January 2004
				IT	TO950002	A1	03 July 1995
				PT	101627	A	30 November 1995
				ES	2114786	B1	01 January 1999
				FR	2714670	A1	07 July 1995
				RO	117110	B1	30 October 2001
				NZ	278726	A	26 June 1998
				IE	950002	A1	12 July 1995
				NO	962783	D0	02 July 1996
				FI	121573	B	14 January 2011

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/116227

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		CZ	9601922	A3	14 May 1997
		CA	2178482	C	03 January 2012
		EP	0738323	A1	23 October 1996
		NO	326903	B1	16 March 2009
		BG	63639	B1	31 July 2002
		IT	1283770	B1	30 April 1998
		WO	9518858	A1	13 July 1995
		HR	P941020	A2	30 April 1997
		LV	11632	B	20 April 1997
		IL	112184	A	25 July 2004
		BG	100693	A	30 January 1998
		GB	9425831	D0	22 February 1995
		SK	87596	A3	05 November 1997
		AU	1514695	A	01 August 1995
		HU	9601805	D0	28 August 1996
		LV	11632	A	20 December 1996
		SI	9420079	A	28 February 1997
		FR	2714670	B1	10 January 1997
		HU	T75657	A	28 May 1997
		CZ	296130	B6	11 January 2006
		IL	112184	D0	15 March 1995
		ES	2114786	A1	01 June 1998
		FI	962723	A	03 September 1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/116227

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61P 7/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

数据库：CNABS，CNKI，DWPI，SIPOABS，CNTXT，WOTXT，USTXT，EPTXT，ISI Web of Knowledge，PUBMED，百度学术，EMBL+GenBank+DDBJ,中国专利生物序列检索系统； 关键词：促血小板生成素，Thrombopoietin，THPO，TPO，血小板，thrombocyte，激活，上调，巨核细胞生长和发育因子，megakaryocyte growth and development factor，MG-DF，C-MPL配体，小激活核酸分子，小激活RNA，活化RNA，saRNA ，RNAa，高通量，筛选，对说明书中人THPO启动子序列的检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 103842508 A (米纳治疗有限公司) 2014年 6月 4日 (2014-06-04) 参见权利要求1-13	18-21
Y	CN 106032532 A (中国医学科学院北京协和医院) 2016年 10月 19日 (2016-10-19) 参见权利要求1-3	18-21
Y	CN 106480028 A (上海市第七人民医院) 2017年 3月 8日 (2017-03-08) 参见说明书第[0008]-[0020]段	18-21
A	CN 1141061 A (基因技术股份有限公司) 1997年 1月 22日 (1997-01-22) 参见全文	18-21
Y	Dordelmann C等. "登录号：NG_012136.1" GenBank, 2019年 8月 4日 (2019-08-04), 参见序列表和相关信息	18-21

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 12月 17日	2021年 2月 24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 罗霄 电话号码 62089158

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/116227

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 1-17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT实施细则第39.1(iv)规定的无需检索的情况。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/116227

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	103842508	A	2014年 6月 4日	CN	103842508	B	2016年 2月 24日
				JP	2019115345	A	2019年 7月 18日
				US	10704044	B2	2020年 7月 7日
				US	2018201932	A1	2018年 7月 19日
				US	9284553	B2	2016年 3月 15日
				US	9944930	B2	2018年 4月 17日
				EP	3456828	A1	2019年 3月 20日
				US	9745579	B2	2017年 8月 29日
				EP	2723862	B1	2018年 9月 19日
				US	2014228424	A1	2014年 8月 14日
				JP	2017035083	A	2017年 2月 16日
				JP	5993002	B2	2016年 9月 14日
				JP	2014519838	A	2014年 8月 21日
				KR	20140039307	A	2014年 4月 1日
				JP	6742459	B2	2020年 8月 19日
				KR	20190125504	A	2019年 11月 6日
				EP	2723862	A1	2014年 4月 30日
				US	2016145618	A1	2016年 5月 26日
				WO	2012175958	A1	2012年 12月 27日
				JP	6483645	B2	2019年 3月 13日
				KR	102039315	B1	2019年 11月 4日
				US	2017321215	A1	2017年 11月 9日
CN	106032532	A	2016年 10月 19日		无		
CN	106480028	A	2017年 3月 8日	CN	106480028	B	2019年 4月 5日
CN	1141061	A	1997年 1月 22日	CA	2178482	A1	1995年 7月 13日
				JP	H10113186	A	1998年 5月 6日
				DK	149194	A	1995年 7月 4日
				IT	T0950002	D0	1995年 1月 2日
				NL	9500010	A	1995年 8月 1日
				GB	2285446	B	1999年 7月 28日
				LU	88573	A1	1995年 6月 1日
				AU	704266	B2	1999年 4月 15日
				GB	2285446	A	1995年 7月 12日
				IE	72517	B1	1997年 4月 23日
				SG	47030	A1	1998年 3月 20日
				CZ	192296	A3	1997年 5月 14日
				NO	962783	L	1996年 9月 3日
				PT	101627	B	1996年 11月 29日
				SK	282265	B6	2001年 12月 3日
				NO	962783	A	1996年 9月 3日
				CN	1134539	C	2004年 1月 14日
				IT	T0950002	A1	1995年 7月 3日
				PT	101627	A	1995年 11月 30日
				ES	2114786	B1	1999年 1月 1日
				FR	2714670	A1	1995年 7月 7日
				RO	117110	B1	2001年 10月 30日
				NZ	278726	A	1998年 6月 26日
				IE	950002	A1	1995年 7月 12日
				NO	962783	D0	1996年 7月 2日
				FI	121573	B	2011年 1月 14日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/116227

检索报告引用的专利文件	公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
		CZ	9601922	A3	1997年 5月 14日
		CA	2178482	C	2012年 1月 3日
		EP	0738323	A1	1996年 10月 23日
		NO	326903	B1	2009年 3月 16日
		BG	63639	B1	2002年 7月 31日
		IT	1283770	B1	1998年 4月 30日
		WO	9518858	A1	1995年 7月 13日
		HR	P941020	A2	1997年 4月 30日
		LV	11632	B	1997年 4月 20日
		IL	112184	A	2004年 7月 25日
		BG	100693	A	1998年 1月 30日
		GB	9425831	D0	1995年 2月 22日
		SK	87596	A3	1997年 11月 5日
		AU	1514695	A	1995年 8月 1日
		HU	9601805	D0	1996年 8月 28日
		LV	11632	A	1996年 12月 20日
		SI	9420079	A	1997年 2月 28日
		FR	2714670	B1	1997年 1月 10日
		HU	T75657	A	1997年 5月 28日
		CZ	296130	B6	2006年 1月 11日
		IL	112184	D0	1995年 3月 15日
		ES	2114786	A1	1998年 6月 1日
		FI	962723	A	1996年 9月 3日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15	
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19	
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
Ａ６１Ｐ	*7/04 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04	
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7115(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127	
Ａ６１Ｋ	*31/713(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7115	
Ａ６１Ｋ	*31/712(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713	
Ａ６１Ｋ	*31/7125(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/712	
		Ａ６１Ｋ	31/7125	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

１８

(72)発明者　カン ムーリン
中華人民共和国 チャンスー ２２６４００ ナントン シティ ルードン チューガン アベニュー チュージャン ロード ８８８ ルードン ライフ アンド ヘルス インダストリー パーク ビルディング １８

Ｆターム（参考）　4B065　AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14 BA01 CA24
4C076　AA19 CC14
4C084　AA13 MA24 NA14 ZA531 ZA532
4C086　AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA24 NA14 ZA53