

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-517436

(P2005-517436A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 35/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 35/00

テーマコード (参考)

4 B O 2 4
 4 C O 8 4
 4 C O 8 6

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 153 頁)

(21) 出願番号 特願2003-569803 (P2003-569803)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月20日 (2003. 2. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年6月8日 (2004. 6. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/005022
 (87) 国際公開番号 W02003/070910
 (87) 国際公開日 平成15年8月28日 (2003. 8. 28)
 (31) 優先権主張番号 60/358, 580
 (32) 優先日 平成14年2月20日 (2002. 2. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/363, 124
 (32) 優先日 平成14年3月11日 (2002. 3. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 PCT/US02/17674
 (32) 優先日 平成14年5月29日 (2002. 5. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500203684
 サーナ・セラピューティクス・インコーポ
 レイテッド
 Sirna Therapeutics,
 Inc.
 アメリカ合衆国コロラド州80301, ボ
 ウルダー, ウィルダーネス・プレイス 2
 950
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100106840
 弁理士 森田 耕司
 (74) 代理人 100105991
 弁理士 田中 玲子

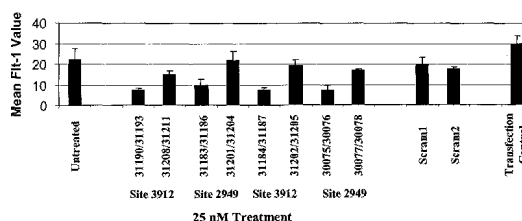
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 短干渉核酸 (s i n A) を用いた血管内皮成長因子および血管内皮成長因子レセプター遺伝子発現のRNA干渉媒介阻害

(57) 【要約】

本発明は、種々の用途、例えば、治療、診断、標的評価およびゲノム発見用途における使用において、血管内皮成長因子 (VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D) および/または血管内皮成長因子レセプター (例えば, VEGF r 1, VEGF r 2 および/または VEGF r 3) の遺伝子発現を調節するのに有用な方法および試薬に関する。詳細には、本発明は、VEGF および/または VEGF r 遺伝子の発現および/または活性に対するRNA干渉 (RNA i) を媒介しうる小核酸分子、例えば、短干渉核酸 (s i n A)、短干渉RNA (s i r N A)、二本鎖RNA (d s R N A)、マイクロRNA (m i R N A)、および短ヘアピンRNA (s h R N A) 分子に関する。小核酸分子は、癌、増殖性疾患、およびVEGFおよび/またはVEGF r の発現または活性の調節に応答する他の任意の病気の治療において有用である。

A375 24h 36B4 VEGFR1 mRNA Expression



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血管内皮成長因子レセプター（VEGFr）遺伝子の発現を減少させる二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子であって、約 21 個のヌクレオチドを含む前記 siNA 分子。

【請求項 2】

前記 siNA 分子がリボヌクレオチドを含まない、請求項 1 に記載の siNA 分子。

【請求項 3】

前記 siNA 分子がリボヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の siNA 分子。

【請求項 4】

前記二本鎖の siNA が VEGFr 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含み、かつ前記二本鎖の siNA 分子の第 2 の鎖が前記 VEGFr 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と実質的に同様のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の siNA 分子分子。 10

【請求項 5】

各前記 siNA 分子の鎖が約 19～23 個のヌクレオチドを含み、かつ各前記鎖が、他の鎖のヌクレオチドと相補的である少なくとも約 19 個のヌクレオチドを含む、請求項 4 に記載の siNA 分子。

【請求項 6】

前記 siNA 分子が、VEGFr 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み、かつ前記 siNA がセンス領域をさらに含み、前記センス領域が前記 VEGFr 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と実質的に同様であるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の siNA 分子。 20

【請求項 7】

前記アンチセンス領域および前記センス領域が約 19～23 個のヌクレオチドを含み、かつ前記アンチセンス領域がセンス領域のヌクレオチドと相補的である少なくとも約 19 個のヌクレオチドを含む、請求項 6 に記載の siNA 分子。

【請求項 8】

前記 siNA 分子がセンス領域およびアンチセンス領域を含み、かつ前記アンチセンス領域が、VEGFr 遺伝子によってコードされる RNA のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含み、かつ前記センスが前記アンチセンス領域と相補的であるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の siNA 分子。 30

【請求項 9】

前記 siNA 分子が 2 つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられており、1 つのフラグメントが前記 siNA 分子のセンス領域を含み、かつ第 2 のフラグメントが前記 siNA 分子のアンチセンス領域を含む、請求項 6 に記載の siNA 分子。

【請求項 10】

前記センス領域がリンカー分子によってアンチセンス領域に接続されている、請求項 6 に記載の siNA 分子。

【請求項 11】

前記リンカー分子がポリヌクレオチドリンカーである、請求項 10 に記載の siNA 分子。 40

【請求項 12】

前記リンカー分子が非ヌクレオチドリンカーである、請求項 10 に記載の siNA 分子。

【請求項 13】

センス領域におけるピリミジンヌクレオチドが、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドである、請求項 6 に記載の siNA 分子。

【請求項 14】

センス領域におけるプリンヌクレオチドが、2'-デオキシプリンヌクレオチドである、請求項 6 に記載の siNA 分子。 50

【請求項 15】

センス領域に存在するピリミジンヌクレオチドが、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項6に記載の s i N A 分子。

【請求項 16】

前記センス領域を含むフラグメントが、前記センス領域を含むフラグメントの5'-末端、3'-末端、または5'-末端および3'-末端の両方で末端キャップ成分を含む、請求項9に記載の s i N A 分子。

【請求項 17】

前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項16に記載の s i N A 分子。

【請求項 18】

前記アンチセンス領域のピリミジンヌクレオチドが、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項6に記載の s i N A 分子。

【請求項 19】

前記アンチセンス領域のプリンヌクレオチドが、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである、請求項6に記載の s i N A 分子。

【請求項 20】

前記アンチセンス領域に存在するプリンヌクレオチドが、2'-デオキシプリンヌクレオチドである、請求項6に記載の s i N A 分子。

【請求項 21】

前記アンチセンス領域が、前記アンチセンス領域の3'-末端でホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項18に記載の s i N A 分子。

【請求項 22】

前記アンチセンス領域が、前記アンチセンス領域の3'-末端でグリセリル修飾を含む、請求項6に記載の s i N A 分子。

【請求項 23】

前記 s i N A 分子の2つのフラグメントのそれぞれが21個のヌクレオチドを含む、請求項9に記載の s i N A 分子。

【請求項 24】

s i N A 分子の各フラグメントの約19個のヌクレオチドが、s i N A 分子の他のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、かつ s i N A 分子の各フラグメントの少なくとも2つの3'-末端ヌクレオチドが s i N A 分子の他のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成しない、請求項23に記載の s i N A 分子。

【請求項 25】

s i N A 分子の各フラグメントの2つの3'-末端ヌクレオチドのそれぞれが、2'-デオキシピリミジンである、請求項24に記載の s i N A 分子。

【請求項 26】

前記2'-デオキシピリミジンが、2'-デオキシチミジンである、請求項25に記載の s i N A 分子。

【請求項 27】

s i N A 分子の各フラグメントの21個のヌクレオチドすべてが、s i N A 分子の他のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成する、請求項23に記載の s i N A 分子。

【請求項 28】

アンチセンス領域の約19個のヌクレオチドが、V E G F r 遺伝子によってコードされるRNAのヌクレオチドまたはその一部と塩基対形成する、請求項23に記載の s i N A 分子。

【請求項 29】

アンチセンス領域の21個のヌクレオチドが、V E G F r 遺伝子によってコードされるRNAのヌクレオチドまたはその一部と塩基対形成する、請求項23に記載の s i N A 分子。

10

20

30

40

50

子。

【請求項 30】

前記アンチセンス領域を含むフラグメントの 5' -末端が任意にリン酸基を含む，請求項 9 に記載の s i N A 分子。

【請求項 31】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 1 である，請求項 1 に記載の s i N A 分子。

【請求項 32】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 2 である，請求項 1 に記載の s i N A 分子。

【請求項 33】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 3 である，請求項 1 に記載の s i N A 分子。

10

【請求項 34】

V E G F r 遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子であって，前記 s i N A 分子がリボヌクレオチドを含まず，かつ前記二本鎖の s i N A 分子の各鎖が約 21 個のヌクレオチドを含む，前記 s i N A 分子。

【請求項 35】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 1 である，請求項 34 に記載の s i N A 分子。

【請求項 36】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 2 である，請求項 34 に記載の s i N A 分子。

【請求項 37】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 3 である，請求項 34 に記載の s i N A 分子。

20

【請求項 38】

V E G F r 遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子であって，前記 s i N A 分子が，V E G F r 遺伝子の発現の前記阻害のために s i N A 分子内にリボヌクレオチドの存在を必要とせず，かつ前記二本鎖 s i N A 分子の各鎖が約 21 個のヌクレオチドを含む，前記 s i N A 分子。

【請求項 39】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 1 である，請求項 38 に記載の s i N A 分子。

【請求項 40】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 2 である，請求項 38 に記載の s i N A 分子。

【請求項 41】

前記 V E G F r 遺伝子が V E G F r 3 である，請求項 38 に記載の s i N A 分子。

30

【請求項 42】

許容可能な担体または希釈剤中に請求項 1 に記載の s i N A 分子を含む，医薬組成物。

【請求項 43】

請求項 1 に記載の s i N A 分子を含む，医薬品。

【請求項 44】

請求項 1 に記載の s i N A 分子を含む，活性成分。

【請求項 45】

V E G F r 遺伝子の発現を減少させる二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子の使用であって，前記 s i N A 分子が 1 つ以上の化学的修飾を含み，かつ前記二本鎖 s i N A の各鎖が約 21 個のヌクレオチドを含む，前記使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は，マクスウィゲン (M c S w i g g e n) の 2002 年 7 月 3 日出願の米国特許出願第 60 / 393, 796 号，マクスウィゲンの 2002 年 7 月 29 日出願の米国特許出願第 60 / 399, 348 号，パブコ (P a v c o) の 2001 年 11 月 30 日出願の米国特許出願第 60 / 334461 号に基づく優先権を主張するパブコの 2002 年 11 月 27 日出願の米国特許出願第 10 / 306, 747 号，パブコの 2002 年 11 月 4 日出願の米国特許出願第 10 / 287, 949 号，パブコの 2002 年 5 月 29 日出願の

50

国際公開出願 PCT/US 02/17674 号, バイゲルマン (Beigelman) の 2002 年 2 月 20 日出願の米国特許出願第 60/358,580 号, バイゲルマンの 2002 年 3 月 11 日出願の米国特許出願第 60/363,124 号, バイゲルマンの 2002 年 6 月 6 日出願の米国特許出願第 60/386,782 号, バイゲルマンの 2002 年 8 月 29 日出願の米国特許出願第 60/406,784 号, バイゲルマンの 2002 年 9 月 5 日出願の米国特許出願第 60/408,378 号, バイゲルマンの 2002 年 9 月 9 日出願の米国特許出願第 60/409,293 号, および バイゲルマンの 2003 年 1 月 15 日出願の米国特許出願第 60/440,129 号に基づく優先権を主張する。これらの出願は、図面を含めて、その全体が本明細書中で参考によって援用される。

【0002】

本発明は、血管内皮成長因子 (VEGF) および/または血管内皮成長因子レセプター (例えば, VEGFr1, VEGFr2 および/または VEGFr3) の遺伝子発現および/または活性の調節に反応する状態および疾患の研究, 診断, および治療のための化合物, 組成物, および方法に関する。本発明は, VEGF および VEGF レセプター経路に参与する遺伝子の発現および/または活性化の調節に反応する状態および疾患に関する化合物, 組成物, および方法にも関する。具体的には, 本発明は, VEGF および VEGF レセプター遺伝子発現に対して RNA 干渉 (RNAi) を媒介する能力がある短干渉核酸 (siNA), 短い干渉 RNA (siRNA), 二本鎖 RNA (dsRNA), ミクロ RNA (miRNA), および短いヘアピン RNA (shRNA) 分子などの小さな核酸分子に関する。

【背景技術】

【0003】

以下は RNAi に関係する関連技術の説明である。この説明は、以下に記載される本発明を理解するためにのみ提供される。この概要は、以下に記載される研究のいずれかが本発明に対する先行技術であると認めるものではない。

【0004】

RNA 干渉とは、動物において短干渉 RNA (siRNA) により媒介される配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す (Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたは RNA サイレncing と称され、真菌においてはクエリングとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており、異なる叢および門が共通して有している (Fire et al., 1999, Trends Genet., 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防御は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインテグレーションから生ずる二本鎖 RNA (dsRNA) の生成に応答して、相同的一本鎖 RNA またはウイルスゲノム RNA を特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのであろう。細胞における dsRNA の存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi 応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼ PKR および 2', 5'-オリゴアデニレートシンセターゼの dsRNA 媒介性活性化の結果リボヌクレアーゼ L による mRNA の非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

【0005】

細胞中に長い dsRNA が存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼ III 酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNA をプロセシングして短干渉 RNA (siRNA) として知られる短い断片の dsRNA にすることに関与している (Bernstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉 RNA は、典型的には約 21-23 ヌクレオチドの長さであり、約 19 塩基対のデュプレックスを含む (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体 RNA から 21 および 22 ヌクレオチドの小さな一時的 RNA (s

10

20

30

40

50

tRNA)を切り出すことに関与することが示唆されている(Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi応答はまた、一般にRNA誘導性サイレンシング複合体(RISC)と称されるエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これはsiRNAデュプレックスのアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、siRNAデュプレックスのアンチセンス鎖に相補的な領域の中央部で生ずる(Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。

【0006】

RNAiは種々の系で研究されてきた。Fireら(1998, Nature, 391, 806)は、C. Elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WiannyおよびGoetz(1999, Nature Cell Biol., 2, 70)は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondら(2000, Nature, 404, 293)は、dsRNAでトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら(2001, Nature, 411, 494)は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の21ヌクレオチドRNAのデュプレックスを導入することにより誘導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsiRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsiRNAデュプレックスは3'末端ジヌクレオチドオーバーハングを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsiRNA鎖を2'-デオキシ(2'-H)または2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3'末端siRNAオーバーハングヌクレオチドを2'-デオキシヌクレオチド(2'-H)で置換することは許容されることが示された。siRNAデュプレックスの中心における単一のミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsiRNAガイド配列の3'末端ではなくガイド配列の5'末端により規定されることを示した(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究は、siRNAデュプレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がsiRNA活性に必要であり、siRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示した(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。

【0007】

2ヌクレオチドの3'-オーバーハングを有する21-merのsiRNAデュプレックスの3'末端ヌクレオチドのオーバーハングしているセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えても、RNAi活性に有害な影響を有しないことが示されている。siRNAの各末端で4個までのヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドで置き換えることはよく許容されると報告されているが、デオキシリボヌクレオチドで完全に置換するとRNAi活性がなくなる(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。さらに、Elbashirら(上掲)はまた、siRNAを2'-O-メチルヌクレオチドで置換すると、RNAi活性が完全に破壊されたことを報告する。Liら(国際公開WO00/44914)およびBeachら(国際公開WO01/68836)は、siRNAがリン酸-糖骨格またはヌクレオシドのいずれかに窒素またはイオウ複素原子の少なくとも1つを含むよう修飾することができることを予備的に示唆する。しかし、いずれの出願も、siRNA分子においてそのような修飾がどの程度許容されるかを仮定しておらず、そのような修飾siRNAのそれ以上の指針または実例を提供していない。Kreutzerら(カナダ特許出願2,359,180)もまた、dsRNAコンストラクトにおいて二本鎖RNA依存性蛋白質キナーゼPKRの活性化を妨げる目的で用いるためのある種の化学的修飾、特に2'-アミノまたは2'-O-メチルヌクレオチド、および2'-Oまたは4'-Cメチレン架橋を含むヌクレオチドを記載する。

しかし、Kreutzerらも同様に、siRNA分子においてこれらの修飾がどの程度許容されるかについての事例または指針を提供していない。

【0008】

Parrishら(2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087)は、C. elegansにおいて長い(>25nt) siRNA転写産物を用いてunc-22遺伝子を標的とするある種の化学的修飾を試験した。著者らは、T7およびT3RNAポリメラーゼによりチオリン酸ヌクレオチド類似体を取り込ませることによりこれらのsiRNA転写産物中にチオリン酸残基を導入すること、および2個のホスホロチオエート修飾塩基を有するRNAもRNAiとしての有効性を実質的に低下させたことを記載する。さらに、Parrishらは、2残基より多いホスホロチオエート修飾は、干渉活性をアッセイすることができないほど大きくインビトロでRNAを不安定化させたことを報告する(同上, 1081)。著者らはまた、長いsiRNA転写産物中のヌクレオチド糖の2'位におけるある種の修飾を試験して、リボヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換すると、特にウリジンからチミジンおよび/またはシチジンからデオキシシチジンへの置換の場合に、干渉活性が実質的に減少することを見いだした(同上)。さらに、著者らは、ある種の塩基修飾、例えば、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖において、ウラシルの代わりに4-チオウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、および3-(アミノアシル)ウラシル、およびグアニンの代わりにイノシンの置換を試験した。4-チオウラシルおよび5-ブロモウラシル置換は許容されたように見えたが、Parrishは、イノシンはいずれの鎖に取り込まれたときにも干渉活性における実質的な減少を生じたことを報告している。Parrishはまた、アンチセンス鎖における5-ヨードウラシルおよび3-(アミノアシル)ウラシルの取り込みによっても、RNAi活性が実質的に減少したことを報告している。

10

20

【0009】

より長いdsRNAの使用が記載されている。例えば、Beachら(国際公開WO01/68836)は、内因性dsRNAを用いて遺伝子発現を弱めるための特定の方法を記載する。Tuschlら(国際公開WO01/75164)は、ショウジョウバエのインビトロRNAiシステム、およびある種の機能的ゲノム用途およびある種の治療用途に特定のsiRNA分子を用いることを記載する。しかし、Tuschl(2001, Chem. Biochem., 2, 239-245)は、インターフェロン応答の活性化の危険性のため、遺伝的疾患またはウイルス感染を治癒させるためにRNAiを用いることができることは疑わしいと述べている。Liら(国際公開WO00/44914)は、ある種の標的遺伝子の発現を弱めるために特定のdsRNAを用いることを記載する。Zernicka-Goetzら(国際公開WO01/36646)は、ある種のdsRNA分子を用いて哺乳動物細胞において特別の遺伝子の発現を阻害するある種の方法を記載する。Fireら(国際公開WO99/32619)は、遺伝子発現の阻害に用いるためにある種のdsRNA分子を細胞内に導入するための特別の方法を記載する。Plaetinckら(国際公開WO00/01846)は、特定のdsRNA分子を用いて細胞において特別の表現型を与える原因である特定の遺伝子を同定するある種の方法を記載する。Melloら(国際公開WO01/29058)は、dsRNA媒介性RNAiに関与する特定の遺伝子の同定を記載する。Descamps Depailletteら(国際公開WO99/07409)は、ある種の抗ウイルス剤と組み合わせた特別のdsRNA分子からなる特定の組成物を記載する。Waterhouseら(国際公開99/53050)は、ある種のdsRNAを用いて植物細胞における核酸の表現型の発現を減少させるある種の方法を記載する。Driscollら(国際公開WO01/49844)は、標的生物において遺伝子サイレンシングを促進するのに用いるための特定のDNAコンストラクトを記載する。

30

40

【0010】

他の者は、種々のRNAiおよび遺伝子サイレンシングシステムを報告している。例えば、Parrishら(2000, Molecular Cell, 6, 1977-10

50

87) は, *C. elegans* の *unc-22* 遺伝子を標的とする特定の化学的に修飾された *siRNA* コンストラクトを記載する。Grossniklaus (国際公開WO01/38551) は, 植物においてある種の *dsRNA* を用いてポリコム遺伝子発現を制御するためのある種の方法を記載する。Churikovら (国際公開WO01/42443) は, ある種の *dsRNA* を用いて生物の遺伝的特性を改変するある種の方法を記載する。Cogoniら (国際公開WO01/53475) は, *Neurospora* のサイレンシング遺伝子を単離するある種の方法およびその用途を記載する。Reedら (国際公開WO01/68836) は, 植物における遺伝子サイレンシングのある種の方法を記載する。Honerら (国際公開WO01/70944) は, ある種の *dsRNA* を用いてパーキンソン病のモデルとしてトランスジェニック線虫を用いる薬剤スクリーニングのある種の方法を記載する。Deakら (国際公開WO01/72774) は, ショウジョウバエにおける *RNAi* に関連するかもしれないある種のショウジョウバエ由来遺伝子産物を記載する。Arndtら (国際公開WO01/92513) は, *RNAi* を増強する因子を用いて遺伝子抑制を媒介するある種の方法を記載する。Tuschlら (国際公開WO02/44321) は, ある種の合成 *siRNA* コンストラクトを記載する。Pachukら (国際公開WO00/63364) および Satishchandranら (国際公開WO01/04313) は, ある種の *dsRNA* を用いてある種のポリヌクレオチド配列の機能を阻害するためのある種の方法および組成物を記載する。Echeverriら (国際公開WO02/38805) は, *RNAi* により同定されたある種の *C. elegans* 遺伝子を記載する。Kreutzerら (国際公開WO02/055692, WO02/055693, およびEP1144623B1) は, *RNAi* を用いて遺伝子発現を阻害するある種の方法を記載する。Grahamら (国際公開WO99/49029 およびWO01/70949, およびAU4037501) は, ベクターから発現されるある種の *siRNA* 分子を記載する。Fireら (US6, 506, 559) は, *RNAi* を媒介するある種の長い (25ヌクレオチドより長い) *dsRNA* コンストラクトを用いてインビトロで遺伝子発現を阻害するためのある種の方法を記載する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の概要

本発明は, 短干渉核酸 (*siNA*) 分子を用いた血管新生および増殖と関連した遺伝子などの遺伝子の発現を調節するために有用な化合物, 組成物, および方法に関する。本発明はまた, 短干渉核酸 (*siNA*), 短い干渉RNA (*siRNA*), 二本鎖RNA (*dsRNA*), ミクロRNA (*miRNA*) および短いヘアピンRNA (*shRNA*) 分子などの小さな核酸分子を用いるRNA干渉 (*RNAi*) による, 血管内皮成長因子 (*VEGF*) および/または血管内皮成長因子レセプター (例えば, *VEGFr1*, *VEGFr2*, *VEGFr3*) 遺伝子, または遺伝子発現の *VEGF* および/または *VEGFr* 経路 および/または *VEGF* 活性に関与する遺伝子の発現および活性を調節するために有用な化合物, 組成物, および方法に関する。特に, 本発明は, 短干渉核酸 (*siNA*), 短い干渉RNA (*siRNA*), 二本鎖RNA (*dsRNA*), ミクロRNA (*miRNA*) および短いヘアピンRNA (*shRNA*) 分子などの小さな核酸分子, および *VEGF* および/または *VEGFr* 遺伝子の発現を調節するために用いられる方法の特徴とする。本発明の *siNA* は, 非修飾または化学的修飾されうる。本発明の *siNA* は, 化学合成され, ベクターから発現され, または酵素合成されうる。本発明は, RNA干渉 (*RNAi*) による細胞における *VEGF* および/または *VEGFr* 遺伝子発現または活性を調節することが可能な種々の化学的に修飾された合成の短干渉核酸 (*siNA*) 分子をも特徴とする。化学修飾 *siNA* の使用は, インビボでのヌクレアーゼ分解に対する耐性の増大 および/または細胞摂取の増大によって天然の *siNA* 分子の種々の特性を改善する。さらに, 以前の公表された研究に反して, 複数の化学修飾を有する *siNA* は, その *RNAi* 活性を保持する。本発明の *siNA* 分子は, 種々の治療, 診断, 標的の確認, ゲノム発

見、遺伝子操作、およびファーマコゲノミクスの用途に有用な試薬および方法を提供する。

【0012】

1つの態様において、本発明は、本明細書中では一般にVEGFおよび／またはVEGF_rと称され、表Iに示されているGenBank受入番号によって呼ばれる配列を含む遺伝子コード配列などの、癌および他の増殖性疾患の維持および／または発展と関連した、血管内皮成長因子(VEGF)および／または血管内皮成長因子レセプター(例えば、VEGF_{r1}, VEGF_{r2}, VEGF_{r3})などの蛋白質をコードする遺伝子の発現を独立に、または組合せて調節する1つ以上のsiNA分子および方法の特徴とする。本発明の種々の観点および態様の以下の説明は、本明細書中ではそれぞれVEGFおよびVEGF_rと称される例示的なVEGFおよびVEGF_r(例えば、VEGF_{r1}, VEGF_{r2}, VEGF_{r3})遺伝子に関して示される。しかし、種々の観点および態様は、変異VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子、VEGFおよび／またはVEGF_rのスプライス変異体、他のVEGFおよび／またはVEGF_rリガンドおよびレセプターにも関する。種々の観点および態様は、疾患(例えば、癌)の進行、発展、および／または維持に関与するシグナル伝達または遺伝子発現のVEGFおよび／またはVEGF_r媒介経路に関与する他の遺伝子にも関する。その追加の遺伝子は、本明細書中でVEGFおよび／またはVEGF_rについて記載された方法を用いて標的部位について分析されうる。したがって、他の遺伝子の阻害およびかかる阻害の効果は、本明細書中に記載されたように実施されうる。

【0013】

1つの態様において、本発明は、VEGF遺伝子の発現を減少させるsiNA分子を特徴とするが、例えば、ここでVEGF遺伝子はVEGFコード配列を含む。

【0014】

1つの態様において、本発明は、VEGF_r遺伝子の発現を減少させるsiNA分子を特徴とするが、例えば、ここでVEGF_r遺伝子はVEGF_rコード配列を含む。

【0015】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAに対してRNAi活性を有するsiNA分子を特徴とするが、ここでsiNA分子は、VEGFおよび／またはVEGF_rを有するRNAと相補的な配列、または表Iに示されているVEGFおよび／またはVEGF_rのGenBank受入番号を有する配列など他のVEGFおよび／またはVEGF_rコード配列を含む。表IIIおよびIVに示され、または本明細書中で別に記載された化学修飾を、本発明のsiNAコンストラクトに適用することができる。

【0016】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAに対してRNAi活性を有するsiNA分子を特徴とするが、ここでsiNA分子は、表Iに示されているVEGFおよび／またはVEGF_rのGenBank受入番号を有する配列などVEGFおよび／またはVEGF_rを有するRNAと相補的な配列を含む。表IIIおよびIVに示され、または本明細書中で別に記載された化学修飾を、本発明のsiNAコンストラクトに適用することができる。

【0017】

別の態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子に対してRNAi活性を有するsiNA分子を特徴とするが、ここでsiNA分子は、表Iに示されているVEGFおよび／またはVEGF_rのGenBank受入番号を有するVEGFおよび／またはVEGF_r配列など、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様において、本発明のsiNA分子は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用し、それによってVEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子発現のサイレンシングを媒介しうるヌクレオチド配列を含むが、例えば、ここでsiNAは、VEGFおよび／またはVEGF_r遺

伝子のクロマチン構造を調節する細胞過程による V E G F および／または V E G F r 遺伝子の調節を媒介し，V E G F および／または V E G F r 遺伝子の転写を予防する。

【0018】

別の態様において，本発明は，ヌクレオチド配列，例えば，V E G F および／または V E G F r 遺伝子の配列のヌクレオチド配列または一部と相補的である s i N A 分子のアンチセンス領域におけるヌクレオチド配列を含む s i N A 分子を特徴とする。別の態様において，本発明は，領域，例えば，V E G F および／または V E G F r 遺伝子配列を含む配列の配列または一部と相補的な s i N A コンストラクトのアンチセンス領域を含む s i N A 分子を特徴とする。

【0019】

1つの態様において，V E G F r 1 s i N A コンストラクトのアンチセンス領域は，配列番号 1～4 2 7 または 1 9 9 7～2 0 0 0 のいずれかを有する配列と相補的な配列を含みうる。1つの態様において，アンチセンス領域は，配列番号 4 2 8～8 5 4，2 0 2 4～2 0 2 7，2 0 3 2～2 0 3 5，2 0 4 0～2 0 4 3，2 1 0 4～2 1 0 7，2 1 0 9，2 1 1 7，2 1 2 0～2 1 2 2，2 1 2 5～2 1 3 2，2 1 3 7～2 1 4 0，2 1 4 2，2 1 5 0，2 1 5 2，2 1 5 4，2 1 5 8～2 1 6 0，2 1 6 4～2 1 6 6，2 1 8 8～2 1 9 0，2 1 9 7，2 1 9 9，2 2 0 3～2 2 0 4，2 2 2 9，2 2 3 1，2 2 3 3，2 2 3 5，2 2 3 7，または 2 2 3 8 のいずれかを有する配列をも含みうる。別の態様において，V E G F r 1 コンストラクトのセンス領域は，配列番号 1～4 2 7，1 9 9 7～2 0 0 0，2 0 0 9～2 0 1 6，2 0 2 0～2 0 2 3，2 0 2 8～2 0 3 1，2 0 3 6～2 0 3 9，2 0 9 2～2 1 0 3，2 1 0 8，2 1 1 4，2 1 1 6，2 1 2 3～2 1 2 4，2 1 3 3～2 1 3 6，2 1 4 1，2 1 4 9，2 1 5 1，2 1 5 3，2 1 5 5～2 1 5 7，2 1 6 1～2 1 6 3，2 1 8 5～2 1 8 7，2 1 9 8，2 2 0 0～2 2 0 2，2 2 2 8，2 2 3 0，2 2 3 2，2 2 3 4，または 2 2 3 6 のいずれかを有する配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 1 7 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 1 8 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 1 9 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 0 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 2 1 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 2 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 2 3 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 4 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 2 5 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 6 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 2 3 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 7 の配列を含みうる。

【0020】

1つの態様において，V E G F r 2 s i N A コンストラクトのアンチセンス領域は，配列番号 8 5 5～1 1 7 8 または 2 0 0 1～2 0 0 4 のいずれかを有する配列と相補的な配列を含みうる。1つの態様において，アンチセンス領域は，配列番号 1 1 7 9～1 5 0 2，2 0 4 8～2 0 5 1，2 0 5 6～2 0 5 9，2 0 6 4～2 0 6 7，2 2 0 8～2 2 1 0，2 2 1 4～2 2 1 6，または 2 0 4 8～2 0 5 1 のいずれかを含みうる。別の態様において，V E G F r 2 コンストラクトのセンス領域は，配列番号 8 5 5～1 1 7 8，2 0 0 1～2 0 0 4，2 0 4 4～2 0 4 7，2 0 5 2～2 0 5 5，2 0 6 0～2 0 6 3，2 0 1 7～2 0 1 9，2 2 0 5～2 2 0 7，2 2 1 1～2 2 1 3，または 2 0 4 4～2 0 4 7 のいずれかを有する配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 1 9 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 0 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 2 1 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 2 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 2 3 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 4 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 2 5 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 6 の配列を含みうる。センス領域は配列番号 2 2 2 3 の配列を含みうるとともに，アンチセンス領域は配列番号 2 2 2 7 の配列を含みうる。

【0021】

10

20

30

40

50

1つの態様において、VEGF_r3 siNAコンストラクトのアンチセンス領域は、配列番号1503～1749または2005～2008のいずれかを有する配列と相補的な配列を含みうる。1つの態様において、アンチセンス領域は、配列番号1750～1996、2072～2075、2080～2083、または2088～2091のいずれかを有する配列をも含みうる。別の態様において、VEGF_r3コンストラクトのセンス領域は、配列番号1503～1749、2005～2008、2068～2071、2076～2079、または2034～2087のいずれかを有する配列を含みうる。センス領域は配列番号2217の配列を含みうるとともに、アンチセンス領域は配列番号2218の配列を含みうる。センス領域は配列番号2219の配列を含みうるとともに、アンチセンス領域は配列番号2220の配列を含みうる。センス領域は配列番号2221の配列を含みうるとともに、アンチセンス領域は配列番号2222の配列を含みうる。センス領域は配列番号2223の配列を含みうるとともに、アンチセンス領域は配列番号2224の配列を含みうる。センス領域は配列番号2225の配列を含みうるとともに、アンチセンス領域は配列番号2226の配列を含みうる。センス領域は配列番号2223の配列を含みうるとともに、アンチセンス領域は配列番号2227の配列を含みうる。

10

20

30

40

50

【0022】

1つの態様において、本発明のsiNA分子は、配列番号1～2238のいずれかを含む。配列番号1～2238に示された配列は制限的ではない。本発明のsiNA分子は、任意の連続的VEGFおよび／またはVEGF_r配列（例えば、約19～約25個、または約19、20、21、22、23、24、または25個の連続的VEGFおよび／またはVEGF_rヌクレオチド）を含みうる。

【0023】

さらに別の態様において、本発明は、配列、例えば、表Iに示されているGenBank受入番号によって表される配列を含む配列または配列の一部と相補的なsiNAコンストラクトのアンチセンス配列を含むsiNA分子を特徴とする。表IIIおよびIV、および本明細書中に記載された化学修飾が、本発明の任意のsiRNAコンストラクトに適用されうる。

【0024】

本発明の1つの態様においては、siNA分子は、約19～約29ヌクレオチドを有するアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、VEGFおよび／またはVEGF_r蛋白質をコードするRNA配列に相補的であり、前記siNAは、さらに約19～約29（例えば、約19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29）ヌクレオチドを有するセンス鎖を含み、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は、少なくとも約19の相補的ヌクレオチドを有する別々のヌクレオチド配列である。

【0025】

本発明の別の態様においては、本発明のsiNA分子は、約19～約29（例えば、約19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29）ヌクレオチドを有するアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域はVEGFおよび／またはVEGF_r蛋白質をコードするRNA配列に相補的であり、前記siNAはさらに約19～約29ヌクレオチドを有するセンス領域を含み、ここで、前記センス領域および前記アンチセンス領域は、少なくとも約19の相補的ヌクレオチドを有する直鎖状分子を含む。

【0026】

本発明の1つの態様においては、siNA分子はVEGFおよび／またはVEGF_r蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。siNAはさらにセンス鎖を含み、ここで前記センス鎖はVEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む。

【0027】

別の態様においては、siNA分子はVEGFおよび／またはVEGF_r蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス

領域を含む。s i N A分子はさらにセンス領域を含み、ここで、前記センス領域は、V E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む。

【0028】

1つの態様においては、本発明のs i N A分子は、V E G F 遺伝子によりコードされるR N Aの発現を調節するR N A i 活性を有する。V E G F 遺伝子は互いにある程度の配列ホモロジーを共有することができるため、異なるV E G F 標的の間で共有されているか、または特定のV E G F 標的にユニークである配列を選択することにより、一群のV E G F 遺伝子（および関連するレセプターまたはリガンド遺伝子）または特定のV E G F 遺伝子を標的とするようs i N A分子を設計することができる。したがって、1つの態様においては、s i N A分子は、1つのs i N A分子でいくつかのV E G F 遺伝子（例えば、異なるV E G F アイソフォーム、スプライシング変種、変異体遺伝子等）を標的とするように、いくつかのV E G F 遺伝子の間でホモロジーを有するV E G F R N A配列の保存領域を標的とするよう設計することができる。別の態様においては、s i N A分子がR N A i 活性を媒介するためには高度の特異性を必要とするため、s i N A分子は特定のV E G F R N A配列にユニークである配列を標的とするよう設計することができる。

10

【0029】

1つの態様において、本発明のs i N A分子は、V E G F r 遺伝子によってコードされるR N Aの発現を調節するR N A i 活性を有する。V E G F r 遺伝子は、互いに相同のある程度の配列を共有するため、s i N A分子は、異なるV E G F r 標的の中で共有されるか、または特異的V E G F r 標的に特異であるいずれかの配列を選択することによって、V E G F r 遺伝子のクラス（および関連レセプターまたはリガンド遺伝子）、あるいは、特異的なV E G F r 遺伝子をターゲティングするように設計されうる。したがって、1つの態様において、s i N A分子は、1つのs i N A分子を用いていくつかのV E G F r 遺伝子（例えば、異なるV E G F r イソ型、スプライス変異体、変異遺伝子等）をターゲティングするために、いくつかのV E G F r 遺伝子間で相同性を有するV E G F r R N Aの保存領域をターゲティングするように設計されうる。別の態様において、s i N A分子は、R N A i 活性を媒介するのにs i N Aが必要とする高度の特異性により、特定のV E G F r R N Aに独特の配列をターゲティングするように設計されうる。

20

【0030】

1つの態様において、本発明のs i N A分子は、V E G F r 遺伝子によってコードされるR N Aの発現を調節するR N A i 活性を有する。V E G F r 遺伝子は、互いにある程度の配列ホモロジーを共有するため、s i N A分子は、異なるV E G F r 標的の中で共有されるか、または特定のV E G F r 標的に独特のいずれかの配列を選択することによって、V E G F r 遺伝子のクラス、あるいは特異的なV E G F r 遺伝子をターゲティングするように設計されうる。したがって、1つの態様において、s i N A分子は、1つのs i N A分子を用いていくつかのV E G F r 遺伝子（例えば、V E G F r 1、V E G F r 2および／またはV E G F r 3、異なるV E G F r イソ型、スプライス変異体、変異遺伝子等）をターゲティングするために、いくつかのV E G F r 遺伝子間で相同性を有するV E G F r R N Aの保存領域をターゲティングするように設計されうる。別の態様において、s i N A分子は、R N A i 活性を媒介するのにs i N Aが必要とする高度の特異性により、特定のV E G F r R N Aに独特の配列をターゲティングするように設計されうる。

30

40

【0031】

1つの態様において、本発明のs i N A分子は、V E G F 遺伝子によってコードされるR N Aの発現を調節するR N A i 活性を有する。V E G F 遺伝子は、互いにある程度の配列ホモロジーを共有するため、s i N A分子は、異なるV E G F 標的の中で共有されるか、または特定のV E G F 標的に独特のいずれかの配列を選択することによって、V E G F 遺伝子のクラス、あるいは特異的なV E G F 遺伝子をターゲティングするように設計されうる。したがって、1つの態様において、s i N A分子は、1つのs i N A分子を用いていくつかのV E G F 遺伝子（例えば、V E G F - A、V E G F - B、V E G F - Cおよび／またはV E G F - D、異なるV E G F イソ型、スプライス変異体、変異遺伝子等）をタ

50

ーゲティングするために、いくつかの V E G F 遺伝子間で相同性を有する V E G F R N A の保存領域をターゲティングするように設計されうる。別の態様において、s i N A 分子は、R N A i 活性を媒介するのに s i N A が必要とする高度の特異性により、特定の V E G F R N A に独特の配列をターゲティングするように設計されうる。

【0032】

1つの態様においては、R N A 干渉遺伝子サイレンシング応答のメディエータとして作用する本発明の核酸分子は二本鎖核酸分子である。別の態様においては、本発明の s i N A 分子は、約 19—約 25（例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24 または 25）ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの間に約 19 塩基対を含むデュプレックスから構成される。さらに別の態様においては、本発明の s i N A 分子は約 1—約 3（例えば、約 1, 2, または 3）ヌクレオチドのオーバーハング末端を有するデュプレックス、例えば、約 19 塩基対および 3' 末端モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、またはトリヌクレオチドオーバーハングを有する約 21 のヌクレオチドのデュプレックスを含む。

【0033】

1つの態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r を発現する核酸分子、例えば V E G F および／または V E G F r 蛋白質をコードする R N A に対する特異性を有する、1またはそれ以上の化学的に修飾された s i N A コンストラクトを特徴とする。そのような化学的修飾の非限定的例には、限定されないが、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、"万能塩基"ヌクレオチド、"非環状"ヌクレオチド、5-C-メチルヌクレオチド、および末端グリセリルおよび／または反転デオキシ無塩基残基を取り込むことが含まれる。これらの化学的修飾は、種々の s i N A コンストラクト中で用いた場合、細胞において R N A i 活性を保ち、同時に、これらの化合物の血清安定性を劇的に増加させることが示されている。さらに、P a r r i s h ら（上掲）により公表されたデータに反して、本発明においては、多数（2以上）のホスホロチオエート置換が十分に許容され、修飾 s i N A コンストラクトの血清安定性を実質的に増加させることが示される。

【0034】

1つの態様においては、本発明の s i N A 分子は、R N A i を媒介する能力を維持しながら、修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドを用いて、インビトロまたはインビボでの特性、例えば安定性、活性、および／または生物利用性を改良することができる。例えば、本発明の s i N A 分子は、s i N A 分子中に存在するヌクレオチドの総数のパーセンテージとして修飾ヌクレオチドを含むことができる。すなわち、本発明の s i N A 分子は、一般に、約 5%—約 100% の修飾ヌクレオチド（例えば、5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% または 100% の修飾ヌクレオチド）を含むことができる。所定の s i N A 分子中に存在する修飾ヌクレオチドの実際のパーセンテージは、s i N A 中に存在するヌクレオチドの総数によって異なるであろう。s i N A 分子が一本鎖である場合、修飾のパーセントは一本鎖 s i N A 分子中に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。同様に、s i N A 分子が二本鎖である場合、修飾のパーセントは、センス鎖、アンチセンス鎖、またはセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。

【0035】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とするが、ここで s i N A は 1 つ以上の化学修飾を含み、かつ二本鎖の s i N A の各鎖の長さは約 21 個のヌクレオチドである。

【0036】

1つの態様において、本発明の s i N A 分子は、リボヌクレオチドを含まない。別の態様において、本発明の s i N A 分子はリボヌクレオチドを含む。

【0037】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここで二本鎖siNA分子の鎖の1つは、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含み、かつ二本鎖siNA分子の第2の鎖はVEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と実質的に同様であるヌクレオチド配列を含む。

【0038】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここでsiNA分子の各鎖は約19～約23個のヌクレオチドであり、かつ各鎖は、他の鎖のヌクレオチドと相補的である少なくとも約19個のヌクレオチドを含む。 10

【0039】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここでsiNA分子は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み、かつsiNAはセンス領域をさらに含むが、ここでセンス領域は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と実質的に同様であるヌクレオチドを含む。

【0040】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここでアンチセンス領域およびセンス領域はそれぞれ約19～約23個のヌクレオチドを含み、かつアンチセンス領域は、センス領域のヌクレオチドと相補的である少なくとも約19個のヌクレオチドを含む。 20

【0041】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここでsiNA分子はセンス領域およびアンチセンス領域を含み、かつアンチセンス領域は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子によってコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域と相補的であるヌクレオチド配列を含む。 30

【0042】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここでsiNA分子は2つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ、ここで1つのフラグメントはセンス領域を含み、かつ第2のフラグメントはsiNA分子のアンチセンス領域を含む。センス領域は、ポリヌクレオチドリンカーまたは非ヌクレオチドリンカーなどのリンカー分子によってアンチセンス領域に接続されうる。

【0043】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここでsiNA分子はセンス領域およびアンチセンス領域を含み、かつアンチセンス領域は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子によってコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域と相補的であるヌクレオチド配列を含むとともに、センス領域におけるピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチド、2'-デオキシピリンヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。 40

【0044】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現をダ 50

ウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とするが、ここで s i N A 分子は2つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ、1つのフラグメントはセンス領域を含み、かつ第2のフラグメントは s i N A 分子のアンチセンス領域を含み、ここでセンス領域を含むフラグメントは、センス領域を含むフラグメントの5' - 末端、3' - 末端、または5' - 末端および3' - 末端の両方で末端キャップ成分を含む。別の態様において、末端キャップ成分は反転デオキシ無塩基成分またはグリセリル成分である。別の態様では、s i N A 分子の2つのフラグメントのそれぞれは約21個のヌクレオチドを含む。

【0045】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とするが、ここで s i N A 分子はセンス領域およびアンチセンス領域を含み、かつアンチセンス領域は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子によってコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域と相補的であるヌクレオチド配列を含むとともに、アンチセンス領域に存在するプリンヌクレオチドは、2' - デオキシープリンヌクレオチドを含む。別の態様において、アンチセンス領域は、アンチセンス領域の3' 末端でホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。別の態様において、アンチセンス領域は、アンチセンス領域の3' 末端でグリセリル修飾を含む。

【0046】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖の短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とするが、ここで s i N A は2つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ、ここで1つのフラグメントはセンス領域を含み、かつ第2のフラグメントは s i N A 分子のアンチセンス領域を含み、かつここで s i N A 分子の各フラグメントの約19個のヌクレオチドは s i N A 分子の他のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、s i N A 分子の各フラグメントの少なくとも2つの3' 末端ヌクレオチドは s i N A 分子の他のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成しない。別の態様において、s i N A 分子の各フラグメントの2つの3' 末端ヌクレオチドは、2' - デオキシーチミジンなどの2' - デオキシープリミジン類である。別の態様において、s i N A の各フラグメントの21個のヌクレオチドはすべて s i N A 分子の他のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成する。別の態様において、アンチセンス領域の約19個のヌクレオチドは、V E G F および／または V E G F r 遺伝子によってコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する。別の態様において、アンチセンス領域の21個のヌクレオチドは、V E G F および／または V E G F r 遺伝子によってコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する。別の態様において、前記アンチセンス領域を含むフラグメントの5' - 末端は任意にリン酸基を含む。

【0047】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r R N A 配列の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とするが（例えば、ここで前記標的 R N A 配列は V E G F および／または V E G F r 遺伝子によってコードされる）、ここで s i N A 分子はリボヌクレオチドを含まず、かつ二本鎖の s i N A 分子の各鎖の長さは約21個のヌクレオチドである。

【0048】

1つの態様において、本発明は、本発明の s i N A 分子を含む医薬品を特徴とする。

【0049】

1つの態様において、本発明は、本発明の s i N A 分子を含む活性成分を特徴とする。

【0050】

1つの態様において、本発明は、二本鎖の短干渉核酸（s i N A）分子を用いて、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現をダウンレギュレートすることを特徴とする

が、ここで、s i N A分子は1つ以上の化学修飾を含み、かつ二本鎖s i N Aの各鎖の長さは約21個のヌクレオチドである。

【0051】

1つの態様において、本発明によって意図されたV E G F r遺伝子は、V E G F r 1、V E G F r 2、またはV E G F r 3遺伝子である。

【0052】

1つの態様において、本発明は、V E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とするが、ここで二本鎖s i N A分子の鎖の1つは、V E G Fおよび／またはV E G F r R N Aのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖s i N A分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含む。1つの態様において、V E G F r遺伝子はV E G F r 2である。1つの態様において、V E G F r遺伝子はV E G F r 1である。

10

【0053】

1つの態様において、本発明は、V E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とするが、ここで二本鎖s i N A分子の鎖の1つは、V E G Fおよび／またはV E G F r R N Aのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖s i N A分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここで二本鎖s i N A分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列は、蛋白質またはその一部をコードするV E G Fおよび／またはV E G F r R N Aのヌクレオチド配列またはその一部と相補的である。

20

【0054】

1つの態様において、本発明は、V E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とするが、ここで二本鎖s i N A分子の鎖の1つは、V E G Fおよび／またはV E G F r R N Aのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖s i N A分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでs i N A分子の各鎖は約19個～約29個のヌクレオチドを含み、かつここで各鎖は、他の鎖のヌクレオチドと相補的である少なくとも約19個のヌクレオチドを含む。

30

【0055】

1つの態様において、本発明は、V E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とするが、ここで二本鎖s i N A分子の鎖の1つは、V E G Fおよび／またはV E G F r R N Aのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖s i N A分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでs i N A分子は2つのオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ、ここで1つのフラグメントはs i N A分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列を含み、第2のフラグメントはs i N A分子のセンス領域のヌクレオチド配列を含む。

40

【0056】

1つの態様において、本発明は、V E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とするが、ここで二本鎖s i N A分子の鎖の1つは、V E G Fおよび／またはV E G F r R N Aのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、か

50

つここで二本鎖 s i N A 分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでセンス鎖は、ポリヌクレオチドリinkerまたは非ヌクレオチドリinkerなどのリinker分子によってアンチセンス鎖に接続されている。

【0057】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とするが、ここで二本鎖 s i N A 分子の鎖の1つは、V E G F および／または V E G F r R N A のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖 s i N A 分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでセンス鎖に存在するピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域に存在するプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである。

10

【0058】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とするが、ここで二本鎖 s i N A 分子の鎖の1つは、V E G F および／または V E G F r R N A のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖 s i N A 分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでセンス鎖は3'-末端および5'-末端を含み、かつここで末端キャップ成分(例えば、反転デオキシ無塩基成分)は、センス鎖の5'-末端、3'-末端、または5'-末端および3'-末端の両方に存在する。

20

【0059】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とするが、ここで二本鎖 s i N A 分子の鎖の1つは、V E G F および／または V E G F r R N A のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖 s i N A 分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでアンチセンス鎖は、1個以上の2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチド、および1個以上の2'-O-メチルプリンヌクレオチドを含む。

30

【0060】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とするが、ここで二本鎖 s i N A 分子の鎖の1つは、V E G F および／または V E G F r R N A のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖 s i N A 分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでアンチセンス鎖に存在するピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、かつここでアンチセンス鎖に存在するプリンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。

40

【0061】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とするが、ここで二本鎖 s i N A 分子の鎖の1つは、V E G F および／または V E G F r R N A のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖 s i N A 分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでアンチセンス鎖はアンチセンス鎖の3'末端でホスホロチオエートヌクレオチ

50

ド間結合を含む。

【0062】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここで二本鎖siNA分子の鎖の1つは、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖siNA分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでアンチセンス鎖は3'末端でグリセリル修飾を含む。

【0063】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここで二本鎖siNA分子の鎖の1つは、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖siNA分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでsiNA分子の2つの鎖のそれぞれは21個のヌクレオチドを含む。別の態様において、siNA分子の各鎖の約19個のヌクレオチドはsiNA分子の他の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、かつここでsiNA分子の各鎖の少なくとも2個の3'末端ヌクレオチドは、siNA分子の他の鎖のヌクレオチドと塩基対形成しない。別の態様において、siNA分子の各フラグメントの2個の3'末端ヌクレオチドのそれぞれは、2'-デオキシチミジンなどの2'-デオキシピリミジン類である。別の態様において、アンチセンス鎖の約19個のヌクレオチドは、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する。別の態様において、アンチセンス鎖の21個のヌクレオチドは、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する。

【0064】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここで二本鎖siNA分子の鎖の1つは、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖siNA分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、かつここでアンチセンス鎖の5'-末端は任意にリン酸基を含む。

【0065】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここで二本鎖siNA分子の鎖の1つは、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖siNA分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAの5'-非翻訳領域のヌクレオチド配列またはその一部と相補的である。

【0066】

1つの態様において、本発明は、VEGFおよび／またはVEGF_r遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とするが、ここで二本鎖siNA分子の鎖の1つは、VEGFおよび／またはVEGF_r RNAのヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖siNA分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含み、

10

20

30

40

50

かつここでアンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は、V E G F および／または V E G F r に存在する V E G F および／または V E G F r R N A のヌクレオチド配列またはその一部と相補的である。

【0067】

1つの態様において、本発明は、許容可能な担体または賦形剤中に本発明の s i N A 分子を含む医薬組成物を特徴とする。

【0068】

1つの態様において、本発明は、本発明の s i N A 分子を含む医薬品を特徴とする。

【0069】

1つの態様において、本発明は、本発明の s i N A 分子を含む活性成分を特徴とする。 10

【0070】

1つの態様において、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を阻害する二本鎖の短干渉核酸 (s i N A) 分子の使用を特徴とするが、ここで二本鎖 s i N A 分子の鎖の1つは、V E G F および／または V E G F r R N A のヌクレオチド配列またはその一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、かつここで二本鎖 s i N A 分子に存在するピリミジンヌクレオチドの大半は糖修飾を含む。

【0071】

非限定的例においては、核酸分子中に化学的に修飾されたヌクレオチドを導入することは、外的にデリバリーされる天然の R N A 分子に固有の、インビボ安定性および生物利用性の潜在的な制限を解消する有力な道具を提供する。例えば、化学的に修飾された核酸分子は血清中でより長い半減期を有する傾向にあるため、化学的に修飾された核酸分子を用いることにより、所定の治療効果に必要な特定の核酸分子の投与量を低下させることができる。さらに、ある種の化学的修飾は、特定の細胞または組織を標的とすることにより、および／または核酸分子の細胞取り込みを改良することにより、核酸分子の生物利用性を改良することができる。したがって、化学的に修飾された核酸分子の活性が、天然の核酸分子と比較して、例えば、全 R N A 核酸分子と比較したときに低いとしても、分子の改良された安定性および／またはデリバリーのため、修飾核酸分子の全体的活性は天然の分子より高い可能性がある。天然の非修飾 s i N A とは異なり、化学的に修飾された s i N A はまた、ヒトにおいてインターフェロン活性を活性化する可能性を最小限にすることができる。 20 30

【0072】

本発明の s i N A 分子のアンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の 3' 末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。アンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の 5' 末端に約 1—約 5 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。本発明の s i N A 分子の 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングは、核酸の糖、塩基、または骨格で化学的に修飾されたリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含むことができる。3' 末端ヌクレオチドオーバーハングは、1またはそれ以上の万能塩基リボヌクレオチドを含むことができる。3' 末端ヌクレオチドオーバーハングは、1またはそれ以上の非環状ヌクレオチドを含むことができる。 40

【0073】

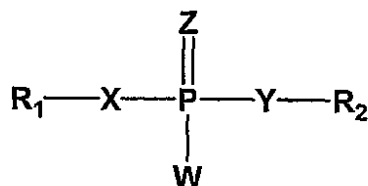
本発明の1つの態様は、本発明の少なくとも1つの s i N A 分子をコードする核酸配列を、核酸分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを提供する。本発明の別の態様は、そのような発現ベクターを含む哺乳動物細胞を提供する。哺乳動物細胞はヒト細胞であってもよい。発現ベクターの s i N A 分子は、センス領域およびアンチセンス領域を含むことができる。アンチセンス領域は V E G F および／または V E G F r をコードする R N A または D N A 配列に相補的な配列を含むことができ、センス領域はアンチセンス領域に相補的な配列を含むことができる。s i N A 分子は、相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有する2つの別々の鎖を含むことができる。s i N A 分子は、相補的なセン 50

ス領域およびアンチセンス領域を有する一本の鎖を含むことができる。

【0074】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてVEGFおよび／またはVEGF_rに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I

【化1】



10

[式中、

各R₁およびR₂は、独立して、任意のヌクレオチド、非ヌクレオチド、またはポリヌクレオチドであり、これは天然に生ずるものであっても化学的に修飾されたものでもよく、各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、または置換アルキルであり、各ZおよびWは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカリール、またはアラルキルであり、W、X、Y、およびZは任意に全てOでなくともよい]

20

を有する骨格修飾ヌクレオチド間結合を含む、1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のヌクレオチドを含む。

【0075】

例えば任意のZ、W、X、および／またはYが独立してイオウ原子を含む式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合は、s i N Aデュプレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明のs i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に、1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に、約1-約5個またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5個またはそれ以上)の式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のピリミジンヌクレオチドを含むことができる。さらに別の非限定的例においては、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のプリンヌクレオチドを含むことができる。別の態様においては、式Iのヌクレオチド間結合を有する本発明のs i N A分子はまた、式I-VIIのいずれかを有する化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

30

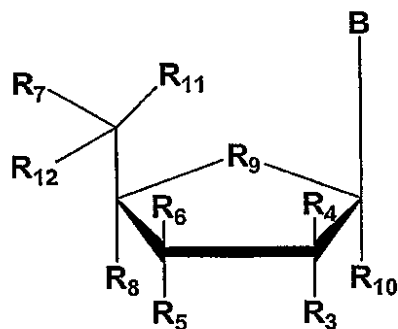
40

【0076】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてVEGFおよび／またはVEGF_rに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I

I:

【化 2】



10

〔式中、

各 R 3, R 4, R 5, R 6, R 7, R 8, R 10, R 11 および R 12 は、独立して、H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラルキル, F, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-O-SH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH₂, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカリール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式 1 を有する基であり; R 9 は、O, S, CH₂, S=O, CHF, または CF₂ であり、B は、ヌクレオシド塩基, 例えば、アデニン, グアニン, ウラシル, シトシン, チミン, 2-アミノアデノシン, 5-メチルシトシン, 2, 6-ジアミノプリン, または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよい他の任意の天然に生じない塩基, または非ヌクレオシド塩基, 例えば、フェニル, ナフチル, 3-ニトロピロール, 5-ニトロインドール, ネブラリン, ピリドン, ピリジノン, または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよい他の任意の天然に生じない万能塩基である〕

20

を有する 1 またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上) のヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

30

【0077】

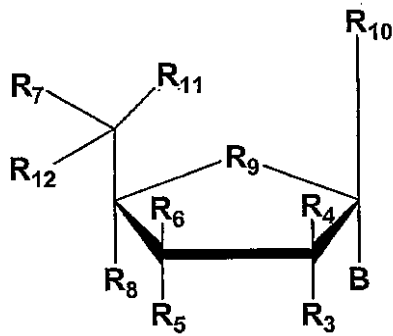
式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドは、siNA デュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖, 例えば、センス鎖, アンチセンス鎖, または両方の鎖に存在することができる。本発明の siNA 分子は、1 またはそれ以上の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを、センス鎖, アンチセンス鎖, または両方の鎖の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に含むことができる。例えば、本発明の例示的 siNA 分子は、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上) の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを、センス鎖, アンチセンス鎖, または両方の鎖の 5' 末端に含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的 siNA 分子は、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上) の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを、センス鎖, アンチセンス鎖, または両方の鎖の 3' 末端に含むことができる。

40

【0078】

1 つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において VEGF および/または VEGFr に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸 (siNA) 分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式 I I :

【化 3】



10

〔式中、

各 R 3, R 4, R 5, R 6, R 7, R 8, R 10, R 11 および R 12 は、独立して、H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-O-SH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH₂, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカリール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式 1 を有する基であり; R 9 は、O, S, CH₂, S=O, CHF, または CF₂ であり、B は、ヌクレオシド塩基, 例えば、アデニン, グアニン, ウラシル, シトシン, チミン, 2-アミノアデノシン, 5-メチルシトシン, 2, 6-ジアミノプリン, または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよいように用いることができる他の任意の天然に生じない塩基, または非ヌクレオシド塩基, 例えば、フェニル, ナフチル, 3-ニトロピロール, 5-ニトロインドール, ネブラリン, ピリドン, ピリジノン, または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよい他の任意の天然に生じない万能塩基である〕

を有する 1 またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上) のヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

20

30

【0079】

式 I I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドは、s i N A デュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖に、例えば、センス鎖, アンチセンス鎖, または両方の鎖に存在することができる。本発明の s i N A 分子は、センス鎖, アンチセンス鎖, または両方の鎖の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に、1 またはそれ以上の式 I I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。例えば、本発明の例示的 s i N A 分子は、センス鎖, アンチセンス鎖, または両方の鎖の 5' 末端に、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上) の式 I I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的 s i N A 分子は、センス鎖, アンチセンス鎖, または両方の鎖の 3' 末端に、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上) の式 I I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。

40

【0080】

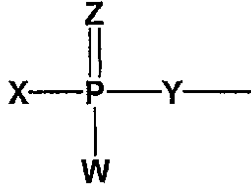
別の態様においては、本発明の s i N A 分子は、式 I I または I I I を有するヌクレオチドを含み、ここで、式 I I または I I I を有するヌクレオチドは反転のコンフィギュレーションである。例えば、式 I I または I I I を有するヌクレオチドは、s i N A コンストラクトに 3'-3', 3'-2', 2'-3', または 5'-5' コンフィギュレーションで、例えば、s i N A 鎖の一方または両方の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に結合させることができる。

50

【0081】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてVEGFおよび／またはVEGF_rに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I V:

【化4】



10

[式中、
各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロであり；各ZおよびWは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカール、アラルキル、またはアルキルハロであり；W、X、YおよびZはすべてOではない]
を有する5'末端リン酸基を含む。

【0082】

1つの態様においては、本発明は、標的-相補的鎖、例えば、標的RNAに相補的な鎖に式I Vを有する5'末端リン酸基を有するs i N A分子を特徴とし、ここで、s i N A分子は、全RNA s i N A分子を含む。別の態様においては、本発明は、標的-相補的鎖に式I Vを有する5'末端リン酸基を有するs i N A分子を特徴とし、ここで、s i N A分子はまた、一方または両方の鎖の3'末端に約1-約4個(例えば、約1, 2, 3, または4個)のデオキシリボヌクレオチドを有する、約1-約3(例えば、約1, 2, または3)ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む。別の態様においては、式I Vを有する5'末端リン酸基は、本発明のs i N A分子、例えば式I-V I Iのいずれかを有する化学的修飾を有するs i N A分子の標的-相補的鎖に存在する。

20

【0083】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてVEGFおよび／またはVEGF_rに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は1またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。例えば、非限定的例においては、本発明は、一方のs i N A鎖に約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)を特徴とする。さらに別の態様においては、本発明は、両方のs i N A鎖に独立して約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)を特徴とする。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、s i N Aデュプレックスのオリゴヌクレオチド鎖の一方または両方に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明のs i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に1またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に、約1-約5個またはそれ以上(例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 個またはそれ以上)の連続するホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、1またはそれ以上(例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のピリミジンホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。さらに別の非限定的例においては、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、

30

40

50

1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のプリンホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0084】

1つの態様においては、本発明は、センス鎖が1またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および／または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ, 2'-O-メチル, 2'-デオキシ-2'-フルオロ, および／または約1またはそれ以上の（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンス鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含み；かつ、アンチセンス鎖が約1-約10個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および／または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ, 2'-O-メチル, 2'-デオキシ-2'-フルオロ, および／または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含むs i N A分子を特徴とする。別の態様においては、センスおよび／またはアンチセンスs i N A鎖の1またはそれ以上の、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ, 2'-O-メチルおよび／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じまたは異なる鎖に存在する、1またはそれ以上の、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および／または3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を有していても有していなくてもよい。

【0085】

別の態様においては、本発明は、センス鎖が約1-約5個、特に約1, 2, 3, 4, または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および／または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上）の2'-デオキシ, 2'-O-メチル, 2'-デオキシ-2'-フルオロ, および／または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンス鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含み；かつ、アンチセンス鎖が約1-約5個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および／または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ, 2'-O-メチル, 2'-デオキシ-2'-フルオロ, および／または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含むs i N A分子を特徴とする。別の態様においては、センスおよび／またはアンチセンスs i N A鎖の1またはそれ以上の、例えば約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ, 2'-O-メチルおよび／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じまたは異なる鎖に存在する、約1-約5個またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および／または3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を有していても有してなくてもよい。

【0086】

1つの態様においては、本発明は、アンチセンス鎖が1またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および／または約1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6

、7、8、9、10個またはそれ以上)の2'-デオキシ、2'-オーメチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、および/または1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含み;かつ、アンチセンス鎖が約1-約10個またはそれ以上、特に約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の2'-デオキシ、2'-オーメチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、および/または1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含む s i N A 分子を特徴とする。別の態様においては、センスおよび/またはアンチセンス s i N A 鎖の1またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ、2'-オーメチルおよび/または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じまたは異なる鎖に存在する1またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を有していても有していなくてもよい。

【0087】

別の態様においては、本発明は、アンチセンス鎖が約1-約5個またはそれ以上、特に約1、2、3、4、5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の2'-デオキシ、2'-オーメチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、および/または1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含み;かつ、アンチセンス鎖が約1-約5個またはそれ以上、特に約1、2、3、4、5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の2'-デオキシ、2'-オーメチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、および/または1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含む、s i N A 分子を特徴とする。別の態様においては、センスおよび/またはアンチセンス s i N A 鎖の1またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ、2'-オーメチルおよび/または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じ鎖または異なる鎖に存在する約1-約5個、例えば、約1、2、3、4、5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を有していても有していなくてもよい。

【0088】

1つの態様においては、本発明は、s i N A 分子の各鎖に約1-約5個、特に約1、2、3、4、5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する、化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とする。

【0089】

別の態様においては、本発明は、2'-5'ヌクレオチド間結合を含むs i N A 分子を特徴とする。2'-5'ヌクレオチド間結合は、s i N A 配列鎖の一方または両方の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在することができる。さらに、2'-5'ヌクレオチド間結合は、s i N A 配列鎖の一方または両方の種々の他の位置

に存在することができ、例えば、s i N A分子の一方または両方の鎖のピリミジンヌクレオチドの約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上、例えばすべてのヌクレオチド間結合は、2' - 5'ヌクレオチド間結合を含むことができ、またはs i N A分子の一方または両方の鎖のプリンヌクレオチドの約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上、例えばすべてのヌクレオチド間結合は、2' - 5'ヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0090】

別の態様においては、本発明の化学的に修飾されたs i N A分子は、2つの鎖を有するデュプレックスを含み、この一方または両方を化学的に修飾することができ、各鎖は約18 - 約27（例えば、約18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, または27）ヌクレオチドの長さであり、デュプレックスは約18 - 約23（例えば、約18, 19, 20, 21, 22, または23）塩基対を有し、化学的修飾は、式I - V I Iのいずれかを有する構造を含む。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は2つの鎖を有するデュプレックスを含み、この一方または両方は式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾されていてもよく、各鎖は約21ヌクレオチドからなり、それぞれは2 - ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドオーバーハングを有し、デュプレックスは約19塩基対を有する。別の態様においては、本発明のs i N A分子は一本鎖ヘアピン構造を有し、ここで、s i N Aは約36 - 約70（例えば、約36, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または70）ヌクレオチドの長さであり、約18 - 約23（例えば、約18, 19, 20, 21, 22, または23）塩基対を有し、s i N Aは式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む化学的修飾を含むことができる。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は、式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された、約42 - 約50（例えば、約42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または50）ヌクレオチドを有する直鎖状オリゴヌクレオチドを含み、ここで、直鎖状オリゴヌクレオチドは約19塩基対および2 - ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドオーバーハングを有するヘアピン構造を形成する。別の態様においては、本発明の直鎖状ヘアピンs i N A分子はステムループモチーフを含み、ここで、s i N A分子のループ部分は生物分解性である。例えば、本発明の直鎖状ヘアピンs i N A分子は、s i N A分子のループ部分のインビボでの分解により3'末端オーバーハング、例えば約2ヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチドオーバーハングを有する二本鎖s i N A分子が生成されうるように設計される。

【0091】

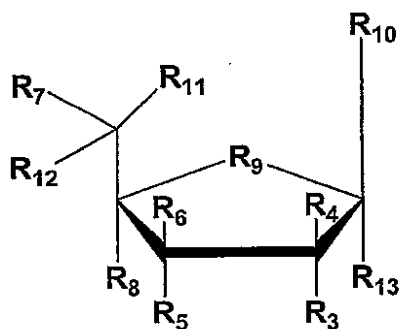
別の態様においては、本発明のs i N A分子は環状核酸分子を含み、ここで、s i N Aは約38 - 約70（例えば、約38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または70）ヌクレオチドの長さであり、約18 - 約23（例えば、約18, 19, 20, 21, 22, または23）塩基対を有し、s i N Aは化学的修飾を含むことができ、これは式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は、式I - V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された約42 - 約50（例えば、約42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または50）ヌクレオチドを有する環状オリゴヌクレオチドを含み、環状オリゴヌクレオチドは約19塩基対および2個のループを有するダンベル形状の構造を形成する。

【0092】

別の態様においては、本発明の環状s i N A分子は、2つのループモチーフを含み、ここで、s i N A分子のループ部分の一方または両方は生物分解性である。例えば、本発明の環状s i N A分子は、s i N A分子のループ部分のインビボでの分解により、3'末端オーバーハング、例えば約2ヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチドオーバーハングを有する二本鎖s i N A分子が生成することができるよう設計される。

【0093】

1つの態様においては、本発明の s i N A 分子は、少なくとも1つ（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の無塩基成分、例えば、式V：
【化5】



10

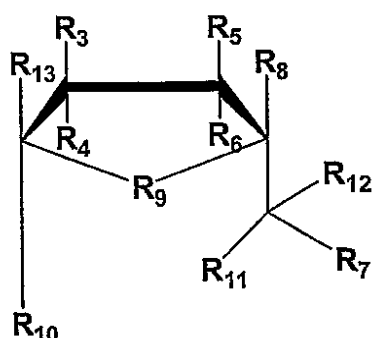
〔式中、
各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, およびR13は、独立して、H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラルキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-O-SH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, NO2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH2, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカリール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式1を有する基であり；R9は、O, S, CH2, S=O, CHF, またはCF2である〕
を有する化合物を含む。

20

【0094】

1つの態様においては、本発明の s i N A 分子は、少なくとも1つ（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の反転無塩基成分、例えば、式VI：

【化6】



30

〔式中、
各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, およびR13は、独立して、H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラルキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-O-SH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, NO2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH2, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカリール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式Iを有す

40

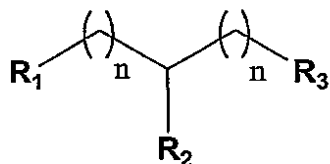
50

る基であり；R₉は、O、S、CH₂、S=O、CHF、またはCF₂であり、R₂、R₃、R₈またはR₁₃のいずれかは、本発明のs i N A分子への結合の点として働く]を有する化合物を含む。

【0095】

別の態様においては、本発明のs i N A分子は、少なくとも1つ（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の置換ポリアルキル成分、例えば、式V I I：

【化7】



10

[式中、各nは、独立して、1-12の整数であり、各R₁、R₂およびR₃は、独立して、H、OH、アルキル、置換アルキル、アルカールまたはアラルキル、F、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、OCN、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、N-アルケニル、SO-アルキル、アルキル-OH、アルキル-OH、O-アルキル-OH、O-アルキル-SH、S-アルキル-OH、S-アルキル-SH、アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、アミノアルキル、アミノ酸、アミノアシル、ONH₂、O-アミノアルキル、O-アミノ酸、O-アミノアシル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、または式Iを有する基であり、R₁、R₂またはR₃は、本発明のs i N A分子への結合の点として働く]を有する化合物を含む。

20

【0096】

別の態様においては、本発明は、R₁およびR₂はヒドロキシル（OH）基であり、nは1であり、R₃はOを含み、かつ本発明の二本鎖s i N A分子の一方または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方への、または本発明の一本鎖s i N A分子への結合の点である、式V I Iを有する化合物を特徴とする。この修飾は、本明細書において"グリセリル"と称される（例えば、図10の修飾6を参照）。

30

【0097】

別の態様においては、式V、V IまたはV I Iのいずれかを有する本発明の成分は、本発明のs i N A分子の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在する。例えば、式V、V IまたはV I Iを有する成分は、s i N A分子のアンチセンス鎖、センス鎖、またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在することができる。さらに、式V I Iを有する成分は、本明細書に記載されるように、ヘアピンs i N A分子の3'末端または5'末端に存在することができる。

【0098】

別の態様においては、本発明のs i N A分子は、式VまたはV Iを有する無塩基残基を含み、ここで、式V IまたはV Iを有する無塩基残基は、3'-3'、3'-2'、2'-3'、または5'-5'コンフィギュレーションで、例えば、一方または両方のs i N A鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方でs i N Aコンストラクトに結合している。

40

【0099】

1つの態様においては、本発明のs i N A分子は、例えば、s i N A分子の5'末端、3'末端、5'末端および3'末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1またはそれ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上）のロック核酸（LNA）ヌクレオチドを含む。

50

【0100】

別の態様においては、本発明の s i N A 分子は、例えば、s i N A 分子の 5' 末端、3' 末端、5' 末端および 3' 末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1 またはそれ以上（例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上）の非環状ヌクレオチドを含む。

【0101】

1 つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i N A がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の（例えば、1 またはそれ以上、またはすべての）ピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、センス領域中に存在する任意の（例えば、1 またはそれ以上、またはすべての）プリンヌクレオチドは 2'-デオキシプリンヌクレオチドである（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2'-デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2'-デオキシプリンヌクレオチドである）。

10

【0102】

1 つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i N A がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の（例えば 1 またはそれ以上、またはすべての）ピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、センス領域中に存在する任意の（例えば、1 またはそれ以上、またはすべての）プリンヌクレオチドは 2'-デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2'-デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2'-デオキシプリンヌクレオチドである）、ここで、前記センス領域中に存在する 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは 2'-デオキシヌクレオチドである。

20

30

【0103】

1 つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i N A がアンチセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1 またはそれ以上、またはすべての）ピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1 またはそれ以上、またはすべての）プリンヌクレオチドは 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである）。

40

【0104】

1 つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i N A がアンチセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i N A）分子を特徴とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1 またはそれ以上、またはすべての）ピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意

50

の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）プリンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである）、ここで、前記アンチセンス領域中に存在する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは2'-デオキシヌクレオチドである。

【0105】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されたsiNAがアンチセンス領域を含む本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（siNA）分子を特徴とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである）。

10

【0106】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてVEGFおよび／またはVEGF_rに対するRNA干渉（RNAi）を媒介しうる、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（siNA）分子を特徴とし、ここで、化学的に修飾されたsiNAはセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、センス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである）、および、センス領域の3'末端、5'末端、または3'末端、および5'末端の両方に存在していてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み、センス領域はさらに約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の2'-デオキシリボヌクレオチドを有する3'末端オーバーハングを含んでいてもよく；かつ、化学的に修飾された短干渉核酸分子はアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示されるいずれかの修飾を含み、これは任意に、アンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在してもよく、アンチセンス領域はさらに任意に、約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の2'-デオキシヌクレオチドを有する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく、ここでオーバーハングヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1, 2, 3, または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾されたsiNAの非限定的例は図4および5および本明細書の表IIIおよびVIに示される。

20

30

40

【0107】

50

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてVEGFおよび／またはVEGF_rに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、s i N Aはセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、センス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドはプリンリボヌクレオチドであり(例えば、すべてのプリンヌクレオチドがプリンリボヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドがプリンリボヌクレオチドである)、およびセンス領域の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に任意に存在していてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み、センス領域はさらに任意に、約1-約4個(例えば、約1, 2, 3, または4個)の2'-デオキシリボヌクレオチドを有する3'末端オーバーハングを含み;かつ、s i N Aはアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、アンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり(例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである)、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在してもよく、アンチセンス領域はさらに任意に約1-約4個(例えば、約1, 2, 3, または4個)の2'-デオキシヌクレオチドを有する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく、ここで、オーバーハングヌクレオチドはさらに1またはそれ以上(例えば、1, 2, 3, または4個)のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾されたs i N Aの非限定的例は、図4および5および本明細書の表I I IおよびV Iに示される。

【0108】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてVEGFおよび／またはVEGF_rに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、化学的に修飾されたs i N Aはセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、例えば、センス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチド、ロック核酸(L N A)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択され(例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチド、ロック核酸(L N A)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択されるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチド、ロック核酸(L N A)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択される)、かつ、任意にセンス領域の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に反転デオキシ無塩基修飾が存在していてもよく、センス領域はさらに任意に約1-約4個(例えば、約1, 2, 3, または4個)の2'-デオキシリボヌクレオチドを有す

る3'末端オーバーハングを含んでいてもよく；かつ，化学的に修飾された短干渉核酸分子はアンチセンス領域を含み，ここで，アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば，すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか，あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである），アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは，2'-デオキシヌクレオチド，ロック核酸（LNA）ヌクレオチド，2'-メトキシエチルヌクレオチド，4'-チオヌクレオチド，および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択され（例えば，すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチド，ロック核酸（LNA）ヌクレオチド，2'-メトキシエチルヌクレオチド，4'-チオヌクレオチド，および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択されるか，あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチド，ロック核酸（LNA）ヌクレオチド，2'-メトキシエチルヌクレオチド，4'-チオヌクレオチド，および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択される），および末端キャップ修飾，例えば，本明細書に記載されるかまたは図10に示されるいずれかの修飾を含み，これは任意にアンチセンス配列の3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に存在していてもよく，アンチセンス領域はさらに任意に，約1-約4個（例えば，約1，2，3，または4個）の2'-デオキシヌクレオチドを有する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく，ここで，オーバーハングヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば1，2，3，または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0109】

別の態様においては，本発明のsiNA分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは，好ましくは，本発明のsiNA分子のアンチセンス鎖に存在するが，また任意に，センスおよび／またはアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に存在していてもよく，これは，天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば，本発明は，ノザンコンフォメーション（例えば，ノザン偽回転サイクル，例えば，Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照）を有する修飾ヌクレオチドを含むsiNA分子を特徴とする。このように，本発明のsiNA分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは，好ましくは，本発明のsiNA分子のアンチセンス鎖に存在するが，また任意にセンスおよび／またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方に存在してもよく，これはヌクレアーゼ分解に対して耐性であると同時にRNAiを媒介する能力を維持する。ノザンコンフィギュレーションを有するヌクレオチドの非限定的例としては，ロック核酸（LNA）ヌクレオチド（例えば，2'-O，4'-C-メチレン-（D-リボフラノシル）ヌクレオチド）；2'-メトキシエトキシ（MOE）ヌクレオチド；2'-メチルーチオ-エチル，2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド，2'-デオキシ-2'-クロロヌクレオチド，2'-アジドヌクレオチド，および2'-O-メチルヌクレオチドが挙げられる。

【0110】

1つの態様においては，本発明は，細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてVEGFおよび／またはVEGF_rに対するRNA干渉（RNAi）を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸分子（siNA）を特徴とし，ここで，化学的修飾は，化学的に修飾されたsiNA分子に共有結合したコンジュゲートを含む。別の態様においては，コンジュゲートは化学的に修飾されたsiNA分子に生物分解性リンカーを介して共有結合している。1つの態様においては，コンジュゲート分子は，化学的に修飾されたsiNA分子のセンス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の3'末端に結合している。別の態様においては，コンジュゲート分子は，化学的に修飾されたsiNA分子のセンス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の5'末端に結合している。さらに別の態様においては，コンジュゲート分子は，化学的に修飾されたsiNA分子のセンス鎖，アンチセンス鎖

、または両方の鎖の3'末端および5'末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせに結合している。1つの態様においては、本発明のコンジュゲート分子は、化学的に修飾された siNA 分子の生物学的システム（例えば細胞）へのデリバリーを促進する分子を含む。別の態様においては、化学的に修飾された siNA 分子に結合したコンジュゲート分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、または細胞取り込みを媒介することができる細胞レセプターのリガンドである。化学的に修飾された siNA 分子に結合させることができる、本発明により企図される特定のコンジュゲート分子の例は、Vargeese ら（米国特許出願 10/201,394、本明細書の一部としてここに引用する）に記載される。用いられるコンジュゲートのタイプおよび本発明の siNA 分子のコンジュゲーションの程度は、同時に siNA が RNAi 活性を媒介する能力を維持しながら、siNA コンストラクトの改良された薬物動態学プロファイル、生物利用性、および/または安定性について評価することができる。このように、当業者は、例えば、当該技術分野において一般的に知られる動物モデルにおいて、種々のコンジュゲートで修飾された siNA コンストラクトをスクリーニングして、siNA コンジュゲート複合体が RNAi を媒介する能力を維持しながら改良された特性を有するかを判定することができる。

10

【0111】

1つの態様においては、本発明は、siNA がさらに siNA のセンス領域と siNA のアンチセンス領域とを連結させるヌクレオチド、非ヌクレオチド、または混合ヌクレオチド/非ヌクレオチドリンカーを含む本発明の短干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。1つの態様においては、本発明のヌクレオチドリンカーは、2ヌクレオチド以上の長さ、例えば、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドの長さのリンカーでありうる。別の態様においては、ヌクレオチドリンカーは、核酸アプタマーであってもよい。本明細書において用いる場合、"アプタマー"または"核酸アプタマー"とは、標的分子に特異的に結合する核酸分子を意味し、ここで、核酸分子は、その天然の設定において標的分子により認識される配列を含む配列を有する。あるいは、アプタマーは天然には核酸に結合しない標的分子に結合する核酸分子であってもよい。標的分子は目的とする任意の分子でありうる。例えば、アプタマーを用いて蛋白質のリガンド結合ドメインに結合させ、このことにより、天然に生ずるリガンドと蛋白質との相互作用を妨害することができる。これは非限定的例であり、当業者は当該技術分野において一般に知られる手法を用いて他の態様を容易に生成しうることを認識するであろう（例えば、Gold et al., 1995, Annu. Rev. Biochem., 64, 763; Brody and Gold, 2000, J. Biotechnol., 74, 5; Sun, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther., 2, 100; Kusser, 2000, J. Biotechnol., 74, 27; Hermann and Patel, 2000, Science, 287, 820; および Jayasena, 1999, Clinical Chemistry, 45, 1628 を参照）。

20

30

【0112】

さらに別の態様においては、本発明の非ヌクレオチドリンカーには、無塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素、または他のポリマー性化合物（例えば、ポリエチレングリコール、例えば2-100個のエチレングリコール単位を有するもの）が含まれる。特定の例としては、Seela and Kaiser, Nucleic Acids Res. 1990, 75:6353 および Nucleic Acids Res. 1987, 75:3113; Cload and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 173:6324; Richardson and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 773:5109; Ma et al., Nucleic Acids Res. 1993, 27:2585 および Biochemistry 1993, 32:1751; Durand et al., Nucleic Acids Res. 1990, 75:6353; McCurdy et al., Nucleosides & Nucleotides 1991, 10:287; Jschke et al., Tetra

40

50

hedron Lett. 1993, 34:301; Ono et al., Biochemistry 1991, 30:9914; Arnold et al., 国際公開WO95/02439; Usman et al., 国際公開WO95/06731; Dudycz et al., 国際公開WO95/11910およびFerentz and Verdine, J. Am. Chem. Soc. 1991, 773:4000 (すべて本明細書の一部としてここに引用する)に記載されるものが挙げられる。"非ヌクレオチド"はさらに、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに糖および/またはリン酸置換のいずれかにより核酸鎖中に取り込むことができ、残りの塩基がその酵素活性を発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、一般に認識されているヌクレオチド塩基、例えばアデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミンを、例えば糖のC1位に含まない場合、無塩基でありうる。

10

【0113】

1つの態様において、本発明は、細胞内または再構成されたインビトロ系でRNA干渉(RNAi)を媒介する能力がある短干渉核酸を特徴とするが、ここで2つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てられるsiNA分子の1つまたは両方の鎖はリボヌクレオチドを含まない。例えば、siNA分子は単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられてもよく、ここで、siNAのセンス領域およびアンチセンス領域は、オリゴヌクレオチドに存在するリボヌクレオチド(例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド)を有さない別々のオリゴヌクレオチドを含む。別の例においては、siNA分子は単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられてもよく、ここで、siNAのセンス領域およびアンチセンス領域は、本明細書中に記載されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドによって連結されるか、または環化されており、オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチドに存在するリボヌクレオチド(例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド)を有さない。出願人は、siNA分子内のリボヌクレオチド(例えば、2'-ヒドロキシル基を有するヌクレオチド)の存在は、RNAi活性を支持するために必要ではないか、または重要ではないことを意外にも見出した。したがって、1つの態様において、siNA内のすべての位置は、細胞内のRNAi活性を支持するsiNA分子の能力が維持される程度まで、式I, II, III, IV, V, VI, またはVII, あるいはその組合せを有するヌクレオチドまたは非ヌクレオチドなどの化学修飾ヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチドを含みうる。

20

【0114】

1つの態様においては、本発明のsiNA分子は、細胞または再構成されたインビトロ系においてRNAi活性を媒介する一本鎖siNA分子であり、ここで、siNA分子は、標的核酸配列に対して相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含む。別の態様においては、本発明の一本鎖siNA分子は、5'末端リン酸基を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖siNA分子は5'末端リン酸基および3'末端リン酸基(例えば、2', 3'-環状リン酸)を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖siNA分子は、約19-約29ヌクレオチドを含む。さらに別の態様においては、本発明の一本鎖siNA分子は、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。例えば、細胞中においてsiNA分子がRNAi活性を支持する能力が維持される程度に、siNA分子中のすべての位置で、化学的に修飾されたヌクレオチド、例えば式I-VIIのいずれかを有するヌクレオチドまたはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

30

40

【0115】

1つの態様においては、本発明のsiNA分子は、細胞または再構成されたインビトロ系においてRNAi活性を媒介する一本鎖siNA分子であり、ここで、siNA分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、siNA中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、アンチセン

50

ス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在してもよく、s i N Aはさらに任意に、s i N A分子の3'末端に約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の末端2'-デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく、ここで、末端ヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1, 2, 3, または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ、s i N Aはさらに任意に末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

10

【0116】

1つの態様においては、本発明のs i N A分子は、細胞または再構成されたインビトロ系においてRNA i活性を媒介する一本鎖s i N A分子であり、ここで、s i N A分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、s i N A中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、およびアンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドであるかあるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在してもよく、s i N Aはさらに任意にs i N A分子の3'末端に約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の末端2'-デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく、ここで末端ヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1, 2, 3, または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ、s i N Aはさらに任意に、末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

20

【0117】

1つの態様においては、本発明のs i N A分子は、細胞または再構成されたインビトロ系においてRNA i活性を媒介する一本鎖s i N A分子であり、ここで、s i N A分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、s i N A中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、アンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドはロック核酸（LNA）ヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドがLNAヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドがLNAヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在していてもよく、s i N Aはさらに任意に、s i N A分子の3'末端に約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の末端2'-デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく、ここで末端ヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1, 2, 3, または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ、s i N Aはさらに任意に、末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

30

40

【0118】

1つの態様においては、本発明のs i N A分子は、細胞または再構成されたインビトロ系においてRNA i活性を媒介する一本鎖s i N A分子であり、ここで、s i N A分子は

50

、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、s i N A中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、およびアンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-メトキシエチルプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-メトキシエチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-メトキシエチルプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在していてもよく、s i N Aはさらに任意に、s i N A分子の3'末端に約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の末端2'-デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく、ここで末端ヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1, 2, 3, または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ、s i N Aはさらに任意に、末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

10

【0119】

別の態様においては、本発明の一本鎖s i N A分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは、天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本発明は、ノザンコンフォメーション（例えば、ノザン偽回転（pseudorotation）サイクル（例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照）を有する修飾ヌクレオチドを含むs i N A分子を特徴とする。このように、本発明の一本鎖s i N A分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは、好ましくは、ヌクレアーゼ分解に耐性であり、同時にRNAiを媒介する能力を維持する。

20

【0120】

1つの態様においては、本発明は、細胞中においてVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして（b）細胞におけるVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を細胞に導入する、ことを含む。

30

【0121】

1つの態様においては、本発明は、細胞中においてVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、s i N Aのセンス鎖配列は標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして（b）細胞中におけるVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を細胞に導入する、ことを含む。

40

【0122】

別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして（b）細胞におけるVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を細胞に導入する、ことを含む。

【0123】

別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のVEGFおよび／またはVEGF r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子

50

を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み、s i N Aのセンス鎖配列は、標的R N Aの配列と同一の配列を含み；そして（b）細胞におけるV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を細胞に導入する、ことを含む。

【0124】

1つの態様において、本発明のs i N A分子は、エキソビボ用途における試薬として用いられる。例えば、s i N A試薬は、治療効果のために被験者の中に移植される組織または細胞に導入される。細胞および／または組織は、その後、外植片を受ける生物または被験者由来、または移植前の別の生物または被験者由来でありうる。s i N A分子を用いて、インビボ移植された場合に細胞または組織が所望の表現型を獲得し、または機能を実行しうるように、細胞または組織における1つ以上の遺伝子の発現を調節することができる。1つの態様においては、ある種の標的細胞が患者から抽出される。これらの抽出細胞は、これらの細胞によるs i N Aの取込みに適した条件下に（例えば、陽イオン脂質、リポソーム等などのデリバリー試薬を用い、またはエレクトロポレーションなどの方法を用いて、細胞へのs i N Aのデリバリーを促進することにより）細胞内の特定のヌクレオチド配列をターゲティングするs i N Aと接触させる。次いで、細胞は同じ患者または他の患者に再導入されて戻される。1つの態様においては、本発明は、組織外植片におけるV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）組織外植片におけるV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0125】

1つの態様においては、本発明は、組織外植片においてV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み、s i N Aのセンス鎖配列は標的R N Aの配列と同一の配列を含み；そして（b）組織外植片におけるV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0126】

別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）組織外植片におけるV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0127】

1つの態様においては、本発明は、生物においてV E G Fおよび／またはV E G F r 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し

、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）生物におけるV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を生物に導入する、ことを含む。

【0128】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）生物におけるV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を生物に導入する、ことを含む。 10

【0129】

1つの態様においては、本発明は、細胞内においてV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N AはV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子のR N Aに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして（b）細胞におけるV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を細胞に導入する、ことを含む。

【0130】

別の態様においては、本発明は、細胞内において2以上のV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N AはV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子のR N Aに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして（b）細胞におけるV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子をインビトロまたはインビボで細胞と接触させる、ことを含む。 20

【0131】

1つの態様においては、本発明は、組織外植片においてV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N AはV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子のR N Aに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして（b）組織外植片におけるV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞と接触させる、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。 30

【0132】

別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N AはV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子のR N Aに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして（b）組織外植片におけるV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。 40

【0133】

1つの態様においては、本発明は、生物においてV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N AはV E G Fおよび／またはV E G F r遺伝子のR N Aに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして（b）生物におけるV E G F 50

および／または V E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で s i N A 分子を生物に導入する，ことを含む。

【0134】

別の態様においては，本発明は，生物において2以上の V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし，該方法は，（a）本発明の s i N A 分子を合成し，これは化学的に修飾してもよく，s i N A は V E G F および／または V E G F r 遺伝子の R N A に対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして（b）生物における V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で s i N A 分子を生物に導入する，ことを含む。

【0135】

1つの態様においては，本発明は，生物において V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし，該方法は，生物における V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で，生物を本発明の s i N A 分子と接触させることを含む。

【0136】

別の態様においては，本発明は，生物において2以上の V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし，該方法は，生物における V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で，生物を1またはそれ以上の本発明の s i N A 分子と接触させることを含む。

【0137】

本発明の s i N A 分子は，種々の R N A 分子を標的とする R N A i により標的（V E G F および／または V E G F r）遺伝子の発現が阻害されるよう設計することができる。1つの態様においては，本発明の s i N A 分子は，標的遺伝子に対応する種々の R N A を標的とするよう用いられる。そのような R N A の非限定的例には，メッセンジャー R N A （m R N A），標的遺伝子の選択的 R N A スプライシング変種，標的遺伝子の転写後修飾 R N A，標的遺伝子の プレー m R N A，および／または R N A テンプレートが含まれる。選択的スプライシングにより，適当なエクソンの使用により区別される転写産物のファミリーが生ずる場合には，本発明は，適当なエクソンにより遺伝子発現を阻害して，遺伝子ファミリーメンバーの機能を特異的に阻害するかまたはその間を区別するために用いることができる。例えば，選択的スプライシングされた貫膜ドメインを含む蛋白質を，膜結合型および分泌型の両方の形で発現させることができる。本発明を用いて貫膜ドメインを含むエクソンを標的とすることにより，分泌型の蛋白質に対して，膜結合型の薬学的ターゲティングの機能的な重要性を判定することができる。これらの R N A 分子を標的とすることに関連する本発明の用途の非限定的例には，治療的医薬用途，医薬の発見用途，分子診断および遺伝子機能用途，および遺伝子マッピング，例えば本発明の s i N A 分子を用いる単一ヌクレオチド多型のマッピングが含まれる。そのような用途は，既知の遺伝子配列を用いて，または発現配列タグ（E S T）から入手可能な部分配列から実行することができる。

【0138】

別の態様においては，本発明の s i N A 分子は，遺伝子ファミリー，例えば V E G F および／または V E G F r ファミリー遺伝子に対応する保存配列を標的とするために用いられる。そのように，多くの V E G F および／または V E G F r 標的を標的とする s i N A 分子は，増加した治療効果を提供することができる。さらに，s i N A は，種々の応用法において遺伝子機能の経路を特性決定するために用いることができる。例えば，本発明を用いて，経路における標的遺伝子の活性を阻害して，遺伝子機能分析，m R N A 機能分析，または翻訳分析において，特性決定されていない遺伝子の機能を決定することができる。本発明は，医薬開発に向けて，種々の疾病および健康状態に関与する可能性のある標的遺伝子経路を決定するために用いることができる。本発明は，例えば，癌の進行および／または維持に関与する遺伝子発現の経路を理解するために用いることができる。

【0139】

1つの態様においては、本発明の s i N A 分子および／または方法は、G e n b a n k 受託番号で表される R N A をコードする遺伝子、例えば、本明細書において G e n b a n k 受託番号（例えば表 I に示される G e n b a n k 受託番号）で表される R N A 配列をコードする V E G F および／または V E G F r 遺伝子の発現を阻害するために用いられる。

【0140】

1つの態様においては、本発明は、（a）予め決定された複雑性を有する s i N A コンストラクトのライブラリを生成し、そして（b）標的 R N A 配列中の R N A i 標的部位を決定するのに適した条件下で、上述の（a）の s i N A コンストラクトをアッセイする、ことを含む方法の特徴とする。別の態様においては、（a）の s i N A 分子は、固定された長さ、例えば、約 23 ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、（a）の s i N A 分子は、異なる長さのものであり、例えば、約 19－約 25（例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24, または 25）ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的 R N A が発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、標的 R N A のフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノザンブロット分析、または R N A s e 保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的 R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 R N A 配列は、当該技術分野において知られるように、例えば、クローニングおよび／またはインビトロ系については転写、インビボ系においては細胞発現により、得ることができる。

10

20

【0141】

1つの態様においては、本発明は、（a）予め決定された複雑性、例えば 4^N （N は、s i N A コンストラクトの鎖のそれぞれにおいて塩基対形成したヌクレオチドの数を示し、例えば、19 塩基対を有する 21 ヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する s i N A コンストラクトについては、複雑性は 4^{19} となる）を有するランダム化された s i N A コンストラクトのライブラリを生成し；そして（b）標的 V E G F および／または V E G F r R N A 配列中の R N A i 標的部位を決定するのに適した条件下で、上述の（a）の s i N A コンストラクトをアッセイする、の各工程を含む方法の特徴とする。別の態様においては、（a）の s i N A 分子は、固定された長さ、例えば約 23 ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、（a）の s i N A 分子は異なる長さのものであり、例えば、約 19－約 25（例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24, または 25）ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書の実施例 7 に記載されるような、再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的 R N A が発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、V E G F および／または V E G F r R N A のフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノザンブロット分析、または R N A s e 保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的 V E G F および／または V E G F r R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 V E G F および／または V E G F r R N A 配列は、当該技術分野において知られるように、例えば、クローニングおよび／またはインビトロ系については転写により、インビボ系においては細胞発現により、得ることができる。

30

40

【0142】

別の態様においては、本発明は、：（a）標的遺伝子によりコードされる R N A 標的の配列を分析し；（b）（a）の R N A の 1 またはそれ以上の領域に相補的な配列を有する 1 またはそれ以上の s i N A 分子の組を合成し；そして（c）標的 R N A 配列中の R N A i 標的を決定するのに適した条件下で（b）の s i N A 分子をアッセイする、の各工程を含む方法の特徴とする。1つの態様においては、（b）の s i N A 分子は、固定された長さ、例えば約 23 ヌクレオチドの長さの鎖を有する。別の態様においては、（b）の s i N A 分子は、異なる長さ、例えば、約 19－約 25（例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24, または 25）ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、

50

アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含んでいてもよい。別の態様においては、アッセイは、標的 R N A が発現されている細胞培養系を含むことができる。標的 R N A のフラグメントを、検出可能なレベルの切断について、例えばゲル電気泳動、ノザンプロット分析、または R N A s e 保護アッセイにより分析して、標的 R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 R N A 配列は、当該技術分野において知られるようにして、例えば、クローニングおよび／またはインビトロ系については転写により、インビボ系においては発現により、得ることができる。

【0143】

"標的部位"とは、アンチセンス領域中に標的配列に相補的な配列を含む s i N A コンストラクトにより媒介される切断の"標的とされる"、標的 R N A 中の配列を意味する。

10

【0144】

"検出可能なレベルの切断"とは、標的 R N A のランダム分解から生成する R N A のバックグラウンドから切断産物を識別するのに十分な程度の標的 R N A の切断（および切断産物 R N A の形成）を意味する。ほとんどの検出方法について、標的 R N A の 1 - 5 % から切断産物が生成すれば、バックグラウンドから検出するのに充分である。

【0145】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明の s i N A 分子を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む組成物を特徴とする。別の態様においては、本発明は、1またはそれ以上の遺伝子を標的とし、化学的に修飾されていてもよい本発明の s i N A 分子を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む医薬組成物を特徴とする。別の態様においては、本発明は、被験者において疾病または健康状態を治療または予防する方法を特徴とし、該方法は、被験者における疾病または健康状態の治療または予防に適した条件下で、被験者に本発明の組成物を単独でまたは1またはそれ以上の他の治療用化合物と併用して投与することを含む。さらに別の態様においては、本発明は、被験者において組織拒絶を低減または予防する方法を特徴とし、該方法は、被験者における組織拒絶の低減または予防に適した条件下で被験者に本発明の組成物を投与することを含む。

20

【0146】

別の態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r 遺伝子標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明の s i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A 鎖の一方は V E G F および／または V E G F r 標的遺伝子の R N A に相補的な配列を含み；(b) 細胞、組織、または生物において V E G F および／または V E G F r 標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A 分子を細胞、組織、または生物に導入し；そして(c) 細胞、組織、または生物における表現型変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

30

【0147】

別の態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r 標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明の s i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾されていてもよく、s i N A 鎖の一方は V E G F および／または V E G F r 標的遺伝子の R N A に相補的な配列を含み；(b) 生物学的システムにおける V E G F および／または V E G F r 標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A 分子を生物学的システムに導入し；そして(c) 生物学的システムにおける表現型の変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

40

【0148】

"生物学的システム"とは、生物起源、例えば、限定されないが、ヒト、動物、植物、昆虫、細菌、ウイルスまたは他の起源からの、精製されたまたは精製されていない形の物質を意味し、ここで、システムは R N A i 活性に必要な成分を含む。"生物学的システム"との用語には、例えば、細胞、組織、または生物、またはそれらの抽出物が含まれる。生物学的システムとの用語にはまた、インビトロの設定で用いることができる再構成された R N A i 系が含まれる。

50

【0149】

"表現型変化"とは、本発明の核酸分子（例えば s i N A）との接触または処理に応答して生ずる任意の検出可能な細胞の変化を意味する。そのような検出可能な変化には、限定されないが、形状、サイズ、増殖、運動性、蛋白質発現または R N A 発現、または当該技術分野において知られる方法によりアッセイすることができる他の物理学的または化学的变化が含まれる。検出可能な変化にはまた、グリーン蛍光蛋白質（G F P）等のレポーター遺伝子／分子、または発現された蛋白質を同定するために用いられる種々のタグ、またはアッセイすることができる任意の他の細胞成分の発現が含まれる。

【0150】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明の s i N A 分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物における V E G F および／または V E G F r 標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい2以上の本発明の s i N A 分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物において2以上の V E G F および／または V E G F r 標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。

【0151】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明の1またはそれ以上の s i N A 分子を含有する細胞を特徴とする。別の態様においては、本発明の s i N A 分子を含有する細胞は哺乳動物細胞である。さらに別の態様においては、本発明の s i N A 分子を含有する細胞はヒト細胞である。

【0152】

1つの態様においては、化学的に修飾されていてもよい本発明の s i N A 分子の合成は、（a）s i N A 分子の2つの相補的鎖を合成し；（b）二本鎖 s i N A 分子を得るのに適した条件下で2つの相補的鎖と一緒にアニーリングさせる、ことを含む。別の態様においては、s i N A 分子の2つの相補的鎖の合成は、固相オリゴヌクレオチド合成により行う。さらに別の態様においては、s i N A 分子の2つの相補的鎖の合成は、固相タンデムオリゴヌクレオチド合成により行う。

【0153】

1つの態様においては、本発明は、s i N A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、（a）s i N A 分子の第1のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第1のオリゴヌクレオチド配列鎖は s i N A の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；（b）第1のオリゴヌクレオチド配列鎖の足場上で s i N A の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第2のオリゴヌクレオチド配列鎖はさらに、s i N A デュープレックスを精製するために用いることができる化学成分を含み；（c）2つの s i N A オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュープレックスを形成するのに適した条件下で（a）のリンカー分子を切断し；そして（d）第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して s i N A デュープレックスを精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の（c）におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば、メチルアミン等のアルキルアミン塩基を用いて加水分解条件下で行う。1つの態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス（C P G）またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、ここで、（a）の第1の配列は、固体支持体を足場として用いてスクシニルリンカー等の切断可能なリンカー上で合成される。（a）において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーと（a）の切断可能なリンカーの切断が同時に行われるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性を有することができる。別の態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に用いることができる（b）の化学成分は、ジメトキシトリチル基等のトリチル基を含み、これは本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略において利用することができる。さらに別の態様においては、ジメトキシトリチル基等の化学成分は、精製の間に、例えば酸性条件を用いて除去する。

10

20

30

40

50

【0154】

さらに別の態様においては、s i N A 合成の方法は溶液相合成またはハイブリッド相合成であり、ここでは、第1の配列に結合され、第2の配列の合成の足場として作用する切断可能なリンカーを用いて、s i N A デュープレックスの両方の鎖をタンデムで合成することにより、二本鎖 s i N A 分子が形成される。

【0155】

別の態様においては、本発明は、s i N A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) s i N A 分子の一方のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、配列は他方のオリゴヌクレオチド配列の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1の配列鎖に対して相補性を有する第2のオリゴヌクレオチド配列を(a)の足場上で合成し、ここで、第2の配列は二本鎖 s i N A 分子の他方の鎖を含み、かつ、第2の配列はさらに、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる化学成分を含み；(c) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して、切断可能なリンカーにより接続された両方の s i N A オリゴヌクレオチド鎖を含む全長配列を単離するのに適した条件下で、かつ、2つの s i N A オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュープレックスを形成するのに適した条件下で、(b)の生成物を精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば加水分解条件下で行う。別の態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の後に行う。別の態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(C P G)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、ここで、(a)の第1の配列は、スクシニルリンカー等の切断可能なリンカー上で、固体支持体を足場として用いて合成する。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーおよび(a)の切断可能なリンカーが同時にまたは別々に切断されるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性または異なる反応性を有することができる。1つの態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる(b)の化学成分は、トリチル基、例えばジメトキシトリチル基を含む。

【0156】

別の態様においては、本発明は、1回の合成プロセスで二本鎖 s i N A 分子を作製する方法を特徴とし、該方法は、(a) 第1の配列および第2の配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、ここで、第1の配列は第2の配列に相補的であり、第1のオリゴヌクレオチド配列は切断可能なリンカーを介して第2の配列に連結されており、かつ、第2の配列を有するオリゴヌクレオチドには末端5'-保護基、例えば、5'-O-ジメトキシトリチル基(5'-O-DMT)が残存しており；(b) オリゴヌクレオチドを脱保護し、このことにより脱保護によって2つのオリゴヌクレオチド配列を結合しているリンカーが切断され；そして(c) 二本鎖 s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、例えば本明細書に記載されるトリチルーオン合成戦略を用いて、(b)の生成物を精製する、の工程を含む。

【0157】

別の態様においては、本発明の s i N A 分子の合成の方法は、S c a r i n g e らの米国特許5,889,136；6,008,400；および6,111,086(その全体を本明細書の一部としてここに引用する)の教示を含む。

【0158】

1つの態様においては、本発明は V E G F および／または V E G F r に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、s i N A コンストラクトは、s i N A コンストラクトのヌクレアーゼ耐性を増加させる1またはそれ以上の化学的修飾、例えば、式 I-V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0159】

別の態様においては、本発明は、ヌクレアーゼ耐性が増加している s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I-V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) ヌクレアーゼ耐性が増加している s i N A 分子を単離するのに適した条件下で工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0160】

1つの態様においては、本発明は V E G F および／または V E G F r に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、s i N A コンストラクトは、s i N A コンストラクトのセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性を調節する、1またはそれ以上の本明細書に記載される化学的修飾を含む。 10

【0161】

別の態様においては、本発明は、s i N A 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I-V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) s i N A 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している s i N A 分子を単離するのに適した条件下で工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0162】

1つの態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、s i N A コンストラクトは、s i N A コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的標的 R N A 配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。 20

【0163】

1つの態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、s i N A コンストラクトは、s i N A コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的標的 D N A 配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0164】

別の態様においては、本発明は、s i N A 分子のアンチセンス鎖と相補的標的 R N A 配列との間の結合親和性が増加している s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I-V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) s i N A 分子のアンチセンス鎖と相補的標的 R N A 配列との間の結合親和性が増加している s i N A 分子を同定するのに適した条件下で工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。 30

【0165】

別の態様においては、本発明は、s i N A 分子のアンチセンス鎖と相補的標的 D N A 配列との間の結合親和性が増加している s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I-V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) s i N A 分子のアンチセンス鎖と相補的標的 D N A 配列との間の結合親和性が増加している s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。 40

【0166】

1つの態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、s i N A コンストラクトは、化学的に修飾された s i N A コンストラクトに対する配列ホモロジーを有する追加の内因性 s i N A 分子を生成しうる細胞性ポリメラーゼのポリメラーゼ活性を調節する、本明細書に記載される 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0167】

別の態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i N A 分子に対して配列ホモロ 50

ジーを有する追加の内因性 s i N A 分子を生成しうる細胞性ポリメラーゼのポリメラーゼ活性の増加を媒介することができる s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) 化学的に修飾された s i N A 分子に対して配列ホモロジーを有する追加の内因性 s i N A 分子を生成しうる細胞性ポリメラーゼのポリメラーゼ活性の増加を媒介することができる s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0168】

1つの態様においては、本発明は、細胞において V E G F および／または V E G F r に対する R N A i を媒介する化学的に修飾された s i N A コンストラクトを特徴とし、ここで、化学的修飾は、そのような s i N A コンストラクトにより媒介される R N A i の効率を低下させるような様式で、s i N A と標的 R N A 分子、D N A 分子および／または蛋白質または R N A i に必須の他の因子との相互作用に有意に影響を与えない。

10

【0169】

別の態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) 改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0170】

20

さらに別の態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r 標的 R N A に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) 標的 R N A に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0171】

さらに別の態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r 標的 D N A に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) 標的 D N A に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

30

【0172】

1つの態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、ここで、s i N A コンストラクトは、s i N A コンストラクトの細胞取り込みを調節する本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0173】

別の態様においては、本発明は、改良された細胞取り込みを有する、V E G F および／または V E G F r に対する s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は (a) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして (b) 改良された細胞取り込みを有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 (a) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

40

【0174】

1つの態様においては、本発明は、V E G F および／または V E G F r に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、ここで、s i N A コンストラクトは、例えば、s i N A コンストラクトの薬物動態学を改良するポリエチレングリコールまたは同等のコンジュゲート等のポリマー性コンジュゲートを結合させることにより、またはインビボで特定の組織のタイプまたは細胞のタイプにターゲティングするコンジュゲートを

50

結合させることにより、s i N Aコンストラクトの生物利用性を増加させる、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。そのようなコンジュゲートの非限定的例は、V a r g e e s e e t a l . , 米国特許出願10/201,394（本明細書の一部としてここに引用する）に記載されている。

【0175】

1つの態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i N A分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)コンジュゲートをs i N A分子の構造中に導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するs i N A分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i N A分子をアッセイする、ことを含む。そのようなコンジュゲートには、細胞レセプターのリガンド、例えば、天然に生ずる蛋白質リガンドに由来するペプチド；蛋白質局在化配列、例えば細胞Z I Pコード配列；抗体；核酸アプタマー；ビタミンおよび他の補因子、例えば葉酸およびN-アセチルガラクトースアミン；ポリマー、例えばポリエチレングリコール(P E G)；リン脂質；ポリアミン、例えばスペルミンまたはスペルミジン；および他のものが含まれる。

【0176】

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i N A分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)賦形剤処方s i N A分子に導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するs i N A分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i N A分子をアッセイする、ことを含む。そのような賦形剤には、ポリマー、例えばシクロデキストリン、脂質、カチオン性脂質、ポリアミン、リン脂質、およびその他のものが含まれる。

【0177】

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i N A分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-V I Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i N A分子に導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するs i N A分子を単離するのに適した条件下で工程(a)のs i N A分子をアッセイする、ことを含む。

【0178】

別の態様においては、本発明のs i N A化合物にポリエチレングリコール(P E G)を共有結合的に結合させることができる。結合したP E Gは、任意の分子量のものであってよく、好ましくは約2,000-約50,000ダルトン(D a)である。

【0179】

本発明は、単独で、またはインビトロまたはインビボでR N Aを試験サンプルおよび/または被験者に導入するのに必要な試薬の少なくとも1つを有するキットの成分として、用いることができる。例えば、キットの好ましい成分には、本発明のs i N A分子およびs i N Aを目的とする細胞内に導入することを促進する本明細書に記載されるベヒクルが含まれる(例えば、脂質および当該技術分野において知られるトランスフェクションの他の方法、例えば、B e i g e l m a n e t a l , 米国特許6,395,713を参照)。キットは、標的評価、例えば、遺伝子機能および/または活性の判定において、または薬剤最適化において、および薬剤の発見において用いることができる(例えば、U s m a n e t a l . , 米国特許出願60/402,996を参照)。そのようなキットはまた、キットのユーザが本発明を実施できるようにするための指針を含むことができる。

【0180】

本明細書において用いる場合、"短干渉核酸","s i N A","短干渉R N A","s i R N A","短干渉核酸分子","短干渉オリゴヌクレオチド分子",または"化学的に修飾された短干渉核酸分子"との用語は、例えば、配列特異的様式でR N A干渉"R N A i"または遺伝子サイレンシングを媒介することにより遺伝子発現を阻害またはダウンレギュレートする任意の核酸分子を表す(例えば、B a s s , 2001, N a t u r e , 411, 428-429; E l b a s h i r e t a l . , 2001, N a t u r e , 411, 494-498; およびK r e u t z e r e t a l . , 国際公開W O 0 0 / 4 4 8 9 5

; Zernicka-Goetz et al., 国際公開WO01/36646; Fire, 国際公開WO99/32619; Plaetinck et al., 国際公開WO00/01846; Mello and Fire, 国際公開WO01/29058; Deschamps-Depaillette, 国際公開WO99/07409; および Li et al., 国際公開WO00/44914; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237; Hutvagner and Zamore, 2002, Science, 297, 2056-60; McManus et al., 2002, RNA, 8, 842-850; Reinhart et al., 2002, Gene & Dev., 16, 1616-1626; および Reinhart & Bartel, 2002, Science, 297, 1831を参照)。本発明の siNA 分子の非限定的例は、図4-6および本明細書の表II, IIIおよびVIに示される。例えば、siNAは、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。siNAは2つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、ここで一方の鎖はセンス鎖であり、他方はアンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖およびセンス鎖は自己相補的であり（すなわち、各鎖は、他方の鎖中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、例えば、アンチセンス鎖とセンス鎖とがデュプレックスまたは二本鎖構造を形成し、例えば、二本鎖領域は約19塩基対である）；アンチセンス鎖は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を含む。あるいは、siNAは単一のオリゴヌクレオチドから組み立ててもよく、ここで、siNAの自己相補的センス領域およびアンチセンス領域は、核酸系または非核酸系のリンカーにより連結されている。siNAは、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は別の標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。siNAは2またはそれ以上のループ構造および自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を含むステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、インビボまたはインビトロでプロセッシングされて、RNAiを媒介しうる活性なsiNA分子を生ずることができる。siNAはまた、標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含んでいてもよく（例えば、そのようなsiNA分子がsiNA分子中に標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列の存在を必要としない場合）、ここで、一本鎖ポリヌクレオチドはさらに末端リン酸基、例えば5'-リン酸（例えば、Martinez et al., 2002, Cell, 110, 563-574およびSchwarz et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537-568を参照）、または5', 3'-二リン酸を含んでいてもよい。ある態様においては、本発明のsiNA分子は、別々のセンスおよびアンチセンス配列または領域を含んでいてもよく、センスおよびアンチセンス領域は、当該技術分野において知られるヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリinker分子により共有結合により結合しているか、あるいは、イオン相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水的相互作用、および／またはスタッキング相互作用により非共有結合的に結合している。ある態様においては、本発明のsiNA分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明のsiNA分

子は、標的遺伝子の発現の阻害が引き起こされるように、標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。本明細書において用いる場合、*siNA*分子はRNAのみを含む分子に限定される必要はなく、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドも包含する。ある態様においては、本発明の短干渉核酸分子は2'-ヒドロキシ(2'-OH)含有ヌクレオチドを欠失している。本出願人は、ある態様において、RNAiを媒介するために2'-ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない短干渉核酸を記載する。すなわち、本発明の短干渉核酸分子は、任意にリボヌクレオチド(例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド)を含まなくてもよい。しかし、RNAiを支持するために*siNA*分子中にリボヌクレオチドの存在を必要としないそのような*siNA*分子は、2'-OH基を有する1またはそれ以上のヌクレオチドを含む、結合したリンカーまたは他の結合しているかまたは会合している基、成分、または鎖を有することができる。任意に、*siNA*分子は、ヌクレオチド位置の約5, 10, 20, 30, 40, または50%にリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の修飾短干渉核酸分子はまた、短干渉修飾オリゴヌクレオチド"*siMON*"と称される。本明細書において用いる場合、*siNA*との用語は、配列特異的RNAiを媒介しうる核酸分子を記述するために用いられる他の用語、例えば、短干渉RNA(*siRNA*)、二本鎖RNA(*dsRNA*)、マイクロRNA(*miRNA*)、短ヘアピンRNA(*shRNA*)、短干渉オリゴヌクレオチド、短干渉核酸、短干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学的に修飾された*siRNA*、転写後遺伝子サイレンシングRNA(*ptgsRNA*)、および他のものと同等であることを意味する。さらに、本明細書において用いる場合、RNAiとの用語は、配列特異的RNA干渉を記述する他の用語、例えば転写後遺伝子サイレンシング、または後成遺伝学(*epigenetics*)と同等であることを意味する。例えば、本発明の*siNA*分子を用いて、転写後レベルまたは転写前レベルの両方で後成的に遺伝子をサイレンシングさせることができる。非限定的例においては、本発明の*siNA*分子による遺伝子発現の後成的制御は、クロマチン構造の*siNA*媒介性修飾により生じて遺伝子発現を変化させることができる(例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237を参照)。

【0181】

"調節する"とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または蛋白質または蛋白質サブユニットの1またはそれ以上の活性が、発現、レベル、または活性が、調節剤の非存在下で観察されるより高いかまたは低いように、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされることを意味する。例えば、"調節する"との用語は、"阻害する"ことを意味しうるが、"調節する"との用語の使用はこの定義には限定されない。

【0182】

"阻害する", "ダウンレギュレートする", または"減少させる"とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子(例えば*siNA*)の非存在下において観察されるより低く減少していることを意味する。1つの態様においては、*siNA*分子による阻害、ダウンレギュレーションまたは低下は、不活性または減弱化分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の態様においては、*siNA*分子による阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、例えば、スクランブル化配列を有するか mismatches を有する*siNA*分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の態様においては、本発明の核酸分子による遺伝子発現の阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、核酸分子の存在下においてその非存在下におけるより大きい。

【0183】

"遺伝子"または"標的遺伝子"とは、RNAをコードする核酸を意味し、例えば、限定されないが、ポリペプチドをコードする構造遺伝子などの核酸配列が含まれる。標的遺伝子は、細胞に由来する遺伝子、内因性遺伝子、トランスジーン、または外来遺伝子、例えば、病原体（例えばウイルス）の感染後に細胞中に存在する病原体の遺伝子でありうる。標的遺伝子を含む細胞は、任意の生物、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌または真菌に由来するかその中に含まれうる。植物の非限定的例には、単子葉植物、双子葉植物、または裸子植物が含まれる。動物の非限定的例には脊椎動物または無脊椎動物が含まれる。真菌の非限定的例には糸状菌または酵母が含まれる。

【0184】

本明細書中で用いられる「VEGF」によって、血管内皮成長因子活性を有する任意の血管内皮成長因子（例えば、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D）蛋白質、ペプチド、またはポリペプチド、例えば、表Iに示されているVEGFのGenBank受入番号によってコードされたものなどが意味される。VEGFなる用語は、血管内皮成長因子活性を有する任意の血管内皮成長因子蛋白質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸配列をも指す。 10

【0185】

「VEGF-B」によって、血管内皮成長因子タイプB活性を有する、蛋白質、ペプチド、またはポリペプチド、またはその誘導体、例えば、GenBank受入番号NM_003377によってコードされたものなどが意味される。VEGF-Bなる用語は、VEGF-B活性を有する任意のVEGF-B蛋白質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸配列をも指す。 20

【0186】

「VEGF-C」によって、血管内皮成長因子タイプC活性を有する、蛋白質、ペプチド、またはポリペプチド、またはその誘導体、例えば、GenBank受入番号NM_005429によってコードされたものなどが意味される。VEGF-Cなる用語は、VEGF-C活性を有する任意のVEGF-B蛋白質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸配列をも指す。

【0187】

「VEGF-D」によって、血管内皮成長因子タイプD活性を有する、蛋白質、ペプチド、またはポリペプチド、またはその誘導体、例えば、GenBank受入番号NM_004469によってコードされたものなどが意味される。VEGF-Dなる用語は、VEGF-C活性を有する任意のVEGF-D蛋白質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸配列をも指す。 30

【0188】

本明細書中で用いられる「VEGFr」によって、血管内皮成長因子活性を有する任意の血管内皮成長因子レセプター蛋白質、ペプチド、またはポリペプチド（例えば、VEGFr1、VEGFr2、またはVEGFr3、その膜結合および／または可溶性形態の両方を含む）、例えば、表Iに示されているVEGFのGenBank受入番号によってコードされたものなどが意味される。VEGFrなる用語は、血管内皮成長因子レセプター活性を有する任意の血管内皮成長因子レセプター蛋白質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸配列をも指す。 40

【0189】

「VEGFr1」によって、血管内皮成長因子レセプタータイプ1（flt）活性を有する、例えば、血管内皮成長因子を結合する能力を有する蛋白質、ペプチド、またはポリペプチド、またはその誘導体、例えば、GenBank受入番号NM_002019によってコードされたものなどが意味される。VEGFr1なる用語は、VEGFr1活性を有する任意のVEGFr1蛋白質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸配列をも指す。

【0190】

「VEGFr2」によって、血管内皮成長因子レセプタータイプ2（kdr）活性を有 50

する、例えば、血管内皮成長因子を結合する能力を有する蛋白質、ペプチド、またはポリペプチド、またはその誘導体、例えば、GenBank受入番号NM_002253によってコードされたものなどが意味される。VEGF_r2なる用語は、VEGF_r2活性を有する任意のVEGF_r2蛋白質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸配列をも指す。

【0191】

「VEGF_r3」によって、血管内皮成長因子レセプタータイプ1(kdr)活性を有する、例えば、血管内皮成長因子を結合する能力を有する蛋白質、ペプチド、またはポリペプチド、またはその誘導体、例えば、GenBank受入番号NM_002020によってコードされたものなどが意味される。VEGF_r3なる用語は、VEGF_r3活性を有する任意のVEGF_r3蛋白質、ペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸配列をも指す。

10

【0192】

"高度に保存された配列領域"とは、標的遺伝子中の1またはそれ以上の領域のヌクレオチド配列が、1つの世代と他の世代とで、または1つの生物学的システムと他の生物学的システムとで有意に相違しないことを意味する。

【0193】

"センス領域"とは、siNA分子のアンチセンス領域に対する相補性を有する、siNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、siNA分子のセンス領域は、標的核酸配列とホモロジーを有する核酸配列を含むことができる。

20

【0194】

"アンチセンス領域"とは、標的核酸配列に対する相補性を有する、siNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、siNA分子のアンチセンス領域は、siNA分子のセンス領域に対する相補性を有する核酸配列を任意に含むことができる。

【0195】

"標的核酸"とは、その発現または活性が調節されるべき任意の核酸配列を意味する。標的核酸はDNAまたはRNAでありうる。

【0196】

"相補性"とは、核酸が、伝統的なワトソン・クリックまたは他の非伝統的なタイプのいずれかにより、別の核酸配列と水素結合を形成しうることを意味する。本発明の核酸分子に関して、核酸分子とその相補的配列との結合自由エネルギーは、核酸の適切な機能、例えば、RNAi活性を進行させるのに十分なものである。核酸分子についての結合自由エネルギーの決定は当該技術分野においてよく知られている(例えば、Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LI pp. 123-133; Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377; Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785を参照)。相補性のパーセンテージは、核酸分子中の、第2の核酸配列と水素結合(例えば、ワトソン・クリック塩基対形成)を形成しうる連続する残基のパーセンテージを示す(例えば、10塩基中の5, 6, 7, 8, 9, 10塩基は、50%, 60%, 70%, 80%, 90%, および100%の相補性である)。"完全な相補性"とは、核酸配列の連続する残基がすべて第2の核酸配列中の同じ数の連続する残基と水素結合するであろうことを意味する。

30

40

【0197】

本発明のsiRNA分子は、腫瘍の血管新生および癌など種々の病的徴候または他の状態、例えば、限定されないが、乳癌、肺癌(非小細胞肺癌を含む)、前立腺癌、大腸癌、脳腫瘍、食道癌、膀胱癌、膵臓癌、子宮頸癌、頭頸部癌、皮膚癌、鼻咽腔癌、脂肪肉腫、上皮癌、腎細胞癌、胆嚢腺癌、耳下腺癌、卵巣癌、黒色腫、リンパ腫、神経膠腫、子宮内膜腫、多剤耐性癌、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、血管新生緑内障、近視性変性症、関節炎、乾癬、子宮内膜症、女性生殖、尋常性疣贅、結節硬化症の血管線維腫、ポートワイン母斑、スタージ・ウェーバー症候群、クリッペル・トレノネー・ウェーバー症候群、オス

50

ラー・ウェーバー・ランジュー症候群，常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）などの腎疾患，および細胞または組織におけるVEGF，VEGF1，VEGF2および／またはVEGF3のレベルに関連し，またはこれらに反応する他の疾患または状態を治療するための，単独または他の療法と組合せた新規な治療方法を示す。VEGF，VEGF1，VEGF2および／またはVEGF3発現（特に，VEGF，VEGF1，VEGF2および／またはVEGF3遺伝子RNAレベル）の低減，およびそれぞれの蛋白質のレベルにおける低減は，疾患または状態の症状をある程度まで軽減する。

【0198】

本発明の1つの態様においては，本発明のsiNA分子の各配列は，独立して，約18ー約24ヌクレオチドの長さであり，特定の態様においては，約18，19，20，21，22，23，または24ヌクレオチドの長さである。別の態様においては，本発明のsiNAデュープレックスは，独立して，約17ー約23（例えば，約17，18，19，20，21，22または23）塩基対を含む。さらに別の態様においては，ヘアピンまたは環状構造を含む本発明のsiNA分子は，約35ー約55（例えば，約35，40，45，50または55）ヌクレオチドの長さであるか，または約38ー約44（例えば，38，39，40，41，42，43または44）ヌクレオチドの長さであり，約16ー約22（例えば，約16，17，18，19，20，21または22）塩基対を含む。本発明の例示的siNA分子は，表IIに示される。本発明の例示的合成siNA分子は，表IIIおよびVI，および／または図4ー5に示される。

【0199】

本明細書において用いる場合，"細胞"は，その通常の生物学的意味で用いられ，多細胞生物全体を指さず，特にヒトを指さない。細胞は生物中で，例えば，鳥類，植物および哺乳動物，例えばヒト，ウシ，ヤギ，無尾サル，有尾サル，ブタ，イヌおよびネコ中で存在することができる。細胞は，原核生物（例えば細菌細胞）または真核生物（例えば哺乳動物または植物細胞）であってもよい。細胞は体細胞起源でも生殖細胞系起源でもよく，全能細胞でも多能性細胞でもよく，分裂していても分裂していなくてもよい。細胞はまた，配偶子または胚，幹細胞，または完全に分化した細胞に由来するか，またはこれらを含むものであってもよい。

【0200】

本発明のsiNA分子は，直接加えてもよく，またはカチオン性脂質と複合体化して，リボソーム中に封入して，または他の方法により，標的細胞または組織にデリバリーすることができる。核酸または核酸複合体は，関連する組織にエクスピボで，または注射，注入ポンプまたはステントを用いてインピボで，バイオポリマー中に取り込ませてまたは取り込ませずに，局所的に投与することができる。特定の態様においては，本発明の核酸分子は表IIーIIIおよび／または図4ー5に示される配列を含む。そのような核酸分子の例は，これらの表および図面において規定される配列から本質的になる。さらに，表IVに記載される化学的に修飾されたコンストラクトを本発明の任意のsiNA配列に適用することができる。

【0201】

別の観点においては，本発明は本発明の1またはそれ以上のsiNA分子を含む哺乳動物細胞を提供する。1またはそれ以上のsiNA分子は，独立して，同じまたは異なる部位を標的とすることができる。

【0202】

"RNA"とは，少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。"リボヌクレオチド"とは， β -D-リボフラノース成分の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は，二本鎖RNA，一本鎖RNA，単離されたRNA，例えば部分的に生成されたRNA，本質的に純粋なRNA，合成RNA，組換え的に製造されたRNA，ならびに1またはそれ以上のヌクレオチドの付加，欠失，置換および／または変更により天然に生ずるRNAと異なるように変更されたRNAを含む。そのような変更は，非ヌクレオチド物質の付加，例えば，siNAの末端または内部（例えばRNA

10

20

30

40

50

の少なくとも1またはそれ以上のヌクレオチド)への付加を含むことができる。本発明のRNA分子中のヌクレオチドはまた、標準的ではないヌクレオチド、例えば、天然に生じないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドを含むことができる。これらの変更されたRNAは、類似体または天然に生ずるRNAの類似体と称することができる。

【0203】

"被験者"とは、外植された細胞のドナーまたはレシピエントである生物または細胞それ自体を意味する。"被験者"とはまた、本発明の核酸分子を投与することができる生物を表す。1つの態様においては、被験者は哺乳動物または哺乳動物細胞である。別の態様においては、被験者はヒトまたはヒト細胞である。

10

【0204】

本明細書において用いる場合、"ホスホロチオエート"との用語は、式I(式中、Zおよび/またはWはイオウ原子を含む)を有するヌクレオチド間結合を表す。したがって、ホスホロチオエートとの用語は、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートヌクレオチド間結合の両方を表す。

【0205】

本明細書において用いる場合、"万能塩基"との用語は、天然のDNA/RNA塩基のそれぞれと、これらをほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を表す。万能塩基の非限定的例としては、当該技術分野において知られるように(例えば、L o a k e s, 2001, N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h, 29, 2437-2447を参照)、C-フェニル、C-ナフチルおよび他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、およびニトロアゾール誘導体、例えば、3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および6-ニトロインドールが挙げられる。

20

【0206】

本明細書において用いる場合、"非環状ヌクレオチド"との用語は、非環状リボース糖を有する任意のヌクレオチド、例えば、リボース炭素(C1, C2, C3, C4, またはC5)のいずれかが、独立してまたは組み合わせてヌクレオチド中に存在しないヌクレオチドを表す。

【0207】

本発明の核酸分子は、個別に、または他の薬剤と組み合わせてまたは一緒に、本明細書に記載される疾病または健康状態(例えば、癌および他の増殖性状態)を治療するために用いることができる。例えば、特定の疾病または健康状態を治療するために、治療に適した条件下で、s i N A分子を個別にまたは1またはそれ以上の薬剤と組み合わせて被験者に投与することができ、または当業者には明らかな他の適当な細胞に投与することができる。

30

【0208】

さらに別の態様においては、s i N A分子を他の既知の治療法と組み合わせて用いて、上述の健康状態または疾病を治療することができる。例えば、本明細書に記載される分子を1またはそれ以上の既知の治療剤と組み合わせて用いて、疾病または健康状態を治療することができる。本発明のs i N A分子と容易に組み合わせることができる他の治療剤の非限定的例は、酵素的核酸分子、アロステリック核酸分子、アンチセンス、デコイ、またはアプタマー核酸分子、抗体、例えばモノクローナル抗体、小分子、および他の有機および/または無機化合物、例えば金属、塩およびイオンである。

40

【0209】

1つの態様においては、本発明は、本発明の少なくとも1つのs i N A分子をコードする核酸配列を、そのs i N A分子の発現を可能とするように含む発現ベクターを特徴とする。例えば、ベクターは、デュープレックスを含むs i N A分子の両方の鎖をコードする配列を含むことができる。ベクターはまた、自己相補的でありしたがってs i N A分子を形成する1つの核酸分子をコードする配列を含むことができる。そのような発現ベクター

50

の非限定的例は、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; および Novina et al., 2002, Nature Medicine, advance online publication doi:10.1038/nm725 に記載されている。

【0210】

別の態様においては、本発明は、本発明の発現ベクターを含む哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を特徴とする。

10

【0211】

さらに別の態様においては、本発明の発現ベクターは、Genbank 受託番号、例えば表 I に示される Genbank 受託番号で表される RNA 分子に対する相補性を有する siNA 分子の配列を含む。

【0212】

1つの態様においては、本発明の発現ベクターは、2またはそれ以上の siNA 分子をコードする核酸配列を含み、これらは同じであっても異なってもよい。

【0213】

本発明の別の観点においては、標的 RNA 分子と相互作用して、標的 RNA 分子（例えば、本明細書において Genbank 受託番号で表される標的 RNA 分子）をコードする遺伝子をダウンレギュレートする siNA 分子は、DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは、DNA プラスミドまたはウイルスベクターでありうる。siNA を発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアルファウイルスに基づいて構築することができる。siNA 分子を発現しうる組換えベクターは、本明細書に記載されるようにデリバリーされ、標的細胞中に残留する。あるいは、siNA 分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いることもできる。そのようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、siNA 分子は結合して RNA 干渉 (RNAi) により遺伝子機能または発現をダウンレギュレートする。siNA を発現するベクターのデリバリーは、全身的（例えば、静脈内または筋肉内投与により）、被験者から外植された標的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所望の標的細胞中への導入を可能とする他のいずれかの手段により行うことができる。

20

30

【0214】

"ベクター"とは、所望の核酸をデリバリーするために用いられる、任意の核酸および／またはウイルスに基づく手法を意味する。

【0215】

本発明の他の特徴および利点は、以下の本発明の好ましい態様の説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0216】

40

図面の簡単な説明

図1は、siNA 分子を合成するスキームの非限定的例を示す。相補的 siNA 配列鎖である鎖1および鎖2をタンデムで合成し、切断可能な結合、例えばヌクレオチドスクシネートまたは無塩基スクシネートで結合させる。これは、固体支持体上の固相合成において用いられる切断可能なリンカーと同じであっても異なってもよい。合成は固相でも液相でもよく、示される例においては合成は固相合成である。合成は、タンデムオリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチド上にジメトキシトリチル基等の保護基が残るように実施する。オリゴヌクレオチドを切断および脱保護すると、2つの siNA 鎖は自発的にハイブリダイズして siNA デュープレックスを形成するため、末端保護基の性質を利用してデュープレックスを精製することができる。これは、例えば、末端保護基を有するデュ

50

ープレックス／オリゴヌクレオチドのみが単離されるトリチルオン精製法を適用することにより行うことができる。

【0217】

図2は、本発明の方法により合成された精製 s i N A デュープレックスの M A L D I - T O V 質量分析を示す。示される2つのピークは、別々の s i N A 配列鎖の推定質量に対応する。この結果は、タンデム合成から生成された s i N A デュープレックスを、単純なトリチルオン精製方法論を用いて単一物質として精製しうることを示す。

【0218】

図3は、R N A i に関与する標的 R N A 分解の提唱されるメカニズムの非限定的例を示す図である。外来一本鎖 R N A、例えばウイルス、トランスポゾン、または他の外因性 R N A から R N A 依存性 R N A ポリメラーゼ (R d R P) により生成される二本鎖 R N A (d s R N A) が、ダイサー (D I C E R) 酵素を活性化し、次にこれは s i N A デュープレックスを生成する。あるいは、合成されたまたは発現された s i N A を適当な手段により細胞内に直接導入することができる。活性な s i N A 複合体が形成され、これは標的 R N A を認識し、その結果、R I S C エンドヌクレアーゼ複合体により標的 R N A が分解されるか、または R N A 依存性 R N A ポリメラーゼ (R d R P) により追加の R N A が合成され、これはダイサーを活性化して追加の s i N A 分子が生じ、このことにより R N A i 応答が増幅される。

【0219】

図4A-Fは、本発明の化学的に修飾された s i N A コンストラクトの非限定的例を示す。図中、Nは任意のヌクレオチド(アデノシン、グアニン、シトシン、ウリジン、または任意にチミジン)を表し、例えば、括弧(NN)により表されるオーバーハング領域においてチミジンで置換されていてもよい。s i N A コンストラクトのセンス鎖およびアンチセンス鎖について種々の修飾が示されている。

【0220】

図4A:センス鎖は、4個のホスホロチオエート5'-および3'末端ヌクレオチド間結合を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に標的 R N A 配列に相補的であってもよく、1個の3'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合および4個の5'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0221】

図4B:センス鎖は21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは、任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは、任意に標的 R N A 配列に相補的であってもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0222】

図 4 C：センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 21ヌクレオチドを含み、ここで、2 個の末端 3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN)ヌクレオチドを除き 2'-O-メチルまたは 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は、21ヌクレオチドを含み、任意に 3'末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3'-ヌクレオチドは任意に標的 RNA 配列に相補的であってもよく、1 個の 3'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN)ヌクレオチドを除き 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

10

【0223】

図 4 D：センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 21ヌクレオチドを含み、ここで、2 個の末端 3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN)ヌクレオチドを除き 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができ、存在しうるすべてのプリンヌクレオチドは 2'-デオキシヌクレオチドである。アンチセンス鎖は 21ヌクレオチドを含み、これは任意に 3'末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3'-ヌクレオチドは任意に標的 RNA 配列に相補的であってもよく、1 個の 3'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのプリンヌクレオチドは (NN)ヌクレオチドを除き 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

20

【0224】

図 4 E：センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 21ヌクレオチドを含み、ここで、2 個の末端 3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN)ヌクレオチドを除き 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は 21ヌクレオチドを含み、任意に 3'末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3'-ヌクレオチドは任意に標的 RNA 配列に相補的であってもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのプリンヌクレオチドは (NN)ヌクレオチドを除き 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

30

【0225】

図 4 F：センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 21ヌクレオチドを含み、ここで、2 個の末端 3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN)ヌクレオチドを除き 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は 21ヌクレオチドを含み、任意に 3'末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3'-ヌクレオチドは任意に標的 RNA 配列に相補的であってもよく、1 個の 3'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのプリンヌクレオチドは (NN)ヌクレオチドを除

40

50

き 2' -デオキシヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。コンストラクト A - F のアンチセンス鎖は、本発明のいずれかの標的核酸配列に相補的な配列を含む。

【0226】

図 5 A - F は、本発明の化学的に修飾された特定の s i N A 配列の非限定的例を示す。A - F は、図 4 A - F に示される化学的修飾を V E G F r 1 s i N A 配列に適用したものである。そのような化学的修飾は、本明細書に記載される任意の配列、例えば、V E G F、V E G F r 1、V E G F r 2、または V E G F r 3 配列のいずれかに適用することができる。

10

【0227】

図 6 は、本発明の種々の s i N A コンストラクトの非限定的例を示す。示される例（コンストラクト 1、2、および 3）は典型的な約 19 塩基対を有するが、本発明の異なる態様には本明細書に記載される任意の数の塩基対が含まれる。括弧内の領域は、例えば約 1、2、3、または 4 ヌクレオチドの長さ、好ましくは約 2 ヌクレオチドを含むヌクレオチドオーバーハングを表す。コンストラクト 1 および 2 は、R N A i 活性用に独立して用いることができる。コンストラクト 2 は、ポリヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリinkerを含むことができ、これは、任意に、生物分解性リンカーとして設計することができる。1つの態様においては、コンストラクト 2 に示されるループ構造は生物分解性リンカーを含むことができ、このことにより、インビボおよび／またはインビトロでコンストラクト 1 が形成される。別の例においては、同じ原理でコンストラクト 2 を生成するためにコンストラクト 3 を用いることができ、ここで、リンカーはインビボおよび／またはインビトロで活性な s i N A コンストラクト 2 を生成するために用いられ、これは任意に別の生物分解性リンカーを用いてインビボおよび／またはインビトロで活性な s i N A コンストラクト 1 を生成することができる。そのように、s i N A コンストラクトの安定性および／または活性は、インビボまたはインビトロで、および／またはインビトロにおいて用いるための s i N A コンストラクトの設計に基づいて調節することができる。

20

【0228】

図 7 A - C は、s i N A ヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。

30

【0229】

図 7 A : 5' -制限部位 (R 1) 配列、次に予め決定された V E G F および／または V E G F r 標的配列と同一の配列を有する領域 (s i N A のセンス領域) を含むように D N A オリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約 19、20、21、または 22 ヌクレオチド (N) の長さを有し、その後例えば約 3 - 約 10 ヌクレオチドを含む規定された配列 (X) のループ配列を有する。

【0230】

7 B : 次に、合成コンストラクトを D N A ポリメラーゼにより伸長して、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成し、このことにより、V E G F および／または V E G F r 標的配列に対する特異性を有し、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有する s i N A 転写産物が得られる。

40

【0231】

図 7 C : コンストラクトを加熱 (例えば約 95 °C に) して、配列を直鎖状とすることにより、第 1 の鎖の 3' -制限配列に対するプライマーを用いて相補的な第 2 の D N A 鎖を伸長することができる。次に、二本鎖 D N A を細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。コンストラクトは、例えば、制限部位を設計することにより、および／または P a u l ら (2002, N a t u r e B i o t e c h n o l o g y, 29, 505 - 508) に記載されるようにポリ U 末端領域を利用することにより、転写により 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングが生ずるように設計することができる。

【0232】

50

図 8 A－C は、発現カセットを作製して二本鎖 s i N A コンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。

【0233】

図 8 A：5'－制限（R1）部位配列，次に予め決定された V E G F および／または V E G F r 標的配列と同一の配列を有する領域（s i N A のセンス領域）を有するように，D N A オリゴマーを合成する。ここで，センス領域は，例えば，約 19，20，21，または 22 ヌクレオチド（N）の長さを含み，その後規定された配列（X）のループ配列に隣接する 3'－制限部位（R2）を有する。

【0234】

図 8 B：次に，合成コンストラクトを D N A ポリメラーゼで伸長させて，自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成する。 10

【0235】

図 8 C：コンストラクトを R1 および R2 に特異的な制限酵素で処理して二本鎖 D N A を生成し，次にこれを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。U6 プロモーター領域が d s D N A の両側を挟むように転写カセットを設計し，このことにより s i N A の別々のセンス鎖およびアンチセンス鎖が生ずる。ポリ T 末端配列をコンストラクトに付加して，得られる転写産物中に U オーバーハングを生成することができる。

【0236】

図 9 A－E は，特定の標的核酸配列，例えばメッセンジャー R N A 中の s i N A 媒介性 R N A i の標的部位を決定するために用いられる方法の概略図である。 20

【0237】

図 9 A：s i N A コンストラクトのアンチセンス領域が標的核酸配列の全域で標的部位に対する相補性を有し，センス領域が s i N A のアンチセンス領域に相補的な配列を含むよう，s i N A オリゴヌクレオチドのプールを合成する。

【0238】

図 9 B および C：配列をプールし，ベクターの細胞中へのトランスフェクションにより s i N A が発現するように（図 9 C），ベクター中に挿入する（図 9 B）。

【0239】

図 9 D：標的核酸配列の調節に伴う表現型の変化に基づいて細胞を分類する。

【0240】

図 9 E：分類された細胞から s i N A を単離し，シーケンスして，標的核酸配列中の有効な標的部位を同定する。 30

【0241】

図 10 は，例えば，本発明の s i N A 配列の 3' 末端を安定化させるために用いることができる，種々の安定化化学（1-10）の非限定的例を示す：（1）[3-3']－反転デオキシリボース；（2）デオキシリボヌクレオチド；（3）[5'-3']－3'-デオキシリボヌクレオチド；（4）[5'-3']－リボヌクレオチド；（5）[5'-3']－3'-O-メチルリボヌクレオチド；（6）3'-グリセリル；（7）[3'-5']－3'-デオキシリボヌクレオチド；（8）[3'-3']－デオキシリボヌクレオチド；（9）[5'-2']－デオキシリボヌクレオチド；および（10）[5-3']－ジデオキシリボヌクレオチド。図面に示されている修飾および非修飾の骨格化学に加えて，これらの化学を本明細書に記載されるような別の骨格修飾，例えば，式 I を有する骨格修飾と組み合わせることができる。さらに，示される末端修飾の 5' 側に示される 2'-デオキシヌクレオチドは，本明細書に記載される別の修飾または非修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド，例えば，式 I-V I I またはそれらの任意の組み合わせを有する修飾であってもよい。 40

【0242】

図 11 は，ヌクレアーゼに耐性であるが R N A i 活性を媒介する能力を保持している本発明の化学的に修飾された s i N A コンストラクトを同定するために用いられる戦略の非限定的例を示す。経験に基づく設計パラメータ（例えば，2'-修飾，塩基修飾，骨格修 50

飾、末端キャップ修飾等の導入)に基づいて*siNA*コンストラクトに化学修飾を導入する。修飾されたコンストラクトを適当な系(例えば、示されるようにヌクレアーゼ耐性についてはヒト血清、またはPK/デリバリーパラメータについては動物モデル)で試験する。平行して、例えば、細胞培養系において、例えばルシフェラーゼレポーターアッセイにより、*RNAi*活性について*siNA*コンストラクトを試験する。次に、特定の特徴を有する*RNAi*活性を保持しているリード*siNA*コンストラクトを同定し、これをさらに修飾し、再びアッセイする。この同じ方法を用いて、改良された薬物動態学的プロファイル、デリバリー、および*RNAi*活性を有する*siNA*-コンジュゲート分子を同定することができる。

【0243】

10

図12は、血管新生のラット角膜モデルを用いたVEGF誘導性血管新生の*siNA*媒介阻害の非限定的例を示す図である。VEGF1 *RNA* 29695/29699(RPI番号センス鎖/アンチセンス鎖で表示)の部位2340を標的とする*siNA*を3つの異なる濃度(1 μ g, 3 μ g, および10 μ g)で反転対照*siNA* 29983/29984(RPI番号センス鎖/アンチセンス鎖で表示)と比較し、かつ*siNA*が投与されていないVEGF対照と比較した。図示されているように、VEGF r1 *RNA*を標的とする*siNA*コンストラクトは、ラット角膜モデルにおいて血管新生の顕著な阻害を示しうる。

【0244】

図13は、VEGF r mRNAを標的とする化学修飾*siNA*によって媒介されるA 375細胞におけるVEGF r1 mRNAの低減の非限定的例を示す図である。25 nM *siNA*と複合化した0.25 μ g/ウェルの脂質でA549細胞をトランスフェクションした。一連の、Stab 4/5化学(RPI 31190/31193), Stab 1/2化学(RPI 31183/31186およびRPI 31184/31187), および非修飾*RNA* (RPI 30075/30076)を含む*siNA*コンストラクト(安定化「Stab」化学は表IVに示され、コンストラクトはRPI番号によって指示されている、表III参照)を、未処理細胞、マッチした化学の反転対照*siNA*コンストラクト(RPI 31208/31211, RPI 31201/31204, RPI 31202/31205, およびRPI 30077/30078), スクランブル化*siNA*対照コンストラクト(Scram1およびScram2), および脂質のみでトランスフェクションされた細胞(トランスフェクション対照)と比較した。すべての*siNA*コンストラクトは、VEGF r1 *RNA*発現の有意な低減を示す。

【0245】

発明の詳細な説明

本発明の核酸分子の作用のメカニズム

以下の議論は、現在知られている短干渉*RNA*により媒介される*RNA*干渉の提唱されるメカニズムを記載するが、限定を意味するものではなく、先行技術であると認めるものではない。本出願人は、本明細書において、化学的に修飾された短干渉核酸が*siRNA*分子と類似のまたは改良された*RNAi*媒介能力を有し、インビボで改良された安定性および活性を有すると予測されることを示す。したがって、この議論は、*siRNA*のみに限定されることを意味するものではなく、*siNA*全体に適用することができる。"*RNAi*を媒介する改良された能力"または"改良された*RNAi*活性"とは、インビトロおよび/またはインビボで測定された*RNAi*活性を含むことを意味し、ここで、*RNAi*活性は*siNA*が*RNAi*を媒介する能力と本発明の*siNA*の安定性との両方を反映する。本発明においては、これらの活性の積を、全*RNA* *siRNA*または複数のリボヌクレオチドを含む*siNA*と比較して、インビトロおよび/またはインビボで増加させることができる。場合によっては、*siNA*分子の活性または安定性は低下するかもしれないが(すなわち、10分の1以下)、*siNA*分子の全体的活性はインビトロおよび/またはインビボで増強される。

【0246】

50

RNA干渉とは、動物において短干渉RNA (siRNA) により媒介される配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す (Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと称され、真菌においてはクエリングとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており、異なる叢および門が共通して有している (Fire et al., 1999, Trends Genet., 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防御は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインテグレーションから生ずる二本鎖RNA (dsRNA) の生成にตอบสนองして、相同的一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのであろう。細胞におけるdsRNAの存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼPKRおよび2', 5'-オリゴアデニレートシンセターゼのdsRNA媒介性活性化の結果、リボヌクレアーゼLによるmRNAの非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

【0247】

細胞中に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼIII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAをプロセシングして短干渉RNA (siRNA) として知られる短い断片のdsRNAとすることに関与している (Bernstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉RNAは、典型的には約21-23ヌクレオチドの長さであり、約19塩基対のデュプレックスを含む。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体RNAから21および22ヌクレオチドの小さな一時的RNA (stRNA) を切り出すことに関与することが示唆されている (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi応答はまた、一般にRNA誘導性サイレンシング複合体 (RISC) と称される、siRNAを含むエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これはsiRNAと相同な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、siRNAデュプレックスのガイド配列に相補的な領域の中央部で生ずる (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。さらに、RNA干渉には、小さいRNA (例えば、マイクロRNAまたはmiRNA) に媒介される遺伝子サイレンシングが関与する場合もある。これはおそらく、クロマチン構造を制御する細胞性メカニズムによるものであり、このことにより標的遺伝子配列の転写が妨害される (例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; およびHall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237を参照)。このように、本発明のsiRNA分子は、RNA転写産物との相互作用を介して、あるいは特定の遺伝子配列との相互作用により、遺伝子サイレンシングを媒介するために用いることができ、そのような相互作用により転写レベルまたは転写後レベルのいずれかで遺伝子サイレンシングが生ずる。

【0248】

RNAiは種々の系で研究されてきた。Fireら (1998, Nature, 391, 806) は、C. Elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WiannyおよびGoetz (1999, Nature Cell Biol., 2, 70) は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondら (2000, Nature, 404, 293) は、dsRNAでトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら (2001, Nature, 411, 494) は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の21ヌクレオチドRNAのデュプレックスを導入することにより誘導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究は、効率的

なRNAi活性を媒介するために必須であるsiRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsiRNAデュプレックスは2つの2-ヌクレオチド3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsiRNA鎖を2'-デオキシまたは2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3'末端siRNAヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換することは許容されることが示された。siRNAデュプレックスの中心におけるミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsiRNAガイド配列の3'末端ではなく5'末端により規定されることを示した(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究は、siRNAデュプレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がsiRNA活性に必要であり、siRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示した(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。他の研究は、siRNAデュプレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がsiRNA活性に必要であり、siRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示したが(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)、5'-リン酸を欠失したsiRNAは外的に導入したときに活性であり、このことは、インビボでsiRNAコンストラクトの5'-リン酸化が生じているかもしれないことを示唆する。

【0249】

核酸分子の合成

100ヌクレオチドを越える長さの核酸の合成は、自動化方法を用いては困難であり、そのような分子の治療コストは非常に高くなる。本発明においては、好ましくは、小さい核酸モチーフ("小さい"とは、100ヌクレオチド以下の長さ、好ましくは80ヌクレオチド以下の長さ、最も好ましくは50ヌクレオチド以下の長さの核酸モチーフ、例えば、別々のsiNAオリゴヌクレオチド配列またはタンデムで合成されたsiNA配列を表す)が外的デリバリーに用いられる。これらの分子は構造が簡単であるため、核酸が蛋白質および/またはRNA構造の標的領域に進入する能力が高い。本発明の例示的分子は化学的に合成するが、他の分子も同様に合成することができる。

【0250】

オリゴヌクレオチド(例えば、ある種の修飾オリゴヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを欠失しているオリゴヌクレオチドの一部)は、例えば、Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19, Thompson et al., 国際公開99/54459, Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684, Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45, およびBrennan, 米国特許6,001,311に記載されるような、当該技術分野において知られるプロトコルを用いて合成する(これらの文献はすべて本明細書の一部としてここに引用する)。オリゴヌクレオチドの合成は、一般の核酸保護基およびカップリング基、例えば5'末端にジメトキシトリチル、および3'末端にホスホルアミダイトを用いて行う。非限定的例においては、394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で、0.2 μmolスケールのプロトコルで、2'-O-メチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程、および2'-デオキシヌクレオチドまたは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドについては45秒間のカップリング工程で、小スケールの合成を行う。表Vは、合成サイクルで用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2 μmolスケールでの合成は、96ウェルプレート合成機、例えば、Protogene (Palo Alto, CA)により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-O-メチル残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対

して33倍過剰(60 μ Lの0.11M=6.6 μ mol)の2'-O-メチルホスホルアミダイトおよび105倍過剰のS-エチルテトラゾール(60 μ Lの0.25M=15 μ mol)を用いることができる。デオキシ残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して22倍過剰(40 μ Lの0.11M=4.4 μ mol)のデオキシホスホルアミダイトおよび70倍過剰のS-エチルテトラゾール(40 μ Lの0.25M=10 μ mol)を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は、トリチル画分の比色定量により決定して、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである：脱トリチル化溶液は塩化メチレン中3%TCA(ABI)であり；

10 キャッピングは、THF中16%N-メチルイミダゾール(ABI)およびTHF中10%無水酢酸/10%2,6-ルチジン(ABI)中で行い；酸化溶液は、THF中16.9mM I_2 , 49mMピリジン, 9%水(PERSEPTIVE(登録商標))である。Burdick & Jackson合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルテトラゾール溶液(アセトニトリル中0.25M)は、American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは、ホスホロチオエート結合の導入のためには、ボークージ試薬(3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド, アセトニトリル中0.05M)を用いる。

【0251】

DNA系オリゴヌクレオチドの脱保護は以下のように行う：ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4mLのガラスねじ蓋バイアルに移し、40%水性メチルアミン(1mL)の溶液中で65℃で10分間懸濁する。-20℃に冷却した後、上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を1.0mLのEtOH:MeCN:H₂O/3:1:1で3回洗浄し、ボルテックスし、次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して、白色粉末を得る。

【0252】

本発明のある種のsiNA分子を含むRNAについて用いられる合成方法は、Usmanら(1987 J. Am. Chem. Soc., 109, 7845), Scaringeら(1990 Nucleic Acids Res., 18, 5433)およびWincottら(1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684), Wincottら(1997, Methods Mol. Bio., 74, 59)に記載の方法にしたがい、慣用の核酸保護基およびカップリング基、例えば、5'末端にジメトキシトリチル、および3'末端にホスホルアミダイトを用いて行う。非限定的例においては、小スケールの合成は、394 Applied Biosystems, Inc. 合成機で、改変した0.2 μ molスケールのプロトコルを用いて、アルキルシリル保護ヌクレオチドについては7.5分間のカップリング工程を、2'-O-メチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程を行う。表Vは、合成サイクルにおいて用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2 μ molスケールでの合成は、96ウェルプレート合成機、例えば、Protogene (Palo Alto, CA)により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-O-メチル残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して33倍過剰(60 μ Lの0.11M=6.6 μ mol)の2'-O-メチルホスホルアミダイトおよび75倍過剰のS-エチルテトラゾール(60 μ Lの0.25M=15 μ mol)を用いることができる。リボ残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して66倍過剰(120 μ Lの0.11M=13.2 μ mol)のアルキルシリル(リボ)保護ホスホルアミダイトおよび150倍過剰のS-エチルテトラゾール(120 μ Lの0.25M=30 μ mol)を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均

40

50

9%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである：脱トリチル化溶液は塩化メチレン中3% TCA (ABI) であり；キャッピングは，THF中16% N-メチルイミダゾール (ABI) およびTHF中10% 無水酢酸／10% 2, 6-ルチジン (ABI) 中で行い；酸化溶液は，THF中16.9 mM I_2 ，49 mM ピリジン，9% 水 (PERSEPTIVE (登録商標)) である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルテトラゾール溶液 (アセトニトリル中0.25 M) は，American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは，ホスホロチオエート結合の導入のためには，ボーテージ試薬 (3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド，アセトニトリル中0.05 M) を用いる。 10

【0253】

RNAの脱保護は，2ポットプロトコルまたは1ポットプロトコルのいずれかを用いて行う。2ポットプロトコルについては，ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4 mLのガラスねじ蓋バイアルに移し，40% 水性メチルアミン (1 mL) の溶液中で65℃で10分間懸濁する。−20℃に冷却した後，上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を1.0 mLのEtOH:MeCN:H₂O／3:1:1で3回洗浄し，ボルテックスし，次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して，白色粉末を得る。塩基脱保護オリゴリボヌクレオチドを無水TEA/HF/NMP溶液 (1.5 mL N-メチルピロリジノン，750 μL TEAおよび1.0 mL TEA・3HFの溶液300 μL，HF濃度1.4 M) に再懸濁し，65℃に加熱する。1.5時間後，オリゴマーを1.5 M NH₄HCO₃で反応を停止させる。 20

【0254】

あるいは，1ポットプロトコルのためには，ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4 mLのガラスねじ蓋バイアルに移し，33% エタノール性メチルアミン/DMSO:1/1 (0.8 mL) の溶液中で，65℃で15分間懸濁する。バイアルを室温にする。TEA・3HF (0.1 mL) を加え，バイアルを65℃で15分間加熱する。試料を−20℃に冷却し，次に1.5 M NH₄HCO₃で反応を停止させる。

【0255】

トリチルオンオリゴマーの精製のためには，停止したNH₄HCO₃溶液を，アセトニトリル，続いて50 mM TEAAで予備洗浄したC-18含有カートリッジに負荷する。負荷したカートリッジを水で洗浄した後，RNAを0.5% TFAで13分間脱トリチル化する。次にカートリッジを水で再び洗浄し，1 M NaClで塩交換し，再び水で洗浄する。次に，30% アセトニトリルでオリゴヌクレオチドを溶出する。 30

【0256】

平均段階カップリング収率は，典型的には>98%である (Wincott et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684)。当業者は，合成のスケールは，上述の例より大きくまたは小さく，例えば，限定されないが，96ウエルのフォーマットに適合させることができること認識するであろう。

【0257】

あるいは，本発明の核酸分子は，別々に合成して，合成後に例えばライゲーションにより (Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al. 国際公開WO93/23569; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides 16, 951; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204)，または合成および／または脱保護の後にハイブリダイゼーションにより，一緒につなげてよい。 40

【0258】

本発明の s i N A 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の s i N A 鎖を、切断可能なリンカーにより分離された単一の連続するオリゴヌクレオチドフラグメントまたは鎖として合成し、次にこれを切断して別々の s i N A フラグメントまたは鎖を生成し、これはハイブリダイズして s i N A デュープレックスの精製を可能とする。リンカーはポリヌクレオチドリンカーであっても非ヌクレオチドリンカーであってもよい。本明細書に記載される s i N A のタンデム合成は、マルチウエル／マルチプレート合成プラットフォーム、例えば 96 ウエルまたは同様のより大きなマルチウエルプラットフォームのいずれにも容易に適合させることができる。本明細書に記載される s i N A のタンデム合成はまた、バッチリアクター、合成カラムなどを用いる大規模合成プラットフォームにも容易に適合させることができる。 10

【0259】

s i N A 分子はまた、一方のフラグメントが R N A 分子のセンス領域を含み、第 2 のフラグメントがアンチセンス領域を含む 2 つの別々の核酸鎖またはフラグメントから組み立ててもよい。

【0260】

本発明の核酸分子は、広範囲に修飾して、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、2'-アミノ、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-H による修飾により安定性を高めることができる（概説として、Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163 を参照）。s i N A コンストラクトは、一般的な方法を用いてゲル電気泳動により精製するか、または高速液体クロマトグラフィー（HPLC; Wincott et al., (上掲) を参照、その全体を本明細書の一部としてここに引用する）により精製し、水に再懸濁する。 20

【0261】

本発明の別の観点においては、本発明の s i N A 分子は、DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは、DNA プラスミドまたはウイルスベクターでありうる。s i N A を発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスまたはアルファウイルスに基づいて構築することができる。s i N A 分子を発現しうる組換えベクターを本明細書に記載されるようにデリバリーし、標的細胞中に残留させることができる。あるいは、s i N A 分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いてもよい。 30

【0262】

本発明の核酸分子の活性の最適化

修飾（塩基、糖および／またはリン酸）を有する化学的に合成した核酸分子は、血清リボヌクレアーゼによる分解を防止することができ、このことによりその抗力を高めることができる（例えば、Eckstein et al., 国際公開 WO 92/07065; Perrault et al., 1990 Nature 344, 565; Piek et al., 1991 Science 253, 314; Usman and Cedergren, 1992 Trends in Biochem. Sci. 17, 334; Usman et al., 国際公開 WO 93/15187; Rossi et al., 国際公開 WO 91/03162; Sproat, 米国特許 5,334,711; Gold et al., US 6,300,074 および Burgin et al., (上掲) を参照（これらはすべて本明細書の一部としてここに引用する）。上述の参考文献はすべて、本明細書に記載される核酸分子の塩基、リン酸および／または糖成分になしうる種々の化学修飾を記載する。細胞中におけるその抗力を増強するように修飾し、およびオリゴヌクレオチドの合成時間を短縮し化学物質の必要性を減少するために核酸分子から塩基を除去することが望ましい。 40

【0263】

当該技術分野には、そのヌクレアーゼ安定性および効力を有意に増強することができる 50

、核酸分子中に導入することができる糖、塩基およびリン酸修飾を記述するいくつかの例がある。例えば、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、2'-アミノ、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-H等のヌクレオチド塩基修飾で修飾することにより、安定性を高め、および／または生物学的活性を増強するために修飾される（総説については、Usman and Cedergren, 1992 TITBS 17, 34; Usman et al., 1994 Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163; Burgin et al., 1996 Biochemistry 35, 14090を参照）。核酸分子の糖修飾は、当該技術分野において広く記載されている（Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Perrault et al. Nature 1990, 344, 565-568; Pieken et al. Science 1991, 253, 314-317; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 1992, 17, 334-339; Usman et al. 国際公開WO93/15187; Sproat, 米国特許5, 334, 711, Beigelman et al., 1995 J. Biol. Chem. 270, 25702; Beigelman et al., 国際公開WO97/26270; Beigelman et al., 米国特許5, 716, 824; Usman et al., 米国特許5, 627, 053; Woolf et al., 国際公開WO98/13526; Thompson et al., 米国特許出願60/082, 404（1998年4月20日出願）; Karpeisky et al., 1998, Tetrahedron Lett., 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), 48, 39-55; Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem., 67, 99-134; および Burlina et al., 1997, Bioorg. Med. Chem., 5, 1999-2010を参照、これらの参考文献はすべて、その全体を本明細書の一部としてここに引用する）。これらの刊行物は、触媒活性を変更することなく、糖、塩基および／またはリン酸修飾等を核酸分子中に組み込む位置を決定する一般的方法および戦略を記載しており、本明細書の一部としてここに引用する。このような教示の観点から、siNAが細胞においてRNAiを促進する能力が有意に阻害されない限り、本明細書に記載されるように、同様の修飾を用いて本発明のsiNA核酸分子を修飾することができる。

【0264】

ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、および／または5'-メチルホスホネート結合によるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合の化学修飾は安定性を改良するが、過剰な修飾はある種の毒性または活性の低下を引き起こしうる。したがって、核酸分子を設計する場合、これらのヌクレオチド間結合の量は最小にすべきである。これらの結合の濃度を減少させると、毒性が低下し、これらの分子の効力が増加し特異性が高くなるはずである。

【0265】

活性を維持または増強する化学的修飾を有する短干渉核酸（siNA）分子が提供される。そのような核酸はまた、一般に非修飾核酸よりヌクレアーゼに対する耐性が高い。したがって、インビトロおよび／またはインビボで活性は顕著に低下しないはずである。調節が目的である場合には、外的にデリバリーされる治療用核酸分子は、最適には、望ましくない蛋白質のレベルが低下するのに充分長い時間標的RNAの翻訳が調節されるまで細胞内で安定であるべきである。この時間は、疾病の状態により数時間から数日まで様々である。RNAおよびDNAの化学合成における進歩（Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677; Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19（本明細書の一部としてここに引用する））により、上述のようにヌクレオチド修飾を導入してそのヌクレアーゼ安定性を高めることにより、核酸分子を改変する可能性が

拡大した。

【0266】

1つの態様においては、本発明の核酸分子は、1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のGクランプヌクレオチドを含む。Gクランプヌクレオチドは、修飾シトシン類似体であり、ここで、修飾は、デュープレックス中の相補的グアニンのワトソン・クリックおよびフーグスティーン面の両方の水素結合の能力を与える。例えば、Lin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc., 120, 8531-8532を参照。オリゴヌクレオチド中の単一のGクランプ類似体置換により、相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたときのらせん熱安定性およびミスマッチ識別性を実質的に増強することができる。そのようなヌクレオチドを本発明の核酸分子中に取り込ませることにより、核酸標的の相補的配列またはテンプレート鎖に対する親和性および特異性の両方が増強される。別の態様においては、本発明の核酸分子は1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のLNA"ロック核酸"ヌクレオチド、例えば、2', 4'-Cメチレンビスクロヌクレオチドを含む（例えば、Wengel et al., 国際公開WO00/66604およびWO99/14226を参照）。

10

【0267】

別の態様においては、本発明は、本発明のsiNA分子のコンジュゲートおよび／または複合体を特徴とする。そのようなコンジュゲートおよび／または複合体は、生物学的システム、例えば細胞へのsiNA分子のデリバリーを容易にするために用いることができる。本発明により提供されるコンジュゲートおよび複合体は、治療用化合物を細胞膜を超えて輸送し、薬物動態学を変更し、および／または本発明の核酸分子の局在化を調節することにより、治療的活性を付与することができる。本発明は、分子、例えば、限定されないが、小分子、脂質、リン脂質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、抗体、トキシン、負に荷電したポリマーおよび他のポリマー、例えば、蛋白質、ペプチド、ホルモン、炭水化物、ポリエチレングリコール、またはポリアミンを、細胞膜を横切ってデリバリーするための、新規コンジュゲートおよび複合体の設計および合成を包含する。一般に、記載されるトランスポーターは、個々にまたは多成分系の一部として、分解性リンカー付きでまたはなしで用いよう設計される。これらの化合物は、血清の存在下または非存在下で、本発明の核酸分子を異なる組織に由来する多数の細胞タイプにデリバリーおよび／または局在化することを改良すると予測される（Sullenger and Cech, 米国特許5, 854, 038を参照）。本明細書に記載される分子のコンジュゲートは、生物分解性のリンカー、例えば生物分解性核酸リンカー分子を介して、生物学的に活性な分子に結合させることができる。

20

30

【0268】

本明細書において用いる場合、"生物分解性リンカー"との用語は、1つの分子を別の分子に、例えば、生物学的に活性な分子を本発明のsiNA分子に、または本発明のsiNA分子のセンス鎖とアンチセンス鎖とを接続するための生物分解性リンカーとして設計される核酸または非核酸リンカー分子を表す。生物分解性リンカーは、特定の目的、例えば特定の組織または細胞タイプへのデリバリーのためにその安定性を調節することができるように設計する。核酸に基づく生物分解性リンカー分子の安定性は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、および化学的に修飾されたヌクレオチド、例えば、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アミノ、2'-O-アミノ、2'-C-アシル、2'-O-アシル、および他の2'-修飾または塩基修飾ヌクレオチドの種々の組み合わせを用いることにより調節することができる。生物分解性核酸リンカー分子は、ダイマー、トリマー、テトラマー、またはより長い核酸分子、例えば、約2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, または20ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであることができ、またはリン酸に基づく結合、例えば、ホスホルアミデートまたはホスホジエステル結合を有する単一のヌクレオチドを含むことができる。生物分解性核酸リンカー分子はまた、核酸骨格、核酸糖、または核酸塩

40

50

基修飾を含むことができる。

【0269】

本明細書において用いる場合，"生物分解性"との用語は，生物学的システムにおける分解，例えば酵素的分解または化学的分解を表す。

【0270】

本明細書において用いる場合，"生物学的に活性な分子"との用語は，システムにおいて生物学的応答を導き出すかまたは調節することができる化合物または分子を表す。本発明により単独または他の分子との組み合わせで企図される生物学的に活性な s i N A 分子の非限定的例としては，治療上活性な分子，例えば，抗体，ホルモン，抗ウイルス剤，ペプチド，蛋白質，化学療法剤，小分子，ビタミン，補因子，ヌクレオシド，ヌクレオチド，オリゴヌクレオチド，酵素的核酸，アンチセンス核酸，トリプレックス形成オリゴヌクレオチド，2，5-Aキメラ，s i N A，d s R N A，アロザイム，アプタマー，デコイおよびこれらの類似体が含まれる。本発明の生物学的に活性な分子には，他の生物学的に活性な分子の薬物動態学および／または薬力学を調節することができる分子，例えば，脂質およびポリマー，例えば，ポリアミン，ポリアミド，ポリエチレングリコールおよび他のポリエーテルも含まれる。

10

【0271】

本明細書において用いる場合，"リン脂質"との用語は，少なくとも1つのリン酸基を含む疎水性分子を表す。例えば，リン脂質は，リン酸含有基および飽和または不飽和アルキル基を含むことができ，これは，OH，COOH，オキソ，アミン，または置換もしくは未置換アリール基で任意に置換されていてもよい。

20

【0272】

外的にデリバリーされた治療用核酸分子（例えば，s i N A 分子）は，最適には，R N A 転写産物のレベルが低下するのに充分長い時間 R N A の逆転写が調節されるまで細胞内で安定であるべきである。核酸分子は，有効な細胞内治療用薬剤として機能するためには，ヌクレアーゼに耐性である。本明細書におよび当該技術分野において記載される核酸分子の化学合成の改良により，上述したように，ヌクレオチド修飾を導入してそのヌクレアーゼ安定性を増強させることにより，核酸分子を修飾する可能性が拡大した。

【0273】

さらに別の態様においては，R N A i に関与する蛋白質の酵素活性を維持するかまたは増強させる化学的修飾を有する s i N A 分子が提供される。そのような核酸はまた，一般に非修飾核酸よりヌクレアーゼに対してより耐性が高い。したがって，インビトロおよび／またはインビボで，活性は顕著に低下しないであろう。

30

【0274】

本発明の核酸系分子の使用は，組み合わせ療法の可能性を提供することにより，疾病の進行のよりよい治療につながるであろう（例えば，異なる遺伝子を標的とする多数の s i N A 分子，既知の小分子阻害剤とカップリングさせた核酸分子，または分子（異なる酵素的核酸分子モチーフを含む）および／または他の化学的または生物学的分子の組み合わせによる間欠的治療）。s i N A 分子を用いる被験者の治療にはまた，異なる種類の核酸分子，例えば，酵素的核酸分子（リボザイム），アロザイム，アンチセンス，2，5-Aオリゴアデニレート，デコイ，およびアプタマーの組み合わせが含まれる。

40

【0275】

別の観点においては，本発明の s i N A 分子は，1またはそれ以上の5'および／または3'-キャップ構造を，例えばセンス s i N A 鎖のみに，アンチセンス s i N A 鎖のみに，または両方の s i N A 鎖に含む。

【0276】

"キャップ構造"とは，オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれている化学的修飾を意味する（例えば，A d a m i c e t a l . ，米国特許5，998，203（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。これらの末端修飾は，核酸分子をエキソヌクレアーゼ分解から保護し，デリバリーおよび／または細胞中の局在化を助けるであ

50

ろう。キャップは5'末端(5'-キャップ)に存在してもよく、または3'末端(3'-キャップ)に存在してもよく、両方の末端に存在してもよい。非限定的例においては、5'-キャップは、グリセリル、反転デオキシ無塩基残基(成分)；4'，5'-メチレンヌクレオチド；1-(ベータ-D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド，4'-チオヌクレオチド；炭素環式ヌクレオチド；1，5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート結合；スレオ-ペントフラノシルヌクレオチド；非環状3'，4'-セコヌクレオチド；非環状3，4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環状3，5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド，3'-3'-反転ヌクレオチド成分；3'-3'-反転無塩基成分；3'-2'-反転ヌクレオチド成分；3'-2'-反転無塩基成分；1，4-ブタンジオールリン酸；3'-ホスホルアミデート；ヘキシルリン酸；アミノヘキシルリン酸；3'-リン酸；3'-ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート；または架橋または非架橋メチルホスホネート成分からなる群より選択される。

【0277】

非限定的例においては、3'-キャップは、例えば、グリセリル、反転デオキシ無塩基残基(成分)，4'，5'-メチレンヌクレオチド；1-(ベータ-D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド；4'-チオヌクレオチド，炭素環式ヌクレオチド；5'-アミノ-アルキルリン酸；1，3-ジアミノ-2-プロピルリン酸；3-アミノプロピルリン酸；6-アミノヘキシルリン酸；1，2-アミノドデシルリン酸；ヒドロキシプロピルリン酸；1，5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート；スレオ-ペントフラノシルヌクレオチド；非環状3'，4'-セコヌクレオチド；3，4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；3，5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド，5'-5'-反転ヌクレオチド成分；5'-5'-反転無塩基成分；5'-ホスホルアミデート；5'-ホスホロチオエート；1，4-ブタンジオールリン酸；5'-アミノ；架橋および／または非架橋5'-ホスホルアミデート，ホスホロチオエートおよび／またはホスホロジチオエート，架橋または非架橋メチルホスホネートおよび5'-メルカプト成分からなる群より選択される(より詳細には，Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925(本明細書の一部としてここに引用する)を参照)。

【0278】

"非ヌクレオチド"との用語は、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに核酸鎖中に導入することができ、糖および／またはリン酸置換のいずれかを含み、残りの塩基がその酵素的活性を発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、一般に認識されているヌクレオチド塩基，例えば，アデノシン，グアニン，シトシン，ウラシルまたはチミンを含まず，したがって1'位に塩基を欠失している場合，無塩基である。

【0279】

"アルキル"基とは、飽和脂肪族炭化水素を表し、直鎖，分枝鎖，および環状アルキル基が含まれる。好ましくは、アルキル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1-7個の炭素，より好ましくは1-4個の炭素を有する低級アルキルである。アルキルは置換されていてもされていなくてもよい。置換されている場合，置換基は，好ましくは，ヒドロキシル，シアノ，アルコキシ，=O，=S，NO₂またはN(CH₃)₂，アミノ，またはSHである。この用語は，また，少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む不飽和炭化水素基であるアルケニル基を含み，直鎖，分枝鎖，および環状基を含む。好ましくは，アルケニル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは，これは1-7個の炭素原子，より好ましくは1-4個の炭素原子の低級アルケニルである。アルケニル基は置換されていてもされていなくてもよい。置換されている場合，置換基は，好ましくは，ヒドロキシル，シアノ，アルコキシ，=O，=S，NO₂，ハロゲン，N(CH₃)₂，アミノ，またはSHから選択される。"アルキル"との用語はまた，少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む不飽和の炭化水素基を有するアルキニル基を含み，直鎖，分枝鎖，

および環状基を含む。好ましくは、アルキニル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1-7個の炭素、より好ましくは1-4個の炭素を有する低級アルキニル基である。アルキニル基は、置換されていてもされていなくてもよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、=O、=S、NO₂またはN(CH₃)₂、アミノまたはSHである。

【0280】

そのようなアルキル基はまた、アリール、アルキルアリール、炭素環式アリール、複素環アリール、アミドおよびエステル基を含むことができる。"アリール"基とは、共役したパイ電子系を有する少なくとも1つの環を有する芳香族基を表し、炭素環式アリール、複素環アリールおよびニアリール基が含まれる。これらはすべて任意に置換されていてもよい。アリール基の好ましい置換基は、ハロゲン、トリハロメチル、ヒドロキシル、SH、OH、シアノ、アルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、およびアミノ基である。"アルキルアリール"基は、アリール基(上述)に共有結合したアルキル基(上述)を表す。炭素環式アリール基は、芳香族環の環原子がすべて炭素原子である基である。炭素原子は任意に置換されていてもよい。複素環アリール基は、芳香族環中の環原子として1-3個の複素原子を有し、環原子の残りが炭素原子である基である。適当な複素原子には、酸素、イオウ、および窒素が含まれ、例えば、フラニル、チエニル、ピリジル、ピロリル、N-低級アルキルピロロ、ピリミジル、ピラジニル、イミダゾリル等が挙げられる。これらはすべて任意に置換されていてもよい。"アミド"とは、-C(O)-NH-R(式中、Rはアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。"エステル"とは、-C(O)-OR'(式中、Rはアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。

【0281】

本明細書において用いる場合、"ヌクレオチド"は、当該技術分野においては、天然塩基(標準的)、および当該技術分野においてよく知られる修飾塩基を含むと認識されている。そのような塩基は、一般にヌクレオチド糖成分の1'位に位置する。ヌクレオチドは一般に、塩基、糖およびリン酸基を含む。ヌクレオチドは、糖、リン酸および/または塩基成分において修飾されていてもされていなくてもよい(互換的に、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、非標準的ヌクレオチド等とも称される。例えば、Usman and McSwigen(上掲); Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Uhlman & Peyman, (上掲)(すべて本明細書の一部としてここに引用する)を参照)。当該技術分野において知られる修飾核酸塩基のいくつかの例があり、Limbach et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183にまとめられている。核酸中に導入することができる塩基修飾のいくつかの非限定的例としては、例えば、イノシン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュドウラシル、2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン(例えば5-メチルシチジン)、5-アルキルウリジン(例えばリボチミジン)、5-ハロウリジン(例えば5-ブロモウリジン)または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン(例えば6-メチルウリジン)、プロピンおよびその他のものが挙げられる(Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, 上掲)。この観点において、"修飾塩基"とは、1'位におけるアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基またはそれらの同等物を意味する。

【0282】

1つの態様においては、本発明はリン酸骨格修飾を有する修飾されたs i N A分子を特徴とし、これは1またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミデート、カルバメート、カルボキシメチル、アセトアミデート、ポリアミド、スルホネート、スルホンアミド、スルファメ

ート, ホルムアセタール, チオホルムアセタール, および／またはアルキルシリル置換を含む。オリゴヌクレオチド骨格修飾の概説については, Hunziker and Leumann, 1995, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417, および Mesmaeker et al., 1994, *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39を参照されたい。

【0283】

"無塩基"とは, 1'位において塩基を欠失しているか, または塩基の代わりに他の化学基を有する糖成分を意味する(例えば, Adamic et al., 米国特許5,998,203を参照)。

【0284】

"非修飾ヌクレオシド"とは, β -D-リボフラノースの1'炭素に結合した塩基, アデニン, シトシン, グアニン, チミンまたはウラシルのいずれかの塩基を意味する。

【0285】

"修飾ヌクレオシド"とは, 非修飾ヌクレオチドの塩基, 糖および／またはリン酸の化学構造中に修飾を含む任意のヌクレオチド塩基を意味する。修飾ヌクレオチドの非限定的例は式I-VIIに示されるか, および／または本明細書に記載される他の修飾である。

【0286】

本発明において記載される2'-修飾ヌクレオチドに関して, "アミノ"とは, 2'-NH₂または2'-O-NH₂を意味し, これは修飾されていてもされていなくてもよい。そのような修飾基は, 例えば, Eckstein et al., 米国特許5,672,695およびMatulic-Adamic et al., 米国特許6,248,878(いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

【0287】

核酸s i N A構造に対する種々の修飾を作成して, これらの分子の有用性を高めることができる。例えば, このような修飾は, 製品寿命, インビトロの半減期, 安定性, およびそのようなオリゴヌクレオチドを標的部位に導入する容易さを高め, 例えば, 細胞膜の透過性を高め, 標的とする細胞を認識し結合する能力を付与するであろう。

【0288】

核酸分子の投与

本発明のs i N A分子は, 腫瘍の血管新生および癌, 例えば, 限定されないが, 乳癌, 肺癌(非小細胞肺癌を含む), 前立腺癌, 大腸癌, 脳腫瘍, 食道癌, 膀胱癌, 膵臓癌, 子宮頸癌, 頭頸部癌, 皮膚癌, 鼻咽腔癌, 脂肪肉腫, 上皮癌, 腎細胞癌, 胆嚢腺癌, 耳下線癌, 卵巣癌, 黒色腫, リンパ腫, 神経膠腫, 子宮内膜腫, 多剤耐性癌, 糖尿病性網膜症, 黄斑変性症, 血管新生緑内障, 近視性変性症, 関節炎, 乾癬, 子宮内膜症, 雌の生殖, 尋常性疣贅, 結節硬化症の血管線維腫, ポートワイン母斑, スタージ・ウェーバー症候群, クリッペル・トレノネー・ウェーバー症候群, オスラー・ウェーバー・ランジュー症候群, 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)などの腎疾患, および細胞または組織におけるVEGF, VEGF1, VEGF2および／またはVEGF3のレベルに関連し, またはこれらに反応する他の疾患または状態を, 単独または他の療法と組合わせて治療する用途に適合させることができる。例えば, s i N A分子は, 被験者に投与するためのリポソーム等のデリバリーベヒクル, 担体および希釈剤, およびそれらの塩を含むことができ, および／または薬学的に許容しうる処方中に存在することができる。核酸分子のデリバリーの方法は, Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Biol.*, 2, 139; *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995; Maurer et al., 1999, *Mol. Membr. Biol.*, 16, 129-140; Hofland and Huang, 1999, *Handb*

Exp. Pharmacol., 137, 165-192; および Lee et al., 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184-192 (いずれも本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。Beigelman et al., 米国特許 6,395,713 および Sullivan et al., PCT WO 94/02595 は、さらに、核酸分子をデリバリーするための一般的な方法を記載する。これらのプロトコルを用いて、事実上いかなる核酸分子もデリバリーすることができる。核酸分子は当業者に知られる種々の方法によって細胞に投与することができ、これには、限定されないが、リポソームへの封入、イオントホレシス、または他のベヒクル、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン (例えば、Gonzalez et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 1068-1074 を参照)、生分解性ナノカプセル、および生体接着性小球体への組み込み、または蛋白質性ベクター (O'Hare and Normand, 国際公開 WO 00/53722) によるものが含まれる。あるいは、核酸/ベヒクルの組み合わせを、直接注入により、または注入ポンプを用いることにより局所的にデリバリーする。本発明の核酸分子の直接注入は、標準的な針とシリンジの方法論を用いて、または例えば Conry et al., 1999, Clin. Cancer Res., 5, 2330-2337 および Barry et al., 国際公開 WO 99/31262 に記載される無針手法により、皮下、筋肉内、または皮膚内に行うことができる。本発明の分子は医薬品として用いることができる。医薬品は、被験者における疾病状態を予防し、発症を調節しまたは治療する (症状をある程度、好ましくは症状をすべて軽減する)。

10

20

【0289】

すなわち、本発明は、本発明の1またはそれ以上の核酸を、許容しうる担体、例えば安定剤、緩衝液等を含む医薬組成物を特徴とする。本発明のポリヌクレオチドは、安定剤、緩衝液等を用いてまたは用いずに医薬組成物を形成することにより、任意の標準的な手段により、投与 (例えば、RNA, DNA または蛋白質) し、被験者に導入することができる。リポソームデリバリーメカニズムを利用することが望ましい場合には、リポソームを形成する標準的なプロトコルにしたがうことができる。本発明の組成物はまた、経口投与用には錠剤、カプセルまたはエリキシルとして; 直腸投与用には座剤として; 滅菌溶液として; 注入投与の用には懸濁液として、および当該技術分野において知られる他の組成物として、処方し使用することができる。

30

【0290】

本発明はまた、記載される化合物の薬学的に許容しうる処方を含む。これらの処方には、上述の化合物の塩、例えば、酸付加塩 (例えば、塩酸、シュウ酸、酢酸およびベンゼンスルホン酸の塩) が含まれる。

【0291】

医薬組成物または処方は、細胞または被験者 (例えばヒト) への投与 (例えば全身投与) に適当な形態の組成物または処方を表す。適当な形態は、部分的には、使用する投与経路 (例えば経口、経皮、または注射) に依存する。そのような形態は、組成物または処方が標的細胞 (すなわち、負に荷電した核酸がデリバリーされることが望まれる細胞) に到達することを妨害してはならない。例えば、血流中に注入される医薬組成物は可溶性でなければならない。他の因子は当該技術分野において知られており、例えば、毒性、および組成物または処方がその効果を発揮することを妨害する形態等を考慮することが含まれる。

40

【0292】

"全身投与"とは、インビボでの全身吸収、または血流中における薬剤の蓄積の後に全身に分配されることを意味する。全身的吸収をもたらす投与経路には、限定されないが、静脈内、皮下、腹腔内、吸入、経口、肺内および筋肉内が含まれる。これらの投与経路のそれぞれは、本発明の siNA 分子をアクセス可能な疾患組織に暴露する。薬剤が循環中に入る速度は、分子量またはサイズの関数であることが示されている。本発明の化合物を含むリポソームまたは他の薬剤担体を使用することにより、薬剤を、例えば、あるタイプの

50

組織（例えば網状内皮系（RES）の組織）に局在化させることが可能である。薬剤と細胞（例えば白血球およびマクロファージ）の表面との会合を容易にすることができるリポソーム処方もまた有用である。この方法は、マクロファージおよび白血球による異常な細胞（例えば過剰のVEGFおよび／またはVEGF_rを産生する細胞）の免疫認識の特異性を利用することにより、薬剤の標的細胞への輸送を増強するであろう。

【0293】

"薬学的に許容しうる処方"とは、本発明の核酸分子をその所望の活性に最も適した物理学的位置に有効に分布させることができる組成物または処方を意味する。本発明の核酸分子とともに処方するのに適した薬剤の非限定的例には以下のものが含まれる：CNS中への薬剤の侵入を促進することができるP-糖蛋白質阻害剤（Pluronic P85等）（Jolliet-Riant and Tillement, 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26）；大脳内移植後の徐放輸送用の生分解性ポリマー、例えばポリ（DL-ラクチド-co-グリコリド）微小球（Emrich, DF et al, 1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58）（Alkermes, Inc. Cambridge, MA）；および薬剤を脳血管関門を越えて輸送することができ、神経の取り込みメカニズムを変更しうる、例えばポリブチルシアノアクリレートから作成される充填されたナノ粒子（Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999）。本発明の核酸分子のデリバリー戦略の他の非限定的例には、Boado et al., 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308-1315；Tyler et al., 1999, *FEBS Lett.*, 421, 280-284；Pardridge et al., 1995, *PNAS USA*, 92, 5592-5596；Boado, 1995, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15, 73-107；Aldrian-Herrada et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4910-4916；およびTyler et al., 1999, *PNAS USA*, 96, 7053-7058に記載される物質が含まれる。

【0294】

本発明はまた、ポリ（エチレングリコール）脂質（PEG-修飾、または長期間循環リポソームまたはステルスリポソーム）を含む表面修飾リポソームを含む組成物の使用を特徴とする。これらの処方は、標的組織における薬剤の蓄積を増加させる方法を提供する。この種類の薬剤担体は、単核食細胞システム（MPSまたはRES）によるオプソニン作用および排除に抵抗性であり、したがって、封入された薬剤の血流循環時間を長くし、組織への暴露を増強する（Lasica et al. *Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627；Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011）。そのようなリポソームは、おそらくは脈管新生標的組織における溢出および捕獲のため、腫瘍中に選択的に蓄積することが示されている（Lasica et al., *Science* 1995, 267, 1275-1276；Oku et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90）。長期間循環リポソームは、特に、MPSの組織で蓄積することが知られている慣用のカチオン性リポソームと比べて、DNAおよびRNAの薬物動態学および薬力学を増強する（Liu et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 42, 24864-24870；Choi et al., 国際公開WO96/10391；Ansell et al., 国際公開WO96/10390；Holland et al., 国際公開WO96/10392）。長期間循環リポソームはまた、代謝的に攻撃的なMPS組織、例えば肝臓および脾臓における蓄積を回避するその能力に基づいて、カチオン性リポソームと比較して薬剤をヌクレアーゼ分解からより強く保護するようである。

【0295】

本発明はまた、薬学的に有効量の所望の化合物を薬学的に許容しうる担体または希釈剤

中に含む、保存または投与用に調製される組成物を含む。治療用途に用いるための許容しうる担体または希釈剤は、医薬の技術分野においてよく知られており、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) (本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。例えば、保存剤、安定剤、染料、および風味剤を用いることができる。これらには、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、および p-ヒドロキシ安息香酸のエステルが含まれる。さらに、抗酸化剤および懸濁剤を用いてもよい。

【0296】

薬学的に有効な用量とは、疾患状態の予防、発症の阻害、または治療（症状をある程度緩和し、好ましくはすべての症状を緩和する）に必要な用量である。薬学的に有効な用量は、疾患の種類、用いる組成物、投与の経路、治療する哺乳動物の種類、考慮中の特定の哺乳動物の物理学的特性、同時に投与される薬剤、および医薬の分野の当業者が認識するであろう他の因子によって異なる。一般に、負に荷電したポリマーの効力に依存して、 $0.1\text{ mg/kg} - 100\text{ mg/kg}$ 体重/日の活性成分を投与する。

【0297】

本発明の核酸分子およびその処方は、慣用的な無毒性の薬学的に許容しうる担体、アジュバントおよびベヒクルを含む用量単位処方中で、経口的に、局所的に、非経口的に、吸入またはスプレーにより、または直腸に投与することができる。本明細書において用いる場合、非経口的との用語には、経皮、皮下、血管内（例えば、静脈内）、筋肉内、または髄腔内注射または注入の手法等が含まれる。さらに、本発明の核酸分子および薬学的に許容しうる担体を含む医薬処方提供される。1またはそれ以上の本発明の核酸分子は、1またはそれ以上の無毒性の薬学的に許容しうる担体および/または希釈剤、および/またはアジュバント、および所望の場合には他の活性成分とともに存在することができる。本発明の核酸分子を含有する医薬組成物は、経口使用に適した形、例えば、錠剤、トローチ剤、菱形剤、水性または油性懸濁液、分散可能な粉体または顆粒、乳剤、硬カプセルまたは軟カプセル、またはシロップまたはエリキシル剤の形であることができる。

【0298】

経口で使用することが意図される組成物は、医薬組成物の製造について当該技術分野において知られる任意の方法にしたがって製造することができ、そのような組成物は、薬学的に洗練された口に合う製品を提供するために、1またはそれ以上のそのような甘味剤、芳香剤、着色剤または保存剤を含んでもよい。錠剤は、錠剤の製造に適した無毒性の薬学的に許容しうる賦形剤との混合物として活性成分を含む。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム；顆粒化剤および崩壊剤、例えば、コーンスターチ、またはアルギン酸；結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム、および潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクでありうる。錠剤は被覆しなくてもよく、既知の手法により被覆してもよい。場合によっては、既知の手法によりそのような被覆を調製して、胃腸管における崩壊および吸収を遅延させ、このことによりより長い期間の持続的な作用を与えることができる。例えば、遅延用材料、例えばグリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートを用いることができる。

【0299】

経口使用のための処方、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンと混合されている硬ゼラチンカプセル、または活性成分が水または油状媒体、例えば、ピーナッツ油、液体パラフィンまたはオリーブ油と混合されている軟ゼラチンカプセルであってもよい。

【0300】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤との混合物中に活性物質を含む。そのような賦形剤は、懸濁剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリ

ドン、トララガントガムおよびアラビアゴムである。分散剤または湿潤剤は、天然に生ずるホフファチド、例えば、レシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、またはエチレンオキシドと脂肪酸および無水ヘキシトールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエートであってもよい。水性懸濁液はまた、1またはそれ以上の保存剤、例えば、エチルー、またはn-プロピル-p-ヒドロキシベンゾエート、1またはそれ以上の着色剤、1またはそれ以上の芳香剤、および1またはそれ以上の甘味剤、例えばショ糖またはサッカリンを含んでいてもよい。 10

【0301】

油性懸濁液は、活性成分を植物油、例えば、アラキス油、オリーブ油、ゴマ油またはココナツ油、または無機油、例えば液体パラフィン中に懸濁させることにより処方することができる。油性懸濁液は、増粘剤、例えば、密ロウ、硬パラフィンまたはセチルアルコールを含むことができる。甘味剤および芳香剤を加えて、口に合う経口製品を得ることができる。これらの組成物は、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸を加えることにより保存することができる。

【0302】

水を加えることにより水性懸濁液を製造するのに適した分散可能な粉体および顆粒は、活性成分を、分散剤または湿潤剤、懸濁剤および1またはそれ以上の保存剤との混合物中で与える。適当な分散剤または湿潤剤または懸濁剤は、上で例示したとおりである。さらに別の賦形剤、例えば、甘味剤、芳香剤および着色剤が存在していてもよい。 20

【0303】

本発明の医薬組成物はまた、水中油エマルジョンの形であってもよい。油相は、植物油またはミネラルオイルまたはこれらの混合物であってもよい。適当な乳化剤としては、天然に生ずるガム、例えば、アラビアゴムまたはトラガガントゴム、天然に生ずるホスファチド類、例えば、大豆、レクチン、および脂肪酸とヘキシトールから誘導されるエステルまたは部分エステル、無水物、例えば、ソルビタンモノオレエート、および前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートが挙げられる。エマルジョンは、甘味料および芳香剤を含んでいてもよい。 30

【0304】

シロップおよびエリキシルは、甘味剤、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、グルコースまたはショ糖を用いて処方することができる。このような処方ではまた、粘滑剤、保存剤および甘味料および着色料を含んでいてもよい。医薬組成物は、滅菌した注射可能な水性または油性の懸濁液の形であってもよい。この懸濁液は、上述した適当な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて、当該技術分野において知られるように処方することができる。滅菌した注射可能な製品はまた、無毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の滅菌した注射可能な溶液または懸濁液、例えば、1, 3-ブタンジオール中の溶液であってもよい。用いることのできる許容可能なベヒクルおよび溶媒の例は、水、リンゲル溶液および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに、滅菌し固定した油を溶媒または懸濁媒体として便利に用いることができる。この目的のためには、任意の非刺激性の固定した油、例えば、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを用いることができる。さらに、脂肪酸、例えば、オレイン酸を注射可能な薬剤の製造において用いることができる。 40

【0305】

本発明の核酸分子はまた、例えば、薬剤の直腸投与用に、座剤の形で投与することができる。これらの組成物は、薬剤を、通常温度では固体であるが直腸温度では液体であり、したがって直腸中で溶融して薬剤を放出する適当な非刺激性賦形剤と混合することにより製造することができる。そのような材料としては、カカオバターおよびポリエチレング 50

リコールが挙げられる。

【0306】

本発明の核酸分子は、滅菌媒体中で非経口的に投与することができる。薬剤は、使用するベヒクルおよび濃度に応じて、ベヒクル中に懸濁されていてもよく、溶解されていてもよい。アジュバント、例えば局所麻酔剤、保存剤および緩衝剤をベヒクル中に溶解することも有利である。

【0307】

上述した健康状態の治療には、体重1キログラムあたり1日あたり約0.1mg〜約140mgのオーダーの投与量レベルが有用である（被験者あたり1日あたり約0.5mg〜約7g）。担体物質と組み合わせて1回投与量形を生成することができる活性成分の量は、治療される宿主および投与の特定のモードに依存して様々である。投与量単位形は、一般に、約1mg〜約500mgの活性成分を含む。

【0308】

特定の被験者についての特定の投与量レベルは、種々の因子、例えば、用いる特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路、および排出速度、薬剤の組み合わせ、および治療をしている特定の疾病の重篤性に依存することが理解されるであろう。

【0309】

ヒト以外の動物に投与するためには、組成物を動物飼料または飲料水に加えてもよい。動物が治療上適当な量の組成物を飼料とともに接種できるよう、動物飼料および飲用水組成物を処方することが便利であろう。飼料または飲料水に加えるように組成物をプレミックスとして製造することも便利であろう。

【0310】

本発明の核酸分子はまた、他の治療用化合物と組み合わせて被験者に投与して、全体的治療効果を高めることができる。ある適応症の治療に複数の化合物を用いることにより、副作用の存在を低下させながら有益な効果を高めることができる。

【0311】

1つの態様においては、本発明は、特定の細胞タイプに本発明の核酸分子を投与するのに適した組成物を含む。例えば、アシアロ糖蛋白質レセプター（ASGPR）（Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432）は、肝細胞に独特であり、分枝鎖ガラクトース末端糖蛋白質、例えばアシアロオロソムコイド（ASOR）に結合する。別の例においては、多くの癌細胞中で葉酸レセプターが過剰発現されている。そのような糖蛋白質、合成グリココンジュゲート、または葉酸のレセプターへの結合は、オリゴサッカライド鎖の分枝の程度に強く依存する親和性で生ずる。例えば、三触角構造は、二触角または一触角鎖より高い親和性で結合する（Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 939-945）。Lee and Lee (1987, Glycoconjugate J., 4, 317-328) は、ガラクトースと比較してレセプターに対してより高い親和性を有するN-アセチル-D-ガラクトースアミンを炭水化物成分として用いることによりこの高い特異性を得た。この"クラスタリング効果"はまた、マンノシル末端糖蛋白質またはグリココンジュゲートの結合および取込についても記載されている（Ponpipom et al., 1981, J. Med. Client., 24, 1388-1395）。ガラクトース、ガラクトースアミンまたは葉酸に基づくコンジュゲートを使用して外来性化合物を細胞膜を超えて輸送することにより、例えば、肝疾患、肝臓の癌、または他の癌の治療に標的化デリバリー法を提供することができる。また、バイオコンジュゲートの使用により、治療に必要な治療用化合物の必要用量を低下させることができる。さらに、本発明の核酸バイオコンジュゲートを使用することにより、治療薬の生物利用性、薬力学、および薬物動態学的パラメータを調節することができる。そのようなバイオコンジュゲートの非限定的例は、Vargeese et al., 米国特許出願10/201,394, (200 30 40 50

1年8月13日出願) ; およびMatulic-Adamic et al, 米国特許出願60/362, 016 (2002年3月6日出願) に記載されている。

【0312】

あるいは、本発明のある種の siNA 分子は、細胞中で真核生物プロモーターから発現させることができる (例えば, Izant and Weintraub, 1985 Science 229, 345; McGarry and Lindquist, 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 399; Scanlon et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992 Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic et al., 1992 J. Virol 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991 J. Virol, 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990 Science 247, 1222-1225; Thompson et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2259; Good et al., 1997, Gene Therapy, 4, 45)。当業者は、真核生物細胞中で任意の核酸を適当な DNA/RNA ベクターから発現させることができることを認識するであろう。そのような核酸の活性は、酵素的核酸によりそれらを一次転写産物から放出させることにより増大させることができる (Draper et al., PCT WO93/23569, Sullivan et al., PCT WO94/02595; Ohkawa et al., 1992 Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-6; Taira et al., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Ventura et al., 1993 Nucleic Acids Res., 21, 3249-55; Chowrira et al., 1994 J. Biol. Chem. 269, 25856)。

【0313】

本発明の別の観点においては、本発明の RNA 分子は、DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現させることができる (例えば Couture et al., 1996, TIG., 12, 510 を参照)。組換えベクターは、DNA プラスミドであってもウイルスベクターであってもよい。siNA を発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアルファウイルスに基づいて構築することができる。別の態様においては、pol III に基づくコンストラクトを用いて、本発明の核酸分子を発現させる (例えば, Thompson, 米国特許 5, 902, 880 および 6, 146, 886 を参照)。siNA 分子を発現しうる組換えベクターは、上述のようにデリバリーされ、標的細胞中に残留することができる。あるいは、核酸分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いることもできる。そのようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、siNA 分子は標的 mRNA と相互作用して、RNAi 応答を生ずる。siNA 分子を発現するベクターの輸送は、全身的 (例えば、静脈内または筋肉内投与により)、患者から外植された標的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所望の標的細胞中への導入を可能とする他のいずれかの手段により、行うことができる (総説については、Couture et al., 1996, TIG., 12, 510 を参照)。

【0314】

1つの観点においては、本発明は、少なくとも1つの本発明の siNA 分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを特徴とする。発現ベクターは、siNA デュープレックスの一方または両方の鎖、または自己ハイブリダイズして siNA デュープレックスを生ずる1本の自己相補的鎖をコードすることができる。本発明の siNA 分子をコードする

核酸配列は、その siNA 分子の発現を可能とする様式で動作可能なように連結することができる（例えば、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; および Novina et al., 2002, Nature Medicine, advance online publication doi:10.1038/nm725 を参照）。

【0315】

別の観点においては、本発明は、以下を含む発現ベクターを特徴とする：a) 転写開始領域（例えば真核生物 pol I, II または III の開始領域）；b) 転写終止領域（例えば真核生物 pol I, II または III の終止領域）；および c) 本発明の siNA 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を含み、前記配列は、siNA 分子の発現および／またはデリバリーを可能とする様式で、前記開始領域および前記終止領域に動作可能なように連結されている。ベクターは、任意に、本発明の siNA をコードする配列の 5' 側または 3' 側に動作可能なように連結された蛋白質のオープンリーディングフレーム（ORF）；および／またはイントロン（介在配列）を含んでいてもよい。

【0316】

siNA 分子配列の転写は、真核生物 RNA ポリメラーゼ I (pol I), RNA ポリメラーゼ II (pol II), または RNA ポリメラーゼ III (pol III) のプロモーターにより推進させることができる。pol II または pol III プロモーターからの転写産物は、すべての細胞において高いレベルで発現される。あるタイプの細胞におけるある pol II プロモーターのレベルは、近くに存在する遺伝子制御配列（エンハンサー、サイレンサー等）の性質に依存する。原核生物 RNA ポリメラーゼ酵素が適当な細胞中で発現される限り、原核生物 RNA ポリメラーゼプロモーターもまた用いられる（Elroy-Stein and Moss, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7; Gao and Huang 1993 Nucleic Acids Res., 21, 2867-72; Lieber et al., 1993 Methods Enzymol., 217, 47-66; Zhou et al., 1990 Mol. Cell. Biol., 10, 4529-37）。何人かの研究者が、そのようなプロモーターから発現した核酸分子が哺乳動物細胞中で機能しうることを示している（例えば、Kashani-Sabet et al., 1992 Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Ojwang et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Yu et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992 EMBO J. 11, 4411-8; Lisziewicz et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 8000-4; Thompson et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2259; Sullenger & Cech, 1993, Science, 262, 1566）。より詳細には、転写ユニット、例えば U6 小核 (snRNA), 転移 RNA (tRNA) およびアデノウイルス VA RNA をコードする遺伝子に由来するものは、細胞中において高濃度の所望の RNA 分子（例えば siNA）を生成するのに有用である（Thompson et al., (上掲); Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲); Noonberg et al., 1994, Nucleic Acid Res., 22, 2830; Noonberg et al., 米国特許 5,1624,803; Good et al., 1997, Gene Ther. 4, 45; Beicreelman et al., 国際公開 WO96/18736）。上述の siNA 転写ユニットは、哺乳動物細胞中に導入するために種々のベクター中に組み込むことができる。ベクターとしては、限定されないが、プラスミド DNA ベクター

、ウイルスDNAベクター（例えばアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスベクター）、またはウイルスRNAベクター（例えばレトロウイルスまたはアルファウイルスベクター）が挙げられる（総説については、Couture and Stinchcomb, 1996,（上掲）を参照）。

【0317】

別の観点においては、本発明は、本発明のsiNA分子の少なくとも1つをコードする核酸配列を、そのsiNA分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを特徴とする。1つの態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域；b) 転写終止領域；およびc) siNA分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み；この配列は、siNA分子の発現および／またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域および終止領域に動作可能なように連結されている。 10

【0318】

別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域；b) 転写終止領域；c) オープンリーディングフレーム；およびd) siNA分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み、この配列は、オープンリーディングフレームの3'-末端に動作可能なように連結されており、配列は、siNA分子の発現および／またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域、オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。さらに別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域；b) 転写終止領域；c) イントロン；およびd) 少なくとも1つのsiNA分子をコードする核酸配列を含み；この配列は、核酸分子の発現および／またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域、イントロンおよび終止領域に動作可能なように連結されている。 20

【0319】

別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域；b) 転写終止領域；c) イントロン；d) オープンリーディングフレーム；およびe) siNA分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み、この配列は、オープンリーディングフレームの3'-末端に動作可能なように連結されており、配列は、siNA分子の発現および／またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域、イントロン、オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

【0320】

VEGFおよび／またはVEGF_rの生物学および生物化学 30

以下の考察は、アール・アンド・ディー（R&D）システムズ（Systems）、サイトカイン・ミニ・レビューズ（Cytokine Mini Reviews）、血管内皮成長因子（VEGF）、著作権（C）2002 R&Dシステムズから構成されている。血管新生は、既存の血管系からの新しい血管発生の過程である。これは、胚発生、組織の正常な成長、創傷治癒、雌の生殖サイクル（すなわち排卵、月経、および胎盤発生）における重要な役割、および多くの疾患における主要な役割を果たす。特に癌に対する関心が焦点となっているが、それは腫瘍は新しい血管供給の発展なしにサイズは数ミリメートル以上に成長しえないためである。血管新生は腫瘍細胞転移の拡大および成長にも必要である。

【0321】

内皮に対する最も重要な成長および生存因子の1つは、血管内皮成長因子（VEGF）である。VEGFは血管新生および内皮細胞増殖を誘導し、新生血管形成の調節において重要な役割を果たす。VEGFは、45 kDのホモダイマーとして分泌されるヘパリン結合糖蛋白質である。大半のタイプの細胞は、通常、内皮細胞そのものではないが、VEGFを分泌する。最初に発見されたVEGFであるVEGF-Aは血管透過性を増大させるため、血管透過性因子として知られていた。また、VEGFは、部分的に内皮細胞における一酸化窒素合成の刺激によって血管拡張をひき起こす。VEGFはまた、細胞移動を刺激し、かつアポトーシスを阻害する。 40

【0322】

VEGF-Aの複数のスプライス変異体がある。その主なものとしては、121, 16 50

5, 189, および206アミノ酸(aa)が挙げられ, それぞれが特異的なエキソン付加物を含む。VEGF165は最も優勢な蛋白質であるが, VEGF121の転写産物はより豊富であるかもしれない。VEGF206は稀にしか発現されず, 胎児肝においてのみ検出されている。最近, 145および183aaの他のスプライス変異体についても記載されている。165, 189, および206aaスプライス変異体はヘパリン結合性ドメインを有し, これらがそれらの細胞外基質における固定に役立ち, かつ硫酸ヘパリンへの結合およびVEGFレセプターへの提示に関与する。かかる提示はVEGF能力の重要な因子である(すなわち, ヘパリン結合形態はより活性である)。VEGFファミリーのいくつかの他のメンバー, 例えば, VEGF-B, -C, および-Dがクローン化されている。胎盤成長因子(PlGF)もVEGF-Aと密接に関連している。VEGF-A, -B, -C, -D, およびPlGFはすべて, 血小板由来成長因子-A, および-Bとわずかに関連している。VEGF-B, -C, および-Dの機能および調節についてはほとんど知られていないが, VEGF-Aを調節する主要な経路によって調節されているのではないようである。

【0323】

VEGF-Aの転写は, 低酸素に応じて, かつ活性化腫瘍遺伝子によって増強される。転写因子, 低酸素誘導性因子-1a(hif-1a)および-2aは, 酸素正常状態下のプロテオソームによって分解され, 低酸素下で安定化される。この経路は, フォン・ヒッペル・リンドウー遺伝子産物に依存している。hif-1aおよびhif-2aは, 核においてアリール炭化水素核輸送体とヘテロ二量体化し, VEGFプロモーター/エンハンサーを結合する。これは大半のタイプの細胞において発現される重要な経路である。特に, 低酸素誘導性は, VEGFファミリーの他のメンバーおよび他の血管新生因子に対してVEGF-Aを特徴づける。酸素正常状態下のVEGF転写は, H-ras, および上皮成長因子レセプターやerbB2などいくつかの膜貫通チロシンキナーゼを含む多くの腫瘍遺伝子によって活性化される。これらの経路は同時に, 正常組織と比べて腫瘍におけるVEGF-Aの顕著なアップレギュレーションの原因となり, しばしば予後的に重要である。

【0324】

VEGFレセプターファミリーには3つのレセプターがある。それらは, 複数のIgG様細胞外ドメインの一般的な特性およびチロシンキナーゼ活性を有する。VEGFレセプター1(VEGFr1, Flt-1としても知られる), VEGFr2(KDRまたはFlk-1としても知られる), およびVEGFr3(Flt-4としても知られる)の酵素ドメインは, 挿入配列によって分割される。内皮細胞はまた別のVEGFレセプターであるニューロピリン-1およびニューロピリン-2を発現する。VEGF-AはVEGFr1とVEGFr2, およびニューロピリン-1とニューロピリン-2に結合する。PlGFおよびVEGF-Bは, VEGFr1およびニューロピリン-1を結合する。VEGF-Cおよび-Dは, VEGFr3およびVEGFr2を結合する。

【0325】

VEGF-C/VEGFr3経路は, リンパ増殖のために重要である。VEGFr3は, リンパ内皮細胞上に特異的に発現する。Flt-1の可溶性形態は, 末梢血において検出されうるとともに, VEGFに対する高アフィニティーリガンドである。可溶性Flt-1を用いてVEGF機能をアンタゴナイズすることができる。VEGFr1およびVEGFr2は, 腫瘍および増殖性内皮中で, 部分的に低酸素によって, かつVEGF-Aそのものに応じてアップレギュレートされる。VEGFr1およびVEGFr2は, PLC-g, Ras, Shc, Nck, PKC, およびPI3-キナーゼなどの蛋白質を介して複数の下流シグナリング経路と相互作用しうる。VEGFr1はVEGFr2よりもアフィニティーが高く, 運動性および血管透過性を媒介する。VEGFr2は増殖のために必要である。

【0326】

VEGFは, 患者の血漿および血清試料の両方で検出されうるが, 血清中のレベルがよ

り高い。血小板は凝集時に V E G F を放出し、腫瘍への V E G F デリバリーの主要源でありうる。複数の研究により、癌患者における不良な予後と V E G F の高い血清レベルとの関連性が、高い血小板数と相関しうることが示されている。多くの腫瘍は、骨髄における巨核球の産生を刺激し、かつ血小板数を増加させうるサイトカインを放出する。これにより腫瘍への V E G F デリバリーの間接的な増大が生じうる。

【0327】

V E G F は、血管新生の増強と関連したいくつかの他の病的状態に関与することが示唆されている。例えば、V E G F は、感染および慢性関節リウマチの両方において役割を果たす。糖尿病性網膜症は、V E G F の高い眼内レベルと関連している。V E G F 機能の阻害は、黄体機能の遮断によって不妊症を生じさせうる。腫瘍成長における V E G F の重要性の直接的証明は、優性ネガティブの V E G F レセプターを用いるインビボ増殖の阻害により、および V E G F 39 または V E G F r 2 に対する阻害抗体を用いることにより、達成されている。

10

【0328】

したがって、V E G F および対応するレセプターとリガンドを標的とする小干渉核酸分子は、癌、増殖性疾患、または V E G F および／または V E G F r 遺伝子の変更に対して反応する他の疾患または状態の診断および治療において用いることができる新規な一群の治療薬を提供する。

【実施例1】

【0329】

以下は本発明の核酸の選択、単離、合成および活性を示す非限定的例である。

20

【0330】

実施例1：s i N A コンストラクトのタンデム合成

本発明の例示的 s i N A 分子は、切断可能なリンカー、例えば、スクシニル系リンカーを用いて、タンデムで合成する。本明細書に記載されるタンデム合成の後に、1段階精製プロセスを行って、R N A i 分子を高収率で得る。この方法はハイスループット R N A i スクリーニングを支える s i N A 合成に非常に適しており、マルチカラムまたはマルチウェルの合成プラットフォームに容易に適合させることができる。

【0331】

5'末端ジメトキシトリチル(5'-O-DMT)基がそのまま残る s i N A オリゴおよびその相補鎖のタンデム合成(トリチルオン合成)が完了した後、オリゴヌクレオチドを上述のようにして脱保護する。脱保護の後、s i N A 配列鎖を自発的にハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーションにより、一方の鎖が5'-O-DMT基を保持し、相補鎖が末端5'-ヒドロキシルを含むデュープレックスが得られる。新たに形成されたデュープレックスは、1つの分子のみがジメトキシトリチル基を有するにもかかわらず、日常的な固相抽出精製(トリチルオン精製)の間、単一の分子として振る舞う。これらの鎖は安定なデュープレックスを形成するため、オリゴの対を例えばC18カートリッジを用いて精製するためには、このジメトキシトリチル基(または同等の基、例えば他のトリチル基または他の疎水性成分)のみが必要である。

30

【0332】

タンデムリンカー、例えば反転デオキシ無塩基スクシネートまたはグリセリルスクシネートリンカー(図1を参照)または同等の切断可能なリンカーを導入する時点までは、標準的なホスホルアミダイト合成化学を用いる。用いることができるリンカー結合条件の非限定的例には、活性化剤、例えばプロモトリピロジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸(PyBrOP)の存在下で、妨害塩基、例えばジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)および／またはDMA Pを使用することが含まれる。リンカーを結合させた後、標準的な合成化学を用いて第2の配列の合成を完了し、末端の5'-O-DMTはそのまま残す。合成後、得られたオリゴヌクレオチドを本明細書に記載される方法にしたがって脱保護し、適当な緩衝液、例えば、50mM NaOAcまたは1.5M NH₄H₂CO₃で反応を停止させる。

40

50

【0333】

s i N A デュープレックスの精製は、固相抽出、例えば、1 カラム容量 (C V) のアセトニトリル、2 C V の H_2O 、および 2 C V の 50 mM NaOAc で調整した Waters C18 Sep Pak lg カートリッジを用いて、容易に行うことができる。サンプルを負荷し、1 C V の H_2O または 50 mM NaOAc で洗浄する。失敗配列は 1 C V の 14% ACN (水性; 50 mM NaOAc および 50 mM NaCl を含む) で溶出する。次にカラムを 1 C V の H_2O 等で洗浄し、例えば、1 C V の 1% 水性トリフルオロ酢酸 (TFA) をカラムに通し、次にさらに 1 C V の 1% 水性 TFA をカラムに加えて約 10 分間放置することにより、カラム上で脱トリチル化を行う。残りの TFA 溶液を除去し、カラムを H_2O で、次に 1 C V の 1 M NaCl および再度の H_2O で洗浄する。次に、s i N A デュープレックス生成物を、例えば、1 C V の 20% 水性 CAN を用いて溶出する。

10

【0334】

図 2 は、精製した s i N A コンストラクトの MALDI-TOV 質量分析の例を示し、ここで、各ピークは s i N A デュープレックスの個々の s i N A 鎖の計算質量に対応する。同じ精製 s i N A は、キャピラリーゲル電気泳動 (CGE) で分析したときに 3 つのピークを与える。1 つのピークはおそらくはデュープレックス s i N A に対応し、2 つのピークはおそらく個々の s i N A 配列鎖に対応する。同じ s i N A コンストラクトのイオン交換 HPLC 分析では単一のピークしか示されない。以下に記載されるルシフェラーゼレポーターアッセイを用いる精製 s i N A コンストラクトの試験は、別々に合成したオリゴヌクレオチド配列鎖から生成した s i N A コンストラクトと比較して、RNAi 活性が同じであることを示した。

20

【0335】

実施例 2：任意の RNA 配列中の潜在的 s i N A 標的部位の同定

目的とする RNA 標的、例えばウイルスまたはヒト mRNA 転写産物の配列を、例えばコンピュータフォールディングアルゴリズムを用いることにより、標的部位についてスクリーニングする。非限定的例においては、Genbank 等のデータベースから得られる遺伝子または RNA 遺伝子転写産物の配列を用いて、標的に対して相補性を有する s i N A 標的を生成する。そのような配列は、データベースから得ることができるか、または当該技術分野において知られるように実験的に決定することができる。既知の標的部位、例えば、リボザイムまたはアンチセンス等の他の核酸分子を用いた研究に基づいて有効な標的部位であると決定されている標的部位、または疾病または健康状態と関連していることが知られている標的、例えば変異または欠失を含む部位を用いて、これらの部位を標的とする s i N A 分子を設計することができる。種々のパラメータを用いて、標的 RNA 配列中でいずれの部位が最も適当な標的部位であるかを判定することができる。これらのパラメータには、限定されないが、二次または三次 RNA 構造、標的配列のヌクレオチド塩基組成、標的配列の種々の領域間のホモロジーの程度、または RNA 転写産物中の標的配列の相対的位置が含まれる。これらの判定に基づいて、RNA 転写産物中の任意の数の標的部位を選択して、例えば、インビトロ RNA 切断アッセイ、培養細胞、または動物モデルを用いることにより、効力について s i N A 分子をスクリーニングすることができる。非限定的例においては、用いるべき s i N A コンストラクトのサイズに基づいて、転写産物中のいずれかの位置の 1-1000 個の標的部位を選択する。当該技術分野において知られる方法、例えば標的遺伝子発現の有効な減少を判定するマルチウエルまたはマルチプレートアッセイを用いて、s i N A 分子をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングアッセイを開発することができる。

30

40

【0336】

実施例 3：RNA 中の s i N A 分子標的部位の選択

以下の非限定的工程を用いて、所定の遺伝子配列または転写産物を標的とする s i N A の選択を行うことができる。

【0337】

50

1. 標的配列をインシリコで解析して、標的配列中に含まれる特定の長さのすべてのフラグメントまたはサブ配列、例えば23ヌクレオチドフラグメントのリストを作成する。この工程は、典型的にはあつらえのPerlスクリプトを用いて行うが、市販の配列分析プログラム、例えば、Oligo, MacVector, またはthe GCG Wisconsin Packageも同様に用いることができる。

【0338】

2. 場合によっては、s i N Aは2以上の標的配列に対応する。これは、例えば、同じ遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、2以上の遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、またはヒト遺伝子と動物ホモログとの両方を標的とする場合に生じうる。この場合には、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、各リスト中でマッチング配列を見いだす。次に、サブ配列を、所定のサブ配列を含む標的配列の数にしたがってランク付けする。この目的は、標的配列のほとんどまたはすべてに存在するサブ配列を見いだすことである。あるいは、ランク付けにより、標的配列にユニークなサブ配列、例えば変異体標的配列を同定することができる。このような方法により、変異体配列を特異的に標的とし、正常な配列の発現に影響を及ぼさないs i N Aの使用が可能となるであろう。

10

【0339】

3. 場合によっては、s i N Aのサブ配列は、1またはそれ以上の配列中には存在しないが、所望の標的配列中に存在する。これは、s i N Aが標的とされないままであるべきパラログスファミリーのメンバーを有する遺伝子を標的とする場合に生じうる。上述のケース2におけるように、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、標的遺伝子中に存在するが標的ではないパラログ中には存在しない配列を見いだす。

20

【0340】

4. ランク付けされたs i N Aサブ配列をさらに分析して、GC含量にしたがってランク付けすることができる。30-70%のGCを含有する部位が好ましく、40-60%のGCを含有する部位がさらに好ましい。

【0341】

5. ランク付けされたs i N Aサブ配列をさらに分析して、自己フォールディングおよび内部ヘアピンにしたがってランク付けすることができる。内部フォールディングがより弱いことが好ましい。強いヘアピン構造は回避すべきである。

30

【0342】

6. ランク付けされたs i N Aサブ配列をさらに分析して、配列中にGGGまたはCCCの連続を有するか否かにしたがってランク付けすることができる。いずれかの鎖にGGG（またはさらに多いG）が存在すると、オリゴヌクレオチド合成に問題が生じることがあり、RNAi活性を妨害する可能性がある。したがって、よりよい配列が利用可能である限り、これは回避する。CCCはアンチセンス鎖にGGGを配置するため、標的鎖中で検索する。

【0343】

7. ランク付けされたs i N Aサブ配列をさらに分析して、配列の3'末端にジヌクレオチドUU（ウリジンジヌクレオチド）を、および／または配列の5'末端にAA（アンチセンス配列に3'UUを生ずる）を有するか否かにしたがってランク付けする。これらの配列により、末端TTチミジンジヌクレオチドを有するs i N A分子を設計することが可能となる。

40

【0344】

8. 上述のようにランク付けされたサブ配列のリストから4個または5個の標的部位を選択する。次に、例えば、23ヌクレオチドを有するサブ配列において、それぞれの選択された23-merサブ配列の右側21ヌクレオチドをs i N Aデュプレックスの上側（センス）鎖用に設計し合成し、一方、それぞれの選択された23-merサブ配列の左側21ヌクレオチドの逆相補鎖をs i N Aデュプレックスの下側（アンチセンス）鎖用

50

に設計し合成する（表 I I および I I I を参照）。末端 T T 残基が配列にとって望ましい場合には（パラグラフ 7 に記載されるように），オリゴを合成する前にセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方の 2 つの 3' 末端ヌクレオチドを T T で置き換える。

【0345】

9. s i N A 分子をインビトロ、培養細胞または動物モデル系においてスクリーニングして、最も活性な s i N A 分子、または標的 R N A 配列中の最も好ましい標的部位を同定する。

【0346】

別の方法においては、V E G F および／または V E G F r 標的配列に特異的な s i N A コンストラクトのプールを用いて、V E G F および／または V E G F r R N A を発現する細胞、例えば H U V E C、H M V E C または A 3 7 5 細胞において標的部位をスクリーニングする。この方法において用いられる一般的戦略は図 9 に示される。そのようなプールの非限定的例は、配列番号 1-2238 を有する配列を含むプールである。V E G F および／または V E G F r を発現する細胞（例えば、H U V E C、H M V E C または A 3 7 5 細胞）を s i N A コンストラクトのプールでトランスフェクトし、V E G F および／または V E G F r の阻害に伴う表現型を示す細胞を分類する。s i N A コンストラクトのプールは、適当なベクター中に挿入した転写カセットから発現させることができる（例えば、図 7 および図 8 を参照）。ポジティブの表現型変化（例えば、増殖の低下、V E G F および／または V E G F r m R N A レベルの低下または V E G F および／または V E G F r 蛋白質発現の低下）を示す細胞からの s i N A をシーケンスして、標的 V E G F および／または V E G F r R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。

【0347】

実施例 4：V E G F および／または V E G F r を標的とする s i N A の設計

s i N A の標的部位は、実施例 3 に記載される s i N A 分子のライブラリを用いて、あるいは本明細書の実施例 6 に記載されるようなインビトロ s i N A システムを用いて、V E G F および／または V E G F r R N A 標的の配列を分析し、任意にフォールディング（s i N A の標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、選択した。s i N A 分子は、それぞれの標的に結合することができるように設計し、任意に個々にコンピュータフォールディングにより分析して、s i N A 分子が標的配列と相互作用しうるか否かを評価した。種々の長さの s i N A 分子を選択して、活性を最適化することができる。一般に、標的 R N A と結合するかさもなくばこれと相互作用する十分な数の相補的ヌクレオチド塩基が選択されるが、種々の長さまたは塩基組成の s i N A デュープレックスに適応させるように、相補性の程度を調節することができる。そのような方法論を用いることにより、s i N A 分子は、任意の既知の R N A 配列、例えば、任意の遺伝子転写産物に対応する R N A 配列中の部位を標的とするよう設計することができる。

【0348】

化学的に修飾された s i N A コンストラクトを設計して、R N A i 活性を媒介する能力を保存しながら、インビボでの全身投与のためのヌクレアーゼ安定性および／または改良された薬物動態学、局在化、およびデリバリー特性を提供することができる。本明細書に記載される合成方法および一般に当該技術分野において知られる合成方法を用いて、本明細書に記載される化学修飾を合成的に導入する。次に、血清および／または細胞／組織抽出物（例えば肝臓抽出物）中で、合成 s i N A コンストラクトをヌクレアーゼ安定性についてアッセイする。合成 s i N A コンストラクトはまた、適当なアッセイ、例えば本明細書に記載されるルシフェラーゼレポーターアッセイまたは R N A i 活性を定量しうる他の適当なアッセイを用いて、R N A i 活性についても平行して試験する。ヌクレアーゼ安定性および R N A i 活性の両方を有する合成 s i N A コンストラクトは、さらに改変して、安定性および活性のアッセイにおいて再評価することができる。次に、任意の選択された R N A を標的とするいずれかの s i N A 配列に安定化活性 s i N A コンストラクトの化学的修飾を適用して、例えば、標的スクリーニングアッセイにおいて用いて、治療薬を開発

するための s i N A 化合物のリードを拾い上げることができる（例えば、図 1 1 を参照）。

【0349】

実施例 5：s i N A の化学合成および精製

s i N A 分子は、R N A メッセージ中の種々の部位、例えば、本明細書に記載される R N A 配列中の標的配列と相互作用するよう設計することができる。s i N A 分子の一方の鎖の配列は、上述した標的部位配列に相補的である。s i N A 分子は、本明細書に記載される方法を用いて化学的に合成することができる。対照配列として用いられる不活性 s i N A 分子は、s i N A 分子の配列を標的配列に相補的ではないようにスクランブル化することにより、合成することができる。一般に、s i N A コンストラクトは、本明細書に記載されるように、固相オリゴヌクレオチド合成方法を用いて合成することができる（例えば、Usman et al., 米国特許 5, 804, 683; 5, 831, 071; 5, 998, 203; 6, 117, 657; 6, 353, 098; 6, 362, 323; 6, 437, 117; 6, 469, 158; Scaringe et al., 米国特許 6, 111, 086; 6, 008, 400; 6, 111, 086 を参照（いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する））。

10

【0350】

非限定的例においては、R N A オリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られるように、ホスホルアミダイト化学を用いて段階的様式で合成する。標準的なホスホルアミダイト化学においては、5'-O-ジメトキシトリチル、2'-O-tert-ブチルジメチルシリル、3'-O-2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルホスホルアミダイト基、および環外アミン保護基（例えば、N6-ベンゾイルアデノシン、N4-アセチルシチジン、および N2-イソブチリルグアノシン）のいずれかを含むヌクレオシドを使用する。あるいは、Scaringe（上掲）により記載されるように、R N A の合成において 2'-O-シリルエーテルを酸不安定性 2'-O-オルトエステル保護基と組み合わせて用いてもよい。異なる 2' 化学は異なる保護基を必要とし、例えば、Usman et al., 米国特許 5, 631, 360（その全体を本明細書の一部としてここに引用する）に記載されるように、2'-デオキシ-2'-アミノヌクレオシドには N-フタロイル保護を用いることができる。

20

【0351】

固相合成の間に、各ヌクレオチドを順番に（3'-から 5'-方向に）固体支持体結合オリゴヌクレオチドに付加する。鎖の 3' 末端の最初のヌクレオシドを種々のリンカーを用いて固体支持体（例えば、調整多孔ガラスまたはポリスチレン）に共有結合させる。ヌクレオチド前駆体、リボヌクレオシドホスホルアミダイト、および活性化剤を混合して、第 1 のヌクレオシドの 5' 末端上に第 2 のヌクレオシドホスホルアミダイトをカップリングさせる。次に支持体を洗浄し、未反応 5'-ヒドロキシル基を無水酢酸等のキャッピング試薬を用いてキャッピングして、不活性な 5'-アセチル成分を得る。次に 3 価リン結合を酸化してより安定なリン酸結合とする。ヌクレオチド付加サイクルの最後に、適当な条件下で（例えば、トリチル系の基については酸性条件、シリル系の基についてはフッ化物を用いて）、5'-O-保護基を切断する。それぞれの次のヌクレオチドについてこのサイクルを繰り返す。

30

40

【0352】

合成条件を改変して、例えば、合成すべき s i N A の特定の化学組成に応じて、異なるカップリング時間、異なる試薬／ホスホルアミダイト濃度、異なる接触時間、異なる固体支持体および固体支持体リンカー化学を用いることにより、カップリング効率を最適化することができる。s i N A の脱保護および精製は、一般に記載されているようにして行うことができる（Usman et al., 米国特許 5, 831, 071, 米国特許 6, 353, 098, 米国特許 6, 437, 117, および Bellon et al., 米国特許 6, 054, 576, 米国特許 6, 162, 909, 米国特許 6, 303, 773 または Scaringe（上掲）（これらはすべてその全体を本明細書の一部としてここ

50

に引用する))。さらに、脱保護条件を改変して、可能な限り最高の収量および純度の s i N A コンストラクトを得る。例えば、本出願人は、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは不適切な脱保護条件下で分解しうることを見いだした。そのようなオリゴヌクレオチドは、水性メチルアミンを用いて約 35℃で 30 分間脱保護する。2'-デオキシ-2'-フルオロ含有オリゴヌクレオチドがリボヌクレオチドをも含む場合には、水性メチルアミンで約 35℃で 30 分間脱保護した後、T E A-H F を加え、反応液をさらに 15 分間約 65℃に維持する。

【0353】

実施例 6 : s i N A 活性を評価するための R N A i インビトロアッセイ

R N A i を無細胞システムにおいて再現するインビトロアッセイを用いて、V E G F および／または V E G F r R N A 標的を標的とする s i N A コンストラクトを評価する。アッセイは、T u s c h l ら (1999, *Genes and Development*, 13, 3191-3197) および Z a m o r e ら (2000, *Cell*, 101, 25-33) に記載され、V E G F および／または V E G F r 標的 R N A 用に適合させた系を含む。シンシウム胚盤葉に由来するショウジョウバエ抽出物を用いてインビトロで R N A i 活性を再構築する。標的 R N A は、V E G F および／または V E G F r を発現する適当なプラスミドから T7 R N A ポリメラーゼを用いてインビトロ転写することにより、または本明細書に記載されるように化学合成により作製する。センスおよびアンチセンス s i N A 鎖 (例えば各 20 μM) は、緩衝液 (例えば、100 mM 酢酸カリウム, 30 mM H E P E S-K O H, p H 7.4, 2 mM 酢酸マグネシウム) 中で 90℃で 1 分間、次に 37℃で 1 時間インキュベートすることによりアニーリングさせ、次に溶解緩衝液 (例えば 100 mM 酢酸カリウム, 30 mM H E P E S-K O H (p H 7.4), 2 mM 酢酸マグネシウム) で希釈する。アニーリングは、アガロースゲルを用いて T B E 緩衝液でゲル電気泳動し、臭化エチジウムで染色することによりモニターすることができる。ショウジョウバエの溶解物は、O r e g o n R ハエからの 0-2 時間齢の胚を用いて調製し、酵母糖蜜寒天上に回収し、絨毛膜を除去し溶解する。溶解物を遠心分離し、上清を単離する。アッセイは、50% 溶解物 [v o l / v o l], R N A (10-50 pM の最終濃度)、および s i N A (10 nM の最終濃度) を含む 10% [v o l / v o l] 溶解緩衝液を含有する反応混合物を含む。反応混合物はまた、10 mM のクレアチンリン酸, 10 μg / m l のクレアチンホスホキナーゼ, 100 μM の G T P, 100 μM の U T P, 100 μM の C T P, 500 μM の A T P, 5 mM の D T T, 0.1 U / μL の R N a s i n (P r o m e g a), および 100 μM の各アミノ酸を含む。酢酸カリウムの最終濃度は 100 mM に調節する。反応は氷上で予め組立て、25℃で 10 分間プレインキュベートした後に R N A を加え、25℃でさらに 60 分間インキュベートする。4 倍容量の 1.25x P a s s i v e L y s i s B u f f e r (P r o m e g a) で反応を停止させる。標的 R N A の切断は、R T-P C R 分析または当該技術分野において知られる他の方法によりアッセイし、反応から s i N A が省略されている対照反応と比較する。

【0354】

あるいは、アッセイ用の内部標識した標的 R N A を [アルファ-³²P] C T P の存在下でインビトロ転写により調製し、スピントマトグラフィーにより G 50 セファデックス カラムを通し、さらに精製することなく標的 R N A として用いる。任意に、標的 R N A は T4 ポリヌクレオチドキナーゼ酵素を用いて 5'-³²P 末端標識してもよい。アッセイは上述のようにして行い、標的 R N A および R N A i により生成する特異的 R N A 切断産物をゲルのオートラジオグラフィーで可視化する。切断のパーセントは、無傷の対照 R N A または s i N A なしの対照反応からの R N A, およびアッセイにより生成する切断産物を表すバンドを P h o s p h o r I m a g e r (登録商標) で定量することにより決定する。

【0355】

1 つの態様においては、このアッセイを用いて、s i N A 媒介性 R N A i 切断のための V E G F および／または V E G F r R N A 標的の標的部位を決定する。すなわち、例え

ば、標識した標的RNAの電気泳動によりアッセイ反応を分析することにより、またはノザンプロットにより、ならびに当該技術分野において知られる他の方法論により、複数のsiNAコンストラクトをVEGFおよび／またはVEGF-RNA標的のRNA i媒介性切断についてスクリーニングする。

【0356】

実施例7：VEGFおよび／またはVEGF-RNAのインビボでの核酸阻害

上述したようにして、ヒトVEGFおよび／またはVEGF-RNAを標的とするsiNA分子を設計し、合成する。これらの核酸分子は、例えば以下の方法を用いることにより、インビボで切断活性について試験することができる。VEGFおよび／またはVEGF-RNA中の標的配列およびヌクレオチドの位置は表IIおよびIIIに示される。

【0357】

2つのフォーマットを用いて、VEGFおよび／またはVEGF-RNAを標的とするsiNAの効力を試験する。第1に、例えば、HUVEC、HMVECまたはA375細胞を用いて、細胞培養において試薬を試験して、RNAおよび蛋白質の阻害の程度を決定する。本明細書に記載されるように、siNA試薬（例えば、表IIおよびIIIを参照）をVEGFおよび／またはVEGF-RNA標的に対して選択する。これらの試薬を適当なトランスフェクション試薬により、例えば、HUVEC、HMVECまたはA375細胞にデリバリーした後、RNA阻害を測定する。増幅のリアルタイムPCRモニタリング（例えば、ABI7700 Taqman（登録商標））を用いて、アクチンに対する標的RNAの相対量を測定する。無関係標的に対して、または同じ全体の長さおよび化学を有するがそれぞれの位置でランダムに置換されているランダム化siNA対照に対して作製したオリゴヌクレオチド配列の混合物に対して、比較を行う。標的に対して一次および二次のリード試薬を選択し、最適化を行う。最適なトランスフェクション試薬濃度を選択した後、リードsiNA分子を用いてRNAの阻害の経時変化を測定する。さらに、細胞播種フォーマットを用いて、RNA阻害を判定することができる。

【0358】

siNAの細胞へのデリバリー

細胞（例えば、HUVEC、HMVECまたはA375細胞）は、トランスフェクションの前日に、例えば、EGM-2（BioWhittaker）中で 1×10^5 細胞／ウェルで6ウェルディッシュに播種する。siNA（例えば最終濃度20nM）およびカチオン性脂質（例えば最終濃度2μg/ml）を、ポリスチレン管でEGM基礎培地（BioWhittaker）中で、37℃で30分間複合体化させる。ボルテックスした後、複合体化したsiNAを各ウェルに加え、示される時間インキュベートする。最初の最適化実験のためには、細胞を例えば、 1×10^3 で96ウェルプレートに播種し、記載されるようにしてsiNA複合体を加える。siNAの細胞へのデリバリーの効率は、脂質と複合体化した蛍光siNAを用いて決定する。6ウェルディッシュ中の細胞をsiNAとともに24時間インキュベートし、PBSですすぎ、2%パラホルムアルデヒド中で室温で15分間固定する。siNAの取り込みは蛍光顕微鏡を用いて可視化する。

【0359】

Taqmanおよび光サイクラーによるmRNAの定量

siNAのデリバリーの後、例えば、6ウェル用にはQiagen RNA精製キットを、または96ウェルアッセイ用にはRneasy抽出キットを用いて、細胞から総RNAを調製する。Taqman分析のためには、5'末端に共有結合させたレポーター染料（FAMまたはJOE）および3'末端にコンジュゲート化したクエンチャー染料TAMRAを有する二重標識プローブを合成する。1段階RT-PCR増幅は、例えば、ABI PRISM 7700 Sequence Detectorで、10μlの総RNA、100nMのフォワードプライマー、900nMのリバースプライマー、100nMのプローブ、1XTaqMan PCR反応緩衝液（PE-Applied Biosystems）、5.5mM MgCl₂、300μMの各dATP、dCTP、dGTP、お

よび d T T P, 10 U の R N a s e 阻害剤 (P r o m e g a), 1.25 U の A m p l i T a q G o l d (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s) および 10 U の M - M L V リバーストランスクリプターゼ (P r o m e g a) から構成される 50 μ l の反応液を用いて行う。熱サイクリング条件は, 48 $^{\circ}$ C で 30 分間, 95 $^{\circ}$ C で 10 分間, 次に 95 $^{\circ}$ C で 15 秒間および 60 $^{\circ}$ C で 1 分間を 40 サイクルからなるものでありうる。mRNA レベルの定量は, 段階的に希釈した総細胞 RNA (300, 100, 33, 11 ng / rxn) から生成した標準に対して行い, 平行して T a q M a n 反応で測定した β -アクトニンまたは G A P D H mRNA に対して標準化する。目的とする各遺伝子について, 上側プライマーおよび下側プライマー, および蛍光標識したプローブを設計する。特定の P C R 産物中への S Y B R G r e e n I 染料のリアルタイム取り込みは, ガラスキャピラリー管で光サイクラーを用いて測定することができる。対照 c R N A を用いて, 各プライマー対について標準曲線を作成する。値は, 各サンプルにおいて G A P D H に対する相対的発現として表す。

【0360】

ウエスタンブロッティング

核抽出物は, 標準的なマイクロ調製手法 (例えば, A n d r e w s a n d F a l l e r, 1991, N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h, 19, 2499 を参照) を用いて調製することができる。例えば T C A 沈殿を用いて, 上清からの蛋白質抽出物を調製する。等量の 20% T C A を細胞上清に加え, 氷上で 1 時間インキュベートし, 5 分間の遠心分離によりペレット化する。ペレットをアセトンで洗浄し, 乾燥し, 水に再懸濁する。細胞蛋白質抽出物を 10% B i s - T r i s N u P a g e (核抽出物) または 4-12% T r i s - g l y c i n e (上清抽出物) ポリアクリルアミドゲルに流し, ニトロセルロース膜に移す。非特異的結合は, 例えば, 5% 無脂乳とともに 1 時間インキュベートすることによりブロッキングすることができ, 次に一次抗体で 4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させる。洗浄した後, 二次抗体, 例えば (1:10, 000 希釈) を室温で 1 時間適用し, S u p e r S i g n a l 試薬 (P i e r c e) でシグナルを検出する。

【0361】

実施例 8: V E G F および / または V E G F r 遺伝子発現の減少を評価するために有用な動物モデル

V E G F, V E G F r 1, V E G F r 2 および / または V E G F r 3 mRNA に対する s i R N A など, 本発明の核酸の抗血管新生効果が試験しうる複数の動物モデルがある。通常, ラットおよびウサギにおける血管新生を試験するために角膜モデルが使用されているが, それは血管の補充をこの通常無血管組織において容易に追跡することができるためである (パンデイ (P a n d e y) ら, S c i e n c e, 1995 年 (268), 567~569 頁)。これらのモデルにおいては, 血管新生因子 (例えば, b f G F または V E G F) で前処理された小さなテフロンまたはハイドロゲルディスクを, 角膜の外科的に作成されたポケットに挿入する。血管新生は 3~5 日後にモニタリングする。V E G F, V E G F r 1, V E G F r 2 および / または V E G F r 3 mRNA に対する s i R N A もディスクにデリバリーし, または実験の時間的経過にわたって眼に滴下する。別の眼モデルにおいて, 低酸素が V E G F の発現増大と網膜の新血管形成の両方を引き起こすことが示されている (ピアス (P i e r c e) ら, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 1995 年 (92), 905~909 頁, シュワイキ (S h w e i k i) ら, J. C l i n. I n v e s t. 1992 年 (91), 2235~2243 頁)。

【0362】

ヒト神経膠芽細胞腫において, V E G F は少なくとも部分的に腫瘍血管新生の原因であることが示されている (プレート (P l a t e) ら, N a t u r e, 1992 年 (359), 845 頁)。神経膠芽細胞腫の細胞をヌードマウスに皮下移植し, 腫瘍成長および血管新生の過程を試験する動物モデルが開発されている (キム (K i m) ら, 上掲誌, 1993 年, ミラウアー (M i k k a u e r) ら, 上掲誌, 1994 年)。

【0363】

新血管形成に対応する別の動物モデルは、皮下注射されると固体ゲルとなる基底膜の抽出物であるマトリゲルを含む（パサニッティ（Passaniti）ら，Lab. Invest.，1992年（67），519～528頁）。マトリゲルがVEGFなどの血管新生因子を補充されると、血管が3～5日の期間にわたってマトリゲル中に成長し、血管新生を評価することができる。この場合も、VEGF mRNAに対する核酸をマトリゲルにデリバリーする。

【0364】

抗血管新生剤をスクリーニングするための複数の動物モデルが存在する。これらに含まれるものは、角膜損傷後の角膜血管形成（ブルガー（Burger）ら，Cornea，1985年（4），35～41頁，レプリ（Leprici）ら，J. Ocular Pharmacol.，1994年（10），273～280頁，オルメロッド（Ormerod）ら，Am. J. Pathol.，1990年（137），1243～1252頁）または角膜内成長因子移植（グラント（Grant）ら，Diabetologia，1993年（36），282～291頁，パンデイ（Pandey）ら，上掲誌，1995年，ツィッヒェ（Zieche）ら，Lab. Invest.，1992年（67），711～715頁），成長因子を含有するマトリゲル基質への血管成長（パサニッティ（Passaniti）ら，上掲誌，1992年），ホルモン操作後の雌の生殖器官新生血管形成（シュワイキ（Shweiki）ら，J. Clin. Invest.，1992年（91），2235～2243頁），高度に脈管化した固形腫瘍における腫瘍成長の阻害を含む複数のモデル（オーレイリー（O'Reilly）ら，Cell，1994年（79），315～328頁，サンジェ（Senger）ら，Cancer and Metast. Rev.，1993年（12），303～324頁，タカハシ（Takahashi）ら，Cancer Res.，1994年（54），4233～4237頁，キム（Kim）ら，上掲誌，1993年），およびマウス網膜における一時的低酸素誘導性新生血管形成（ピアス（Pierce）ら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA.，1995年（92），905～909頁）である。

【0365】

上記のパンデイ（Pandey）らに記載された角膜モデルは、抗血管新生剤の効果をスクリーニングするための最も一般的かつ十分に特徴づけられたモデルである。このモデルは、血管が刺激剤（成長因子、熱またはアルカリ損傷、内毒素）によって補充される無血管組織を含む。角膜モデルでは、VEGF-ハイドロン溶液中に浸漬したテフロンペレットの基質内角膜移植を利用し、血管をペレット方向に補充するが、これは標準の顕微および画像分析法によって数量化することができる。それらの抗血管新生効果を評価するためには、核酸を眼に局所適用し、またはテフロンペレット自体のハイドロン内に結合させる。この無血管角膜およびマトリゲル（下記参照）は、低いバックグラウンドのアッセイを提供する。角膜モデルはウサギにおいて大規模に実行されているが、ラットにおける試験も行われている。

【0366】

マウスモデル（パサニッティ（Passaniti）ら，上記）は、基底膜の抽出物であるマトリゲル（クラインマン（Kleinman）ら，1986年），または注射前に液体状で成長因子および抗血管新生剤を含浸させることができるミリポア（Millipore）（登録商標）フィルターディスクを利用する非組織モデルである。体温で皮下投与すると、マトリゲルまたはミリポア（登録商標）フィルターディスクは固体移植片を形成する。マトリゲルまたはミリポア（登録商標）に組込んだVEGFを用いて、マトリゲルまたはミリポア（登録商標）フィルターディスクのマトリクス中に血管を補充させ、これを内皮細胞特異的vWF（第V I I I 因子抗原）免疫組織化学、トリクロム・マッソン染色、またはヘモグロビン量のために組織学的に処理することができる。角膜と同じく、マトリゲルまたはミリポア（登録商標）フィルターディスクは無血管性であるが、しかし、組織ではない。マトリゲルまたはミリポア（登録商標）フィルターディスクモデルにおいては、核酸をマトリゲルまたはミリポア（登録商標）フィルターディスクのマトリクス

内に投与し、それらの抗血管新生効果を試験する。したがって、このモデルにおけるデリバリーの問題は、ラット角膜モデルにおけるハイドロロンでコーティングしたテフロンペレットによる核酸のデリバリーの問題と同様に、それぞれのマトリクス中に核酸が均一に存在するため、あまり問題とはならない。

【0367】

腫瘍血管新生を試験する他のモデル系は、 Folkman (Folkman), Adv. Cancer. Res. 1985 (43), 175頁によって検討されている。

【0368】

マウスモデルの使用

1用量群当りマウス10匹(各20g), 5用量(1日, 1, 3, 10, 30, および 100mg/kgを14日にわたり連続投与)を含む典型的な全身的試験のためには、生理食塩水中に調製した400mgの siRNAを用いる。若い成体ラット(200g)における同様の試験では4gが必要とされる。平行して行う薬物動態試験では、ほぼ同じ量の siRNAを使用することを含み、このことは、マウスモデルの使用をさらに正当化する。

【0369】

ルイス肺癌およびB-16黒色腫マウスモデル

核酸の全身的効果試験の一般的な動物モデルを同定することは、全身的効果について siRNAをスクリーニングする効率的な方法である。

【0370】

ルイス肺癌およびB-16マウス黒色腫モデルは、原発性および転移性癌の十分に認められたモデルであり、抗癌剤の初期スクリーニングのために使用される。これらのマウスモデルは免疫不全マウスの使用に依存しておらず、比較的安価であり、かつ収容の問題を最小限にする。ルイス肺癌とB-16黒色腫の両方とも、C57BL/6Jマウスにおける転移性攻撃的腫瘍細胞系(ルイス肺癌系3LLまたはD122, LLC-LN7, B-16-BL6黒色腫)からの約 10^6 腫瘍細胞の皮下移植を含む。あるいは、ルイス肺モデルは、腫瘍球(直径約0.8mm)の外科的移植によって生成することができる。腫瘍細胞を直接静脈内注射することによって転移もモデル化することができる。ルイス肺モデルにおいて、顕微鏡的転移が移植後約14日に確認することができ、21~25日以内に定量化できる肉眼的転移性腫瘍が明らかになる。B-16黒色腫は、移植後4日に始まる腫瘍新生血管形成と同様の時間経過を示す。これらのモデルにおいては、21~25日後に原発性腫瘍と転移性腫瘍の両方が同じ動物に存在するため、効果の指標として複数の測定値を取ることができる。原発性腫瘍の容積および成長遅延のほか、顕微鏡的または肉眼的転移性肺病巣の数または転移を示す動物の数を定量化することができる。寿命の増加率も測定することができる。したがって、これらのモデルは、全身投与された siRNA核酸および siRNA核酸製剤をスクリーニングするための適切な一次効果アッセイを提供する。

【0371】

ルイス肺およびB-16黒色腫モデルにおいて、各種薬剤による全身薬物療法は通常、連続的または複数のいずれかの投与方式により腫瘍移植/摂取後1~7日に開始する。同時に薬物動態試験を行い、期待される薬物動態効果のための siRNAの十分な組織レベルが達成できるかどうかを判定することができる。さらに、原発性腫瘍および続発性肺転移を除去し、種々のインビトロ試験(すなわち、標的RNAの低減)に供することができる。

【0372】

また、動物モデルは、常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)などの腎疾患の結果などの腎疾患の治療における効果について、化合物、例えば、 siRNA分子のスクリーニングにおいて有用である。Han:SPRDラットモデル、Pkd2遺伝子における標的変異によるマウス、および先天性多嚢胞腎(cpk)マウスは、ヒトADPKDにきわめて類似し、かつ血管新生などのADPKD媒介腎不全の病的要素の1つ以上を妨害する潜

在的可能性を有する s i R N A コンストラクトの治療効果を評価する動物モデルを提供する。血管新生は、嚢胞細胞の成長および嚢胞への体液分泌を促進する血管透過性の増大に対する A D P K D の進行において必要とみられる。嚢胞上皮の増殖も、培養中の嚢胞細胞は可溶性の血管内皮成長因子 (V E G F) を生成するという点で、A D P K D の特徴である。V E G F r 1 は、嚢胞管の上皮細胞中では検出されているが、嚢胞腎または正常腎の脈管における内皮細胞中では検出されていない。V E G F r 2 発現は、嚢胞管の内皮細胞および腎虚血再灌流中の内皮細胞において増大する。抗 - V E G F r 1 および抗 - V E G F r 2 s i R N A 分子による V E G F レセプターの阻害が、嚢胞形成、腎不全、および A D P K D における死亡率を軽減することが提案されている。したがって、抗 - V E G F r 2 s i R N A 分子は、嚢胞形成に関与する血管新生を阻害するように設計される。V E G F r 1 は嚢胞上皮中に存在し、嚢胞の血管内皮中には存在しないため、抗 - V E G F r 1 s i R N A 分子は嚢胞上皮細胞増殖およびアポトーシスを軽減し、次いで嚢胞形成をもたらさないことが提案されている。さらに、嚢胞上皮細胞によって生成される V E G F は、血管新生ならびに上皮細胞の増殖およびアポトーシスの刺激物の 1 つであることが提案されている。Han : S P R D ラット (例えば、カスパレイト・リッチンハウゼン (K a s p a r e i t - R i t t i n g h a u s e n) ら, A m . J . P a t h o l . , 1991 年 (139), 693~696 頁を参照), P k d 2 遺伝子における標的変異によるマウス (P k d 2 - / - マウス, 例えば、ウー (W u) ら, N a t . G e n e t . , 2000 年 (24), 75~78 頁を参照), および c p k マウス (例えば、ウー (W o o) ら, N a t u r e , 1994 年 (368), 750~753 頁を参照) の使用はすべて、V E G F r 1 および V E G F r 2 媒介腎不全に対する本発明の s i R N A 分子の有効性を試験する動物モデルを提供する。

【0373】

V E G F , V E G F r 1 , V E G F r 2 および / または V E G F r 3 の蛋白質レベルは、F A C S 分析によって臨床的または実験的に測定することができる。V E G F , V E G F r 1 , V E G F r 2 および / または V E G F r 3 をコードする m R N A レベルは、ノーザン分析、R N a s e 保護、プライマー伸長分析、および / または定量的 R T - P C R によって評価される。V E G F , V E G F r 1 , V E G F r 2 および / または V E G F r 3 蛋白質をコードする m R N A を阻害し、したがってインビトロで 20% 以上の V E G F , V E G F r 1 , V E G F r 2 および / または V E G F r 3 のレベル減少を引き起こす s i R N A 核酸を同定することができる。

【0374】

実施例 9 : インビボでの血管新生の s i R N A 媒介性阻害

この試験の目的は、V E G F 誘導性血管新生のラットモデル (上記参照) における V E G F r 1 を標的とする s i R N A の抗血管新生活性を評価することであった。s i R N A 分子は、R N A 標的と相互作用しえないため不活性である、マッチした反転対照を有する。s i R N A 分子および V E G F を、フィルターディスク法を用いて同時にデリバリーした。すなわち、0.057 径のニトロセルロースフィルターディスク (ミリポア (登録商標)) を適切な溶液中に浸漬し、上記のパンディ (P a n d e y) らによって記載されているようにラット角膜に外科的に移植した。

【0375】

この試験における血管新生の刺激は、角膜実質内に移植される 30 μ M の V E G F によるフィルターディスクの処理であった。この用量により、移植後 5 日の用量反応試験におけるディスクに対して成長する角膜周囲脈管脈叢に起因する再生的新生血管形成が生じる。V E G F に対するベヒクルのみで処理されたフィルターディスクは、血管新生反応を示さない。s i R N A は、2 種類の s i R N A 濃度でディスク上に V E G F と同時投与された。刺激投与に対する 1 つの懸念は、V E G F レセプターが刺激されうるため、s i R N A が血管新生を阻害しえないということである。しかし、出願人が確認したように、低い V E G F 用量で、新生血管形成反応が正常へと逆行し、V E G F 刺激が血管新生応答の維持に重要であることを示す。抗 - V E G F - R m R N A s i R N A の同時投与を用いて V E G

Fレセプターの生成を阻害することにより、VEGFで処理したフィルターディスクによって誘導される正常な新生血管形成が軽減されうる。

【0376】

材料および方法：

試験化合物および対照

アール・アンド・ディー（R & D）システムズ（S y s t e m s）VEGF，82 mM Tris-HCl，pH 6.9 中 75 μ M，担体フリー

s i N A，1.67 μ g / μ L，部位 2340（配列番号：2，配列番号：6）センス / アンチセンス

s i N A，1.67 μ g / μ L，部位 2340 に対する反転対照（配列番号：19，配列番号：20）センス / アンチセンス 10

s i N A 1.67 μ g / μ L，部位 2340（配列番号：419，配列番号：420）センス / アンチセンス

動物

ハーラン・スプラグーダウレイ系ラット，約 225～250 g

雄 45 匹，1 群 5 匹。

【0377】

管理

ラットを 2 つの群で収容する。飼料，水，温度，および湿度は，1996 年実験動物の管理と使用の指針（NRC）に基づく薬学試験施設標準作業手順書（SOP）にしたがって決定する。ラットは実験前の少なくとも 7 日間，施設に馴化される。この期間中，ラットは全体の健康について観察し，基礎血清学のために採血する。 20

【0378】

実験群

各溶液（VEGF および s i N A）を表 I I I に記載されている実験群に示された最終濃度に対する 1 倍溶液として調製した。

【0379】

s i N A アニリング条件

s i N A のセンス鎖およびアンチセンス鎖を 1.67 mg / mL / 鎖で H₂O 中で 1 分間アニリングした後，37℃で 1 時間インキュベートし，3.34 mg / mL のデュプレックス s i N A を生成する。20 μ g / 眼処理のために，3.34 mg / mL のデュプレックス 6 μ L を眼に注入する（下記参照）。用量反応アッセイのためには，次に，3.34 mg / mL のデュプレックス s i N A を連続希釈することができる。 30

【0380】

VEGF フィルターディスクの調製

角膜移植のために，孔径 0.45 μ m のニトロセルロースフィルター膜（ミリポア社）から調製した 0.57 mm 径のニトロセルロースディスクを，氷上のカバーされたペトリ皿で，82 mM Tris-HCl（pH 6.9）中の 75 μ M VEGF 1 μ L 中に 30 分間浸漬した。VEGF のベヒクル（83 mM Tris-maleate pH 6.9）のみで浸漬したフィルターディスクは，血管新生反応を誘導しない。 40

【0381】

角膜の外科処置

この試験に用いられたラット角膜モデルは，上記のコッホ（Koch）ら，および上記のパンディ（Pandey）らから改変した。簡単には，0.5% ポビドンヨード溶液で角膜を活性化した後，生理食塩水および 2% リドカイン 2 滴で活性化した。解剖顕微鏡（ライカ（Leica）MZ-6）下，間質ポケットを作成し，予め浸漬したフィルターディスク（上記参照）を，その端が角膜輪部から 1 mm であるようにポケットに挿入した。

【0382】

試験溶液の結膜内注射

ディスク挿入直後，40～50 μ m OD 注射器（当実験室で構成）の先端を，VEGF 50

浸漬フィルターディスクに直接隣接した角膜輪部の端から1mm離れた結膜組織内に挿入した。600ナノリットルの試験溶液(s i N A, 反転対照または滅菌水ベヒクル)を, シリンジポンプ(K d S c i e n t i f i c)を用いて1.2μL/分の速度で分注した。次いで, 注射器を取出し, 70%エタノールおよび滅菌水中で連続洗浄し, 各注射の間には滅菌水に浸けた。試験溶液を注射したら, ラットが全体の運動活動を回復するまで毛細血管瘤クリップを用いて瞼の閉鎖を維持した。処置後, 37℃の加熱パッド上でラットを保温した。

【0383】

血管新生反応の定量化

ディスク移植後5日にラットを安楽死させた後, 0.4mg/kgアトロピンを投与し, 角膜をデジタル画像化した。新血管表面積(NSA, ピクセルで表示)をコンピュータ制御形態計測機(イメージ・プロ・プラス(Image Pro Plus), メディア・サイバネティックス(Media Cybernetics), v2.0)を用いて血液充填角膜管から死後計測した。フィルターディスクと輪部との間の最大新生血管形成領域の同一サイズの3つの部分から個別平均NSAを3通り測定した。3つの部分の血液充填角膜管に対応するピクセル数を合計し, NSA指数を得た。次いで, 群平均NSAを計算した。各処置群のデータをVEGF/s i N Aベヒクル処理対照NSAに対して標準化し, 最終的にVEGF誘導性血管新生の障害率で表した。

【0384】

統計

処置群の平均の正規性を測定した後, VEGF誘導性血管新生の群平均障害率について, 一元配置分散分析を行った。これは, アルファ=0.05でのダネット検定(VEGF対照との比較)およびテューキー・クレーマー検定(他の全群の平均比較)を含む, 有意性に対する2つの事後的検定によって行った。統計分析は, JMP v. 3.1.6(SASインスティテュート)を用いて行った。

【0385】

結果は, 図12に図示されている。図12に示されているように, 3つの濃度でVEGF r1部位4229活性s i N A(R P I 2 9 6 9 5/2 9 6 9 9)は, 反転s i N A対照(R P I 2 9 8 3/2 9 9 8 4)およびVEGF対照と比べ血管新生の障害において有効であった。2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンおよびリボプリン, および5'および3'末端反転デオキシ無塩基成分を有するセンス鎖(R P I 3 0 1 9 6), および2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンおよびリボプリン, および末端3'-ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するアンチセンス鎖(R P I 3 0 4 1 6)を含むVEGF r1部位4229活性s i N Aの化学修飾変異体は, 同様の障害を示した。(データを示さず)この結果は, 本発明の種々の化学修飾組成のs i N A分子が, インビボで血管新生を有意に障害しうることを示す。

【0386】

実施例10: VEGFおよび/またはVEGF r RNA発現のRNA i媒介障害

例えば, HUVEC, HMVEC, またはA375細胞におけるVEGFおよび/またはVEGF r発現の誘導における有効性について, s i N Aコンストラクト(表III)を試験する。細胞は, トランスフェクションの時点で細胞が70~90%コンフルエントとなるよう, 5,000~7,500細胞/ウェル, 100μl/ウェルで96穴プレートにトランスフェクション前の約24時間に播種する。トランスフェクションのためには, アニールしたs i N Aを, 50μl/ウェルの容積中でトランスフェクション試薬(リポフェクタミン2000, インビトロジェン(Invitrogen))と混合し, 20分間インキュベートする。s i N Aトランスフェクション混合物を細胞に添加し, 150μlの容積中で最終s i N A濃度25nMを得る。各s i N Aトランスフェクション混合物を3通りのs i N A処理のために3つのウェルに添加する。s i N Aトランスフェクション混合物の継続的存在下に24時間, 37℃で細胞をインキュベートする。24時間の時点で, 処理細胞の各ウェルからRNAを調製する。トランスフェクション混合

物を含む上清をまず除去して廃棄し、次いで細胞を溶解し、RNAを各ウェルから調製する。処理後の標的遺伝子発現を標的遺伝子および標準化のために対照遺伝子（36B4，RNAポリメラーゼサブユニット）についてRT-PCRによって評価する。3通りのデータを平均化し、各処理の標準偏差を測定する。標準化したデータを図示し、そのそれぞれの反転対照siNAとの比較で活性siNAによる標的mRNAの低減率を測定する。

【0387】

図13は、VEGFr1 mRNAを標的とする化学修飾siNAによって媒介されるA375細胞におけるVEGFr1 mRNAの低減の非限定的実施例を示す図である。A549細胞は、25nM siNAと複合された0.25μg/ウェルの脂質でトランスフェクションした。一連の，Stab 4/5化学（RPI 31190/31193）10，Stab 1/2化学（RPI 31183/31186およびRPI 31184/31187），および非修飾RNA（RPI 30075/30076）を含むsiNAコンストラクト（安定化「Stab」化学は表IVに示され，コンストラクトはRPI番号によって指示されている，表III参照）を，未処理細胞，マッチした化学の反転対照siNAコンストラクト（RPI 31208/31211，RPI 31201/31204，RPI 31202/31205，およびRPI 30077/30078），スクランブル化siNA対照コンストラクト（Scram1およびScram2），および脂質のみでトランスフェクションした細胞（トランスフェクション対照）と比較した。図示されているように，すべてのsiNAコンストラクトは，VEGFr1 RNA発現の有意な低減を示す。表IVに記載されている追加の安定化化学を，活性について同様20に分析する。これらのsiNAコンストラクトを適切なマッチした化学の反転対照と比較する。さらに，siNAコンストラクトを，未処理細胞，脂質およびスクランブル化siNAコンストラクトでトランスフェクションした細胞，および脂質のみでトランスフェクションした細胞（トランスフェクション対照）と比較する。

【0388】

実施例11：適応症

VEGFおよび/またはVEGFr研究における現在の一連の知識は，VEGFおよび/またはVEGFr活性を分析する方法の必要性，および研究，診断，および治療用途のVEGFおよび/またはVEGFr発現を調節しうる化合物の必要性を示している。本明細書中に記載されているように，本発明の核酸分子は，VEGFおよび/またはVEGFr 30レベルに関連する疾患状態を診断するアッセイにおいて用いることができる。また，核酸分子は，VEGFおよび/またはVEGFrレベルに関連する疾患状態を治療するために用いることができる。

【0389】

VEGFおよび/またはVEGFr発現の調節と関連しうる特定の状態および疾患状態としては以下が含まれるが，これらに限定されない。

【0390】

1) 腫瘍血管新生：血管新生は，腫瘍が病的サイズに成長するために必要であることが示されている（ Folkman (Folkman), PNAS, 1971年(76), 5217~5221頁, ウェルスタイン (Wellstein) とシズバイコ (Czubayko), Breast Cancer Res and Treatment, 1996年(38), 109~119頁)。また，これにより腫瘍細胞は転移中に循環系を通じて移動が可能となる。血管内皮成長因子 (VEGF) など多くの血管新生因子の遺伝子発現のレベル増大が，血管新生化および浮腫関連脳腫瘍において報告されている（ベルクマン (Berkman) ら, J. Clin. Invest., 1993年(91), 153頁)。腫瘍血管新生におけるVEGFの役割のより直接的な証明は，ジム・キム (Jim Kim) ら (Nature, 1993年(362), 841頁) によって明らかにされたが，ここでVEGFに対するモノクローナル抗体が，ヌードマウスにおける横紋筋肉腫，多形性膠芽腫細胞の成長を阻害するために有効に用いられた。同様に，flt-1 VEGF 40レセプターの優勢な陰性変異形態の発現は，ヌードマウスにおけるヒト膠芽腫細胞によ

って誘導される血管新生を阻害する（ミラウアー（M i l l a u e r）ら，N a t u r e，1994年（367），576頁）。本発明の核酸分子を用いて標的とすることができる特定の腫瘍／癌型としては，本明細書中に記載された腫瘍／癌型が挙げられるが，これらに限定されない。

【0391】

2）眼疾患：新生血管形成は，黄斑変性，血管新生緑内障，糖尿病性網膜症，近視性変性，およびトラコーマを含むが，これらに限定されない眼疾患をひき起こし，または悪化させることが示されている（ノルビ（N o r r b y），A P M I S，1977年（105），417～437頁）。アイエロ（A i e l l o）ら（N e w E n g l . J . M e d .，1994年（331），1480頁）は，糖尿病性網膜症および他の網膜疾患に罹患した大半の患者の眼水が高濃度のV E G Fを含有することを示した。ミラー（M i l l e r）ら（A m . J . P a t h o l .，1994年（145），574頁）は，網膜虚血に罹患した患者におけるV E G F m R N Aの高いレベルを報告した。これらの所見は，眼疾患におけるV E G Fの直接的役割を裏づける。V E G F合成を刺激するものを含む他の因子もこれらの適応症に関与しうる。

【0392】

3）皮膚科疾患：血管新生に依存するかもしれない多くの適応症，例えば，限定されないが，乾癬，尋常性疣贅，結節硬化症の血管線維腫，ポートワイン母斑，スタージ・ウェーバー症候群，クリッペル・トレノネー・ウェーバー症候群，およびオスラー・ウェーバー・ランジュール症候群が確認されている（ノルビ，上記）。血管新生因子b - F G Fの皮内注射は，ヌードマウスにおける血管新生を証明した（ウェックベッカー（W e c k b e k e r）ら著「血管新生（A n g i o g e n e s i s）：基本方針－科学－技術－医学（K e y p r i n c i p l e s - S c i e n c e - T e c h n o l o g y - M e d i c i n e）」，R . シュタイナー（S t e i n e r）編）。デトマー（D e t m a r）ら（J . E x p . M e d .，1994年（180），1141頁）は，V E G Fおよびそのレセプターが乾癬皮膚および乾癬皮膚微細血管において過剰発現し，V E G Fが乾癬において重要な役割を果たすことを示していることを報告した。

【0393】

4）慢性関節リウマチ：慢性関節リウマチに罹患した患者の関節からの組織に関する免疫組織学およびインシチュールハイブリダイゼーション試験は，V E G Fおよびそのレセプターのレベル増大を示す（ファバ（F a v a）ら，J . E x p . M e d .，1994年（180），341頁）。また，コッホ（K o c h）ら（J . I m m u n o l，1994年（152），4149頁）は，V E G F特異的抗体が，慢性関節リウマチに罹患した患者からの滑膜組織の細胞分裂誘起活性を大幅に低減しうることを見出した。これらの所見は，慢性関節リウマチにおけるV E G Fの直接的な役割を裏づける。本発明のものを含む他の血管新生因子も関節炎に関与しうる。

【0394】

5）子宮内膜症：種々の研究は，V E G Fが子宮内膜症に直接関与することを示している。1つの研究では，E L I S Aによって測定された腹水中のV E G F濃度が，子宮内膜症のない女性よりも子宮内膜症のある女性において相当に高いことが確認された（ $24.1 \pm 15 \text{ ng/ml}$ vs $13.3 \pm 7.2 \text{ ng/ml}$ （正常値））。子宮内膜症患者において，高濃度のV E G Fが，分泌期（ $10.7 \pm 5 \text{ ng/ml}$ ）と比べ月経周期の増殖期（ $33 \pm 13 \text{ ng/ml}$ ）において検出された。正常な患者からの腹水中には周期変動は認められなかった（マクラレン（M a c l a r e n）ら，H u m a n R e p r o d .，1996年（11），220～223頁）。別の研究では，中等度～重篤な子宮内膜症のある女性の腹水V E G F濃度は，子宮内膜症のない女性よりも相当に高かった。子宮内膜症の重篤度と腹水中のV E G F濃度との間には正の相関関係が認められた。ヒトにおける子宮内膜生検において，V E G F発現は，早期増殖期に対して，中間増殖期，後期増殖，および分泌期子宮内膜において約1.6倍，2倍，および3.6倍増大した（シフレン（S h i f r e n）ら，J . C l i n . E n d o c r i n o l . M e t a b .，19 50

96年(81), 3112~3118頁)。第3の研究では, ヒト異所性子宮内膜のVEGF陽性染色が, マクロファージに局在することが示された(CD14マーカーによる二重免疫染色)。腹水マクロファージは, 子宮内膜症のある女性とない女性におけるVEGF染色を示した。しかし, 対照と比べ子宮内膜症のある女性からの腹水において, マクロファージの活性増大(酸ホスファターゼ活性)が証明された。子宮内膜症患者からの腹水マクロファージコンディショニング培地は, 対照と比べHUVEC細胞における細胞増殖を大幅に増大させた($[^3\text{H}]$ チミジン取込み)。VEGF r_2 mRNAを含む腹水マクロファージの割合は, 分泌期中に高く, かつ対照($32 \pm 20\%$)と比べ子宮内膜症のある女性($80 \pm 15\%$)からの腹水中で相当に高かった。flt-mRNAは, 子宮内膜症のある女性とない女性からの腹水マクロファージにおいて検出されたが, 群間差および周期依存性は認められなかった(マクラーレン(McLaren)ら, J. Clin. Invest., 1996年(98), 482~489頁)。月経周期の早期増殖期において, VEGFは, 雌マウスにおける卵管と子宮の両方の分泌円柱上皮(エストロゲン反応性)内膜に発現することが確認されている。分泌期中, VEGF発現は, 機能的子宮内膜を含む基底支質にシフトしたことが示された。子宮内膜の検査に加えて, 卵巣採および黄体の新生血管形成, ならびに胚着床部位における血管新生について分析されている。これらの過程に対して, VEGFは, 脈管構造の形成に空間的および時間的に近接して発現した(シュワイキ(Shweiki)ら, J. Clin. Invest., 1992年(91), 2235~2243頁)。

10

20

30

40

50

【0395】

6)腎疾患:常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は, 米国において最も一般的な生命を脅かす遺伝性疾患である。これは約1:400~1:1000人が罹患し, ADPKD患者の約50%が腎疾患を発症する。ADPKDは, 米国において透析および腎移植を必要とする末期腎不全の約5~10%を占める。血管新生は, 嚢胞細胞の成長, および嚢胞への体液分泌を促進する血管透過性の増大に関しADPKDの進行に関係している。嚢胞上皮の増殖は, 培養中の嚢胞細胞が可溶性の血管内皮成長因子(VEGF)を生成するという点で, ADPKDの特徴である。VEGF r_1 は, 嚢胞管の上皮細胞中で検出されているが, 嚢胞腎または正常腎の脈管構造における内皮細胞においては検出されていない。VEGF r_2 発現は, 嚢胞管の内皮細胞および腎虚血再灌流中の内皮細胞において増大する。

【0396】

放射線治療, およびゲムシタビンやシクロホスファミドなどの化学療法の使用は, 本発明の核酸(例えば, siNA分子)と組み合わせ, またはこれと併用しうる化学療法剤の非限定的実施例である。当業者であれば, 他の抗癌化合物および療法が同様に本発明の核酸分子(例えば, siNA分子)と容易に組合せ可能であり, したがって本発明の範囲内であることを理解するであろう。かかる化合物および療法は, 当業界では公知であり(例えば, 本明細書中で参考として援用される, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 第1巻および第2巻, デビータ(Devita), V. T., ヘルマン(Hellman), S., およびローゼンベルグ(Rosenberg), S. A. 編, J. B. リッピンコット(Lippincott)社(Company)(米国, フィラデルフィア)を参照), 葉酸塩, 抗葉酸, プリミジン類似体, フルオロプリミジン, プリン類似体, アデノシン類似体, トポイソメラーゼIインヒビター, アントラピラゾール, レチノイド, 抗生物質, アンタシクリン, 白金類似体, アルキル化剤, ニトロソウレア, ピンカアルカロイドなどの植物由来化合物, エピポドフィロトキシン, チロシンキナーゼインヒビター, タクソール, 放射線療法, 手術, 栄養補助食品, 遺伝子療法, 放射線治療, 例えば, 3D-CRT, 抗毒素療法, 例えば, リシン, およびモノクローナル抗体を含むが, これらに限定されない。本発明の核酸分子と組み合わせ, または併用しうる化学療法化合物の特定の実施例としては, パクリタクセル, ドセタクセル, メトトレキサート, ドクソルビン, エダトレキサート, ビノレルビン, トマキシフェン, ロイコボリン, 5-フルオロウリジン(5-FU), イオノテカン, シスプラチ

ン、カルボプラチン、アムサクリン、シタラピン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、デクチノマイシン、ミトラマイシン、ヘキサメチルメラミン、ダカルバジン、L-アスパラギナーゼ、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、イホスファミド、4-ヒドロペロキシシクロホスファミド、チオテパ、イリノテカン（CAMP T O S A R（登録商標）、C P T-11、カンプトテシン-11、カンプト）タモキシフェン、ヘルセプチン、I M C C 2 2 5、A B X-E G F、およびその組合せが挙げられるが、これらに限定されない。上記の化合物リストは、本発明の核酸分子（例えば、s i N A）と組合せ、または併用が可能である化合物および／または方法の非限定的な実施例である。当業者であれば、他の抗癌化合物および療法が同様に本発明の核酸分子（例えば、s i N A分子）と容易に組合せ可能であり、したがって本発明の範囲内であることを理解するであろう。 10

【0397】

実施例12：診断用途

本発明のs i N A分子は、種々の応用において、例えば、臨床、工業、環境、農業および／または研究の設定において、種々の診断用途、例えば分子標的（例えばR N A）の同定に用いることができる。そのようなs i N A分子の診断における使用は、再構成されたR N A i系、例えば、細胞溶解物または部分的に精製された細胞溶解物を利用することを含む。本発明のs i N A分子を診断手段として使用し、疾病に罹患した細胞内の遺伝的浮動および変異を検査するか、または細胞において内因性のまたは外来の（例えばウイルス）R N Aの存在を検出することができる。s i N A活性と標的R N Aの構造との間の密接な関係により、分子のいずれの領域においても、標的R N Aの塩基対形成および3次元構造を変更する変異を検出することができる。本発明に記載されるs i N A分子を複数使用することにより、インビトロならびに細胞および組織におけるR N Aの構造および機能に重要なヌクレオチド変化をマッピングすることができる。s i N A分子による標的R N Aの切断を使用して、遺伝子の発現を阻害し、疾病または感染の進行における特定の遺伝子産物の役割を明らかにすることができる。このようにして、他の遺伝子標的を疾病の重要な介在物として明らかにすることができる。これらの実験は、組み合わせ療法の可能性を提供することにより、疾病進行のよりよい治療につながるであろう（例えば、異なる遺伝子を標的とする多数のs i N A分子、既知の小分子阻害剤と組み合わせたs i N A分子、s i N A分子および／または他の化学的または生物学的分子と組み合わせた間欠的治療） 30 30

。本発明のs i N A分子の他のインビトロにおける使用は当該技術分野においてよく知られており、これには、疾病、感染または関連する健康状態に伴うm R N Aの存在の検出が含まれる。そのようなR N Aは、s i N A分子で処理した後、標準的な方法論、例えば蛍光共鳴エネルギー移動（F R E T）を使用して切断産物の存在を判定することにより検出する。

【0398】

特定の例においては、標的R N Aの野生型または変異型のみしか切断できないs i N A分子をアッセイに使用する。第1のs i N A分子（すなわち、野生型の標的R N Aのみを切断するもの）を用いて試料中の野生型R N Aの存在を同定し、第2のs i N A分子（すなわち、変異型の標的R N Aのみを切断するもの）を用いて試料中の変異型R N Aを同定 40 40

する。反応対照として、野生型および変異型の両方のR N Aの合成基質を両方のs i N A分子で切断し、反応におけるs i N A分子の相対効率および"非標的"R N A種を切断しないことを明らかにする。合成基質からの切断産物は、試料集団中の野生型および変異型R N Aの分析のためのサイズマーカーの生成にも役立つ。したがって、それぞれの分析は2つのs i N A分子、2つの基質、および1つの未知の試料を必要とし、これらを組み合わせて6つの反応を行う。切断産物の存在をR N a s e保護アッセイを用いて確認し、各R N Aの完全長および切断フラグメントをポリアクリルアミドゲルの1レーンで分析できるようにする。標的細胞における変異体R N Aの発現および所望の表現型の変化の推定されるリスクへの洞察を得るために、必ずしも結果を定量する必要はない。その蛋白質産物が表現型（すなわち、疾病に関連するかまたは感染に関連する）の発生に与ることが示 50 50

唆される mRNA の発現はリスクを確立するのに十分である。同等の比活性のプローブを両方の転写産物に使用すれば、RNA レベルの定性的比較で十分であり、初期の診断のコストが低減する。RNA レベルを定性的に比較するにしても定量的に比較するにしても、より高い変異型と野生型の比率はより高いリスクと相関関係があるであろう。

【0399】

本明細書において言及されるすべての特許および刊行物は、本発明の属する技術分野の技術者のレベルを示す。本明細書において引用されるすべての参考文献は、それぞれの参考文献が個々にその全体が本明細書の一部としてここに引用されることと同じ程度に、本明細書の一部として引用される。

【0400】

当業者は、本発明が、その目的を実施し、記載される結果および利点、ならびに本明細書に固有のものを得るためによく適合していることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される方法および組成物は、現在のところ好ましい態様の代表的なものであり、例示的なものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、特許請求の範囲において定義される本発明の精神の中に包含される変更および他の用途をなすであろう。

【0401】

当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して種々の置換および改変をなすことが可能であることを容易に理解するであろう。すなわち、そのような追加の態様は、本発明および特許請求の範囲の範囲内である。本発明は、RNA i 活性を媒介する改良された活性を有する核酸コンストラクトを得るために本明細書に記載される化学的修飾の種々の組み合わせおよび／または置換を試験することを当業者に教示する。そのような改良された活性は、改良された安定性、改良された生物利用性、および／または RNA i を媒介する細胞応答の改良された活性化を含むことができる。したがって、本明細書に記載される特定の態様は限定ではなく、当業者は、改良された RNA i 活性を有する siRNA 分子を同定するために、過度の実験なしに本明細書に記載される修飾の特定の組み合わせを試験しうることを容易に理解することができる。

【0402】

本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定の開示されていない任意の要素または限定なしでも適切に実施することができる。すなわち、例えば、本明細書における各例において、"・・・を含む"、"・・・から本質的になる"および"・・・からなる"との用語は、他の2つのいずれかと置き換えることができる。本明細書において用いられる用語および表現は、説明の用語として用いるものであり、限定ではない。そのような用語および表現の使用においては、示されかつ記載されている特徴またはその一部の等価物を排除することを意図するものではなく、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲中で種々の変更が可能であることが理解される。すなわち、好ましい態様および任意の特徴により本発明を特定の開示してきたが、当業者には本明細書に記載される概念の変更および変種が可能であり、そのような変更および変種も特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

【0403】

さらに、発明の特徴および観点がマーカッシュグループまたは他の代替グループの用語で記載されている場合、当業者は、本発明が、マーカッシュグループまたは他のグループの個々のメンバーまたはサブグループに関してもまた記載されていることを認識するであろう。

【0404】

表 1: VEGF および VEGFr 受託番号

NM_005429	Homo sapiens vascular endothelial growth factor C (VEGFC), mRNA gi 19924300 ref NM_005429.2 [19924300]
NM_003376	Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF), mRNA gi 19923239 ref NM_003376.2 [19923239]
AF095785	Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) gene, promoter region and partial cds gi 4154290 gb AF095785.1 [4154290]
NM_003377	Homo sapiens vascular endothelial growth factor B (VEGFB), mRNA gi 20070172 ref NM_003377.2 [20070172]
AF486837	Homo sapiens vascular endothelial growth factor isoform VEGF165 (VEGF) mRNA, complete cds gi 19909064 gb AF486837.1 [19909064]
AF468110	

Homo sapiens vascular endothelial growth factor B isoform (VEGFB) gene, complete cds, alternatively spliced
gi|18766397|gb|AF468110.1|[18766397]

AF437895

Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) gene, partial cds
gi|16660685|gb|AF437895.1|AF437895[16660685]

AY047581

Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA, complete cds
gi|15422108|gb|AY047581.1|[15422108]

AF063657

Homo sapiens vascular endothelial growth factor receptor (FLT1) mRNA, complete cds
gi|3132830|gb|AF063657.1|AF063657[3132830]

AF092127

Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) gene, partial sequence
gi|4139168|gb|AF092127.1|AF092127[4139168]

AF092126

Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) gene, 5' UTR
gi|4139167|gb|AF092126.1|AF092126[4139167]

AF092125	Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) gene, partial cds
gi 4139165 gb AF092125.1 AF092125[4139165]	
E15157	
Human VEGF mRNA	
gi 5709840 dbj E15157.1 pat JP 1998052285 2[5709840]	
E15156	
Human VEGF mRNA	
gi 5709839 dbj E15156.1 pat JP 1998052285 1[5709839]	
E14233	
Human mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), complete cds	
gi 5708916 dbj E14233.1 pat JP 1997286795 1[5708916]	
AF024710	
Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA, 3'UTR	
gi 2565322 gb AF024710.1 AF024710[2565322]	
AJ010438	
Homo sapiens mRNA for vascular endothelial growth factor, splicing variant VEGF183	
gi 3647280 emb AJ010438.1 HSA010438[3647280]	

【表 4】

AF098331	Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) gene, promoter, partial sequence gi 4235431 gb AF098331.1 AF098331[4235431]
AF022375	Homo sapiens vascular endothelial growth factor mRNA, complete cds gi 3719220 gb AF022375.1 AF022375[3719220]
AH006909	vascular endothelial growth factor {alternative splicing} [human, Genomic, 414 nt 5 segments] gi 1680143 gb AH006909.1 bbm 191843[1680143]
U01134	Human soluble vascular endothelial cell growth factor receptor (sflt) mRNA, complete cds gi 451321 gb U01134.1 U01134[451321]
E14000	Human mRNA for FLT gi 3252767 dbj E14000.1 pat JP 1997255700 1[3252767]
E13332	cDNA encoding vascular endodermal cell growth factor VEGF gi 3252137 dbj E13332.1 pat JP 1997173075 1[3252137]

10

20

30

40

【表 5】

【 0 4 0 9 】

E13256	
Human mRNA for FLT,complete cds	
gi 3252061 dbj E13256.1 pat JP 1997154588 1 3252061]	
AF063658	
Homo sapiens vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR) mRNA, complete cds	
gi 3132832 gb AF063658.1 AF063658[3132832]	
AJ000185	
Homo Sapiens mRNA for vascular endothelial growth factor-D	
gi 2879833 emb AJ000185.1 HSAJ185[2879833]	
D89630	
Homo sapiens mRNA for VEGF-D, complete cds	
gi 2780339 dbj D89630.1 [2780339]	
AF035121	
Homo sapiens KDR/flk-1 protein mRNA, complete cds	
gi 2655411 gb AF035121.1 AF035121[2655411]	
AF020393	
Homo sapiens vascular endothelial growth factor C gene, partial cds and 5' upstream region	
gi 2582366 gb AF020393.1 AF020393[2582366]	

【表 6】

Y08736	H.sapiens vegf gene, 3'UTR gi 1619596 emb Y08736.1 HSVEGF3UT[1619596]
X62568	H.sapiens vegf gene for vascular endothelial growth factor gi 37658 emb X62568.1 HSVEGF[37658]
X94216	H.sapiens mRNA for VEGF-C protein gi 1177488 emb X94216.1 HSVEGFC[1177488]
NM_002020	Homo sapiens fms-related tyrosine kinase 4 (FLT4), mRNA gi 4503752 ref NM_002020.1 [4503752]
NM_002253	Homo sapiens kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase) (KDR), mRNA gi 11321596 ref NM_002253.1 [11321596]

【表 7】

表 II: VEGF および VEGFr s1NA および標的配列

VEGFR1 gjl4503748|ref|NM_002019.1

位置	標的配列	配列 番号	上側 位置	上側配列 seq	配列 番号	下側 位置	下側配列	配列 番号
1	GCGGACACUCCUCUGGCU	1	1	GCGGACACUCCUCUGGCU	1	23	AGCGAGAGGAGUGUCCGC	428
19	UCCUCCCCGGCAGCGGCG	2	19	UCCUCCCCGGCAGCGGCG	2	41	CCGCCGUGCCGGGAGGA	429
37	GCGGUCUGGAGCGGCUCC	3	37	GCGGUCUGGAGCGGCUCC	3	59	GGAGCCCGCUCGAGCCGC	430
55	GCGGUCUGGAGCGGCUCC	4	55	GCGGUCUGGAGCGGCUCC	4	77	CCGUGCACCCGAGCCCGC	431
73	GCGGUCUGGAGCGGCUCC	5	73	GCGGUCUGGAGCGGCUCC	5	95	CGCCGCCAGGCCCGCUGGC	432
91	GAGGAUACCCGGGAAGU	6	91	GAGGAUACCCGGGAAGU	6	113	ACUCCCCGGGUAUCCUC	433
109	UGGUUGUCUCCUGGCUGA	7	109	UGGUUGUCUCCUGGCUGA	7	131	UCCAGCCAGGAGACAACA	434
127	AGCCGCGAGACGGGCGCUC	8	127	AGCCGCGAGACGGGCGCUC	8	149	GAGCCCGCUCUGCGGCU	435
145	CAGGGCGCGGCGGCGGCG	9	145	CAGGGCGCGGCGGCGGCG	9	167	CCGCCGCGGCGGCGGCG	436
163	GCGGCGAACGAGAGGACGG	10	163	GCGGCGAACGAGAGGACGG	10	185	CCGUCCUCUGUUCGCGC	437
181	GACUCUGGCGGCGGCGGCG	11	181	GACUCUGGCGGCGGCGGCG	11	203	CGACCGCGCGCGAGAGUC	438
199	GUUGCCGGGCGGAGCGGCG	12	199	GUUGCCGGGCGGAGCGGCG	12	221	CCGCGCUCGCGCGGCAAC	439
217	GGCACC GGCGAGCAGGCG	13	217	GGCACC GGCGAGCAGGCG	13	239	GGCCUGCUCGCGCGGUGCC	440
235	CGCGUCGCGCUCACCAUGG	14	235	CGCGUCGCGCUCACCAUGG	14	257	CCAUGGUGAGCGCGACGCG	441
253	GUCAGCUACUGGACACCG	15	253	GUCAGCUACUGGACACCG	15	275	CGGUGUCCAGUAGCUGAC	442
271	GGGUGCCUGCUGCGGCG	16	271	GGGUGCCUGCUGCGGCG	16	293	GCGCGACAGCAGGACCCC	443
289	CUGCUCAGCUGCUGCUC	17	289	CUGCUCAGCUGCUGCUC	17	311	GAAGCAGACAGCUGAGCAG	444
307	CUCACAGGAUCUAGUUCAG	18	307	CUCACAGGAUCUAGUUCAG	18	329	CUGAACUAGAUCCUGAG	445
325	GGUUCAAAAUAAAAGAU	19	325	GGUUCAAAAUAAAAGAU	19	347	GAUCUUUAAUUUUGAAC	446
343	CCUGAACUGAGUUUAAAAG	20	343	CCUGAACUGAGUUUAAAAG	20	365	CUUUUAAACUCAGUUCAGG	447
361	GGCACCAGCACAUCAUGC	21	361	GGCACCAGCACAUCAUGC	21	383	GCAUGAUGUGCUGGGUGCC	448
379	CAAGCAGGCCAGACACUGC	22	379	CAAGCAGGCCAGACACUGC	22	401	GCAUGUGUGGCGGCGUUG	449
397	CAUCUCCAAUGCAGGGGGG	23	397	CAUCUCCAAUGCAGGGGGG	23	419	CCCCCGCAGUUGGAGAU	450
415	GAAGCAGCCCAUAAUUGU	24	415	GAAGCAGCCCAUAAUUGU	24	437	ACCAUUUAGGGGCGUUC	451
433	UCUUUGCCUGAAUUGGUGA	25	433	UCUUUGCCUGAAUUGGUGA	25	455	UCACCAUUUAGGCAAGA	452
451	AGUAGGAAAGCGAAAGGC	26	451	AGUAGGAAAGCGAAAGGC	26	473	GCCUUCGCUUCCUUCU	453
469	CUGAGCAUAAUAAUUCUG	27	469	CUGAGCAUAAUAAUUCUG	27	491	CAGAUUAGUUAUUCUAG	454
487	GCCUGUGGAAGAAUUGGCA	28	487	GCCUGUGGAAGAAUUGGCA	28	509	UGCCAUUUCUUCACAGGC	455
505	AAACAAUUCUGCAGUACUU	29	505	AAACAAUUCUGCAGUACUU	29	527	AAGUACUGCAGAAUUGUU	456
523	UUAACCUUGAACACAGCUC	30	523	UUAACCUUGAACACAGCUC	30	545	GAGCUGUGUUAAGGUUAA	457

【 0 4 1 1 】

10

20

30

40

【表 8】

541	CAAGCAAACACACUGGCU	31	541	CAAGCAAACACACUGGCU	31	563	AGCCAGUGUGGUUUUGCUUG	458
559	UUCUACAGCUGCAAUAUC	32	559	UUCUACAGCUGCAAUAUC	32	581	GAUAUUUGCAGCUGUAGAA	459
577	CUAGCUGUACCUUACUCAA	33	577	CUAGCUGUACCUUACUCAA	33	599	UUGAAGUAGGUACAGCUAG	460
595	AAGAAGAAAGAAACAGAAU	34	595	AAGAAGAAAGAAACAGAAU	34	617	AUUCUGUUUCCUUCUUCUU	461
613	UCUGCAAUCUAUAUAUUA	35	613	UCUGCAAUCUAUAUAUUA	35	635	UAAAUAUAUAGAUUUGCAGA	462
631	AUAUGUAUACAGGUAGAC	36	631	AUAUGUAUACAGGUAGAC	36	653	GUUACCCUGUAUCACUAUU	463
649	CCUUUCGUAGAGAUUACA	37	649	CCUUUCGUAGAGAUUACA	37	671	UGUACAUCUCUACGAAAGG	464
667	AGUGAAAUCCCGAAAUUA	38	667	AGUGAAAUCCCGAAAUUA	38	689	UAAUUUCGGGGAUUUACAU	465
685	AUACACAUGACUGAAAGGAA	39	685	AUACACAUGACUGAAAGGAA	39	707	UUCUUUCAGUCAUGUGUAU	466
703	AGGGAGCUGUACUUCUU	40	703	AGGGAGCUGUACUUCUU	40	725	AGGGAUAGCAGGCUCCCU	467
721	UGCCGGUUACGUCACCUA	41	721	UGCCGGUUACGUCACCUA	41	743	UAGGUGACGUAAACCCGGA	468
739	AACAUCACUGUUAUUA	42	739	AACAUCACUGUUAUUA	42	761	UUAAGUAACAGUGAUUU	469
757	AAAAAGUUUCCACUUGACA	43	757	AAAAAGUUUCCACUUGACA	43	779	UGUCAAGUGGAAACUUUUU	470
775	ACUUUGAUCCCUUGAUGGAA	44	775	ACUUUGAUCCCUUGAUGGAA	44	797	UUCCAUCAGGGAUCAAAAGU	471
793	AAACGCAUAUUCUGGGACA	45	793	AAACGCAUAUUCUGGGACA	45	815	UGUCCAGAUUAUGCGUUU	472
811	AGUAGAAAGGCUUACA	46	811	AGUAGAAAGGCUUACA	46	833	UGAUGAAGCCCUUUCUACU	473
829	AUAUCAAUUGCAACGUACA	47	829	AUAUCAAUUGCAACGUACA	47	851	UGUACGUUGCAUUUGAUUA	474
847	AAAGAAAUAGGCUUUCUGA	48	847	AAAGAAAUAGGCUUUCUGA	48	869	UCAGAAAGCCCUUUUCUUU	475
865	ACCUGUGAAGCAACAGUCA	49	865	ACCUGUGAAGCAACAGUCA	49	887	UGACUGUUUGCUUCACAGGU	476
883	AAUGGGCAUUUGUAUAAGA	50	883	AAUGGGCAUUUGUAUAAGA	50	905	UCUUUAJACAAAUUGCCAUU	477
901	ACAAACUAUCUCACACAUC	51	901	ACAAACUAUCUCACACAUC	51	923	GAUGUGUGAGAUAGUUUGU	478
919	CGACAAACCAUAUACAUA	52	919	CGACAAACCAUAUACAUA	52	941	UGAUUGUAUUUGGUUUUGUCG	479
937	AUAGAUGUCCCAUAUAAGCA	53	937	AUAGAUGUCCCAUAUAAGCA	53	959	UGCUUAUUUGGACAUCUAU	480
955	ACACCAGCCCAUUAUUA	54	955	ACACCAGCCCAUUAUUA	54	977	AUUUGACUGGGCGUGUGUGU	481
973	UUACUUAGAGGCCAUUACUC	55	973	UUACUUAGAGGCCAUUACUC	55	995	GAGUAUAGCCCUUAAGUAA	482
991	CUUGUCCUCAAUUUGUACUG	56	991	CUUGUCCUCAAUUUGUACUG	56	1013	CAGUACAAUUGAGGACAAG	483
1009	GCUACCAUCCCUUGAACA	57	1009	GCUACCAUCCCUUGAACA	57	1031	UGUUCAAAGGAGUGGUAGC	484
1027	ACGAGAGUCAAUUGACCU	58	1027	ACGAGAGUCAAUUGACCU	58	1049	AGGUCAUUUGAACUCUCUGU	485
1045	UGGAGUUACCCUGAUGAAA	59	1045	UGGAGUUACCCUGAUGAAA	59	1067	UUUCAUCAGGGGAUACUCCA	486
1063	AAAAUAAGAGAGCUUCCG	60	1063	AAAAUAAGAGAGCUUCCG	60	1085	CGGAAGCUCUCUUAUUUUU	487
1081	GUAAAGCGACGAAUUGACC	61	1081	GUAAAGCGACGAAUUGACC	61	1103	GGUCAUUUCGUCGCCUJAC	488
1099	CAAAGCAUUCCCAUGCCA	62	1099	CAAAGCAUUCCCAUGCCA	62	1121	UGGCAUUGGGAUUUGCUUUG	489
1117	AACAUUUUCACAGUGUUC	63	1117	AACAUUUUCACAGUGUUC	63	1139	GAACACUGUAGAAUAUUGU	490
1135	CUUACUUAUUGACAAAAGC	64	1135	CUUACUUAUUGACAAAAGC	64	1157	GCAUUUUGUCAUAUAGUAAAG	491
1153	CAGAACAAAGACAAAAGGAC	65	1153	CAGAACAAAGACAAAAGGAC	65	1175	GUCCUUUGUCUUUGUUCUG	492
1171	CUUUUAUACUUGUCUGUJAA	66	1171	CUUUUAUACUUGUCUGUJAA	66	1193	UUACACGACAAGUAUAAAG	493

【 0 4 1 2 】

10

20

30

40

【表 9】

1189	AGGAGUGGACCAUCAUUA	67	1189	AGGAGUGGACCAUCAUUA	67	1211	UGAAUGAUGGUCCACUCCU	494
1207	AAUUCUGUUAACACCCUCAG	68	1207	AAUUCUGUUAACACCCUCAG	68	1229	CUGAGGUGUUAACAGAUUU	495
1225	GUGCAUUAUUAUGAUAAAG	69	1225	GUGCAUUAUUAUGAUAAAG	69	1247	CUUUAUCAUUAUUAUGCAC	496
1243	GCAUUCACACUGUGAAAC	70	1243	GCAUUCACACUGUGAAAC	70	1265	GUUUCACAGUGAUGAAUGC	497
1261	CAUCGAAACACGACGGUGC	71	1261	CAUCGAAACACGACGGUGC	71	1283	GCACCCUGCUGUUUUCGAUG	498
1279	CUUAGAACCGUAGCUGGCA	72	1279	CUUAGAACCGUAGCUGGCA	72	1301	UGCCAGCUACGGUUUUCAG	499
1297	AAGCGUCUUAACCGGCUCU	73	1297	AAGCGUCUUAACCGGCUCU	73	1319	AGAGCCGGUAAAGACCGCUU	500
1315	UCUAUGAAAGUGAAGGCAU	74	1315	UCUAUGAAAGUGAAGGCAU	74	1337	AUGCCUUCACUUUCAUAGA	501
1333	UUUCCUCGCGGAAAGUUG	75	1333	UUUCCUCGCGGAAAGUUG	75	1355	CAACUUCGCGGAGGGAAA	502
1351	GUUUGGUUAAAGAUUGGU	76	1351	GUUUGGUUAAAGAUUGGU	76	1373	ACCCAUUUIUUAACCAUAC	503
1369	UUACCUJCGACUGAGAAAU	77	1369	UUACCUJCGACUGAGAAAU	77	1391	AUUUCUCAGUCGACGGUAA	504
1387	UCUGCUCGCUAUUUUGACUC	78	1387	UCUGCUCGCUAUUUUGACUC	78	1409	GAGUCAAUUAGCGAGCAGA	505
1405	CGUGGCUACUCGUUUAUUA	79	1405	CGUGGCUACUCGUUUAUUA	79	1427	UAAUUAACGAGUAGCCACG	506
1423	AUCAAGGACGUAAACUGAAG	80	1423	AUCAAGGACGUAAACUGAAG	80	1445	CUUCAGUUAAGUCCUUGAU	507
1441	GAGGAUGCAGGGAAUUAUA	81	1441	GAGGAUGCAGGGAAUUAUA	81	1463	UAUAAUUCUCCUGCAUCCUC	508
1459	ACAAUCUUGCUGAGCAUAA	82	1459	ACAAUCUUGCUGAGCAUAA	82	1481	UUUAGCUCAGCAAGAUUGU	509
1477	AAACAGUCAAAUUGUUUA	83	1477	AAACAGUCAAAUUGUUUA	83	1499	UAAACACAUUUGACUGUUU	510
1495	AAAAACCUACUJGCCACUC	84	1495	AAAAACCUACUJGCCACUC	84	1517	GAGUGGCAGUGAGGUUUUU	511
1513	CUAAUUGUCAAUUGUAAAC	85	1513	CUAAUUGUCAAUUGUAAAC	85	1535	GUUUCACAUUGACAAUUAAG	512
1531	CCCCAGAUUUAACGAAAAGG	86	1531	CCCCAGAUUUAACGAAAAGG	86	1553	CCUUUUCGUAAAUUCUGGG	513
1549	GCCGUGUCAUCGUUUUCCAG	87	1549	GCCGUGUCAUCGUUUUCCAG	87	1571	CUGGAAACGAGUACACGGC	514
1567	GACCCGGCUCUCUACCCAC	88	1567	GACCCGGCUCUCUACCCAC	88	1589	GUGGGUAGAGAGCCGGGUC	515
1585	CUGGGCAGCAGACAAAUCC	89	1585	CUGGGCAGCAGACAAAUCC	89	1607	GGUUUUGUCUGCUGCCCCAG	516
1603	CUGACUUUGUACCGCAUUAUG	90	1603	CUGACUUUGUACCGCAUUAUG	90	1625	CAUAUGCGGUACAAGUACAG	517
1621	GGUAUCCCUCAACCCUACAA	91	1621	GGUAUCCCUCAACCCUACAA	91	1643	UUUAGGUUUGAGGGAUACC	518
1639	AUCAAGUGGUUCUGGCACC	92	1639	AUCAAGUGGUUCUGGCACC	92	1661	GGUGCCAGAACCCACUUGAU	519
1657	CCUGUAACCAUUAUUAU	93	1657	CCUGUAACCAUUAUUAU	93	1679	AAUGAUUAUUGGUUACAGGG	520
1675	UCCGAAGCAAGGUGUGACU	94	1675	UCCGAAGCAAGGUGUGACU	94	1697	AGUCACACCUUUGCUUCCGGA	521
1693	UUUUGUUCCAAUUAUUAAG	95	1693	UUUUGUUCCAAUUAUUAAG	95	1715	CUUCAUUAUUGGAACAAA	522
1711	GAGUCCUUUAUCCUGGAUG	96	1711	GAGUCCUUUAUCCUGGAUG	96	1733	CAUCCAGGAUAAAGGACUC	523
1729	GCUGACAGCAACAUUGGGAA	97	1729	GCUGACAGCAACAUUGGGAA	97	1751	UUCCAUUGUUGCUGUACAG	524
1747	AACAGAAUUGAGAGCAUCA	98	1747	AACAGAAUUGAGAGCAUCA	98	1769	UGAUGCUCUCAAUUUCUGUU	525
1765	ACUCAGCGCAUGGCAAUAA	99	1765	ACUCAGCGCAUGGCAAUAA	99	1787	UUUUAUGCCAUUGCGCUGAGU	526
1783	AUAGAAAGGAAAGAAUAAAGA	100	1783	AUAGAAAGGAAAGAAUAAAGA	100	1805	UCUUUAUUCUUUCCUUCUUAU	527
1801	AUGGCUAGCACCCUUGGUUG	101	1801	AUGGCUAGCACCCUUGGUUG	101	1823	CAACCAAGGUGGCUAGCCAU	528
1819	GUGGCUAGACUCUAGAAUUU	102	1819	GUGGCUAGACUCUAGAAUUU	102	1841	AAAUUCUAGAGUCAGCCAC	529

【表 10】

1837	UCUGGAAUUCUACAUUUGCA	103	1837	UCUGGAAUUCUACAUUUGCA	103	1859	UGCAAAUGUAGAUUCCAGA	530
1855	AUAGCUUCCAAUAAAGUUG	104	1855	AUAGCUUCCAAUAAAGUUG	104	1877	CAACUUAUUGGAAGCUAU	531
1873	GGGACUGUGGGAAGAAACA	105	1873	GGGACUGUGGGAAGAAACA	105	1895	UGUUUCUCCACAGUCC	532
1891	AUAAGCUUUUAUACACAG	106	1891	AUAAGCUUUUAUACACAG	106	1913	CUGUGAUUAAAGCUUUAU	533
1909	GAUGUGCCAAUUGGUUUC	107	1909	GAUGUGCCAAUUGGUUUC	107	1931	GAACCCAUUUGGCACAUC	534
1927	CAUGUUAACUUGGAAAAA	108	1927	CAUGUUAACUUGGAAAAA	108	1949	UUUUUCCAAAGUUAAACAU	535
1945	AUGCCGACGGAAGGAGAGG	109	1945	AUGCCGACGGAAGGAGAGG	109	1967	CCUCUCCUCCGUCGGCAU	536
1963	GACCUGAAACUGUCUUGCA	110	1963	GACCUGAAACUGUCUUGCA	110	1985	UGCAAGACAGUUUCAGGUC	537
1981	ACAGUUAACAAGUUCUUAU	111	1981	ACAGUUAACAAGUUCUUAU	111	2003	AUAAGAACUUGUUAACUGU	538
1999	UACAGAGACGUUAACUUGGA	112	1999	UACAGAGACGUUAACUUGGA	112	2021	UCCAAGUAACGUCUCUGUA	539
2017	AUUUACUGCGGACAGUUA	113	2017	AUUUACUGCGGACAGUUA	113	2039	UAACUGCCGACAGUAAAAU	540
2035	AAUACAGAAACAAGCACU	114	2035	AAUACAGAAACAAGCACU	114	2057	AGUGCAUUGUUCUGUUAU	541
2053	UACAGUUAUAGCAAGCAAA	115	2053	UACAGUUAUAGCAAGCAAA	115	2075	UUUGCUUGCUAAUACUGUA	542
2071	AAAUUGGCCAUACUAAGG	116	2071	AAAUUGGCCAUACUAAGG	116	2093	CCUAGUGAUGGCCAUUUU	543
2089	GAGCACUCCAUACUCUUA	117	2089	GAGCACUCCAUACUCUUA	117	2111	UAAGAGUGAUGGAGUGCUC	544
2107	AUUCUUACCAUCAUGAAUG	118	2107	AUUCUUACCAUCAUGAAUG	118	2129	CAUUCAUUGAUGGUAAGAU	545
2125	GUUUCUCCUGCAAGAUUCAG	119	2125	GUUUCUCCUGCAAGAUUCAG	119	2147	CUGAAUCUUGCAGGGAAAC	546
2143	GGCACCUAUGCCUGCAGAG	120	2143	GGCACCUAUGCCUGCAGAG	120	2165	CUCUGCAGGCAUAGGUGCC	547
2161	GCCAGGAUUGUAUACACAG	121	2161	GCCAGGAUUGUAUACACAG	121	2183	CUGUGUAUACAUUCCUGGC	548
2179	GGGGAAGAAAUCCUCCAGA	122	2179	GGGGAAGAAAUCCUCCAGA	122	2201	UCUGGAGGAUUUCUUCGCC	549
2197	AAGAAAGAAAUUACAAUCA	123	2197	AAGAAAGAAAUUACAAUCA	123	2219	UGAUUGUAUUUUCUUCUU	550
2215	AGAGAUACAGGAAGCACCAU	124	2215	AGAGAUACAGGAAGCACCAU	124	2237	AUGGUGCUUCCUGAUCUCU	551
2233	UACCUCCUGCGAAACCUCA	125	2233	UACCUCCUGCGAAACCUCA	125	2255	UGAGGUUUCGACGAGGUA	552
2251	AGUGAUCACACAGUGGCCA	126	2251	AGUGAUCACACAGUGGCCA	126	2273	UGGCCACUGUGUGAUCACU	553
2269	AUCAGCAGUUCACCCACUU	127	2269	AUCAGCAGUUCACCCACUU	127	2291	AAGUGGUGGAACUGCUGAU	554
2287	UUAGACUGUCAUGCUAAUG	128	2287	UUAGACUGUCAUGCUAAUG	128	2309	CAUAGCAUGACAGUCUAA	555
2305	GGUGUCCCGAGCCUCAGA	129	2305	GGUGUCCCGAGCCUCAGA	129	2327	UCUGAGGCUCGGGACACC	556
2323	AUCACUUGGUUAAAAACA	130	2323	AUCACUUGGUUAAAAACA	130	2345	UGUUUUUAAACCAAGUGAU	557
2341	AACCACAAAUACAAACAAG	131	2341	AACCACAAAUACAAACAAG	131	2363	CUUGUUGUAUUUUGUGGUU	558
2359	GAGCCUGGAUUUUUUUAG	132	2359	GAGCCUGGAUUUUUUUAG	132	2381	CUAAAAUAAUCCAGGCUC	559
2377	GGACCAGGAAGCAGCACGC	133	2377	GGACCAGGAAGCAGCACGC	133	2399	GCGUGCUGCUUCCUGGUCC	560
2395	CUGUUUAUUUAAAGAGUCA	134	2395	CUGUUUAUUUAAAGAGUCA	134	2417	UGACUCUUUCAAUAAACAG	561
2413	ACAGAAGAGGAUGAAGGUG	135	2413	ACAGAAGAGGAUGAAGGUG	135	2435	CACCUUCAUCCUUCUUGU	562
2431	GUCUAUCACUGCAAAAGCCA	136	2431	GUCUAUCACUGCAAAAGCCA	136	2453	UGGCUUUGCAGUGAUAGAC	563
2449	ACCAACCAGAAGGGCUCUG	137	2449	ACCAACCAGAAGGGCUCUG	137	2471	CAGAGCCCUUCUGGUUGGU	564
2467	GUGGAAAGUUCAGCAUACC	138	2467	GUGGAAAGUUCAGCAUACC	138	2489	GGUAUGCUGAACAUCUCCAC	565

【0414】

10

20

30

40

【表 1 1】

2485	CUCACUGUUCAAGGAACCU	139	2485	CUCACUGUUCAAGGAACCU	139	2507	AGGUUCCUUGAACAGUGAG	566
2503	UCGGACAAGUCUAUUCUGG	140	2503	UCGGACAAGUCUAUUCUGG	140	2525	CCAGAUUAGACUUGUCCGA	567
2521	GAGCUGAUCACUCUAACAU	141	2521	GAGCUGAUCACUCUAACAU	141	2543	AUGUUAGAGUGAUCAGCUC	568
2539	UGCACUGUGUGGCGUGCGA	142	2539	UGCACUGUGUGGCGUGCGA	142	2561	UCGCAGCCACACAGGUGCA	569
2557	ACUCUCUUCUGGCUCCUUAU	143	2557	ACUCUCUUCUGGCUCCUUAU	143	2579	AUAGGAGCCAGAAAGAGAGU	570
2575	UUAACCCUCCUUAUCCGAA	144	2575	UUAACCCUCCUUAUCCGAA	144	2597	UUCGGAUAAAGGAGGGUUA	571
2593	AAAAUGAAAGGUCUUCUU	145	2593	AAAAUGAAAGGUCUUCUU	145	2615	AAGAAGACCUUUUCAUUAU	572
2611	UCUGAAUAAAGACUGACU	146	2611	UCUGAAUAAAGACUGACU	146	2633	AGUCAGUCUUUAUUUCAGA	573
2629	UACCUAUCAAUUAUUAUGG	147	2629	UACCUAUCAAUUAUUAUGG	147	2651	CCAUUAUAAUUGAUAGGUA	574
2647	GACCCAGAUAAAGUUCUU	148	2647	GACCCAGAUAAAGUUCUU	148	2669	AAGGAACUUCUUCUGGGUC	575
2665	UUGGAUGAGCAGUGUGAGC	149	2665	UUGGAUGAGCAGUGUGAGC	149	2687	GCUCACACUGCUCAUCCAA	576
2683	CGGCUCUUUAUGAUGCCA	150	2683	CGGCUCUUUAUGAUGCCA	150	2705	UGGCAUCAUAAAGGAGCCG	577
2701	AGCAAGUGGGAGUUUGCCC	151	2701	AGCAAGUGGGAGUUUGCCC	151	2723	GGGCAACUCCACUUGCU	578
2719	CGGGAGAGACUUAACUGG	152	2719	CGGGAGAGACUUAACUGG	152	2741	CCAGUUUAAGUCUCUCGCCG	579
2737	GGCAAUACACUUGGAAGAG	153	2737	GGCAAUACACUUGGAAGAG	153	2759	CUCUCCAAAGUGAUUUGCC	580
2755	GGGGCUUUUGGAAAAGUGG	154	2755	GGGGCUUUUGGAAAAGUGG	154	2777	CCACUUUCCAAAAGCCCC	581
2773	GUUCAAGCAUCAGCAUUAU	155	2773	GUUCAAGCAUCAGCAUUAU	155	2795	CAAAUGCUGAUGCUUGAAC	582
2791	GGCAUUAAGAAUACACCUA	156	2791	GGCAUUAAGAAUACACCUA	156	2813	UAGGUGAUUUUCUUAUAGCC	583
2809	ACGUGCCGACUGUGGCUG	157	2809	ACGUGCCGACUGUGGCUG	157	2831	CAGCCACAGUCCGGCACGU	584
2827	GUGAAAUGCUGAAAAGAGG	158	2827	GUGAAAUGCUGAAAAGAGG	158	2849	CCUCUUUCAGCAUUAUUCAC	585
2845	GGGGCCACGGCCAGCGAGU	159	2845	GGGGCCACGGCCAGCGAGU	159	2867	ACUCGUGGGCCGUGGCCCC	586
2863	UACAAAGCUCUGAUGACUG	160	2863	UACAAAGCUCUGAUGACUG	160	2885	CAGUCAUCAGAGCUUUGUA	587
2881	GAGCUAAAUAUCUUGACCC	161	2881	GAGCUAAAUAUCUUGACCC	161	2903	GGGUCAAGAUUUUUUAGCUC	588
2899	CACAUUGGCCACCAUCUGA	162	2899	CACAUUGGCCACCAUCUGA	162	2921	UCAGAUUGGUGGCCAAUGUG	589
2917	AACGUGGUUAACCUUGCUGG	163	2917	AACGUGGUUAACCUUGCUGG	163	2939	CCAGCAGGUUAACCAAGU	590
2935	GGAGCCUGCACCAAGCAAG	164	2935	GGAGCCUGCACCAAGCAAG	164	2957	CUUGCUUGGUGCAGGCUC	591
2953	GGAGGCCUCUGAUGGUGA	165	2953	GGAGGCCUCUGAUGGUGA	165	2975	UCACCAUCAGAGGCCUCC	592
2971	AUUGUUGAAUACUGCAAU	166	2971	AUUGUUGAAUACUGCAAU	166	2993	AUUUGCAGUUAUUAACAAU	593
2989	UAUGGAAUUCUCCCAACU	167	2989	UAUGGAAUUCUCCCAACU	167	3011	AGUUGGAGAGAUUUCCAUA	594
3007	UACCUCAAGAGCAACGUG	168	3007	UACCUCAAGAGCAACGUG	168	3029	CACGUUUGCUCUUGAGGUA	595
3025	GACUUAUUUUUUCUCAACA	169	3025	GACUUAUUUUUUCUCAACA	169	3047	UGUUGAGAAAAAUUAGUC	596
3043	AAGGAUGCAGCACAACACA	170	3043	AAGGAUGCAGCACAACACA	170	3065	UGUGUAGUGCUGCAUCCUU	597
3061	AUGGAGCCUAAGAAAGAAA	171	3061	AUGGAGCCUAAGAAAGAAA	171	3083	UUUCUUUCUUAAGGCUCU	598
3079	AAAUGGAGCCAGGCCUGG	172	3079	AAAUGGAGCCAGGCCUGG	172	3101	CCAGGCCUGGCUCUUAUUU	599
3097	GAACAAGGCAAGAAACCAA	173	3097	GAACAAGGCAAGAAACCAA	173	3119	UUGGUUUCUUGCCUUGUUC	600
3115	AGACUAGAUAGCGUCACCA	174	3115	AGACUAGAUAGCGUCACCA	174	3137	UGGUGACGCUAUCUAGUCU	601

【表 1 2】

3133	AGCAGCGAAAGCUUUUGCGA	175	3133	AGCAGCGAAAGCUUUUGCGA	175	3155	UCGCAAAGCUUUUGCGUGCU	602
3151	AGCUCGCGCUUUCAGGAAG	176	3151	AGCUCGCGCUUUCAGGAAG	176	3173	CUUCCUGAAAGCCGAGGCU	603
3169	GAUAAAAGUCUGAGUGAUG	177	3169	GAUAAAAGUCUGAGUGAUG	177	3191	CAUCACUCAGACUUAUUC	604
3187	GUUGAGGAAGAGGAGGAUU	178	3187	GUUGAGGAAGAGGAGGAUU	178	3209	AUCCUCCUCCUCCUCCAA	605
3205	UCUGACGGUUUCUACAAGG	179	3205	UCUGACGGUUUCUACAAGG	179	3227	CCUUGUAGAAACCGUCAGA	606
3223	GAGCCCAUCACUAGGAAG	180	3223	GAGCCCAUCACUAGGAAG	180	3245	CUCCAUAGUGAUGGGCUC	607
3241	GAUCUGAUUUCUACAGUU	181	3241	GAUCUGAUUUCUACAGUU	181	3263	AACUGUAGAAAUACAGAU	608
3259	UUUCAAUGGCCAGAGGCA	182	3259	UUUCAAUGGCCAGAGGCA	182	3281	UGCCUUGGCCACUUGAAA	609
3277	AUGGAGUCCUGUCUCCCA	183	3277	AUGGAGUCCUGUCUCCCA	183	3299	UGGAAGACAGGAACUCCAU	610
3295	AGAAAGUGCAUUAUCGGG	184	3295	AGAAAGUGCAUUAUCGGG	184	3317	CCCGAUGAUUGCACUUUCU	611
3313	GACCUGGCAGCGAGAAACA	185	3313	GACCUGGCAGCGAGAAACA	185	3335	UGUUUCUCGUGGCCAGGUC	612
3331	AUUCUUUAUCUGAGAACA	186	3331	AUUCUUUAUCUGAGAACA	186	3353	UGUUCUCAGAUAAAAGAAU	613
3349	AACGUGGUGAAGAUUUUG	187	3349	AACGUGGUGAAGAUUUUG	187	3371	CACAAUUCUACCCACGUU	614
3367	GAUUUUGCCUUGCCCGG	188	3367	GAUUUUGCCUUGCCCGG	188	3389	CCCGGCAAGGCCAAAUC	615
3385	GAUUAUUAAGAACCCCG	189	3385	GAUUAUUAAGAACCCCG	189	3407	CGGGUUCUUAUAAAUAUC	616
3403	GAUUAUGUGAGAAAGGAG	190	3403	GAUUAUGUGAGAAAGGAG	190	3425	CUCUUUUCUCACAUAAUC	617
3421	GAUACUCGACUCCUCUGA	191	3421	GAUACUCGACUCCUCUGA	191	3443	UCAGAGGAAGUCGAGUAUC	618
3439	AAUUGGAUGGCUCGCCAAU	192	3439	AAUUGGAUGGCUCGCCAAU	192	3461	AUUCGGGAGGCCAUCCAUUU	619
3457	UCUAUCUUUGACAAAUCU	193	3457	UCUAUCUUUGACAAAUCU	193	3479	AGAUUUUGUCAAAAGAUAGA	620
3475	UACAGCACCAAGAGCGACG	194	3475	UACAGCACCAAGAGCGACG	194	3497	CGUCGCUCUUGGUGCUGUA	621
3493	GUGUGGUCUUAACGGAGUAU	195	3493	GUGUGGUCUUAACGGAGUAU	195	3515	AUACUCCGUAAGACCACAC	622
3511	UUGCUGUGGGAAUUCUUCU	196	3511	UUGCUGUGGGAAUUCUUCU	196	3533	AGAAGAUUJCCACAGCAA	623
3529	UCCUAGGUGGGUUCUCCAU	197	3529	UCCUAGGUGGGUUCUCCAU	197	3551	AUGGAGACCCACCUCUAGGA	624
3547	UACCCAGGAGUACAAUUG	198	3547	UACCCAGGAGUACAAUUG	198	3569	CCAUUUGUACUCCUGGGUA	625
3565	GAUGAGGACUUAUUGCAGUC	199	3565	GAUGAGGACUUAUUGCAGUC	199	3587	GACUGCAAAAGUCCUCAUC	626
3583	CGCCUGAGGGAAGGCAUGA	200	3583	CGCCUGAGGGAAGGCAUGA	200	3605	UCAUGCCUUJCCUCCAGGCG	627
3601	AGGAUGAGAGCUCUCCUGAGU	201	3601	AGGAUGAGAGCUCUCCUGAGU	201	3623	ACUCAGGAGCUCUCAUCCU	628
3619	UACUCUACUCCUGAAAUCU	202	3619	UACUCUACUCCUGAAAUCU	202	3641	AGAUUUCAGGAGUAGAGUA	629
3637	UAUCAGAUCAUGCUGGACU	203	3637	UAUCAGAUCAUGCUGGACU	203	3659	AGUCCAGCAUGAUCUGAUA	630
3655	UGCUGGCACAGAGACCCAA	204	3655	UGCUGGCACAGAGACCCAA	204	3677	UUGGGUCUCUGUGCCAGCA	631
3673	AAAGAAAGGCCAAGAUUUG	205	3673	AAAGAAAGGCCAAGAUUUG	205	3695	CAAUCUUGGCCUUCUUCU	632
3691	GCAGAACUUGUGGAAAAAC	206	3691	GCAGAACUUGUGGAAAAAC	206	3713	GUUUUCCACAAAGUUCUGC	633
3709	CUAGGUGAUUUGCUUCAAG	207	3709	CUAGGUGAUUUGCUUCAAG	207	3731	CUUGAAGCAAAUACACCUAG	634
3727	GCAAAUGUACAACAGGAUG	208	3727	GCAAAUGUACAACAGGAUG	208	3749	CAUCCUGUUGUACAUUUGC	635
3745	GGUAAAGACUACAUCGCCAA	209	3745	GGUAAAGACUACAUCGCCAA	209	3767	UUGGGAUGUAGUCUUAUACC	636
3763	AUCAAUGCCAUACUGACAG	210	3763	AUCAAUGCCAUACUGACAG	210	3785	CUGUCAGUAUGGCAUUGAU	637

【表 1 3】

3781	GGAAUAGUGGGUUUACAU	211	3781	GGAAUAGUGGGUUUACAU	211	3803	AUGUAAACCCACUUAUUC	638
3799	UACUCAACUCCUGCCUUCU	212	3799	UACUCAACUCCUGCCUUCU	212	3821	AGAAGCAGGAGUUGAGUA	639
3817	UCUGAGGACUUCUUAAGG	213	3817	UCUGAGGACUUCUUAAGG	213	3839	CCUUGAAGAAAGUCCUCAGA	640
3835	GAAAGUAAUUCAGCUCCGA	214	3835	GAAAGUAAUUCAGCUCCGA	214	3857	UCGGAGCUGAAAUACUUC	641
3853	AAGUUAAUUCAGGAAGCU	215	3853	AAGUUAAUUCAGGAAGCU	215	3875	AGCUUCCUGAAUUAACU	642
3871	UCUGAUGAUGCAGAUUG	216	3871	UCUGAUGAUGCAGAUUG	216	3893	CAUAUCUGACAUCACAGA	643
3889	GUAAUUGCUUUAAGUUA	217	3889	GUAAUUGCUUUAAGUUA	217	3911	UGAACUUGAAAGCAUUAAC	644
3907	AUGAGCCUGGAAAGAAUA	218	3907	AUGAGCCUGGAAAGAAUA	218	3929	UGAUUUCUUCAGGCUCAU	645
3925	AAACCUUUGAAGAACUUU	219	3925	AAACCUUUGAAGAACUUU	219	3947	AAAGUUCUUCAAAGGUUUU	646
3943	UUACCGAAUGCCACCUC	220	3943	UUACCGAAUGCCACCUC	220	3965	UGGAGGUGGCAUUCGGUAA	647
3961	AUGUUUGAUGACUACCG	221	3961	AUGUUUGAUGACUACCG	221	3983	CCUGUAGUCAUCAACAU	648
3979	GGCGACAGCAGCACUCUG	222	3979	GGCGACAGCAGCACUCUG	222	4001	ACAGAGUGCUGCUGUCGCC	649
3997	UUGGCCUCUCCCAUGCUG	223	3997	UUGGCCUCUCCCAUGCUG	223	4019	UCAGCAUGGGAGAGGCCAA	650
4015	AAGCGUUCACCCUGGACUG	224	4015	AAGCGUUCACCCUGGACUG	224	4037	CAGUCCAGGUGAAGCGCUU	651
4033	GACAGCAACCCCAAGGCCU	225	4033	GACAGCAACCCCAAGGCCU	225	4055	AGCCUUGGGUUGCUGUC	652
4051	UCGCUCAAGAUUGACUUG	226	4051	UCGCUCAAGAUUGACUUG	226	4073	UCAAGUCAUUCUUGAGCGA	653
4069	AGAGUACCAAGUAAAGUA	227	4069	AGAGUACCAAGUAAAGUA	227	4091	UACUUUACUGGUUACUCU	654
4087	AAGGAGUCGGGCGUGUCUG	228	4087	AAGGAGUCGGGCGUGUCUG	228	4109	CAGACAGCCCGACUCCUU	655
4105	GAUGUCAGAGGCCCGAGUU	229	4105	GAUGUCAGAGGCCCGAGUU	229	4127	AACUGGCCUUGCUGACAU	656
4123	UUCUGCCAUUCCAGCUGUG	230	4123	UUCUGCCAUUCCAGCUGUG	230	4145	CACAGCUGGAUUGGCAGAA	657
4141	GGGCACGUCAGCGAAGGCA	231	4141	GGGCACGUCAGCGAAGGCA	231	4163	UGCCUUCGUGACGUGGCC	658
4159	AAGCGCAGGUUACCCUACG	232	4159	AAGCGCAGGUUACCCUACG	232	4181	CGUAGGUGAACCCUGCGCUU	659
4177	GACCACGUGAGCUGGAAA	233	4177	GACCACGUGAGCUGGAAA	233	4199	UUUCCAGCUCAGCGUGGUC	660
4195	AGGAAAUCGCGUGCUGCU	234	4195	AGGAAAUCGCGUGCUGCU	234	4217	AGCAGCACGCGAUUUCU	661
4213	UCCCGCCCCCAGACUACA	235	4213	UCCCGCCCCCAGACUACA	235	4235	UGUAGUCUGGGGCGGGGA	662
4231	AACUCGGUGGUCCUGUACU	236	4231	AACUCGGUGGUCCUGUACU	236	4253	AGUACAGGACCCAGAGUU	663
4249	UCCACCCACCCCAUCUAGA	237	4249	UCCACCCACCCCAUCUAGA	237	4271	UCUAGAUGGGUGGGGUGGA	664
4267	AGUUUGACACGAAGCCUUA	238	4267	AGUUUGACACGAAGCCUUA	238	4289	UAAGGCUUCUGUCAAACU	665
4285	AUUUCUAGAAGCACAUGUG	239	4285	AUUUCUAGAAGCACAUGUG	239	4307	CACAUGUGCUUCUAGAAA	666
4303	GUUUUUUACCCCCAGGAA	240	4303	GUUUUUUACCCCCAGGAA	240	4325	UUCUUGGGGUAUAAAUAAC	667
4321	AACUAGCUUUUGCCAGUUA	241	4321	AACUAGCUUUUGCCAGUUA	241	4343	AUACUGGCAAAAAGCUAGUU	668
4339	UUAUGCAUAUAUAAAGUUA	242	4339	UUAUGCAUAUAUAAAGUUA	242	4361	UAAACUUAUAUUGCAUAA	669
4357	ACACCUUUUACUUAUCCAU	243	4357	ACACCUUUUACUUAUCCAU	243	4379	CAUGGAAAGAUAAAGGUGU	670
4375	GGGAGCCAGCUGCUUUUUUG	244	4375	GGGAGCCAGCUGCUUUUUUG	244	4397	CAAAAAGCAGCUGGCUCCC	671
4393	GUGAUUUUUUUAUUAJUGC	245	4393	GUGAUUUUUUUAUUAJUGC	245	4415	GCACUUAUAAAAAAUACAC	672
4411	CUUUUUUUUUUUGACUAA	246	4411	CUUUUUUUUUUUGACUAA	246	4433	GUUAGUCAAAAAAAAAG	673

【表 1 4】

4429	CAAGAAUGUAACUCCAGAU	247	4429	CAAGAAUGUAACUCCAGAU	247	4451	AUCUGGAGUUAUAUUCUUG	674
4447	UAGAGAAAUAGUGACAAGU	248	4447	UAGAGAAAUAGUGACAAGU	248	4469	ACUUGUCACUAUUUCUCUA	675
4465	UGAAGAACACUACUGCUAA	249	4465	UGAAGAACACUACUGCUAA	249	4487	UUAGCAGUAGUUGUUCUUA	676
4483	AAUCCUCAUGUUAUCUCAGU	250	4483	AAUCCUCAUGUUAUCUCAGU	250	4505	ACUGAGUAACAUGAGGAUU	677
4501	UGUUAAGAGAAAUCCUCCU	251	4501	UGUUAAGAGAAAUCCUCCU	251	4523	AGGAAGGAUUUCUCUAACA	678
4519	UAAACCCAAUGACUCCCU	252	4519	UAAACCCAAUGACUCCCU	252	4541	AGGGAAGUACUUGGGUUA	679
4537	UGCUCCAAACCCCGCCACC	253	4537	UGCUCCAAACCCCGCCACC	253	4559	GGUGCGGGGGUUGGAGCA	680
4555	CUCAGGGCACGCAGGACCA	254	4555	CUCAGGGCACGCAGGACCA	254	4577	UGGUCCUGCGUGCCUGAG	681
4573	AGUUUGAUUGAGGAGCUGC	255	4573	AGUUUGAUUGAGGAGCUGC	255	4595	GCAGCUCCUCAUAUCAAACU	682
4591	CACUGAUCACCCAAUGCAU	256	4591	CACUGAUCACCCAAUGCAU	256	4613	UAGCAUUGGGUGAUCAGUG	683
4609	UCACGUACCCACUGGGCC	257	4609	UCACGUACCCACUGGGCC	257	4631	GGCCAGUGGGGUAUCUGA	684
4627	CAGCCUUGCAGCCCAAAAC	258	4627	CAGCCUUGCAGCCCAAAAC	258	4649	GUUUUGGCGUGCAGGGCUG	685
4645	CCCAGGGCAACAAGCCCGU	259	4645	CCCAGGGCAACAAGCCCGU	259	4667	ACGGGCUUUGUUGCCUGGG	686
4663	UUAGCCCCAGGGGAUCACU	260	4663	UUAGCCCCAGGGGAUCACU	260	4685	AGUGAUCCCCUGGGGCUAA	687
4681	UGGCUGGCCUGAGCAACAU	261	4681	UGGCUGGCCUGAGCAACAU	261	4703	AUGUUGCUCAGGCCAGCCA	688
4699	UCUCGGGAGUCCUCUAGCA	262	4699	UCUCGGGAGUCCUCUAGCA	262	4721	UGCUAGAGGACUCCCGAGA	689
4717	AGGCCUAAGACAUUGUGAGG	263	4717	AGGCCUAAGACAUUGUGAGG	263	4739	CCUCACAUUGUJAGGCCU	690
4735	GAGGAAAAGGAAAAAAGC	264	4735	GAGGAAAAGGAAAAAAGC	264	4757	GCUUUUUUCCUJUUCUC	691
4753	CAAAAAGCAAGGGAGAAAA	265	4753	CAAAAAGCAAGGGAGAAAA	265	4775	UUUUCUCCUUGCUUUUUG	692
4771	AGAGAAACCGGAGAGGC	266	4771	AGAGAAACCGGAGAGGC	266	4793	GCCUUCUCCCGGUUUCUCU	693
4789	CAUGAGAAAGAAUUUGAGA	267	4789	CAUGAGAAAGAAUUUGAGA	267	4811	UCUCAAUUUCUUCUCAUG	694
4807	ACGCACCAUGUGGGCACGG	268	4807	ACGCACCAUGUGGGCACGG	268	4829	CCGUGCCCAUUGGUGCGU	695
4825	GAGGGGACGGGCGUCAGC	269	4825	GAGGGGACGGGCGUCAGC	269	4847	GCUGAGCCCGUCCCCUUC	696
4843	CAUUGCCAUUUCAGUGGCU	270	4843	CAUUGCCAUUUCAGUGGCU	270	4865	AGCCACUGAAAAUUGCAUUG	697
4861	UUCGAGCUCUGACCCUUC	271	4861	UUCGAGCUCUGACCCUUC	271	4883	GAAGGGUCAGAGCUGGGAA	698
4879	CUACAUUUGAGGGCCACGC	272	4879	CUACAUUUGAGGGCCACGC	272	4901	GCUGGGCCUCAAUUGUAG	699
4897	CCAGGAGCAGUAGGACAGC	273	4897	CCAGGAGCAGUAGGACAGC	273	4919	GCUGUCCAUCUGCUCUUGG	700
4915	CGAUGAGGGACAUUUUCU	274	4915	CGAUGAGGGACAUUUUCU	274	4937	AGAAAUGUCCUCCUACUG	701
4933	UGGAUUCUGGAGGCAAGA	275	4933	UGGAUUCUGGAGGCAAGA	275	4955	UCUUGCCUCCCGAGAAUCCA	702
4951	AAAAGGACAAAUUUCUUU	276	4951	AAAAGGACAAAUUUCUUU	276	4973	AAAAGAUUUUGUCCUUUU	703
4969	UUUGGAACUAAAGCAAAU	277	4969	UUUGGAACUAAAGCAAAU	277	4991	AAUUUGCUUUUAGUUCCAA	704
4987	UUUAGACCUUUUACCUAUGG	278	4987	UUUAGACCUUUUACCUAUGG	278	5009	CCAUAGGUAAAAGGUCUAAA	705
5005	GAAGUGGUUUCUUAUGUCCAU	279	5005	GAAGUGGUUUCUUAUGUCCAU	279	5027	AUGGACAUAGAACCAUUC	706
5023	UUCUCAUUCUGGCAUGUU	280	5023	UUCUCAUUCUGGCAUGUU	280	5045	AACAUGCCACGAAUAGAA	707
5041	UUUGAUUUUGUAGCACUGAG	281	5041	UUUGAUUUUGUAGCACUGAG	281	5063	CUCAGUGCUACAAUCAA	708
5059	GGGUGGCACUCAACUCUGA	282	5059	GGGUGGCACUCAACUCUGA	282	5081	UCAGAGUUUGAGUGCCACCC	709

【表 1 5】

5077	AGCCCAUACUUUUGGCUCC	283	5077	AGCCCAUACUUUUGGCUCC	283	5099	GGAGCCAAAAGUAUGGGCU	710
5095	CUCUAGUAAGAUGCACUGA	284	5095	CUCUAGUAAGAUGCACUGA	284	5117	UCAGUGCAUCUUAACUAGAG	711
5113	AAAACUUAAGCCAGAGUUAG	285	5113	AAAACUUAAGCCAGAGUUAG	285	5135	CUAACUCUGGCUAAGUUUU	712
5131	GGUUGUCUCCAGGCCAUGA	286	5131	GGUUGUCUCCAGGCCAUGA	286	5153	UCAUGGCCUGGAGACAACC	713
5149	AUGGCCUUAACACUGAAAAU	287	5149	AUGGCCUUAACACUGAAAAU	287	5171	AUUUUCAGUGUAAGGCCAU	714
5167	UGUCACAUUCUUAUUUGGG	288	5167	UGUCACAUUCUUAUUUGGG	288	5189	CCCAAAUAGAAUGUGACA	715
5185	GUUUUAUUAUAGUCCAG	289	5185	GUUUUAUUAUAGUCCAG	289	5207	CUGGACUUAUUAUUAUAC	716
5203	GACACUUAACUCAUUUCU	290	5203	GACACUUAACUCAUUUCU	290	5225	AGAAUUGAGUUAAAGUGUC	717
5221	UUGGUUUUAUUCUGUUUUG	291	5221	UUGGUUUUAUUCUGUUUUG	291	5243	CAAAACAGAAUAAUACCAA	718
5239	GCACAGUUAUGUGAAAG	292	5239	GCACAGUUAUGUGAAAG	292	5261	CUUUCACAAUAAACUGUC	719
5257	GAAAGCUGAGAAGAAUGAA	293	5257	GAAAGCUGAGAAGAAUGAA	293	5279	UUCAUUCUUCACAGCUUUC	720
5275	AAUUGCAGUCCUGAGGAGA	294	5275	AAUUGCAGUCCUGAGGAGA	294	5297	UCUCCUCAGGACUGCAUUU	721
5293	AGUUUUCUCCAUACAATAA	295	5293	AGUUUUCUCCAUACAATAA	295	5315	UUUUGAUUGGAGAAAAACU	722
5311	ACGAGGGCUGAUGGAGGAA	296	5311	ACGAGGGCUGAUGGAGGAA	296	5333	UUCUCCAUACAGCCUUCGU	723
5329	AAAAGGUCAAUAAAGGUCAA	297	5329	AAAAGGUCAAUAAAGGUCAA	297	5351	UUGACCUUAUUGACCUUUU	724
5347	AGGGAAGACCCCGUCUCUA	298	5347	AGGGAAGACCCCGUCUCUA	298	5369	UAGAGACGGGUCUUCUCCU	725
5365	AUACCAACCAAAACCAUUC	299	5365	AUACCAACCAAAACCAUUC	299	5387	GAUUUGGUUUUGGUUGGUU	726
5383	CACCAACACAGUUUGGACC	300	5383	CACCAACACAGUUUGGACC	300	5405	GGUCCCAACUGUGUUGGUG	727
5401	CCAAACACAGGAAGUCAG	301	5401	CCAAACACAGGAAGUCAG	301	5423	CUGACUCCUGUGUJUUGG	728
5419	GUCACGUUUCCUUUUCAUU	302	5419	GUCACGUUUCCUUUUCAUU	302	5441	AAUGAAAAGGAAACGUGAC	729
5437	UUAUUGGGGAUCCACUAU	303	5437	UUAUUGGGGAUCCACUAU	303	5459	AUAGUGGAUACCCCAUUA	730
5455	UCUCACACUAUUCUGAAAG	304	5455	UCUCACACUAUUCUGAAAG	304	5477	CUUUCAGAUUAGUGUGAGA	731
5473	GGAUGUGGAAGAGCAUUAG	305	5473	GGAUGUGGAAGAGCAUUAG	305	5495	CUAAUGCUCUCCACAUCC	732
5491	GCUGGCGCAUUAUAAAGCAC	306	5491	GCUGGCGCAUUAUAAAGCAC	306	5513	GUGCUUAUUAUGCGCCAGC	733
5509	CUUUAAGCUCCUUGAGUAA	307	5509	CUUUAAGCUCCUUGAGUAA	307	5531	UUACUCAAGGAGCUUAAAG	734
5527	AAAAGGUGUAUGUAAUUU	308	5527	AAAAGGUGUAUGUAAUUU	308	5549	AAUUACAUAACCAUCCUUU	735
5545	UAUGCAAGGAUUAUUCUCCA	309	5545	UAUGCAAGGAUUAUUCUCCA	309	5567	UGGAGAAUACCUUGCAUA	736
5563	AGUUGGACUCAGGAUUAU	310	5563	AGUUGGACUCAGGAUUAU	310	5585	AAUAUCCUGAGUCCCAACU	737
5581	UAGUUAUAGAGCCAUACU	311	5581	UAGUUAUAGAGCCAUACU	311	5603	AGUGAUGGCUCAUUAACUA	738
5599	UAGAAGAAAGCCCAUUAU	312	5599	UAGAAGAAAGCCCAUUAU	312	5621	AAAAUGGCUUUUUCUUCUA	739
5617	UCAACUGCUUUUAAAACUUG	313	5617	UCAACUGCUUUUAAAACUUG	313	5639	CAAGUUUCAAAGCAGUUGA	740
5635	GCCUGGGUCUGAGCAUGA	314	5635	GCCUGGGUCUGAGCAUGA	314	5657	UCAUGCUCAGACCCAGGC	741
5653	AUGGGAUAGGGAGACAGG	315	5653	AUGGGAUAGGGAGACAGG	315	5675	CCUGUCUCCUUAUCCCAU	742
5671	GGUAGGAAAGGGCGCCUAC	316	5671	GGUAGGAAAGGGCGCCUAC	316	5693	GUAGGCGCCCUUUCUAC	743
5689	CUCUUCAGGGUCUAAAGAU	317	5689	CUCUUCAGGGUCUAAAGAU	317	5711	AUCUUUAGACCCUUGAAG	744
5707	UCAAGUGGGCCUUGGAUCG	318	5707	UCAAGUGGGCCUUGGAUCG	318	5729	CGAUCCAAGGCCACUUGA	745

【表 1 6】

5725	GCUAAGCUGGCUCUGUUUG	319	5725	GCUAAGCUGGCUCUGUUUG	319	5747	CAACAGAGCCAGCUUAGC	746
5743	GAUGCUAUUUUAGCAAGUU	320	5743	GAUGCUAUUUUAGCAAGUU	320	5765	AACUUGCAUAAUAGCAUC	747
5761	UAGGGUCUAUGUAUUUAGG	321	5761	UAGGGUCUAUGUAUUUAGG	321	5783	CCUAAAUACAUAGACCCUA	748
5779	GAUGCGCCUACUCUUCAGG	322	5779	GAUGCGCCUACUCUUCAGG	322	5801	CCUGAAGAGUAGGCGCAUC	749
5797	GGUCUAAAGAUCAAGUGGG	323	5797	GGUCUAAAGAUCAAGUGGG	323	5819	CCCACUUGAUUUUAGACC	750
5815	GCCUUGGAUCGCUAAGCUG	324	5815	GCCUUGGAUCGCUAAGCUG	324	5837	CAGCUUAGCGAUCCAAAGGC	751
5833	GGCUCUGUUUGAUGCUAUU	325	5833	GGCUCUGUUUGAUGCUAUU	325	5855	AUAGCAUCAAACAGAGCC	752
5851	UUAUGCAAGUUAGGGUCUA	326	5851	UUAUGCAAGUUAGGGUCUA	326	5873	UAGACCCUAACUUGCAUAA	753
5869	AUGUAUUUAGGAUGUCUG	327	5869	AUGUAUUUAGGAUGUCUG	327	5891	GCAGACAUCUUAUUAU	754
5887	CACCUUCUGCAGCCAGUCA	328	5887	CACCUUCUGCAGCCAGUCA	328	5909	UGACUGGCUGCAGAGGUG	755
5905	AGAAGCUGGAGAGGCAACA	329	5905	AGAAGCUGGAGAGGCAACA	329	5927	UGUUGCCUCUCCAGCUUCU	756
5923	AGUGGAUUGCUGCUUCUUG	330	5923	AGUGGAUUGCUGCUUCUUG	330	5945	CAAGAAGCAGCAAUCCACU	757
5941	GGGAGAAAGAGUAUGCUUC	331	5941	GGGAGAAAGAGUAUGCUUC	331	5963	GAAGCAUACUCUUCUCCCC	758
5959	CCUUUUAUCCAUUGUAUUU	332	5959	CCUUUUAUCCAUUGUAUUU	332	5981	AAAUUACAUGGAUAAAAGG	759
5977	UAACUGUAGAACCUGAGCU	333	5977	UAACUGUAGAACCUGAGCU	333	5999	AGCUCAGGUUCUACAGUUA	760
5995	UCUAAGUAACCGAAGAAUG	334	5995	UCUAAGUAACCGAAGAAUG	334	6017	CAUUCUUCGGUUAUUAUA	761
6013	GUAGCCUCUGUUCUUAUG	335	6013	GUAGCCUCUGUUCUUAUG	335	6035	CAUAAAGAACAGAGGCAUAC	762
6031	GUGCCACAUCUUGUUAUA	336	6031	GUGCCACAUCUUGUUAUA	336	6053	UUAACAAGGAUGUGGCAC	763
6049	AAGGCUCUCUGUAUGAAGA	337	6049	AAGGCUCUCUGUAUGAAGA	337	6071	UCUUCAUACAGAGAGCCUU	764
6067	AGAUGGGACCGUACUACAGC	338	6067	AGAUGGGACCGUACUACAGC	338	6089	GCUGAUGACGGUCCCAUCU	765
6085	CACAUUCCCUAGUGAGCCU	339	6085	CACAUUCCCUAGUGAGCCU	339	6107	AGGCUCACUAGGGAAUGUG	766
6103	UACUGGCUCUCCUGGACGCG	340	6103	UACUGGCUCUCCUGGACGCG	340	6125	CCGUGCCAGGAGCCAGUA	767
6121	GCUUUUGUGGAAGACUCAC	341	6121	GCUUUUGUGGAAGACUCAC	341	6143	GUGAGUCUUCACAAAAGC	768
6139	CUAGCCAGAAGAGAGGAGU	342	6139	CUAGCCAGAAGAGAGGAGU	342	6161	ACUCCUCUCUUCUGGCUAG	769
6157	UGGGACAGUCCUCCACC	343	6157	UGGGACAGUCCUCCACC	343	6179	GGUGGAGAGGACUGUCCCA	770
6175	CAAGAUCAAUCCAAACA	344	6175	CAAGAUCAAUCCAAACA	344	6197	UGUUUGGAUUUAGAUUUG	771
6193	AAAAGCAGGCUAGAGCCAG	345	6193	AAAAGCAGGCUAGAGCCAG	345	6215	CUGGCUCUAGCCUGCUUUU	772
6211	GAAGAGAGGACAAAUUUU	346	6211	GAAGAGAGGACAAAUUUU	346	6233	AAAGAUUUGUCCUUCUUC	773
6229	UGUUGUCCUUCUUCUUAAC	347	6229	UGUUGUCCUUCUUCUUAAC	347	6251	GUAAAAGAGAGGAACAACA	774
6247	CACAUACGCAACCCACCUG	348	6247	CACAUACGCAACCCACCUG	348	6269	CAGGUGGUUUGCGUAUGUG	775
6265	GUGACAGCUGGCAAUUUUA	349	6265	GUGACAGCUGGCAAUUUUA	349	6287	UAAAAUUGCCAGCUGUCAC	776
6283	AUAAAAUCAGGUAACUGGAA	350	6283	AUAAAAUCAGGUAACUGGAA	350	6305	UUCCAGUUAACCGAUUUUAU	777
6301	AGGAGGUUAAACUCAGAAA	351	6301	AGGAGGUUAAACUCAGAAA	351	6323	UUUCUGAGUUUAACCUCCU	778
6319	AAAAGAAGACCUCAGUCAA	352	6319	AAAAGAAGACCUCAGUCAA	352	6341	UUUGACUGAGGUUCUUCUUU	779
6337	AUUCUCUACUUUUUUUUUU	353	6337	AUUCUCUACUUUUUUUUUU	353	6359	AAAAAAAAGUAGAGAAU	780
6355	UUUUUUUCCAAAUACAGAU	354	6355	UUUUUUUCCAAAUACAGAU	354	6377	UAUCUGAUUUUGGAAAAAA	781

【表 17】

6373	AAUAGCCCGCAAAUAGUG	355	6373	AAUAGCCCGCAAAUAGUG	355	6395	CACUAAUUUGCUGGGCUAUU	782
6391	GAUAACAAUAAACCUUA	356	6391	GAUAACAAUAAACCUUA	356	6413	UAAGGUUUUAUUUGUUAUC	783
6409	AGCUGUUCAGUCUUGAUU	357	6409	AGCUGUUCAGUCUUGAUU	357	6431	AAUCAAGACAUGAACAGCU	784
6427	UUCAAUAAUAAUUCUUA	358	6427	UUCAAUAAUAAUUCUUA	358	6449	UUAAGAAUUAUUUAUUGAA	785
6445	AUCAUUAAGAGACCAUAAU	359	6445	AUCAUUAAGAGACCAUAAU	359	6467	AUUUUGGUCUCUUAAUUGAU	786
6463	UAAAUACUCCUUUUAAGA	360	6463	UAAAUACUCCUUUUAAGA	360	6485	UCUUGAAAGGAGUAUUUA	787
6481	AGAAAAGCAAAACCAUUA	361	6481	AGAAAAGCAAAACCAUUA	361	6503	CUAAUGGUUUUGCUUUUCU	788
6499	GAUUUGUUAUCUCAGCUCCU	362	6499	GAUUUGUUAUCUCAGCUCCU	362	6521	AGGAGCUGAGUAACAUAUC	789
6517	UUCAAACUCAGGUUUUGUAG	363	6517	UUCAAACUCAGGUUUUGUAG	363	6539	CUACAAACCCUGAGUUUGAA	790
6535	GCAUACAUGAGUCCAUCCA	364	6535	GCAUACAUGAGUCCAUCCA	364	6557	UGGAUGGACUCUAUUAUGC	791
6553	AUCAGUCAAGAAUGGUUC	365	6553	AUCAGUCAAGAAUGGUUC	365	6575	GAACCAUUCUUUGACUGAU	792
6571	CCAUCUGGAGUCUUAUUGU	366	6571	CCAUCUGGAGUCUUAUUGU	366	6593	ACAUUAAGACUCCAGAUUG	793
6589	UAGAAAGAAAUUGGAGAC	367	6589	UAGAAAGAAAUUGGAGAC	367	6611	GUCUCCAUUUUUCUUUCUA	794
6607	CUUGUAAUUAUGAGCUAGU	368	6607	CUUGUAAUUAUGAGCUAGU	368	6629	ACUAGCUCAUUAUUACAAG	795
6625	UUACAAAGUGCUUUGUUAU	369	6625	UUACAAAGUGCUUUGUUAU	369	6647	AUGAACAAAGCACUUUGUAA	796
6643	UUAAAAUAGCACUGAAAAU	370	6643	UUAAAAUAGCACUGAAAAU	370	6665	AUUUUCAGUGCUAUUUUUA	797
6661	UUGAAACAUGAAUUAACUG	371	6661	UUGAAACAUGAAUUAACUG	371	6683	CAGUUAUUUCAUGUUUUA	798
6679	GAUAAUUAUCCAAUUAU	372	6679	GAUAAUUAUCCAAUUAU	372	6701	AAUAGAUUGGAUUAUUUAUC	799
6697	UGCCAUUUUAUGACAAAAU	373	6697	UGCCAUUUUAUGACAAAAU	373	6719	AUUUUGUCUAAUUAUGGCA	800
6715	UGGUUGGCACUAAACAAGA	374	6715	UGGUUGGCACUAAACAAGA	374	6737	UCUUUGUUAUGUGCCAAACA	801
6733	AACGAGCACUCCUUUCAG	375	6733	AACGAGCACUCCUUUCAG	375	6755	CUGAAAGGAAGUGUCUGUU	802
6751	GAGUUUCUGAGAUAAUGUA	376	6751	GAGUUUCUGAGAUAAUGUA	376	6773	UACAUUAUCUCAGAAACUC	803
6769	ACGUGGAACAGUCUGGGUG	377	6769	ACGUGGAACAGUCUGGGUG	377	6791	CACCCAGACUGUUCACAGU	804
6787	GGAAUGGGGCGUAAACCAU	378	6787	GGAAUGGGGCGUAAACCAU	378	6809	AUGGUUUCAGCCCCAUUCC	805
6805	UGUGCAAGUCUGUGUCUUG	379	6805	UGUGCAAGUCUGUGUCUUG	379	6827	CAAGACACAGACUUGCACA	806
6823	GUCAGUCCAAAGAGUGACA	380	6823	GUCAGUCCAAAGAGUGACA	380	6845	UGUCACUUCUUGGACUGAC	807
6841	ACCGAGAUUUAAUUUUA	381	6841	ACCGAGAUUUAAUUUUA	381	6863	CUAAAAUUAACAUUCUGGU	808
6859	GGACCCGUGCCUUUGUUC	382	6859	GGACCCGUGCCUUUGUUC	382	6881	GAAACAAGGCACGGGUCCC	809
6877	CCUAGCCCAACAAGAUUGCA	383	6877	CCUAGCCCAACAAGAUUGCA	383	6899	UGCAUUCUUGUGGGCUAGG	810
6895	AAACAUCAAACAGAUACUC	384	6895	AAACAUCAAACAGAUACUC	384	6917	GAGUAUCUGUUUGAUUUUU	811
6913	CGCUAGCCUUAUUAAUUU	385	6913	CGCUAGCCUUAUUAAUUU	385	6935	AAUUUAAUUGAGGCUAGCG	812
6931	UGAUUAAAGGAGGAGUGCA	386	6931	UGAUUAAAGGAGGAGUGCA	386	6953	UGCACUCCUCCUUUAUUA	813
6949	AUCUUUGGCCGACAGUGGU	387	6949	AUCUUUGGCCGACAGUGGU	387	6971	ACCACUGUCGGCCAAAGAU	814
6967	UGUAACUGUGUGUGUGUGU	388	6967	UGUAACUGUGUGUGUGUGU	388	6989	ACACACACACACAGUUACA	815
6985	UGUGUGUGUGUGUGUGUGU	389	6985	UGUGUGUGUGUGUGUGUGU	389	7007	ACACACACACACACACACA	816
7003	UGUGUGUGUGUGUGUGUGG	390	7003	UGUGUGUGUGUGUGUGUGG	390	7025	CCACACCCACACACACACA	817

【表 18】

7021	GGUGUAUGUGUGUUUUGUG	391	7021	GGUGUAUGUGUGUUUUGUG	391	7043	CACAAAAACACACAUACACC	818
7039	GCAUAAACUAAUUAAGGAAA	392	7039	GCAUAAACUAAUUAAGGAAA	392	7061	UUUCCUUAAAAUAGUUAUGC	819
7057	ACUGGAAUUUUAAGUUAC	393	7057	ACUGGAAUUUUAAGUUAC	393	7079	GUAAUUUUAAAAUCCAGU	820
7075	CUUUUAUACAAACCAAGAA	394	7075	CUUUUAUACAAACCAAGAA	394	7097	UUCUUGGUUUUGUAUAAAG	821
7093	AUAUAUGCUACAGAUUAA	395	7093	AUAUAUGCUACAGAUUAA	395	7115	UUAUAUCUGUAGCAUUAU	822
7111	AGACAGACAUUGUUUGGUC	396	7111	AGACAGACAUUGUUUGGUC	396	7133	GACCAACCAUGUCUGUCU	823
7129	CCUAUUAUUCUAGUCAUGA	397	7129	CCUAUUAUUCUAGUCAUGA	397	7151	UCAUGACUAGAAUUAUAGG	824
7147	AUGAAUGUAUUUUGUAUAC	398	7147	AUGAAUGUAUUUUGUAUAC	398	7169	GUUAACAAAAUACAUUCAU	825
7165	CCAUCUUCAUAAUAAUAC	399	7165	CCAUCUUCAUAAUAAUAC	399	7187	GUUAUUUAUUAUGAAGUUGG	826
7183	CUUAAAAUUAUUCUUAU	400	7183	CUUAAAAUUAUUCUUAU	400	7205	AUUAAGAAUUAUUUUAAG	827
7201	UUGGGAUUUGUAAUCGUAC	401	7201	UUGGGAUUUGUAAUCGUAC	401	7223	GUACGAUUACAAUCCCAA	828
7219	CCAACUUAUUGAUAAACU	402	7219	CCAACUUAUUGAUAAACU	402	7241	AGUUUAUCAAUUAAGUUGG	829
7237	UUGGCAACUGCUUUUAUGU	403	7237	UUGGCAACUGCUUUUAUGU	403	7259	ACAUAAAGCAGUUGCCAA	830
7255	UUCUGUCUCCUCCAUAAA	404	7255	UUCUGUCUCCUCCAUAAA	404	7277	UUUAUGGAAGGAGACAGAA	831
7273	AUUUUUCAAUUAUUAUUA	405	7273	AUUUUUCAAUUAUUAUUA	405	7295	AUUAGUAUUUUUGAAAAAU	832
7291	UCAACAAAGAAAAAGCUCU	406	7291	UCAACAAAGAAAAAGCUCU	406	7313	AGAGCUUUUUUCUUUUGUA	833
7309	UUUUUUUCCUAAAAUAAA	407	7309	UUUUUUUCCUAAAAUAAA	407	7331	UUUAUUUUAGGAAAAAAA	834
7327	ACUCAAAUUUAUCCUUGUU	408	7327	ACUCAAAUUUAUCCUUGUU	408	7349	AACAAGGAUAAAUUUGAGU	835
7345	UUAGAGCAGAGAAAAUUA	409	7345	UUAGAGCAGAGAAAAUUA	409	7367	UAAUUUUUCUCUGCUCUAA	836
7363	AAGAAAAACUUUGAAUUGG	410	7363	AAGAAAAACUUUGAAUUGG	410	7385	CCAUUUCAAAGUUUUUCUU	837
7381	GUCUCAAAAAUUGCUAAA	411	7381	GUCUCAAAAAUUGCUAAA	411	7403	UUUAGCAUUUUUUUGAGAC	838
7399	AUAUUUCAAUUGGAAACU	412	7399	AUAUUUCAAUUGGAAACU	412	7421	AGUUUCCAUUUGAAAAUUA	839
7417	UAAUGUUUAGUUUAGCUGA	413	7417	UAAUGUUUAGUUUAGCUGA	413	7439	UCAGCUAAACUAAUUAUUA	840
7435	AUUGUAUGGGUUUUUCGAA	414	7435	AUUGUAUGGGUUUUUCGAA	414	7457	UUCGAAAAACCCCAUACAAU	841
7453	ACUUUACAUUUUUGUUUG	415	7453	ACUUUACAUUUUUGUUUG	415	7475	CAACAAAAAGUGAAAGGU	842
7471	GUUUUACCAUUAUUCACAAC	416	7471	GUUUUACCAUUAUUCACAAC	416	7493	GUUGUGAAAAUAGGUAAAAAC	843
7489	CUGUGAAAAUUGCCAAUUA	417	7489	CUGUGAAAAUUGCCAAUUA	417	7511	UUUUUGGCAUUUUAACACAG	844
7507	AUUCUGUCCAUUAAAAUG	418	7507	AUUCUGUCCAUUAAAAUG	418	7529	CAUUUUCAUUGGACACAGAAU	845
7525	GCAAAUUAUCCAGUGUAGA	419	7525	GCAAAUUAUCCAGUGUAGA	419	7547	UCUACACUGGACACAGAAU	846
7543	AUAUAUUUGACCAUACCCC	420	7543	AUAUAUUUGACCAUACCCC	420	7565	GGUGAUGGUCUAAUUAUUA	847
7561	CUAUGGAUUAUUGGCUAGUU	421	7561	CUAUGGAUUAUUGGCUAGUU	421	7583	AACUAGCCAAUUAUCCAUAG	848
7579	UUUGCCUUUAUUAAGCAA	422	7579	UUUGCCUUUAUUAAGCAA	422	7601	UUUGCUUUAUUAAGGCAAA	849
7597	AUUCAUUUUCAGCCUGAAUG	423	7597	AUUCAUUUUCAGCCUGAAUG	423	7619	CAUUCAGGCUGAAAAUUAU	850
7615	GUCUGCCUUAUUAUUCUCU	424	7615	GUCUGCCUUAUUAUUCUCU	424	7637	AGAGAAUUAUUAAGGCAGAC	851
7633	UGCUCUUUGUAUUCUCCUU	425	7633	UGCUCUUUGUAUUCUCCUU	425	7655	AAGGAGAAUACAAAGAGCA	852
7651	UUGAACCCGUUAAAAACAUC	426	7651	UUGAACCCGUUAAAAACAUC	426	7673	GAUGUUUUAAACGGGUUCAA	853

【0422】

10

20

30

40

【表 19】

位置	標的配列	配列番号	上側位置	上側配列 seq	配列番号	下側位置	下側配列	配列番号
7662	AAACAUCUUGGACACUC	427	7662	AAAACAUCUUGGACACUC	427	7684	GAGUGCCACAGGAUUGUUU	854
VEGFR2 gj 11321596 ref NM_002253.1								
1	ACUGAGUCCCGGACCCCG	855	1	ACUGAGUCCCGGACCCCG	855	23	CGGGUCCCCGGACUCAGU	1179
19	GGGAGAGCGGUCAGUGUGU	856	19	GGGAGAGCGGUCAGUGUGU	856	41	ACACACUGACCGCUCUCCC	1180
37	UGGUCGUCGCUUUCUCU	857	37	UGGUCGUCGCUUUCUCU	857	59	AGAGAAACGACGACCA	1181
55	UGCCUGCGCCGGGCAUCAC	858	55	UGCCUGCGCCGGGCAUCAC	858	77	GUGAUGCCCGCGCAGGCA	1182
73	CUUGGCGCCGACAGAAAGU	859	73	CUUGGCGCCGACAGAAAGU	859	95	ACUUUCUGCGCGCGCAAG	1183
91	UCCGUCUGGACCCUGGAU	860	91	UCCGUCUGGACCCUGGAU	860	113	AUCCAGGCUGCCAGACGGA	1184
109	UAUCCUCUCCUACCGGCAC	861	109	UAUCCUCUCCUACCGGCAC	861	131	GUGCCGGUAGGAGAGGAUA	1185
127	CCGCGAGACGCCCCUGCAG	862	127	CCGCGAGACGCCCCUGCAG	862	149	CUGCAGGGCGCUCUGCGGG	1186
145	GCCGCCGUCGCGCCCGCGG	863	145	GCCGCCGUCGCGCCCGCGG	863	167	CCGGCGCCGACCGCGCGC	1187
163	GGCUCUCCUAGCCUUGCGG	864	163	GGCUCUCCUAGCCUUGCGG	864	185	CGCACAGGGCUAGGGAGCC	1188
181	GCUAACUGUCCUGCGCUG	865	181	GCUAACUGUCCUGCGCUG	865	203	CAGCGCAGGACAGUUGAGC	1189
199	GCGGGUGCCGCGAGUUC	866	199	GCGGGUGCCGCGAGUUC	866	221	GGAACUCGCGGACCCCGC	1190
217	CACUCCGCGCCUCCUUCU	867	217	CACUCCGCGCCUCCUUCU	867	239	AGAAAGGCGCGGAGGUG	1191
235	UCUAGACAGGCGCUGGGAG	868	235	UCUAGACAGGCGCUGGGAG	868	257	CUCCAGCGCCUGUCUAGA	1192
253	GAAAGAACCGGCUCCCGAG	869	253	GAAAGAACCGGCUCCCGAG	869	275	CUCCGGAGCGGUUCUUUC	1193
271	GUUCUGGGCAUUUCGCCCG	870	271	GUUCUGGGCAUUUCGCCCG	870	293	CGGGCGAAUUGCCCAGAAC	1194
289	GGCUCGAGGUGCAGGAUGC	871	289	GGCUCGAGGUGCAGGAUGC	871	311	GCAUCCUGCACCUUGCUCUG	1195
307	CAGAGCAAGGUGCUGCUGG	872	307	CAGAGCAAGGUGCUGCUGG	872	329	CCAGCAGCACCUUGCUCUG	1196
325	GCCGUCGCCUUGUGGCUUC	873	325	GCCGUCGCCUUGUGGCUUC	873	347	AGAGCCACAGGGCGACGGC	1197
343	UGCUGGAGACCCGGGCCG	874	343	UGCUGGAGACCCGGGCCG	874	365	CGGCCCGGUCUCCACGCA	1198
361	GCCUCUGGGUUUGCCUA	875	361	GCCUCUGGGUUUGCCUA	875	383	UAGGCAAAACCCACAGAGGC	1199
379	AGUUUUCUCUUAUCUGC	876	379	AGUUUUCUCUUAUCUGC	876	401	GCAGAUCAAGAGAAACACU	1200
397	CCCAGGCUCAGCAUACAAA	877	397	CCCAGGCUCAGCAUACAAA	877	419	UUUGUAUGCUGAGCCUGGG	1201
415	AAAGACAUACUUAACAAUUA	878	415	AAAGACAUACUUAACAAUUA	878	437	UAAUUGUAAGUAUGUCUUU	1202
433	AAGGCUAUAACAACUCUUC	879	433	AAGGCUAUAACAACUCUUC	879	455	GAAGAGUUGUAUUAAGCCUU	1203
451	CAAAUUAUUUGCAGGGGAC	880	451	CAAAUUAUUUGCAGGGGAC	880	473	GUCCCCUGCAAGUAUUUG	1204
469	CAGAGGGACUUGGACUGGC	881	469	CAGAGGGACUUGGACUGGC	881	491	GCCAGUCCAAGUCCUCUG	1205
487	CUUUGGCCCAUAUAUCAGA	882	487	CUUUGGCCCAUAUAUCAGA	882	509	UCUGAUUAUUGGGCCAAAG	1206
505	AGUGGCAGUGAGCAAAAGG	883	505	AGUGGCAGUGAGCAAAAGG	883	527	CCCUUGCUCACUGCCACU	1207
523	GUGGAGGUGACUGAGUGCA	884	523	GUGGAGGUGACUGAGUGCA	884	545	UGCACUCAGUACCCUCCAC	1208

【表 2 0】

541	AGCGAUGGCCUCUCUGUA	885	541	AGCGAUGGCCUCUCUGUA	885	563	UACAGAAGAGGCCAUCGCU	1209
559	AAGACACUCACAAUCCAA	886	559	AAGACACUCACAAUCCAA	886	581	UUGGAAUUGAGUGUCUU	1210
577	AAAGUGAUCGGAAUAGACA	887	577	AAAGUGAUCGGAAUAGACA	887	599	UGUCAUUCCGAUCACUUU	1211
595	ACUGGAGCCUACAAGUGCU	888	595	ACUGGAGCCUACAAGUGCU	888	617	AGCACUUGUAGGCUCACGU	1212
613	UUCUACCGGGAAACUGACU	889	613	UUCUACCGGGAAACUGACU	889	635	AGUCAGUUUCCCGUAGAA	1213
631	UUGGCCUCGGUCAUUUAUG	890	631	UUGGCCUCGGUCAUUUAUG	890	653	CAUAAAUGACCGAGGCCAA	1214
649	GUCUAUGUUAAGAUAUACA	891	649	GUCUAUGUUAAGAUAUACA	891	671	UGUAUUCUUGAAACAUAGAC	1215
667	AGAUCUCCAUUUUAUUGCUU	892	667	AGAUCUCCAUUUUAUUGCUU	892	689	AAGCAAUAAAUGGAGAUUCU	1216
685	UCUGUUAGUGACCAACAUG	893	685	UCUGUUAGUGACCAACAUG	893	707	CAUGUUGGUCACUAACAGA	1217
703	GGAGUCGUGUACAUUACUG	894	703	GGAGUCGUGUACAUUACUG	894	725	CAGUAAUGUACACGACUCC	1218
721	GAGAACAAAAACAAAACUG	895	721	GAGAACAAAAACAAAACUG	895	743	CAGUUUUGUUUUUUGUUCUC	1219
739	GUGGUGAUUCCAUUGUCUG	896	739	GUGGUGAUUCCAUUGUCUG	896	761	CGAGACAUGGAAUACCCAC	1220
757	GGGUCCAUUUCAAUUCUCA	897	757	GGGUCCAUUUCAAUUCUCA	897	779	UGAGAUUUUGAAAUGGACCC	1221
775	AACGUGUCACUUUGUGCAA	898	775	AACGUGUCACUUUGUGCAA	898	797	UUGCACAAAGUGACACGUU	1222
793	AGAUACCCAGAAAAGAGAU	899	793	AGAUACCCAGAAAAGAGAU	899	815	AUCUCUUUUCUGGGUAUCU	1223
811	UUUGUUCUGAUGGUAACA	900	811	UUUGUUCUGAUGGUAACA	900	833	UGUUACCAUCAGGAAACAA	1224
829	AGAAUUCUGGGACAGCA	901	829	AGAAUUCUGGGACAGCA	901	851	UGCUGUCCCGAGGAAAUUCU	1225
847	AAGAAGGGCUUUACUAUUC	902	847	AAGAAGGGCUUUACUAUUC	902	869	GAAUAGUAAAGCCCUUCUU	1226
865	CCAGCUACAUGAUCAGCU	903	865	CCAGCUACAUGAUCAGCU	903	887	AGCUGAUCUAGUAGCUGGG	1227
883	UAUGCUGGCAUGGUCUUCU	904	883	UAUGCUGGCAUGGUCUUCU	904	905	AGAAGACCAUGCCAGCAUA	1228
901	UGUGAAGCAAAAAUUAUG	905	901	UGUGAAGCAAAAAUUAUG	905	923	CAUUAUUUUUGCUUCACA	1229
919	GAUGAAAGUUACCAGUCUA	906	919	GAUGAAAGUUACCAGUCUA	906	941	UAGACUGGUAACUUUUAUC	1230
937	AUUAUGUACAUAGUUGUCG	907	937	AUUAUGUACAUAGUUGUCG	907	959	CGACAACUAUGUACAUAAU	1231
955	GUUGUAGGGUAUAGGAUUU	908	955	GUUGUAGGGUAUAGGAUUU	908	977	AAAUCCUAUACCCUACAAC	1232
973	UAUGAUGGGUUCUGAGUC	909	973	UAUGAUGGGUUCUGAGUC	909	995	GACUCAGAACCACAUCAUA	1233
991	CCGUCUCAUGGAAUUGAAC	910	991	CCGUCUCAUGGAAUUGAAC	910	1013	GUUCAAUUCCAUAGAGACGG	1234
1009	CUAUCUGUUGGAGAAAAGC	911	1009	CUAUCUGUUGGAGAAAAGC	911	1031	GCUUUUCUCCCAACAGAUAG	1235
1027	CUUGUCUUAUUUUGUACAG	912	1027	CUUGUCUUAUUUUGUACAG	912	1049	CUGUACAUIUUAAGACAAG	1236
1045	GCAAGAACUGAACUAAUUG	913	1045	GCAAGAACUGAACUAAUUG	913	1067	CAUUUAGUUCAGUUCUUGC	1237
1063	GUGGGAUUUGACUUAACU	914	1063	GUGGGAUUUGACUUAACU	914	1085	AGUUGAAGUCUAAUCCCCAC	1238
1081	UGGGAAUACCCUUCUUCGA	915	1081	UGGGAAUACCCUUCUUCGA	915	1103	UCGAAGAAGGGUUAUCCCA	1239
1099	AAGCAUCAGCAUAAGAAAC	916	1099	AAGCAUCAGCAUAAGAAAC	916	1121	GUUUCUUAUGCUGAUGCUU	1240
1117	CUUGUAAACCGAGACCUAU	917	1117	CUUGUAAACCGAGACCUAU	917	1139	UUAGGUCUCGGUUUUAACAAG	1241
1135	AAACCCAGUCUGGGAGUG	918	1135	AAACCCAGUCUGGGAGUG	918	1157	CACUCCAGACUGGGUUUUU	1242
1153	GAGUUGAAGAAUUUUUUGA	919	1153	GAGUUGAAGAAUUUUUUGA	919	1175	UCAAAAAUUUCUUCUUCUC	1243
1171	AGCACCUUAACUAUAGAUG	920	1171	AGCACCUUAACUAUAGAUG	920	1193	CAUCUAUAGUUAAGGUGCU	1244

【表 2 1】

1189	GGUGUAACCCGGAGUGACC	921	1189	GGUGUAACCCGGAGUGACC	921	1211	GGUCACUCCGGGUUACACC	1245
1207	CAAGGAUUGUACACCCUGUG	922	1207	CAAGGAUUGUACACCCUGUG	922	1229	CACAGGUGUACAAUCCUUG	1246
1225	GCAGCAUCCAGUGGGCUGA	923	1225	GCAGCAUCCAGUGGGCUGA	923	1247	UCAGCCACUGGAUGCUGC	1247
1243	AUGACCAAGAAGAACAGCA	924	1243	AUGACCAAGAAGAACAGCA	924	1265	UGCUGUUCUUCUUGGUCAU	1248
1261	ACAUUUGUCAGGGUCCAU	925	1261	ACAUUUGUCAGGGUCCAU	925	1283	CAUGGACCCUGACAAUUGU	1249
1279	GAAAAACCUUUGUUGCUU	926	1279	GAAAAACCUUUGUUGCUU	926	1301	AAGCAACAAAAGGUUUUUC	1250
1297	UUUGGAAGUGGCAUGGAAU	927	1297	UUUGGAAGUGGCAUGGAAU	927	1319	AUCCAUCCACUCCUCCAAA	1251
1315	UCUCUGGUGGAAGCCACGG	928	1315	UCUCUGGUGGAAGCCACGG	928	1337	CCUGGCUUCCACCAGAGA	1252
1333	GUGGGGAGCGUGUCAGAA	929	1333	GUGGGGAGCGUGUCAGAA	929	1355	UUCUGACACGCUCCCCAC	1253
1351	AUCCUUGCGAAGUACCUUG	930	1351	AUCCUUGCGAAGUACCUUG	930	1373	CAAGGUACUUCGCAGGGAU	1254
1369	GGUUAACCCACCCCCAGAAA	931	1369	GGUUAACCCACCCCCAGAAA	931	1391	UUUCUGGGGUGGGUAAACC	1255
1387	AUAAAUGGUUAAAAAUG	932	1387	AUAAAUGGUUAAAAAUG	932	1409	CAUUUUUAUACCAUUUUU	1256
1405	GGAAUACCCCUUGAGUCCA	933	1405	GGAAUACCCCUUGAGUCCA	933	1427	UGGACUCAAGGGGUUUUCC	1257
1423	AAUCACACAUAUAAAGCGG	934	1423	AAUCACACAUAUAAAGCGG	934	1445	CCGUUUUAUUGUGUGAUU	1258
1441	GGGCAUGUACUGACGAUUA	935	1441	GGGCAUGUACUGACGAUUA	935	1463	UAUCGUCAGUACAUGCC	1259
1459	AUGGAUGUGAGUAAAGAG	936	1459	AUGGAUGUGAGUAAAGAG	936	1481	CUCUUACUCACUCCUCCAU	1260
1477	GACACAGGAAUUAACACUG	937	1477	GACACAGGAAUUAACACUG	937	1499	CAGUGAAUUUCCUGUGUC	1261
1495	GUCAUCCUUAACCAUCCCA	938	1495	GUCAUCCUUAACCAUCCCA	938	1517	UGGGAUUGGUAAAGGAUGAC	1262
1513	AUUUCAAAGGAGAGCAGA	939	1513	AUUUCAAAGGAGAGCAGA	939	1535	UCUGCUUUCUCCUUUGAAA	1263
1531	AGCCAUGUGGUCUCUCUGG	940	1531	AGCCAUGUGGUCUCUCUGG	940	1553	CCAGAGAGACCAUAGGCU	1264
1549	GUUGUGUAUGUCCACCC	941	1549	GUUGUGUAUGUCCACCC	941	1571	GGGUGGGACAUACACAAC	1265
1567	CAGAUUGGUGAGAAUUC	942	1567	CAGAUUGGUGAGAAUUC	942	1589	GAGAUUUCUACCAUUCUG	1266
1585	CUAAUCUCUCCUGUGGAU	943	1585	CUAAUCUCUCCUGUGGAU	943	1607	AAUCCACAGGAGAGAUUAG	1267
1603	UCCUACAGUACGGCACCA	944	1603	UCCUACAGUACGGCACCA	944	1625	UGGUGCCGUACUGGUAGGA	1268
1621	ACUCAAACGCUGACAUUA	945	1621	ACUCAAACGCUGACAUUA	945	1643	UACAUUCAGCGUUGAGU	1269
1639	ACGGUCUAUGCCAUUCCUC	946	1639	ACGGUCUAUGCCAUUCCUC	946	1661	GAGGAUUGGCAUAGACCGU	1270
1657	CCCCGCAUCACAUCCACU	947	1657	CCCCGCAUCACAUCCACU	947	1679	AGUGGAUGUGAUUGCGGGG	1271
1675	UGGAUUUGGCAGUUGGAGG	948	1675	UGGAUUUGGCAGUUGGAGG	948	1697	CCUCCAACUGGCCAAUACCA	1272
1693	GAAGAGUGCGCCAACGAGC	949	1693	GAAGAGUGCGCCAACGAGC	949	1715	GCUCGUUGGCCGCACUCUUC	1273
1711	CCAGCCAAGCUGUCUCAG	950	1711	CCAGCCAAGCUGUCUCAG	950	1733	CUGAGACAGCUUGGCUGGG	1274
1729	GUGACAAACCCAUACCCU	951	1729	GUGACAAACCCAUACCCU	951	1751	AAGGGAUUGGGUUGUUCAC	1275
1747	UGUGAAGAAUGGAGAAGUG	952	1747	UGUGAAGAAUGGAGAAGUG	952	1769	CACUUCUCCAUUCUUCACA	1276
1765	GUGGAGGACUCCAGGGAG	953	1765	GUGGAGGACUCCAGGGAG	953	1787	CUCCUGGAAAGUCCUCCAC	1277
1783	GGAAUUAUUUAUGAAGUUA	954	1783	GGAAUUAUUUAUGAAGUUA	954	1805	UAACUUAUUUUUAUUC	1278
1801	AUUAAAAUCAAUUUGCUC	955	1801	AUUAAAAUCAAUUUGCUC	955	1823	GAGCAAAUUGAUUUUUU	1279
1819	CUAAUUGAAGGAAAAACA	956	1819	CUAAUUGAAGGAAAAACA	956	1841	UGUUUUUUUCCUUCAAUAG	1280

【表 2 2】

1837	AAAACUGUAAGUACCCUUG	957	1837	AAAACUGUAAGUACCCUUG	957	1859	CAAGGGUACUACAGUUUU	1281
1855	GUUAUCCAAAGCGGCAAAUG	958	1855	GUUAUCCAAAGCGGCAAAUG	958	1877	CAUUGCCGCUUGGAUAC	1282
1873	GUGUCAGCUUUGUACAAAU	959	1873	GUGUCAGCUUUGUACAAAU	959	1895	AUUUGUACAAAGCUGACAC	1283
1891	UGUGAAAGCGGUCACAAAG	960	1891	UGUGAAAGCGGUCACAAAG	960	1913	CUUUGUAGCCGCUUCACA	1284
1909	GUCGGAGAGGAGAGAGGG	961	1909	GUCGGAGAGGAGAGAGGG	961	1931	CCUCUCUCCUUCUCCCGAC	1285
1927	GUGAUCUCCUCCACGUGA	962	1927	GUGAUCUCCUCCACGUGA	962	1949	UCACGUGGAAGGAGAUAC	1286
1945	ACCAGGGUCCUGAAAUUA	963	1945	ACCAGGGUCCUGAAAUUA	963	1967	UAUUUCAGGACCCUGGU	1287
1963	ACUUUGCAACCGACAUAGC	964	1963	ACUUUGCAACCGACAUAGC	964	1985	GCAUGUCAGGUUGCAAAGU	1288
1981	CAGCCACUGAGCAGGAGA	965	1981	CAGCCACUGAGCAGGAGA	965	2003	UCUCCUGCUCAGUGGGCUG	1289
1999	AGCGUGUCUUUGUGGUGCA	966	1999	AGCGUGUCUUUGUGGUGCA	966	2021	UGCACCACAAAGACACGCU	1290
2017	ACUGCAGACAGAUUACGU	967	2017	ACUGCAGACAGAUUACGU	967	2039	ACGUAGAUCUGUCUGCAGU	1291
2035	UUUGAGAAACCUACAUUGU	968	2035	UUUGAGAAACCUACAUUGU	968	2057	ACCAUGUGAGGUUCUCAAA	1292
2053	UACAAGCUUGGCCACACAGC	969	2053	UACAAGCUUGGCCACACAGC	969	2075	GCUGUGGGCCAAAGCUUGUA	1293
2071	CCUCUGCCAAUCCAUUGUG	970	2071	CCUCUGCCAAUCCAUUGUG	970	2093	CCACAUGGAUUGGCAGAGG	1294
2089	GGAGAGUUGCCACACACUG	971	2089	GGAGAGUUGCCACACACUG	971	2111	CAGGUGUGGGCAACUCUCC	1295
2107	GUUUGCAAGAAUUGGAUA	972	2107	GUUUGCAAGAAUUGGAUA	972	2129	UAUCCAAGUUUUGCAAAC	1296
2125	ACUCUUUGGAAAUUGAAUG	973	2125	ACUCUUUGGAAAUUGAAUG	973	2147	CAUUCAAUUUCCAAAGAGU	1297
2143	GCCACCAUGUUCUCUAAUA	974	2143	GCCACCAUGUUCUCUAAUA	974	2165	UAUUAGAGAAACAUGGUGGC	1298
2161	AGCACAAUUGACAUUUUGA	975	2161	AGCACAAUUGACAUUUUGA	975	2183	UCAAAUGUGCAUUUGUGCU	1299
2179	AUCAUGGAGCUUAAGAAUG	976	2179	AUCAUGGAGCUUAAGAAUG	976	2201	CAUUCUUAAGCUCCAUAGU	1300
2197	GCAUCCUUGCAGGACCAAG	977	2197	GCAUCCUUGCAGGACCAAG	977	2219	CUUGGUCCUGCAAGGAUGC	1301
2215	GGAGACUAUGUCUCCUUG	978	2215	GGAGACUAUGUCUCCUUG	978	2237	CAAGGCAGACAUAGUCUCC	1302
2233	GCUCAAGACAGGAAGACCA	979	2233	GCUCAAGACAGGAAGACCA	979	2255	UGGUCUCCUGUCUUGAGC	1303
2251	AAGAAAGACAUUGCGUGG	980	2251	AAGAAAGACAUUGCGUGG	980	2273	CCACGAAUGUCUUUUCUU	1304
2269	GUCAGGCAGCUCACAGUCC	981	2269	GUCAGGCAGCUCACAGUCC	981	2291	GGACUGUGAGCUGCCUGAC	1305
2287	CUAGAGCGUGUGGCACCCA	982	2287	CUAGAGCGUGUGGCACCCA	982	2309	UGGGUGCCACACGCUCUAG	1306
2305	ACGAUCACAGGAAACCCUGG	983	2305	ACGAUCACAGGAAACCCUGG	983	2327	OCAGGUUUCUGUGAUUCGU	1307
2323	GAGAAUCAGACGACAAAGUA	984	2323	GAGAAUCAGACGACAAAGUA	984	2345	UACUUGUCGUCUGAUUCUC	1308
2341	AUUGGGGAAAGCAUCGAAG	985	2341	AUUGGGGAAAGCAUCGAAG	985	2363	CUUCGAUGCUUUCGCCAAU	1309
2359	GUCUCAUGCACGGCAUCUG	986	2359	GUCUCAUGCACGGCAUCUG	986	2381	CAGAUGCCGUGCAUGAGAC	1310
2377	GGGAAUCCCCUCCACAGA	987	2377	GGGAAUCCCCUCCACAGA	987	2399	UCUGUGGAGGGGAUUCUCC	1311
2395	AUCAUGUGGUUUAAAGAU	988	2395	AUCAUGUGGUUUAAAGAU	988	2417	UAUCUUUAAACCAUAGAU	1312
2413	AUAGAGACCCUUGUAGAA	989	2413	AUAGAGACCCUUGUAGAA	989	2435	CUUCUACAAGGGUCUCAUU	1313
2431	GACUCAGGCAUUGUAUUUA	990	2431	GACUCAGGCAUUGUAUUUA	990	2453	UCAUAACAAGCCUGAGUC	1314
2449	AAGGAUGGGAAACCGGAACC	991	2449	AAGGAUGGGAAACCGGAACC	991	2471	GGUUCGCUUCCCAUCCUU	1315
2467	CUCACUAUCCGCGAGAGUGA	992	2467	CUCACUAUCCGCGAGAGUGA	992	2489	UCACUCUGCGGAUAGUGAG	1316

【表 2 3】

2485	AGGAAGGAGGACGAAGGCC	993	2485	AGGAAGGAGGACGAAGGCC	993	2507	GGCCUUCGUCUCCUCCU	1317
2503	CUCUACACUUGCCAGGCAU	994	2503	CUCUACACUUGCCAGGCAU	994	2525	AUGCCUGGCAGGUGUAGAG	1318
2521	UGCAGUGUUCUUGGCUGUG	995	2521	UGCAGUGUUCUUGGCUGUG	995	2543	CACAGCCAAGAACACUGCA	1319
2539	GCAAAAGUGGAGGCAUUUU	996	2539	GCAAAAGUGGAGGCAUUUU	996	2561	AAAAGCCUCCACUUUUGC	1320
2557	UUCAUAUAGAAAGGUGCCC	997	2557	UUCAUAUAGAAAGGUGCCC	997	2579	GGGCACCUUCUUAUUAUGAA	1321
2575	CAGGAAAAGACGAACUUGG	998	2575	CAGGAAAAGACGAACUUGG	998	2597	CCAAGUUCGUCUUUCCUG	1322
2593	GAAUUAUUAUUCUAGUAG	999	2593	GAAUUAUUAUUCUAGUAG	999	2615	CUACUAGAAUAUAUGAUUC	1323
2611	GGCAGGGGUGUAUUGCCA	1000	2611	GGCAGGGGUGUAUUGCCA	1000	2633	UGGCAUACACCGCGUGCC	1324
2629	AUGUUCUUCUGGCUACUUC	1001	2629	AUGUUCUUCUGGCUACUUC	1001	2651	GAAGUAGCCAGAGAACAUC	1325
2647	CUUGUCAUCAUCCUACGGA	1002	2647	CUUGUCAUCAUCCUACGGA	1002	2669	UCCGUAGGAUGAUGACAAG	1326
2665	ACCGUUAAGCGGCCAAUG	1003	2665	ACCGUUAAGCGGCCAAUG	1003	2687	CAUUGGCCCGCUUAACGGU	1327
2683	GGAGGGGAACUGAAGACAG	1004	2683	GGAGGGGAACUGAAGACAG	1004	2705	CUGUCUUCAGUUCGCCUCC	1328
2701	GGCUACUUGUCCAUUCGUA	1005	2701	GGCUACUUGUCCAUUCGUA	1005	2723	UGACGAUGGACAAAGUAGCC	1329
2719	AUGGAUCCAGAUGAACUCC	1006	2719	AUGGAUCCAGAUGAACUCC	1006	2741	GGAGUUAUCUUGGAUCCAU	1330
2737	CCAUUGGAUGAACAUUUG	1007	2737	CCAUUGGAUGAACAUUUG	1007	2759	CACAAUGUUAUCCAAUGG	1331
2755	GAACGACUGCCUUAUGAUG	1008	2755	GAACGACUGCCUUAUGAUG	1008	2777	CAUCAUAAGGCAGUCGUUC	1332
2773	GCCAGCAAAUGGGAUUUCC	1009	2773	GCCAGCAAAUGGGAUUUCC	1009	2795	GGAUUCUCCAUUUUGCUGGC	1333
2791	CCCAGAGACCGGCUGAAGC	1010	2791	CCCAGAGACCGGCUGAAGC	1010	2813	GCUUCAGCCGGUCUCUGGG	1334
2809	CUAGGUAAGCCUUCUUGGCC	1011	2809	CUAGGUAAGCCUUCUUGGCC	1011	2831	GGCCAAGAGGGCUUAACUAG	1335
2827	CGUGGUGCCUUGGCCAAG	1012	2827	CGUGGUGCCUUGGCCAAG	1012	2849	CUUGGCCAAAGGCACCACG	1336
2845	GUGAUUGAAAGCAGAUGCCU	1013	2845	GUGAUUGAAAGCAGAUGCCU	1013	2867	AGGCAUCUCUGCUUCAAUCAC	1337
2863	UUUGGAAUUGACAAGACAG	1014	2863	UUUGGAAUUGACAAGACAG	1014	2885	CUGUCUUGUCAAUUCCAAA	1338
2881	GCAACUUGCAGGACAGUAG	1015	2881	GCAACUUGCAGGACAGUAG	1015	2903	CUACUGUCCUGCAAGUUGC	1339
2899	GCAGUCAAAAUGUUGAAAG	1016	2899	GCAGUCAAAAUGUUGAAAG	1016	2921	CUUUCACAUUUUGACUUC	1340
2917	GAAGGAGCAACACACAGUG	1017	2917	GAAGGAGCAACACACAGUG	1017	2939	CACUGUGUGUUGCUCCUUC	1341
2935	GAGCAUCGAGCUCUCUAGU	1018	2935	GAGCAUCGAGCUCUCUAGU	1018	2957	ACAUGAGAGCUCGUAUCUC	1342
2953	UCUGAACUCAAGAUCCUCA	1019	2953	UCUGAACUCAAGAUCCUCA	1019	2975	UGAGGAUCUUGAGUUCAGA	1343
2971	AUUCAUUUUGGUCACCAUC	1020	2971	AUUCAUUUUGGUCACCAUC	1020	2993	GAUGGUGACCAAUUAUGAAU	1344
2989	CUCAAUGUGGUAACCCUUC	1021	2989	CUCAAUGUGGUAACCCUUC	1021	3011	GAAGGUUGACCAAUUUGAG	1345
3007	CUAGGUGCCUGUACCAAGC	1022	3007	CUAGGUGCCUGUACCAAGC	1022	3029	GCUUGGUACAGGCACCUAG	1346
3025	CCAGGAGGGCCACUCUAGG	1023	3025	CCAGGAGGGCCACUCUAGG	1023	3047	CCAUGAGUGGCCUCCUUGG	1347
3043	GUGAUUGUGGAAUUCUGCA	1024	3043	GUGAUUGUGGAAUUCUGCA	1024	3065	UGCAGAAUUCACAAUUCAC	1348
3061	AAAUUUGGAAACCCUGUCCA	1025	3061	AAAUUUGGAAACCCUGUCCA	1025	3083	UGGACAGGUUUUCCAAAUUU	1349
3079	ACUUAACUGAGGAGCAAGA	1026	3079	ACUUAACUGAGGAGCAAGA	1026	3101	UCUUGCUCUACAGGUAAGU	1350
3097	AGAAUUGAAUUUGUCCCUU	1027	3097	AGAAUUGAAUUUGUCCCUU	1027	3119	AGGGGACAAAUUCAUUCU	1351
3115	UACAAGACCAAAAGGGGCAC	1028	3115	UACAAGACCAAAAGGGGCAC	1028	3137	GUGCCCCUUUGGUCUUGUA	1352

【表 2 4】

3133	CGAUUCCGUCUACAGGAAAG	1029	3133	CGAUUCCGUCUACAGGAAAG	1029	3155	CUUCCCCUUGACGGAAUCG	1353
3151	GACUACGUUGGAGCAAUCC	1030	3151	GACUACGUUGGAGCAAUCC	1030	3173	GGAUUGUCUCCAACGUAGUC	1354
3169	CCUGUGGAUCUGAAACGGC	1031	3169	CCUGUGGAUCUGAAACGGC	1031	3191	GCCGUUUCAGAUCCACAGG	1355
3187	CGCUUGGACAGCAUACCA	1032	3187	CGCUUGGACAGCAUACCA	1032	3209	UGGUGAUGCUGUCCAAGCG	1356
3205	AGUAGCCAGAGCUCAGCCA	1033	3205	AGUAGCCAGAGCUCAGCCA	1033	3227	UGGUGAGCUCUGGCUACU	1357
3223	AGCUCUGGAUUUGGAGG	1034	3223	AGCUCUGGAUUUGGAGG	1034	3245	CCUCCACAAUCCAGAGCU	1358
3241	GAGAAGUCCUCAGUGAUG	1035	3241	GAGAAGUCCUCAGUGAUG	1035	3263	CAUCACUGAGGGACUUCUC	1359
3259	GUAGAAGAGAGGAAGCUC	1036	3259	GUAGAAGAGAGGAAGCUC	1036	3281	GAGCUCCUCUUCUUCUAC	1360
3277	CCUGAAGAUUCUGUAUAGG	1037	3277	CCUGAAGAUUCUGUAUAGG	1037	3299	CCUUAACAGAUUUUACAGG	1361
3295	GACUCCUGACCUUGGAGC	1038	3295	GACUCCUGACCUUGGAGC	1038	3317	GCUCCAAAGGUCAGGAAGUC	1362
3313	CAUCUCAUCUGUACAGCU	1039	3313	CAUCUCAUCUGUACAGCU	1039	3335	AGCUGUAACAGAUAGAGAU	1363
3331	UCCAAGUGGCUAAGGGCA	1040	3331	UCCAAGUGGCUAAGGGCA	1040	3353	UGCCCUUAGCCACUUGGAA	1364
3349	AUGGAGUUCUUGGCAUCGC	1041	3349	AUGGAGUUCUUGGCAUCGC	1041	3371	GCGAUGCCAAGAAACUCCAU	1365
3367	CGAAAGUGUAUCCACAGGG	1042	3367	CGAAAGUGUAUCCACAGGG	1042	3389	CCCUUGUGAUACACUUCUG	1366
3385	GACCUGGCGGCACGAAUA	1043	3385	GACCUGGCGGCACGAAUA	1043	3407	UAUUUCGUGCCGCCAGGUC	1367
3403	AUCCUCUUAUCGGAGAAGA	1044	3403	AUCCUCUUAUCGGAGAAGA	1044	3425	UCUUCUCCGAUAAGAGGAU	1368
3421	AACGUGGUUAAAUUCUGUG	1045	3421	AACGUGGUUAAAUUCUGUG	1045	3443	CACAGAUUUUAACCAAGUU	1369
3439	GACUUGGCUUGGCCCGGG	1046	3439	GACUUGGCUUGGCCCGGG	1046	3461	CCCGGCCAAAGCCAAAGUC	1370
3457	GAUUAUUUAAGAUCCAG	1047	3457	GAUUAUUUAAGAUCCAG	1047	3479	CUGGAUCUUUAUAAAUUUC	1371
3475	GAUUAUGUCAGAAAGGAG	1048	3475	GAUUAUGUCAGAAAGGAG	1048	3497	CUCUUUUUCUGACAUAAUC	1372
3493	GAUGCUCGCCUCCCUUUGA	1049	3493	GAUGCUCGCCUCCCUUUGA	1049	3515	UCAAAAGGAGGCGGAGCAUC	1373
3511	AAUUGAUGGCCCCAGAAA	1050	3511	AAUUGAUGGCCCCAGAAA	1050	3533	UUUCUGGGGCCAUCCAUUU	1374
3529	ACAUUUUUUGACAGAGUGU	1051	3529	ACAUUUUUUGACAGAGUGU	1051	3551	ACACUCUGUCAAAAAUUGU	1375
3547	UACACAAUCCAGAGUGACG	1052	3547	UACACAAUCCAGAGUGACG	1052	3569	CGUCACUCUGGAUUUGUGUA	1376
3565	GUCUGGUCUUUUGGUGUUU	1053	3565	GUCUGGUCUUUUGGUGUUU	1053	3587	AAACACCAAAGACCAGAC	1377
3583	UUGCUGUGGGAAAUUUUU	1054	3583	UUGCUGUGGGAAAUUUUU	1054	3605	AAAAUUUUCCACACAGCAA	1378
3601	UCCUUAGGUGCUUCUCCAU	1055	3601	UCCUUAGGUGCUUCUCCAU	1055	3623	AUGGAGAAGCACCUAAGGA	1379
3619	UAUCCUGGGUAAAGAUUG	1056	3619	UAUCCUGGGUAAAGAUUG	1056	3641	CAAUUUUACCCACAGGAUA	1380
3637	GAUGAAGAAUUUUGUAGGC	1057	3637	GAUGAAGAAUUUUGUAGGC	1057	3659	GCCUACAAAAUUCUUCUACU	1381
3655	CGAUUGAAAGAAAGGAACUA	1058	3655	CGAUUGAAAGAAAGGAACUA	1058	3677	UAGUCCUUCUUUUAUCCG	1382
3673	AGAUAGAGGGCCCCUGAUU	1059	3673	AGAUAGAGGGCCCCUGAUU	1059	3695	AAUCAGGGGCCCUCAUUCU	1383
3691	UAUACUACACCAAGAAUUGU	1060	3691	UAUACUACACCAAGAAUUGU	1060	3713	ACAUUUCUGGUGUAGUAUA	1384
3709	UACCAGACCAUUGCUGGACU	1061	3709	UACCAGACCAUUGCUGGACU	1061	3731	AGUCCAGCAUGGUCUGGUA	1385
3727	UGCUGGCACGGGGAGCCCCA	1062	3727	UGCUGGCACGGGGAGCCCCA	1062	3749	UGGGUCCCCGUGGCCAGCA	1386
3745	AGUCAGAGACCCACGUUUU	1063	3745	AGUCAGAGACCCACGUUUU	1063	3767	AAAACGUGGGUCUCUGACU	1387
3763	UCAGAGUUUGGUGGAACAUU	1064	3763	UCAGAGUUUGGUGGAACAUU	1064	3785	AAUGUUCCACCAACUCUGA	1388

【表 2 5】

3781	UUUGGAAAUUCUCUUGCAAG	1065	3781	UUUGGAAAUUCUCUUGCAAG	1065	3803	CUUGCAAGAGAUUUCCCAA	1389
3799	GCUAUUGCUCAGCAGGAUG	1066	3799	GCUAUUGCUCAGCAGGAUG	1066	3821	CAUCCUGCUGAGCAUUAGC	1390
3817	GGCAAAGACUACAUUGUUC	1067	3817	GGCAAAGACUACAUUGUUC	1067	3839	GAACAAUGUAGUCUUGCC	1391
3835	CUUCCGAUAUCAGAGACUU	1068	3835	CUUCCGAUAUCAGAGACUU	1068	3857	AAGUCUCUGAUUCCGGAAG	1392
3853	UUGAGCAUGGAAGAGGAUU	1069	3853	UUGAGCAUGGAAGAGGAUU	1069	3875	AUCCUCUUCUCCAUUCUCAA	1393
3871	UCUGGACUCUCUCUGCCUA	1070	3871	UCUGGACUCUCUCUGCCUA	1070	3893	UAGGACAGAGAGUCCAGA	1394
3889	ACCUACCCUGUUUCCUGUA	1071	3889	ACCUACCCUGUUUCCUGUA	1071	3911	UACAGGAACAGGUGAGGU	1395
3907	AUGGAGGAGGAGGAAGUAU	1072	3907	AUGGAGGAGGAGGAAGUAU	1072	3929	AUACUUCUCCUCCUCCAU	1396
3925	UGUGACCCCAAUUCCAUU	1073	3925	UGUGACCCCAAUUCCAUU	1073	3947	AUUGAAUUUUGGGGUCACA	1397
3943	UAUGACAACACAGCAGGAA	1074	3943	UAUGACAACACAGCAGGAA	1074	3965	UUCUGCUGUGUUGUACAUA	1398
3961	AUCAGUCAGUAUCUGCAGA	1075	3961	AUCAGUCAGUAUCUGCAGA	1075	3983	UCUGCAGAUACUGACUGAU	1399
3979	AACAGUAAGCGAAAGAGCC	1076	3979	AACAGUAAGCGAAAGAGCC	1076	4001	GGCUCUUCGCUUACUGUU	1400
3997	CGGCCUGUGAGUGUAAAAA	1077	3997	CGGCCUGUGAGUGUAAAAA	1077	4019	UUUUACACUCACAGGCCG	1401
4015	ACAUUUGAAGAUUCCCGU	1078	4015	ACAUUUGAAGAUUCCCGU	1078	4037	ACGGGAUAUCUUCAAAUGU	1402
4033	UUAGAAGAACAGAAAGUAA	1079	4033	UUAGAAGAACAGAAAGUAA	1079	4055	UUACUUCUGGUUCUUCUAA	1403
4051	AAAGUAUCCCGAGAUACA	1080	4051	AAAGUAUCCCGAGAUACA	1080	4073	UGUCAUCUGGGAUUACUUU	1404
4069	AACAGACGGACAGUGGUA	1081	4069	AACAGACGGACAGUGGUA	1081	4091	UACCACUGUCCGUCUGGUU	1405
4087	AUGGUUCUUGCCUCAGAAG	1082	4087	AUGGUUCUUGCCUCAGAAG	1082	4109	CUUCUGAGGCAAGAACCAU	1406
4105	GAGCUGAAACUUUUGGAAG	1083	4105	GAGCUGAAACUUUUGGAAG	1083	4127	CUUCCAAAGUUUUCAGCUC	1407
4123	GACAGAACCAAAUUUUAUC	1084	4123	GACAGAACCAAAUUUUAUC	1084	4145	GAGUAUUUUGGUUCUGUC	1408
4141	CCAUCUUUUGGUGGAUUGG	1085	4141	CCAUCUUUUGGUGGAUUGG	1085	4163	CCAUCCACCAAAAGAUUGG	1409
4159	GUGCCAGCAAAAGCAGGG	1086	4159	GUGCCAGCAAAAGCAGGG	1086	4181	CCUUGCUUUUGCUGGGCAC	1410
4177	GAGUCUGUGGCAUCUGAAG	1087	4177	GAGUCUGUGGCAUCUGAAG	1087	4199	CUUCAGAUGCCACAGACUC	1411
4195	GGCUCAAACAGACAAAGCG	1088	4195	GGCUCAAACAGACAAAGCG	1088	4217	CGCUUGUCUGGUUUAGGCC	1412
4213	GGCUACCGUCCGGGAUUC	1089	4213	GGCUACCGUCCGGGAUUC	1089	4235	GAUUCGGACUGGUAGCC	1413
4231	CACUCCGAUGACACAGACA	1090	4231	CACUCCGAUGACACAGACA	1090	4253	UGUCUGUUAUCGAGUG	1414
4249	ACCACCGUGUACUCCAGUG	1091	4249	ACCACCGUGUACUCCAGUG	1091	4271	CACUGGAGUACACGGUGGU	1415
4267	GAGGAAGCAGAACUUUUA	1092	4267	GAGGAAGCAGAACUUUUA	1092	4289	UAAAAGUUUUGCUUCCUC	1416
4285	AAGCUGAUAGAGAUUGGAG	1093	4285	AAGCUGAUAGAGAUUGGAG	1093	4307	CUCCAAUCUCUUAUCAGCUU	1417
4303	GUGCAAACCGGUAGCACAG	1094	4303	GUGCAAACCGGUAGCACAG	1094	4325	CUGUCUACCGGUUUUGCAC	1418
4321	GCCCAGAUUCCAGCCUG	1095	4321	GCCCAGAUUCCAGCCUG	1095	4343	CAGGCUAGGAUUCUGGGC	1419
4339	GACUCGGGGACACACUGA	1096	4339	GACUCGGGGACACACUGA	1096	4361	UCAGUGUGGCCCGGAGUC	1420
4357	AGCUCUCCUCCUGUUUAAA	1097	4357	AGCUCUCCUCCUGUUUAAA	1097	4379	UUAAACAGGAGGAGAGCU	1421
4375	AAGGAAGCAUCCACACCCC	1098	4375	AAGGAAGCAUCCACACCCC	1098	4397	GGGUGUGGAGUUCUCCUU	1422
4393	CAACUCCCGGACAUACAU	1099	4393	CAACUCCCGGACAUACAU	1099	4415	AUGUGAUGUCCGGGAGUUG	1423
4411	UGAGAGGUCUGCUCAGAUU	1100	4411	UGAGAGGUCUGCUCAGAUU	1100	4433	AAUCUGAGCAGACCUCUCA	1424

【表 2 6】

4429	UUUGAAGUGUUGUUUUUUU	1101	4429	UUUGAAGUGUUGUUUUUUU	1101	4451	GAAAGAACACACUUCAAA	1425
4447	CCACCAGCAGGAAGUAGCC	1102	4447	CCACCAGCAGGAAGUAGCC	1102	4469	GGCUACUCCUGCUGGUGG	1426
4465	CGCAUUUGAUUUUUUUUUU	1103	4465	CGCAUUUGAUUUUUUUUUU	1103	4487	GAAUUGAAAAUCAAUUGCG	1427
4483	CGACAAACAGAAAAAGGACC	1104	4483	CGACAAACAGAAAAAGGACC	1104	4505	GGUCCUUUUUUUUUUUUUG	1428
4501	CUCGGACUGCAGGGAGGCCA	1105	4501	CUCGGACUGCAGGGAGGCCA	1105	4523	UGGCUCCUUGCAGUCCGAG	1429
4519	AGUCUUUJAGGCAUAUCCU	1106	4519	AGUCUUUJAGGCAUAUCCU	1106	4541	AGGAUUGCCUJAGAAGACU	1430
4537	UGGAAGAGGCUUGUGACCC	1107	4537	UGGAAGAGGCUUGUGACCC	1107	4559	GGGUCACAAAGCCUUCUCCA	1431
4555	CAAGAAUGUGUCUGUGUCU	1108	4555	CAAGAAUGUGUCUGUGUCU	1108	4577	AGACACAGACACAUUCUUG	1432
4573	UUCUCCAGUGUUGACCCUG	1109	4573	UUCUCCAGUGUUGACCCUG	1109	4595	CAGGUCAACACUGGGAGAA	1433
4591	GAUCCUUCUUUUUUUUUUU	1110	4591	GAUCCUUCUUUUUUUUUUU	1110	4613	UGAAUGAAAAAAGAGGAUC	1434
4609	AUUUAAAAAGCAUUAUUAU	1111	4609	AUUUAAAAAGCAUUAUUAU	1111	4631	AUGAAUUGCUUUUUUUUUU	1435
4627	UGCCUUGCUGCGGGUCUC	1112	4627	UGCCUUGCUGCGGGUCUC	1112	4649	GAGACCCGACAGAGGGGCA	1436
4645	CACCAUGGGUUUJAGAACAA	1113	4645	CACCAUGGGUUUJAGAACAA	1113	4667	UUGUUCUAAACCCAUUGGUG	1437
4663	AAGAGCUUCAAGCAAUUGGC	1114	4663	AAGAGCUUCAAGCAAUUGGC	1114	4685	GCCAUUGCUUUGAAGCUCUU	1438
4681	CCCCAUCCUCAAAGAAAGUA	1115	4681	CCCCAUCCUCAAAGAAAGUA	1115	4703	UACUUCUUGAGGAUUGGGG	1439
4699	AGCAGUACCUUGGGAGCUG	1116	4699	AGCAGUACCUUGGGAGCUG	1116	4721	CAGCUCUCCAGGUACUUCU	1440
4717	GACACUUCUGUAAACUAG	1117	4717	GACACUUCUGUAAACUAG	1117	4739	CUAGUUUUACAGAAUGUGUC	1441
4735	GAAGAUAAACCAGGCAACG	1118	4735	GAAGAUAAACCAGGCAACG	1118	4757	CGUUGCCUGGUUUUUUUUUU	1442
4753	GUAAGUGUUCGAGGUGUUG	1119	4753	GUAAGUGUUCGAGGUGUUG	1119	4775	CAACACCUCCGAAACACUUA	1443
4771	GAAGAUUGGGAAGGAUUUGC	1120	4771	GAAGAUUGGGAAGGAUUUGC	1120	4793	GCAAUCCUUCUCCCAUUCU	1444
4789	CAGGGCUGAGUCUAUCCAA	1121	4789	CAGGGCUGAGUCUAUCCAA	1121	4811	UUGGAUAGACUCAGCCUUG	1445
4807	AGAGGCUUUGUUUJAGGACG	1122	4807	AGAGGCUUUGUUUJAGGACG	1122	4829	CGUCCUAAACAAAAGCCUUCU	1446
4825	GUGGUCCCAAGCCAAAGCC	1123	4825	GUGGUCCCAAGCCAAAGCC	1123	4847	GGCUUGGCUUGGGAGCCAC	1447
4843	CUUAAAGUGUGGAUUUCGGA	1124	4843	CUUAAAGUGUGGAUUUCGGA	1124	4865	UCCGAAUCCACACAUUJAG	1448
4861	AUUGAUAGAAAGGAAGACU	1125	4861	AUUGAUAGAAAGGAAGACU	1125	4883	AGUCUUCUUCUUAUCAAU	1449
4879	UAACGUUACCUUGCUUUUGG	1126	4879	UAACGUUACCUUGCUUUUGG	1126	4901	CCAAAGCAAGGUAAACGUUA	1450
4897	GAGAGUACUGGAGCCUGCA	1127	4897	GAGAGUACUGGAGCCUGCA	1127	4919	UGCAGGCUCCAGUACUCUC	1451
4915	AAUUGCAUUGUUGUUUGCUC	1128	4915	AAUUGCAUUGUUGUUUGCUC	1128	4937	GAGCAACACAAUUGCAUUU	1452
4933	CUGGUGGAGGUGGGCAUUGG	1129	4933	CUGGUGGAGGUGGGCAUUGG	1129	4955	CCAUGCCACCUCCACCCAG	1453
4951	GGGUCUGUUCUGAAAUGUA	1130	4951	GGGUCUGUUCUGAAAUGUA	1130	4973	UACAUUUCAGAACACAGCCC	1454
4969	AAAGGGUUCAGACGGGGUUU	1131	4969	AAAGGGUUCAGACGGGGUUU	1131	4991	AACCCGUCUCUAAACCCUUU	1455
4987	UUCUGGUUUUJAGAAAGGUUG	1132	4987	UUCUGGUUUUJAGAAAGGUUG	1132	5009	CAACCUUCUAAACCCAGAA	1456
5005	GCUGUUUCUUCGAGUUUGG	1133	5005	GCUGUUUCUUCGAGUUUGG	1133	5027	CCCAACUCGAAAGAACACGC	1457
5023	GCUAAAGUAGAGUUCGUUG	1134	5023	GCUAAAGUAGAGUUCGUUG	1134	5045	CAACGAACUCUACUUUJAGC	1458
5041	GUGCUGUUUCUGACUCCUA	1135	5041	GUGCUGUUUCUGACUCCUA	1135	5063	UAGGAGUCAGAAAACAGCAC	1459
5059	AAUGAGAGUUCUCCUCCAGA	1136	5059	AAUGAGAGUUCUCCUCCAGA	1136	5081	UCUGGAAGGAACUCUCAAU	1460

【 0 4 3 0 】

10

20

30

40

【表 2 7】

5077	ACCGUAGCUGUCUCCUUG	1137	5077	ACCGUAGCUGUCUCCUUG	1137	5099	CAAGGAGACAGCUAACGGU	1461
5095	GCCAAAGCCCCAGGAAGAA	1138	5095	GCCAAAGCCCCAGGAAGAA	1138	5117	UUUCUCCUGGGGCUUGGC	1462
5113	AAUGAUGCAGCUCUGGCUC	1139	5113	AAUGAUGCAGCUCUGGCUC	1139	5135	GAGCCAGAGCUGCAUCAU	1463
5131	CCUUGUCUCCAGGCUGAU	1140	5131	CCUUGUCUCCAGGCUGAU	1140	5153	AUCAGCCUGGGAGACAAGG	1464
5149	UCCUUUAUUCAGAAUACCA	1141	5149	UCCUUUAUUCAGAAUACCA	1141	5171	UGUAUUUCUGAAUAAAGGA	1465
5167	ACAAAGAAAGGACAUUCAG	1142	5167	ACAAAGAAAGGACAUUCAG	1142	5189	CUGAAUGUCCUUUCUUUGU	1466
5185	GCUCAAGGCUCUCCUGCCGU	1143	5185	GCUCAAGGCUCUCCUGCCGU	1143	5207	ACGGCAGGGAGCCUUGAGC	1467
5203	UGUUGAAGAGUUCUGACUG	1144	5203	UGUUGAAGAGUUCUGACUG	1144	5225	CAGUCAGAACUCUUCACA	1468
5221	GCACAAACCAGCUUCUGGU	1145	5221	GCACAAACCAGCUUCUGGU	1145	5243	ACCAGAAGCUGGUUUUGUC	1469
5239	UUUCUUCUGGAUAAUAC	1146	5239	UUUCUUCUGGAUAAUAC	1146	5261	GUUUCAUUCAGAAAGAA	1470
5257	CCCUCAUAUCUGUCCUGAU	1147	5257	CCCUCAUAUCUGUCCUGAU	1147	5279	AUCAGGACAGAUUAGAGGG	1471
5275	UGUGAUUUGUCUGAGACUG	1148	5275	UGUGAUUUGUCUGAGACUG	1148	5297	CAGUCUCAGACAUUACACA	1472
5293	GAUUGCGGGAGGUUCAUUG	1149	5293	GAUUGCGGGAGGUUCAUUG	1149	5315	CAUUGAACCUCCCGCAUUC	1473
5311	GUGAAGCUGUGUGUGGUGU	1150	5311	GUGAAGCUGUGUGUGGUGU	1150	5333	ACACCACACACAGCUUCAC	1474
5329	UCAAAGUUUCAGGAAGGAU	1151	5329	UCAAAGUUUCAGGAAGGAU	1151	5351	AUCCUCCUGAGAAACUUUGA	1475
5347	UUUACCCUUUUUGUUCUUG	1152	5347	UUUACCCUUUUUGUUCUUG	1152	5369	GAAGAACAAGGUAUAAA	1476
5365	CCCCUGUCCCAACCCAC	1153	5365	CCCCUGUCCCAACCCAC	1153	5387	GUGGGUUGGGACAGGGGG	1477
5383	CUCACACCCGCAACCCAU	1154	5383	CUCACACCCGCAACCCAU	1154	5405	AUGGGUUGCGGGUGAGAG	1478
5401	UCAGUAAUUUAGUUUUUG	1155	5401	UCAGUAAUUUAGUUUUUG	1155	5423	CAAAUACUAAAUAUCUGA	1479
5419	GGCCUCUACUCCAGUAAAC	1156	5419	GGCCUCUACUCCAGUAAAC	1156	5441	GUUUACUGGAGUAGAGGCC	1480
5437	CCUGAUUGGGUUUUGUUCAC	1157	5437	CCUGAUUGGGUUUUGUUCAC	1157	5459	GUGAACAAACCCAAUUCAGG	1481
5455	CUCUCUGAAUGAUUUUAG	1158	5455	CUCUCUGAAUGAUUUUAG	1158	5477	CUAAUAAUUAUUCAGAGAG	1482
5473	GCCAGACUUCAAAAUUUUU	1159	5473	GCCAGACUUCAAAAUUUUU	1159	5495	AUAUUUUUUGAAGUCUGGC	1483
5491	UUUAUAGCCCAAAUUUAA	1160	5491	UUUAUAGCCCAAAUUUAA	1160	5513	UUUAUUUUUGGGCUAUAAA	1484
5509	ACAUCUAAUUGUAUUUUUA	1161	5509	ACAUCUAAUUGUAUUUUUA	1161	5531	UAAAUAAUACAAUAGAUUG	1485
5527	AGACUUUUUACAUUUAAG	1162	5527	AGACUUUUUACAUUUAAG	1162	5549	CUCUAUAUGUUAAAAGUCU	1486
5545	GCUAUUUCUACUGAUUUUU	1163	5545	GCUAUUUCUACUGAUUUUU	1163	5567	AAAAUCAGUAGAAAUAAGC	1487
5563	UGCCCUUGUUCUGUCCUUU	1164	5563	UGCCCUUGUUCUGUCCUUU	1164	5585	AAAGGACAGAAACAAGGGCA	1488
5581	UUUUUCAAAGAAAGAAUUG	1165	5581	UUUUUCAAAGAAAGAAUUG	1165	5603	CAUUUCUUUUUUUGAAAAA	1489
5599	GUGUUUUUUUGUUUGGUACC	1166	5599	GUGUUUUUUUGUUUGGUACC	1166	5621	GGUACCAAAACAAAAACAC	1490
5617	CAUAGUGGAAUUGCUGGG	1167	5617	CAUAGUGGAAUUGCUGGG	1167	5639	CCCAGCAUUUCACACUAUG	1491
5635	GAACAAUGACUAUAAAGACA	1168	5635	GAACAAUGACUAUAAAGACA	1168	5657	UGUCUUUAUAGUCAUUUGUUC	1492
5653	AUGCUAUGGCACAUUAUUU	1169	5653	AUGCUAUGGCACAUUAUUU	1169	5675	AAUAUAUGUGCCCAUAGCAU	1493
5671	UUAUAGUCUGUUUAUUGUAG	1170	5671	UUAUAGUCUGUUUAUUGUAG	1170	5693	CUACAUAACACAGACUAUAA	1494
5689	GAACAAUUGUAUUAUUU	1171	5689	GAACAAUUGUAUUAUUU	1171	5711	AAUAUAUUAUUAUUGUUUC	1495
5707	UAAAGCCUUUAUUAUUAUUG	1172	5707	UAAAGCCUUUAUUAUUAUUG	1172	5729	CAUUAUAUAUAAAGGCUUUA	1496

【表 28】

5725	GAACUUUGUACUAUUCACA	1173	5725	GAACUUUGUACUAUUCACA	1173	5747	UGUGAAUAGUACAAAGUUUC	1497
5743	AUUUUGUAUCAGUAUUAUG	1174	5743	AUUUUGUAUCAGUAUUAUG	1174	5765	CAUAAUACUGAUACAAAU	1498
5761	GUAGCAUAAACAAAGGUCAU	1175	5761	GUAGCAUAAACAAAGGUCAU	1175	5783	AUGACCUUUGUUAUGCUAC	1499
5779	UAUUGCUUUCAGCAAUUGA	1176	5779	UAUUGCUUUCAGCAAUUGA	1176	5801	UCAAUUGCUGAAAGCAUUA	1500
5797	AUGUCAUUUAUUAAGAA	1177	5797	AUGUCAUUUAUUAAGAA	1177	5819	UUCUUUAUAAAAUAGACAU	1501
5812	AGAACAUIUGAAAAACUUGA	1178	5812	AGAACAUIUGAAAAACUUGA	1178	5834	UCAAGUUUUUCAAUGUUUCU	1502

gi|4503752|ref|NM_002020.1

位置	標的配列	配列番号	上側位置	上側配列 seq	配列番号	下側位置	下側配列	配列番号
1	ACCCACGCGCAGCGGCCGG	1503	1	ACCCACGCGCAGCGGCCGG	1503	23	CCGCGCGCUGCGCGUGGGU	1750
19	GAGAUAGCAGCGGGCGCCG	1504	19	GAGAUAGCAGCGGGCGCCG	1504	41	CGGCGCCCGCUGCAUCUC	1751
37	GCGCUGUGCCUGCGACUGU	1505	37	GCGCUGUGCCUGCGACUGU	1505	59	ACAGUCGCAGGCACAGCGC	1752
55	UGGCUCUGCCUGGGACUCC	1506	55	UGGCUCUGCCUGGGACUCC	1506	77	GGAGUCCCAGGCAGAGCCA	1753
73	CUGGACGGCCUGGUGAGUG	1507	73	CUGGACGGCCUGGUGAGUG	1507	95	CACUCACAGGCCGUCUCCAG	1754
91	GACUACUCCAUAGACCCCC	1508	91	GACUACUCCAUAGACCCCC	1508	113	GGGGGUGCAUGGAGUAGUC	1755
109	CCGACCUUGAACAUACCGG	1509	109	CCGACCUUGAACAUACCGG	1509	131	CCGUGAUGUUAAGGUCGG	1756
127	GAGGAGUCACAGUCAUCG	1510	127	GAGGAGUCACAGUCAUCG	1510	149	CGAUGACGUGAGUACUCCUC	1757
145	GACACCGGUGACAGCCUGU	1511	145	GACACCGGUGACAGCCUGU	1511	167	ACAGGUGUCACCGGUGUC	1758
163	UCCAUCUCCUGCAGGGGAC	1512	163	UCCAUCUCCUGCAGGGGAC	1512	185	GUCCCCUGCAGGAGAUUGA	1759
181	CAGCACCCUUCGAGUGGG	1513	181	CAGCACCCUUCGAGUGGG	1513	203	CCCACUCGAGGGGUGCUG	1760
199	GCUUGGCCAGGAGCUCAGG	1514	199	GCUUGGCCAGGAGCUCAGG	1514	221	CCUGAGUCCUGGCCAAGC	1761
217	GAGGCGCCAGCCACCGGAG	1515	217	GAGGCGCCAGCCACCGGAG	1515	239	CUCGGUGGCGUGGCCGCCUC	1762
235	GACAAGGACAGCGAGGACA	1516	235	GACAAGGACAGCGAGGACA	1516	257	UGUCCUCCUGUCCUUGUC	1763
253	ACGGGGGUGGUGCGAGACU	1517	253	ACGGGGGUGGUGCGAGACU	1517	275	AGUCUGCACCCACCCCGU	1764
271	UGCGAGGGCACAGACGCCA	1518	271	UGCGAGGGCACAGACGCCA	1518	293	UGGCGUCUGUGCCCCUCGCA	1765
289	AGGCCCUACUGCAAGGUGU	1519	289	AGGCCCUACUGCAAGGUGU	1519	311	ACACCUUGCAGUAGGGCCU	1766
307	UUGCUGCUGCACGAGGUAC	1520	307	UUGCUGCUGCACGAGGUAC	1520	329	GUACCUUGGCGAGCAGCAA	1767
325	CAUGCCAAACGACACAGGCA	1521	325	CAUGCCAAACGACACAGGCA	1521	347	UGCCUGUGUCGUUGGGCAUG	1768
343	AGCUACGUCUGCUACUACA	1522	343	AGCUACGUCUGCUACUACA	1522	365	UGUAGUAGCAGACGUAGCU	1769
361	AAGUACAUAAGGCACGCA	1523	361	AAGUACAUAAGGCACGCA	1523	383	UGCGUGCCUUGAUGUACUU	1770
379	AUCGAGGGCACCAACGGCCG	1524	379	AUCGAGGGCACCAACGGCCG	1524	401	CGGCCGUGGUGCCCCUGAU	1771
397	GCCAGCUCCUACGUGUUCG	1525	397	GCCAGCUCCUACGUGUUCG	1525	419	CGAACACGUAGGAGCUGGC	1772

10

20

30

40

【表 2 9】

415	GUGAGAGACUUUGAGCAGC	1526	415	GUGAGAGACUUUGAGCAGC	1526	437	GCUGCUCAAAGUCUCUCAC	1773
433	CCAUUCAUCAACAAGCCUG	1527	433	CCAUAUCAACAAGCCUG	1527	455	CAGGCUUGUUGAUGAAUGG	1774
451	GACACGCUCUUGGUCAACA	1528	451	GACACGCUCUUGGUCAACA	1528	473	UGUUGACCAAGAGCGUGUC	1775
469	AGGAAGGAGCGCCAUUGUGG	1529	469	AGGAAGGAGCGCCAUUGUGG	1529	491	CCCACAUUGGCGUCCUUCU	1776
487	GUGCCUGUCUGGUGUCCA	1530	487	GUGCCUGUCUGGUGUCCA	1530	509	UGGACACACAGACAGGGCAC	1777
505	AUCCCCGGCCUCAUUGUCA	1531	505	AUCCCCGGCCUCAUUGUCA	1531	527	UGACAUUGAGGCGCGGGAU	1778
523	ACGUCGCGUCGCAAAAGCU	1532	523	ACGUCGCGUCGCAAAAGCU	1532	545	AGCUUUGCGAGCGCAGCGU	1779
541	UCGGUGCUGUGGCCAGACG	1533	541	UCGGUGCUGUGGCCAGACG	1533	563	CGUCUGGCCACACAGCACCGA	1780
559	GGCAGGAGGUGGUGUGGG	1534	559	GGCAGGAGGUGGUGUGGG	1534	581	CCCACACACACUCCUGCCC	1781
577	GAUGACCGCGGGGCAUGC	1535	577	GAUGACCGCGGGGCAUGC	1535	599	GCAUGCCCCCGCGGUAUC	1782
595	CUCGUGUCCACGCCACUGC	1536	595	CUCGUGUCCACGCCACUGC	1536	617	GCAGUGGCGUGGACACGAG	1783
613	CUGCACGAUGCCCUGUACC	1537	613	CUGCACGAUGCCCUGUACC	1537	635	GGUACAGGGCAUCGUGCAG	1784
631	CUGCAGUGCGAGACCACCU	1538	631	CUGCAGUGCGAGACCACCU	1538	653	AGGUGUCUCGACUUGCAG	1785
649	UGGGAGACCAAGGACUUC	1539	649	UGGGAGACCAAGGACUUC	1539	671	GGAAGUCCUGGUCUCCCCA	1786
667	CUUCCAAACCCCUCCUGG	1540	667	CUUCCAAACCCCUCCUGG	1540	689	CCAGGAAAGGGGUUGGAAAG	1787
685	GUGCACAUCACAGGCAACG	1541	685	GUGCACAUCACAGGCAACG	1541	707	CGUUGCCUGUGAUGUGCAC	1788
703	GAGCUCUAUGACAUCCAGC	1542	703	GAGCUCUAUGACAUCCAGC	1542	725	GCUGGAUGUCAUAGAGCUC	1789
721	CUGUUGCCACGGAAGUCGC	1543	721	CUGUUGCCACGGAAGUCGC	1543	743	GCGACUUCUUGGGCAACAG	1790
739	CUGGAGCUCUGGUAGGGG	1544	739	CUGGAGCUCUGGUAGGGG	1544	761	CCCCUACACGACGCUCCAG	1791
757	GAGAAGCUGGUCCUCAACU	1545	757	GAGAAGCUGGUCCUCAACU	1545	779	AGUUGAGGACCAAGCUUCUC	1792
775	UGCACCGUGUGGGCUGAGU	1546	775	UGCACCGUGUGGGCUGAGU	1546	797	ACUCAGCCCACACGUGGCA	1793
793	UUUAACUCAGGUGUCACCU	1547	793	UUUAACUCAGGUGUCACCU	1547	815	AGGUGACACCCUGAGUUAAA	1794
811	UUUGACUGGGACUACCCAG	1548	811	UUUGACUGGGACUACCCAG	1548	833	CUGGGUAGUCCAGUCAAA	1795
829	GGGAAGCAGGACAGCGGG	1549	829	GGGAAGCAGGACAGCGGG	1549	851	CCGCUUCUGCCUUCUCCC	1796
847	GGUAAUGUGGGUGCCCGAGC	1550	847	GGUAAUGUGGGUGCCCGAGC	1550	869	GCUCGGGCACCCACUUAAC	1797
865	CGACGCUCCCAACAGACCC	1551	865	CGACGCUCCCAACAGACCC	1551	887	GGGUCUUGUUGGAGCGUCG	1798
883	CACACAGAACUCUCCAGCA	1552	883	CACACAGAACUCUCCAGCA	1552	905	UGCUGGAGAGUUCUGUGUG	1799
901	AUCCUGACCAUCCACAACG	1553	901	AUCCUGACCAUCCACAACG	1553	923	CGUUGGGAUGGUCAGGAU	1800
919	GUCAGCCAGCACGACCUUG	1554	919	GUCAGCCAGCACGACCUUG	1554	941	CCAGGUCGUGCUGGCGUGAC	1801
937	GGCUCGUUUGUGCAAGG	1555	937	GGCUCGUUUGUGCAAGG	1555	959	CCUUGCACACAUACGAGCC	1802
955	GCCAACAACGGCAUCCAGC	1556	955	GCCAACAACGGCAUCCAGC	1556	977	GCUGGAUGCCGUUGUUGGC	1803
973	CGAUUUCGGGAGAGCACCG	1557	973	CGAUUUCGGGAGAGCACCG	1557	995	CGGUGCUCUCCCCGAAUUCG	1804
991	GAGGUCAUUGUGCAUGAAA	1558	991	GAGGUCAUUGUGCAUGAAA	1558	1013	UUUCAUGCACAAUGACCCUC	1805

【 0 4 3 3 】

10

20

30

40

【表 3 0】

1009	AAUCCUUCAUCAGGUCG	1559	1009	AAUCCUUCAUCAGGUCG	1559	1031	CGACGCUGAUGAAGGGAUU	1806
1027	GAGUGGCUCAAAGGACCCA	1560	1027	GAGUGGCUCAAAGGACCCA	1560	1049	UGGUGCUUUUGAGCCACUC	1807
1045	AUCCUGGAGGCCACGGCAG	1561	1045	AUCCUGGAGGCCACGGCAG	1561	1067	CUGCCGUGGCCUCCAGGAU	1808
1063	GGAGACGAGCUGGUGAAGC	1562	1063	GGAGACGAGCUGGUGAAGC	1562	1085	GCUACACGAGCUCGUCUC	1809
1081	CUGCCCGUGAAGCUGGCAG	1563	1081	CUGCCCGUGAAGCUGGCAG	1563	1103	CUGCCAGCUUCACGGGCAG	1810
1099	GCGUACCCCGCCCGCAGU	1564	1099	GCGUACCCCGCCCGCAGU	1564	1121	ACUCGGCGGGGGGUACGC	1811
1117	UUCGAGUGGUACAAGGAUG	1565	1117	UUCGAGUGGUACAAGGAUG	1565	1139	CAUCCUUGUACCAUGGAA	1812
1135	GGAAGGCACUGUCCGGGC	1566	1135	GGAAGGCACUGUCCGGGC	1566	1157	GCCCGACAGUGCCUUUCC	1813
1153	CGCCACAGUCCACAUGCCC	1567	1153	CGCCACAGUCCACAUGCCC	1567	1175	GGGCAUGUGGACUGUGGCG	1814
1171	CUGGUGCUCAAGGAGGUGA	1568	1171	CUGGUGCUCAAGGAGGUGA	1568	1193	UCACCUCCUUGAGCACCAG	1815
1189	ACAGAGGCCAGCACAGGCA	1569	1189	ACAGAGGCCAGCACAGGCA	1569	1211	UGCCUGUGCUGGGCCUCUGU	1816
1207	ACCUACACCCUCGCCUCUGU	1570	1207	ACCUACACCCUCGCCUCUGU	1570	1229	ACAGGGCGAGGGGUGUAGGU	1817
1225	UGGAACUCCGUGCUGGCC	1571	1225	UGGAACUCCGUGCUGGCC	1571	1247	GGCCAGCAGCGGAGUJCCA	1818
1243	CUGAGGCGCAACAUCAGCC	1572	1243	CUGAGGCGCAACAUCAGCC	1572	1265	GGCUGAUGUUGCGCCUCAG	1819
1261	CUGGAGCUGGUGGUGAAUG	1573	1261	CUGGAGCUGGUGGUGAAUG	1573	1283	CAUACACCAACAGCUCACAG	1820
1279	GUGCCCCCCCAGAUACAUG	1574	1279	GUGCCCCCCCAGAUACAUG	1574	1301	CAUGUAUCUGGGGGGGGCAC	1821
1297	GAGAGGAGGCCUCCUCC	1575	1297	GAGAGGAGGCCUCCUCC	1575	1319	GGGAGGAGGCCUCCUUCUC	1822
1315	CCCAGCAUCUACUCGCGUC	1576	1315	CCCAGCAUCUACUCGCGUC	1576	1337	GACGCGAGUAGUAGCUGGG	1823
1333	CACAGCCGCCAGGCCCUCA	1577	1333	CACAGCCGCCAGGCCCUCA	1577	1355	UGAGGGCCUGGGCGGUCUG	1824
1351	ACCUGCACGGCCUACGGGG	1578	1351	ACCUGCACGGCCUACGGGG	1578	1373	CCCCGUAAGGCCGUGCAGGU	1825
1369	GUGCCCCUGCCUUCAGCA	1579	1369	GUGCCCCUGCCUUCAGCA	1579	1391	UGCUGAGAGGCCAGGGGCAC	1826
1387	AUCCAGUGGCACUGGCGGC	1580	1387	AUCCAGUGGCACUGGCGGC	1580	1409	GCCGCCAGUGCCACUGGAU	1827
1405	CCCUGGACACCCUGCAAGA	1581	1405	CCCUGGACACCCUGCAAGA	1581	1427	UCUUGCAGGGUGUCCAGGG	1828
1423	AUGUUUGCCAGCGUAGUC	1582	1423	AUGUUUGCCAGCGUAGUC	1582	1445	GACUACGCGUGGGCAAACAU	1829
1441	CUCGGCGCGGCGAGCAGC	1583	1441	CUCGGCGCGGCGAGCAGC	1583	1463	GCUGCUGCCGCCCGCGGAG	1830
1459	CAAGACCUCUAGCCACAGU	1584	1459	CAAGACCUCUAGCCACAGU	1584	1481	ACUGUGGCAUGAGGUCUUG	1831
1477	UGCCGUGACUGGAGGGCGG	1585	1477	UGCCGUGACUGGAGGGCGG	1585	1499	CCGCCUCCAGUACAGGCA	1832
1495	GUGACCACGCAGGAUGCCG	1586	1495	GUGACCACGCAGGAUGCCG	1586	1517	CGGCAUCCUGCGUGGUCAC	1833
1513	GUGAACCCCAUCGAGAGCC	1587	1513	GUGAACCCCAUCGAGAGCC	1587	1535	GGCUCUCGAUGGGGUUCAC	1834
1531	CUGGACACCCUGGACCGAGU	1588	1531	CUGGACACCCUGGACCGAGU	1588	1553	ACUCGGUCCAGGUGUCCAG	1835
1549	UUUGUGGAGGGAAAGAAUA	1589	1549	UUUGUGGAGGGAAAGAAUA	1589	1571	UAUUCUUCUCCUCCACAAA	1836
1567	AAGACUGAGCAAGCUGG	1590	1567	AAGACUGAGCAAGCUGG	1590	1589	CCAGCUUGCUCACAGUCUU	1837
1585	GUGAUCCAGAAUGCCAACG	1591	1585	GUGAUCCAGAAUGCCAACG	1591	1607	CGUUGGCAUUCUGGAUCAC	1838

【 0 4 3 4 】

10

20

30

40

【表 3 1】

1603	GUGUCUGCCCAUGAACAAGU	1592	1603	GUGUCUGCCCAUGAACAAGU	1592	1625	1603	ACUUGUACAUGGCAGACAC	1839
1621	UGUGUGGUCUCCCAACAAGG	1593	1621	UGUGUGGUCUCCCAACAAGG	1593	1643	1643	CCUUGUUGGAGACACACA	1840
1639	GUGGCCAGGAUGAGCGGC	1594	1639	GUGGCCAGGAUGAGCGGC	1594	1661	1661	GCCGCUCAUCCUGGCCAC	1841
1657	CUCAUCUACUUCUAUGUGA	1595	1657	CUCAUCUACUUCUAUGUGA	1595	1679	1679	UCACAUAGAAGUAGAUGAG	1842
1675	ACCACCAUCCCGACGGCU	1596	1675	ACCACCAUCCCGACGGCU	1596	1697	1697	AGCCGUCGGGAUGGUGGU	1843
1693	UUCACCAUCGAUCCAAGC	1597	1693	UUCACCAUCGAUCCAAGC	1597	1715	1715	GUUUGGAUUCGAUGUGAA	1844
1711	CCAUCGAGGAGCUACUAG	1598	1711	CCAUCGAGGAGCUACUAG	1598	1733	1733	CUAGUAGCUCCUCGGAUGG	1845
1729	GAGGCCAGCCGGUGCUCC	1599	1729	GAGGCCAGCCGGUGCUCC	1599	1751	1751	GGAGCACCGCUGGCCCCUC	1846
1747	CUGAGCUGCCAAAGCCGACA	1600	1747	CUGAGCUGCCAAAGCCGACA	1600	1769	1769	UGUCGGCUUGGCAGCUCAG	1847
1765	AGCUACAAGUACGAGCAUC	1601	1765	AGCUACAAGUACGAGCAUC	1601	1787	1787	GAUGCUCGUACUUGUAGCU	1848
1783	CUGCGCUGGUACCGCCUCA	1602	1783	CUGCGCUGGUACCGCCUCA	1602	1805	1805	UGAGGGGUACCAAGCGCAG	1849
1801	AACUGUCCACGCGUCACG	1603	1801	AACUGUCCACGCGUCACG	1603	1823	1823	CGUGCAGCGUGGACAGGUU	1850
1819	GAUGCGCACGGGAACCCGC	1604	1819	GAUGCGCACGGGAACCCGC	1604	1841	1841	GCGGUUCCCGUUGCGCAUC	1851
1837	CUUCUGCUCGACUGCAAGA	1605	1837	CUUCUGCUCGACUGCAAGA	1605	1859	1859	UCUUGCAGUCGAGCAGAAG	1852
1855	AACGUGCAUCUGUUCGCCA	1606	1855	AACGUGCAUCUGUUCGCCA	1606	1877	1877	UGGCGAACAGAUACACGUU	1853
1873	ACCCUCUGGCCGCCAGCC	1607	1873	ACCCUCUGGCCGCCAGCC	1607	1895	1895	GGCUGCGGCCAGAGGGGU	1854
1891	CUGGAGGAGGUGGCACCUG	1608	1891	CUGGAGGAGGUGGCACCUG	1608	1913	1913	CAGGUGCCACCUCCUCCAG	1855
1909	GGGGCGGCCACGCCACGC	1609	1909	GGGGCGGCCACGCCACGC	1609	1931	1931	GCGUGCGUGGCGCGCCCC	1856
1927	CUCAGCCUGAGUAUCCCCC	1610	1927	CUCAGCCUGAGUAUCCCCC	1610	1949	1949	GGGGGAUACUCAGGCUAG	1857
1945	CGCGUCGCGCCCGAGCACG	1611	1945	CGCGUCGCGCCCGAGCACG	1611	1967	1967	CGUGCUGGGCGCGCAGCGG	1858
1963	GAGGGCCACUAUGUGCGG	1612	1963	GAGGGCCACUAUGUGCGG	1612	1985	1985	CGACACAUAGUGGCCCUUC	1859
1981	GAAGUGCAAGACCGGCGCA	1613	1981	GAAGUGCAAGACCGGCGCA	1613	2003	2003	UGCGCCGGUCUUGCACUUC	1860
1999	AGCCAUGACAAGCACUGCC	1614	1999	AGCCAUGACAAGCACUGCC	1614	2021	2021	GGCAGUGCUUGUACAUUGCU	1861
2017	CACAAGAAGUACCUUGUCGG	1615	2017	CACAAGAAGUACCUUGUCGG	1615	2039	2039	CCGACAGGUACUUCUUGUG	1862
2035	GUGCAGGCCCUUGGAAGCCC	1616	2035	GUGCAGGCCCUUGGAAGCCC	1616	2057	2057	GGGUUCCAGGGGCCUUGCAC	1863
2053	CCUCGGCUCACGCAGAACU	1617	2053	CCUCGGCUCACGCAGAACU	1617	2075	2075	AGUUCUGCGUGAGCCGAGG	1864
2071	UUGACCGACCUCCUGGUGA	1618	2071	UUGACCGACCUCCUGGUGA	1618	2093	2093	UCACCAGGAGGUCGGUCAA	1865
2089	AACGUGAGCGACUCGCGUGG	1619	2089	AACGUGAGCGACUCGCGUGG	1619	2111	2111	CCAGCGAGUCGCUACGUU	1866
2107	GAGUAGCAGUGCUUGGUGG	1620	2107	GAGUAGCAGUGCUUGGUGG	1620	2129	2129	CCACCAAGCACUGCAUCUC	1867
2125	GCCGGAGCGCACGCGCCCA	1621	2125	GCCGGAGCGCACGCGCCCA	1621	2147	2147	UGGGCGCGUGGCGCUCCGGC	1868
2143	AGCAUCGUGUGGUACAAG	1622	2143	AGCAUCGUGUGGUACAAG	1622	2165	2165	CUUUGUACCACACGAUGCU	1869
2161	GACGAGAGGCGUCUGGAGG	1623	2161	GACGAGAGGCGUCUGGAGG	1623	2183	2183	CCUCCAGCAGCCUUCGUC	1870
2179	GAAAAGUCUGGAGUCGACU	1624	2179	GAAAAGUCUGGAGUCGACU	1624	2201	2201	AGUCGACUCCAGACUUCUUC	1871

【 0 4 3 5 】

10

20

30

40

【表 3 2】

2197	UUGCGGACUCCAAACCAGA	1625	2197	UUGCGGACUCCAAACCAGA	1625	2219	UCUGGUUGGAGUCCGCCAA	1872
2215	AAGCUGAGCAUCCAGCGCG	1626	2215	AAGCUGAGCAUCCAGCGCG	1626	2237	CGCGCUGGAUGCUCAGCUU	1873
2233	GUGCGCGAGGAGGAUGCGG	1627	2233	GUGCGCGAGGAGGAUGCGG	1627	2255	CCGCAUCCUCCUCGCGCAC	1874
2251	GGACCGUAUCUGUGCAGCG	1628	2251	GGACCGUAUCUGUGCAGCG	1628	2273	CGCUGCACAGAUACGGUCC	1875
2269	GUGUGCAGACCCAAAGGCU	1629	2269	GUGUGCAGACCCAAAGGCU	1629	2291	AGCCCUUGGUCUGCACAC	1876
2287	UGCGUCAACUCCUCCGCCA	1630	2287	UGCGUCAACUCCUCCGCCA	1630	2309	UGCGCGAGGAGUUGACGCA	1877
2305	AGCGUGGCCGUGGAAAGCU	1631	2305	AGCGUGGCCGUGGAAAGCU	1631	2327	AGCCUCCACGCGCCACGCU	1878
2323	UCCGAGGAUAAGGCAGCA	1632	2323	UCCGAGGAUAAGGCAGCA	1632	2345	UGCUGCCCUUAUCCUCGGA	1879
2341	AUGGAGAUCCGUAUCCUUG	1633	2341	AUGGAGAUCCGUAUCCUUG	1633	2363	CAAGGAUCACGAUCCCAU	1880
2359	GUCGGUACCGGCGUCAUCG	1634	2359	GUCGGUACCGGCGUCAUCG	1634	2381	CGAUGACGCGGUACCGAC	1881
2377	GCUGUCUUCUUGGGUCC	1635	2377	GCUGUCUUCUUGGGUCC	1635	2399	GGACCCAGAAAGACAGC	1882
2395	CUCCUCCUCCAUUCUUCU	1636	2395	CUCCUCCUCCAUUCUUCU	1636	2417	AGAAGAUAGGAGGAGGAG	1883
2413	UGUAACAUGAGGAGGCCGG	1637	2413	UGUAACAUGAGGAGGCCGG	1637	2435	CCGGCCUCCUCAUGUUACA	1884
2431	GCCACGCGAGACAUAAGA	1638	2431	GCCACGCGAGACAUAAGA	1638	2453	UCUUGAUGUCUGCGUGGGC	1885
2449	ACGGGCUACCUGUCCAUA	1639	2449	ACGGGCUACCUGUCCAUA	1639	2471	UGAUGGACAGGUAGCCCGU	1886
2467	AUCAUGACCCCGGGGAGG	1640	2467	AUCAUGACCCCGGGGAGG	1640	2489	CCUCCCGGGGUGUCCAUAU	1887
2485	GUGCCUCUGGAGGAGCAAU	1641	2485	GUGCCUCUGGAGGAGCAAU	1641	2507	AUUGCUCCUCCAGAGGCAC	1888
2503	UGCGAAUACCUGUCCUACG	1642	2503	UGCGAAUACCUGUCCUACG	1642	2525	CGUAGGACAGGUAUUCGCA	1889
2521	GAUGCCAGCCAGUGGGAU	1643	2521	GAUGCCAGCCAGUGGGAU	1643	2543	AUUCACACUGGUGGCAUC	1890
2539	UUCGCCGAGAGCGGCGUC	1644	2539	UUCGCCGAGAGCGGCGUC	1644	2561	GCAGCCGCUUCUGGGGGA	1891
2557	CACCUUGGGAGAGUGCUCG	1645	2557	CACCUUGGGAGAGUGCUCG	1645	2579	CGAGCACUCUCCCCAGGUG	1892
2575	GGCUACGGCGCCUUCGGGA	1646	2575	GGCUACGGCGCCUUCGGGA	1646	2597	UCCCGAAGGCGCCGUAGCC	1893
2593	AAGGUGGUGGAAGCCUCCG	1647	2593	AAGGUGGUGGAAGCCUCCG	1647	2615	CGGAGGCUUCCACCACCUU	1894
2611	GCUUUCGGCAUCCACAAGG	1648	2611	GCUUUCGGCAUCCACAAGG	1648	2633	CCUUGUGGAUGCCCGAAAGC	1895
2629	GGCAGCAGCUGUGACACCG	1649	2629	GGCAGCAGCUGUGACACCG	1649	2651	CGGUGUCACAGCUGCUGCC	1896
2647	GUGGCCGUGAAAUGCUGA	1650	2647	GUGGCCGUGAAAUGCUGA	1650	2669	UCAGCAUUUUCACGGCCAC	1897
2665	AAAGAGGGCGCCACGGCCA	1651	2665	AAAGAGGGCGCCACGGCCA	1651	2687	UGGCCGUGGCGGCCUUCUU	1898
2683	AGCGAGCAGCGCGCGCUGA	1652	2683	AGCGAGCAGCGCGCGCUGA	1652	2705	UCAGCGCGCGCUGCUCGU	1899
2701	AUGUCGGAGCUCAGAUAUC	1653	2701	AUGUCGGAGCUCAGAUAUC	1653	2723	GGAUCUUUGAGCUCGACAU	1900
2719	CUCAUUCACAUCCGCAACC	1654	2719	CUCAUUCACAUCCGCAACC	1654	2741	GGUUGCCGGAUGUGAAUGAG	1901
2737	CACCUCACACGUGGUCAACC	1655	2737	CACCUCACACGUGGUCAACC	1655	2759	GGUUGACCACCGUUGAGGUG	1902
2755	CUCCUCGGGCGUGCACCA	1656	2755	CUCCUCGGGCGUGCACCA	1656	2777	UGGUGCACGCCCGGAGGAG	1903
2773	AAGCCGAGGGCCCCCUCA	1657	2773	AAGCCGAGGGCCCCCUCA	1657	2795	UGAGGGGGCCCCCUGCGCUU	1904

【表 3 3】

2791	AUGGUGAUCGUGGAGUUCU	1658	2791	AUGGUGAUCGUGGAGUUCU	1658	2813	2813	AGAUCUCCACGACUACCAU	1905
2809	UGCAAGUACGGCAACCUCU	1659	2809	UGCAAGUACGGCAACCUCU	1659	2831	2831	AGAGUUGCCGUAUUGCA	1906
2827	UCCAACUUCUGCGGCCA	1660	2827	UCCAACUUCUGCGGCCA	1660	2849	2849	UGGCGCGCAGGAAGUUGGA	1907
2845	AAGCGGACGCCUUCAGCC	1661	2845	AAGCGGACGCCUUCAGCC	1661	2867	2867	GGCUGAAGGCGUCCCGCUU	1908
2863	CCUGCGCGGAGAGUUC	1662	2863	CCUGCGCGGAGAGUUC	1662	2885	2885	GAGACUUCUCCGCGCAGGG	1909
2881	CCGAGCAGCGCGGACGCU	1663	2881	CCGAGCAGCGCGGACGCU	1663	2903	2903	AGCGUCCGCGCUGCUCGGG	1910
2899	UUCGCGCCAUUGGUGAGC	1664	2899	UUCGCGCCAUUGGUGAGC	1664	2921	2921	GCUCCACCAUGGCGCGGAA	1911
2917	CUCGCCAGGCUUGAUCGGA	1665	2917	CUCGCCAGGCUUGAUCGGA	1665	2939	2939	UCCGAUCCAGCCUGGCGAG	1912
2935	AGCGGCCGCGGAGCAGCG	1666	2935	AGCGGCCGCGGAGCAGCG	1666	2957	2957	CGCUGCUCCCGCGCGCCU	1913
2953	GACAGGGUCCUCUUCGCGC	1667	2953	GACAGGGUCCUCUUCGCGC	1667	2975	2975	GCGCGAAGAGGACCCUGUC	1914
2971	CGGUUCUCGAAGACCGAGG	1668	2971	CGGUUCUCGAAGACCGAGG	1668	2993	2993	CCUCGGUUCUUCGAGAACC	1915
2989	GGCGGAGCGAGCGCGGCUU	1669	2989	GGCGGAGCGAGCGCGGCUU	1669	3011	3011	AAGCCCGCCUCGCUCCGCC	1916
3007	UCCAGACCAAGAAGCUG	1670	3007	UCCAGACCAAGAAGCUG	1670	3029	3029	CAGCUUCUUGGUCUGGAGA	1917
3025	GAGGACCUUGGCGUGAGCC	1671	3025	GAGGACCUUGGCGUGAGCC	1671	3047	3047	GGCUCAGCCACAGGUCCUC	1918
3043	CCGUGACCAUGGAAGAU	1672	3043	CCGUGACCAUGGAAGAU	1672	3065	3065	GAUCUCCAUGGUGAGCGG	1919
3061	CUUGUCUGCUACAGCUUC	1673	3061	CUUGUCUGCUACAGCUUC	1673	3083	3083	GGAAGCUGUAGCAGACAAG	1920
3079	CAGGUGGCCAGAGGGAUGG	1674	3079	CAGGUGGCCAGAGGGAUGG	1674	3101	3101	CCAUCUCCUGGCGCACCCUG	1921
3097	GAGUUCUUGGCUUCCCGAA	1675	3097	GAGUUCUUGGCUUCCCGAA	1675	3119	3119	UUCGGGAAGCCAGGAACUC	1922
3115	AAGUGCAUCCACAGAGACC	1676	3115	AAGUGCAUCCACAGAGACC	1676	3137	3137	GGUUCUGUGGAGUACACUU	1923
3133	CUGGCUUGCUGGAACAUUC	1677	3133	CUGGCUUGCUGGAACAUUC	1677	3155	3155	GAAUGUCCGAGCAGCCAG	1924
3151	CUGCUGUCGGAAGCGACG	1678	3151	CUGCUGUCGGAAGCGACG	1678	3173	3173	CGUCGCUUCCGACAGCAG	1925
3169	GUGGUGAAGAUUCUGAGU	1679	3169	GUGGUGAAGAUUCUGAGU	1679	3191	3191	AGUCACAGAUUCUACCCAC	1926
3187	UUUGGCCUUGCCCGGACA	1680	3187	UUUGGCCUUGCCCGGACA	1680	3209	3209	UGUCCCGGCAAGGCCAAA	1927
3205	AUCUACAAAGACCCCGACU	1681	3205	AUCUACAAAGACCCCGACU	1681	3227	3227	AGUCGGGGUUCUUUGUAGAU	1928
3223	UACGUCCGCAAGGGCAGUG	1682	3223	UACGUCCGCAAGGGCAGUG	1682	3245	3245	CACUCCCUUGCGGACGUA	1929
3241	GCCCGGCUGCCCCUGAAGU	1683	3241	GCCCGGCUGCCCCUGAAGU	1683	3263	3263	ACUUCAGGGGAGCCCGGGC	1930
3259	UGGAUGGCCCCUGAAAGCA	1684	3259	UGGAUGGCCCCUGAAAGCA	1684	3281	3281	UGCUUUCAGGGGCCAUCCA	1931
3277	AUCUUCGACAAGGUGUACA	1685	3277	AUCUUCGACAAGGUGUACA	1685	3299	3299	UGUACACCUUGUCGAAGAU	1932
3295	ACCACGCAGAGUACCGUGU	1686	3295	ACCACGCAGAGUACCGUGU	1686	3317	3317	ACACGUCACUCUGCGUGGU	1933
3313	UGGUCCUUUGGGUGGCUUC	1687	3313	UGGUCCUUUGGGUGGCUUC	1687	3335	3335	GAAGCACCCCAAAGGACCA	1934
3331	CUCUGGGAGAUUCUUCUCUC	1688	3331	CUCUGGGAGAUUCUUCUCUC	1688	3353	3353	GAGAGAAGAUUCUCCAGAG	1935
3349	CUGGGGGCCUCCCGGUACC	1689	3349	CUGGGGGCCUCCCGGUACC	1689	3371	3371	GGUACGGGGAGGCCCCCGAG	1936
3367	CCUGGGGUGCAGAUCAUUG	1690	3367	CCUGGGGUGCAGAUCAUUG	1690	3389	3389	CAUUGAUCUGCACCCCGAGG	1937

【 0 4 3 7 】

10

20

30

40

【表 3 4】

3385	GAGGAGUUCUGCCAGCGCG	1691	3385	GAGGAGUUCUGCCAGCGCG	1691	3407	CGCGCUGGCGAGAACUCUC	1938
3403	GUGAGAGACGGCACAAGGA	1692	3403	GUGAGAGACGGCACAAGGA	1692	3425	UCCUUGUGCCGUCUCAC	1939
3421	AUGAGGCCCCGGAGCUGG	1693	3421	AUGAGGCCCCGGAGCUGG	1693	3443	CCAGCUCGGGGCCUCU	1940
3439	GCCACUCCCGCCAUACGCC	1694	3439	GCCACUCCCGCCAUACGCC	1694	3461	GGCGUAGGCGGGAGUGGC	1941
3457	CACAUCAUGCUGAACUCU	1695	3457	CACAUCAUGCUGAACUCU	1695	3479	AGCAGUUCAGCAUGAUGUG	1942
3475	UGGUCCGGAGACCCCAAGG	1696	3475	UGGUCCGGAGACCCCAAGG	1696	3497	CCUUGGGGUCUCGGGACCA	1943
3493	GCGAGACCUGCAUUCUCGG	1697	3493	GCGAGACCUGCAUUCUCGG	1697	3515	CCGAGAAUGCAGGUCUCGC	1944
3511	GACCUUGGUGAGAUCCUGG	1698	3511	GACCUUGGUGAGAUCCUGG	1698	3533	CCAGGAUCUCCACCAGGUC	1945
3529	GGGACCUGCUCACAGGCA	1699	3529	GGGACCUGCUCACAGGCA	1699	3551	UGCCUGGAGCAGGUCGCC	1946
3547	AGGGCCUGCAAGAGGAAG	1700	3547	AGGGCCUGCAAGAGGAAG	1700	3569	CUUCCUUGCAGGCCCCU	1947
3565	GAGGAGGUCUGAUGGCC	1701	3565	GAGGAGGUCUGAUGGCC	1701	3587	GGCCAUAGCAGACCUCCU	1948
3583	CCGCGCAGCUCUCAGAGCU	1702	3583	CCGCGCAGCUCUCAGAGCU	1702	3605	AGCUCUGAGAGCUGCGCG	1949
3601	UCAGAAAGAGGCAGCUUCU	1703	3601	UCAGAAAGAGGCAGCUUCU	1703	3623	AGAAGCUGCCCUUCUGA	1950
3619	UCGCAGGUGUCCACCAUGG	1704	3619	UCGCAGGUGUCCACCAUGG	1704	3641	CCAUGGUGGACACCUCCG	1951
3637	GCCCUACACAUCCGCCAGG	1705	3637	GCCCUACACAUCCGCCAGG	1705	3659	CCUGGGCGAUGUGAGGGC	1952
3655	GCUGACGUCAGGACAGCC	1706	3655	GCUGACGUCAGGACAGCC	1706	3677	GGCUGUCCUCAGCGUCAGC	1953
3673	CCGCCAAGCCUGCAGCGCC	1707	3673	CCGCCAAGCCUGCAGCGCC	1707	3695	GGCGCUGCAGGCUUGGGCG	1954
3691	CACAGCCUGGCCGCCAGGU	1708	3691	CACAGCCUGGCCGCCAGGU	1708	3713	ACCUGGGGCCAGGCUUG	1955
3709	UAUUACAACUGGGUGUCCU	1709	3709	UAUUACAACUGGGUGUCCU	1709	3731	AGGACACCCAGUUGUAUA	1956
3727	UUUCCCGGGUGCCUGGCCA	1710	3727	UUUCCCGGGUGCCUGGCCA	1710	3749	UGGCCAGGCACCCGGGAAA	1957
3745	AGAGGGCUGAGACCCGUG	1711	3745	AGAGGGCUGAGACCCGUG	1711	3767	CACGGGUCUCAGCCCCUCU	1958
3763	GGUCCUCCAGGAUGAAGA	1712	3763	GGUCCUCCAGGAUGAAGA	1712	3785	UCUUCAUCCUGGAGGAACC	1959
3781	ACAUUUGAGGAUUUCCCCA	1713	3781	ACAUUUGAGGAUUUCCCCA	1713	3803	UGGGGAAUUCUCAAUUGU	1960
3799	AUGACCCCAACGACCUACA	1714	3799	AUGACCCCAACGACCUACA	1714	3821	UGUAGGUCGUUGGGGUCAU	1961
3817	AAAGGCUCUGGACAACC	1715	3817	AAAGGCUCUGGACAACC	1715	3839	GGUUGUCCACAGAGCCUUU	1962
3835	CAGACAGACAGUGGGAUGG	1716	3835	CAGACAGACAGUGGGAUGG	1716	3857	CCAUCCACUGUCUGUUG	1963
3853	GUGCUGGCCUCGGAGGAGU	1717	3853	GUGCUGGCCUCGGAGGAGU	1717	3875	ACUCCUCCGAGGGCCAGCAC	1964
3871	UUUGAGCAGAUAGAGAGCA	1718	3871	UUUGAGCAGAUAGAGAGCA	1718	3893	UGCUCUCUAUCUCUCUAAA	1965
3889	AGGCAUAGACAAGAAAGCG	1719	3889	AGGCAUAGACAAGAAAGCG	1719	3911	CGCUUUCUUGUCUAUGCCU	1966
3907	GGCUUCAGGUAGCUGAAGC	1720	3907	GGCUUCAGGUAGCUGAAGC	1720	3929	GCUUCAGCUAACCUGAAGCC	1967
3925	CAGAGAGAGAGAAGGCAGC	1721	3925	CAGAGAGAGAGAAGGCAGC	1721	3947	GCUGCCUUCUCUCUCUCUG	1968
3943	CAUACGUCAGCAUUUUCUU	1722	3943	CAUACGUCAGCAUUUUCUU	1722	3965	AAGAAAUGCUGACGUUG	1969
3961	UCUCUGCACUUUAAGAAA	1723	3961	UCUCUGCACUUUAAGAAA	1723	3983	UUUCUUUAAGUGCAGAGA	1970

【 0 4 3 8 】

10

20

30

40

【表 3 5】

3979	AGAUCAAAGACUUUUAAGAC	1724	3979	AGAUCAAAGACUUUUAAGAC	1724	4001	GUCUUAAGUCUUUGAUCU	1971
3997	CUUUCGCUAUUUCUUCUAC	1725	3997	CUUUCGCUAUUUCUUCUAC	1725	4019	GUAGAAGAAUAGCGAAAG	1972
4015	CUGCUAUUCUACUACAAACU	1726	4015	CUGCUAUUCUACUACAAACU	1726	4037	AGUUUGUAGUAGAUAGCAG	1973
4033	UUCAAAGAGGAACACAGGAG	1727	4033	UUCAAAGAGGAACACAGGAG	1727	4055	CUCUGGUUCCUCUUUGAA	1974
4051	GGACAAAGAGGAGCAUGAAA	1728	4051	GGACAAAGAGGAGCAUGAAA	1728	4073	UUUCAUGCUCUUCUUGUCC	1975
4069	AGUGGACAAAGGAGUGUGAC	1729	4069	AGUGGACAAAGGAGUGUGAC	1729	4091	GUCACACUCCUUGUCCACU	1976
4087	CCACUGAAGCACCCACAGGG	1730	4087	CCACUGAAGCACCCACAGGG	1730	4109	CCCUGUGUGCUUCACAGGG	1977
4105	GAGGGGUUAGGCCUCCGGA	1731	4105	GAGGGGUUAGGCCUCCGGA	1731	4127	UCCGGAGGCCUAAACCCUC	1978
4123	AUGACUGCGGGCAGGCCUG	1732	4123	AUGACUGCGGGCAGGCCUG	1732	4145	CAGGCCUGCCCGCAGUCAU	1979
4141	GGAUAAUUAUCCAGCCUCCC	1733	4141	GGAUAAUUAUCCAGCCUCCC	1733	4163	GGGAGGCUUGGAUUAUUC	1980
4159	CACAAGAGCUGGUGGAGC	1734	4159	CACAAGAGCUGGUGGAGC	1734	4181	GCUCCACCAGCUUCUUGUG	1981
4177	CAGAGUGUCCUUGACUCC	1735	4177	CAGAGUGUCCUUGACUCC	1735	4199	GGAGUCAGGGAAACACUCUG	1982
4195	CUCCAAGGAAAGGGAGACG	1736	4195	CUCCAAGGAAAGGGAGACG	1736	4217	CGUCUCCCUUCCUJGGAG	1983
4213	GCCCUUUAUGGUCUGCUG	1737	4213	GCCCUUUAUGGUCUGCUG	1737	4235	CAGCAGACCAUGAAAGGGC	1984
4231	GAGUACAGGUGCCUUC	1738	4231	GAGUACAGGUGCCUUC	1738	4253	GGGAAGGCACCCUGUUAACUC	1985
4249	CAGACACUGGCGUUAUCUGC	1739	4249	CAGACACUGGCGUUAUCUGC	1739	4271	GCAGUAAACGCCAGUGUCUG	1986
4267	CUUGACCAAAGAGCCCUCA	1740	4267	CUUGACCAAAGAGCCCUCA	1740	4289	UGAGGGCUCUUGGUGUAAG	1987
4285	AAGCGGCCUUAUGCCAGC	1741	4285	AAGCGGCCUUAUGCCAGC	1741	4307	GCUGGCAUAAAGGCCCGCUU	1988
4303	CGUGACAGAGGGCUCACCCU	1742	4303	CGUGACAGAGGGCUCACCCU	1742	4325	AGGUGAGCCCUUGUCACG	1989
4321	UCUUGCCUUCUAGGUCACU	1743	4321	UCUUGCCUUCUAGGUCACU	1743	4343	AGUGACCUAGAAGGCAAGA	1990
4339	UUCUCACAAUGUCCCUUCA	1744	4339	UUCUCACAAUGUCCCUUCA	1744	4361	UGAAGGGACAUUUGAGAA	1991
4357	AGCACUGACCCUGUGCCC	1745	4357	AGCACUGACCCUGUGCCC	1745	4379	GGGCACAGGGUCAGGUGCU	1992
4375	CGCCGAUUAUCCUUGGUA	1746	4375	CGCCGAUUAUCCUUGGUA	1746	4397	UACCAAGGAAUAAUCGGCG	1993
4393	AAUUGAGUAAUACAUCAA	1747	4393	AAUUGAGUAAUACAUCAA	1747	4415	UUGAUGUAUUUACUCAUJU	1994
4411	AAGAGUAGUUAUAAAGCU	1748	4411	AAGAGUAGUUAUAAAGCU	1748	4433	AGCUUUUAAUUAUACUACU	1995
4429	UAUUUAUUAUGUUUAUAA	1749	4429	UAUUUAUUAUGUUUAUAA	1749	4451	UUUUAACAUGAUUUAUUA	1996

siRNAコンストラクトの上側配列および下側配列の3'末端は、例えば、約1, 2, 3, または4ヌクレオチドの長さ、好ましくは2ヌクレオチドの長さのオーバーハング配列を含むことができ、下側配列のオーバーハング配列は任意に標的配列の一部と相補的であってもよい。上側配列はセンス鎖とも称され、下側配列はアンチセンス鎖とも称される。表中の上側配列および下側配列は、さらに式I-VIIまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学修飾を含むことができる

【表 3 6】

表 III: VEGF および VEGFR 合成修飾 siNA コンストラクト

VEGFR1

標的位置	標的	配列番号	別名	配列	配列番号
296	GCUGUCGCUUCUCACAGGAUCU	1997	FLT1:298U21 siRNA sense	UGUCUGCUUCUCACAGGAU	2020
1954	GAAGGAGAGGACCUGAAACUGUC	1998	FLT1:1956U21 siRNA sense	AGGAGAGGACCUGAAACUGTT	2021
1955	AAGGAGAGGACCUGAAACUGUCU	1999	FLT1:1957U21 siRNA sense	GGAGAGGACCUGAAACUGUTT	2022
2785	GCAUUUGGCAUUAAAGAAUACACC	2000	FLT1:2787U21 siRNA sense	AUUUGGCAUUAAAGAAUACATT	2023
296	GCUGUCGCUUCUCACAGGAUCU	1997	FLT1:316L21 siRNA (298C) antisense	AUCCUGUGAGAAGCAGACATT	2024
1954	GAAGGAGAGGACCUGAAACUGUC	1998	FLT1:1974L21 siRNA (1956C) antisense	CAGUUUCAGGUCCUCUCUUTT	2025
1955	AAGGAGAGGACCUGAAACUGUCU	1999	FLT1:1975L21 siRNA (1957C) antisense	ACAGUUUCAGGUCCUCUCUUTT	2026
2785	GCAUUUGGCAUUAAAGAAUACACC	2000	FLT1:2805L21 siRNA (2787C) antisense	UGAUUUUCUUAUUGCCAAAUUTT	2027
296	GCUGUCGCUUCUCACAGGAUCU	1997	FLT1:298U21 siRNA stab04 sense	B uGucuGcuucucAcAGGAU	2028
1954	GAAGGAGAGGACCUGAAACUGUC	1998	FLT1:1956U21 siRNA stab04 sense	B AGGAGAGGACCUGAAACUGTT B	2029
1955	AAGGAGAGGACCUGAAACUGUCU	1999	FLT1:1957U21 siRNA stab04 sense	B GGAGAGGACCUGAAACUGTT B	2030
2785	GCAUUUGGCAUUAAAGAAUACACC	2000	FLT1:2787U21 siRNA stab04 sense	B AuuuGGcAuuuAAGAAAUcATT B	2031
296	GCUGUCGCUUCUCACAGGAUCU	1997	FLT1:316L21 siRNA (298C) stab05 antisense	AuccuGuGAGAAAGcAGAcATsT	2032
1954	GAAGGAGAGGACCUGAAACUGUC	1998	FLT1:1974L21 siRNA (1956C) stab05 antisense	cAGuuuucAGGuccucuccuTsT	2033
1955	AAGGAGAGGACCUGAAACUGUCU	1999	FLT1:1975L21 siRNA (1957C) stab05 antisense	AcAGuuuucAGGuccucuccuTsT	2034
2785	GCAUUUGGCAUUAAAGAAUACACC	2000	FLT1:2805L21 siRNA (2787C) stab05 antisense	uGAuuuuuuAAuGccAAAU	2035
296	GCUGUCGCUUCUCACAGGAUCU	1997	FLT1:298U21 siRNA stab07 sense	B uGucuGcuucucAcAGGAU	2036
1954	GAAGGAGAGGACCUGAAACUGUC	1998	FLT1:1956U21 siRNA stab07 sense	B AGGAGAGGACCUGAAACUGTT B	2037
1955	AAGGAGAGGACCUGAAACUGUCU	1999	FLT1:1957U21 siRNA stab07 sense	B GGAGAGGACCUGAAACUGTT B	2038
2785	GCAUUUGGCAUUAAAGAAUACACC	2000	FLT1:2787U21 siRNA stab07 sense	B AuuuGGcAuuuAAGAAAUcATT B	2039
296	GCUGUCGCUUCUCACAGGAUCU	1997	FLT1:316L21 siRNA (298C) stab11 antisense	AuccuGuGAGAAAGcAGAcATsT	2040
1954	GAAGGAGAGGACCUGAAACUGUC	1998	FLT1:1974L21 siRNA (1956C) stab11 antisense	cAGuuuucAGGuccucuccuTsT	2041
1955	AAGGAGAGGACCUGAAACUGUCU	1999	FLT1:1975L21 siRNA (1957C) stab11 antisense	AcAGuuuucAGGuccucuccuTsT	2042
2785	GCAUUUGGCAUUAAAGAAUACACC	2000	FLT1:2805L21 siRNA (2787C) stab11 antisense	uGAuuuuuuAAuGccAAAU	2043

【表 3 7】

VEGFR1

標的	配列番号	RPI 番号	別名	配列	配列番号
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	29694	FLT1:349U21 siRNA stab01 sense	CsUsGsAsGsUUUUAAAAGGCACCCCTsT	2092
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29695	FLT1:2340U21 siRNA stab01 sense	CsAsAsCsCsACAAAAUACAACAATsT	2093
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	29696	FLT1:3912U21 siRNA stab01 sense	CsCsUsGsGsAAAAAGAAUCAAACCCCTsT	2094
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	29697	FLT1:2949U21 siRNA stab01 sense	GsCsAsAsGsGsAGGGCCUCUGAUGTsT	2095
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	29698	FLT1:369L21 siRNA (349C) stab01 sense	GsGsGsUsGsCCUUUUUAAAACUCAGTsT	2096
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29699	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab01 sense	UsUsGsUsUsGUUUUUUUGGUGUGTsT	2097
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	29700	FLT1:3932L21 siRNA (3912C) stab01 sense	GsGsUsUsUsUGAUUCUUUCCAGGTsT	2098
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	29701	FLT1:2969L21 siRNA (2949C) stab01 sense	CsAsUsCsAsGAGGGCCCUUGCTsT	2099
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	29702	FLT1:349U21 siRNA stab03 sense	csusGsAsGuuuAAAAAGGcAcscscsTsT	2100
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29703	FLT1:2340U21 siRNA stab03 sense	csAsAscsAcAAAAUAcAcsAsAsTsT	2101
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	29704	FLT1:3912U21 siRNA stab03 sense	cscsusGsGAAAGAAucAAAAscscsTsT	2102
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	29705	FLT1:2949U21 siRNA stab03 sense	GscsAsAsGGAGGGGccucUgAsusGsTsT	2103
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	29706	FLT1:369L21 siRNA (349C) stab02 antisense	GsGsGsUsGsCsUsUsUsAsAsAsCsUsCsAsGsTsT	2104
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29707	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab02 antisense	UsUsGsUsUsGsUsAsUsUsUsGsUsGsUsUsGsTsT	2105
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	29708	FLT1:3932L21 siRNA (3912C) stab02 antisense	GsGsUsUsUsGsAsUsUsCsUsUsUsCsCsAsGsGsTsT	2106
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	29709	FLT1:2969L21 siRNA (2949C) stab02 antisense	CsAsUsCsAsGsGsGsCsCsUsCsUsGsCsTsT	2107
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29981	FLT1:2340U21 siRNA Native sense	CAACCACAAAAUACAACAAGA	2108
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29982	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) Native antisense	UUGUUGUUUUUUGGUGUUGUU	2109
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29983	FLT1:2342U21 siRNA stab01 inv	AsAsCsAsAsCAUAAAAACACCAACTsT	2110
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29984	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab01 inv	GsUsUsGsGsUGUUUUUUGUUGUUTsT	2111
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29985	FLT1:2342U21 siRNA stab03 inv	AsAscsAsAcAuAAAAAcAcAsAscsTsT	2112
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29986	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab02 inv	GsUsUsGsGsUsGsUsUsUsAsUsGsUsUsGsUsTsT	2113

【表 3 8】

AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29987	FLT1:2340U21 siRNA inv Native sense	AGAACAACAUAUAAAAACACCAAC	2114
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	29988	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) inv Native	UUGUUGGUGUUUUUAUGUUGUU	2115
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30075	FLT1:2340U21 siRNA sense	CAACCCACAAAAUACAACAATT	2116
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30076	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) antisense	UUGUUGUAUUUUUUGUGGUUGTT	2117
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30077	FLT1:2342U21 siRNA inv	AGAACAACAUAUAAAAACACCAATT	2118
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30078	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) inv	UUGUUGGUGUUUUUAUGUUGTT	2119
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30187	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) 2-F U,C antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGTT	2120
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30190	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) X = nitroindole antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGXX	2121
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30193	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) Z = nitroprole antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGZZ	2122
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30196	FLT1:2340U21 siRNA sense IB caps w/2'FY's sense	B cAAccAcAAAAuuAcAAcAATT B	2123
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30199	FLT1:2340U21 siRNA sense IB caps sense	cAAccAcAAAAuuAcAAcAATT	2124
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30340	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) X = 3'dT antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGTX	2125
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30341	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) X = glycyl antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGTX	2126
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30342	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) U = 3'OMeU antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGTU	2127
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30343	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) t = L- dT antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGTt	2128
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30344	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) u = L-U antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGTu	2129
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30345	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) D = idT antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGTD	2130
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30346	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) X = 3'dT antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGXT	2131
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30416	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) TsT antisense	uuGuuuGuAuuuuuuuGuGGuuGTsT	2132
UCGUGUAAGGAGUGGACCAUCAU	2013	30777	FLT1:1184U21 siRNA stab04 sense	B GuGuAAGGAGuGGAccAucTT B	2133
UUACGGAGUAUUGCUUGGGGAAA	2014	30778	FLT1:3503U21 siRNA stab04 sense	B AcGGAGuAuGcuGuGGGATT B	2134
UAGCAGGCCUUAAGACAUUGAGG	2015	30779	FLT1:4715U21 siRNA stab04 sense	B GcAGGccuAAGAcAuGuGATT B	2135
AGCAAAAAGCAAGGGAGAAAAGA	2016	30780	FLT1:4753U21 siRNA stab04 sense	B cAAAAAGcAAGGGAGAAAAATT B	2136

【表 3 9】

UCGUGUAAGGAGUGGACCAUCAU	2013	30781	FLT1:1202L21 siRNA (1184C) stab05 antisense	GAUGGUCCAcuccuuAcAcTsT	2137
UUACGGAGUAUUGCUGUGGAAA	2014	30782	FLT1:3521L21 siRNA (3503C) stab05 antisense	ucccAcAGcAAuAcuccGuTsT	2138
UAGCAGGCCUUAAGACAUGUGAGG	2015	30783	FLT1:4733L21 siRNA (4715C) stab05 antisense	ucAcAuGucuuAGGccuGcTsT	2139
AGCAAAAAGCAAGGGAGAAAAGA	2016	30784	FLT1:4771L21 siRNA (4753C) stab05 antisense	uuuuuccccuuGcuuuuuGTsT	2140
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30955	FLT1:2340U21 siRNA stab07 sense	B cAAccAcAAAAuAcAAcAAATT B	2141
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30956	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab08 antisense	uuGuuGuAuuuuGuGGuuGTsT	2142
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30963	FLT1:2340U21 siRNA inv	AACAACAUAaaaaACACCAACTT	2143
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30964	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) inv	GUUGGUGUUUUUUGUUGUUTT	2144
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30965	FLT1:2340U21 siRNA stab04 inv	B AAcAAcAUAAAAcAccAAcTT B	2145
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30966	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab05 inv	GuuGGuGuuuuAuGuuGuuTsT	2146
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30967	FLT1:2340U21 siRNA stab07 inv	B AAcAAcAUAAAAcAccAAcTT B	2147
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	30968	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab08 inv	GuuGGuGuuuuAuGuuGuuTsT	2148
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31182	FLT1:349U21 siRNA TT sense	CUGAGUUUAAAAGGCACCCCTT	2149
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31183	FLT1:2949U21 siRNA TT antisense	GCAAGGAGGGCCUCUGAUGTT	2150
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31184	FLT1:3912U21 siRNA TT sense	CCUGGAAAGAAUCAAACCCCTT	2151
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31185	FLT1:367L21 siRNA (349C) TT antisense	GGGUGCCUUUUAAAACUCAGTT	2152
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31186	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) TT sense	CAUCAGAGGGCCUCUUGCCTT	2153
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31187	FLT1:3930L21 siRNA (3912C) TT antisense	GGUUUUGAUUUUUUCCAGGTT	2154
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31188	FLT1:349U21 siRNA stab04 sense	B cuGAGuuuAAAAAGGcAccTT B	2155
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31189	FLT1:2949U21 siRNA stab04 sense	B GcAAGGAGGGccuccuGauGTT B	2156
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31190	FLT1:3912U21 siRNA stab04 sense	B ccuGGAAAAAucAAAAccTT B	2157
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31191	FLT1:367L21 siRNA (349C) stab05 antisense	GGGGuGccuuuuuAAAacucAGTsT	2158
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31192	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) stab05 antisense	cAucAGAGGGccuccuuGcTsT	2159
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31193	FLT1:3930L21 siRNA (3912C) stab05 antisense	GGuuuuGAuuuuuuuuccAGGTsT	2160

【表 40】

AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31194	FLT1:349U21 siRNA stab07 sense	B cuGAGuuuAAAAGGcAccTT B	2161
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31195	FLT1:2949U21 siRNA stab07 sense	B GcAAGGAGGGGccucucGauGTT B	2162
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31196	FLT1:3912U21 siRNA stab07 sense	B ccuGGAAAGAAucAAAAccTT B	2163
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31197	FLT1:367L21 siRNA (349C) stab08 antisense	GGGuGccuuuuAAAucucAGTsT	2164
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31198	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) stab08 antisense	cAucAGAGGccucucuuGcTsT	2165
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31199	FLT1:3930L21 siRNA (3912C) stab08 antisense	GGuuuuGauuucuuuccAGGTsT	2166
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31200	FLT1:349U21 siRNA inv TT	CCCACGGAAAAUUUGAGUCTT	2167
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31201	FLT1:2949U21 siRNA inv TT	GUAGUCUCGGGAGGAAcGTT	2168
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31202	FLT1:3912U21 siRNA inv TT	CCAAAACUAAAGAAAGGUcCTT	2169
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31203	FLT1:367L21 siRNA (349C) inv TT	GACUCAAAUUUUCCGUGGGTT	2170
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31204	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) inv TT	CGUUCUCCCCGGAGAGACUACTT	2171
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31205	FLT1:3930L21 siRNA (3912C) inv TT	GGACCUUUUUUAGUUUUUGGTT	2172
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31206	FLT1:349U21 siRNA stab04 inv	B cccAcGGAAAAuuuGAGucTT B	2173
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31207	FLT1:2949U21 siRNA stab04 inv	B GuAGucuccGGGAGGAAcGTT B	2174
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31208	FLT1:3912U21 siRNA stab04 inv	B cccAAAAcuAAGAAAGGUcCTT B	2175
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31209	FLT1:367L21 siRNA (349C) stab05 inv	GAcucAAAAuuuuuccGuGGGTsT	2176
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31210	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) stab05 inv	cGuuuccuccGGAGAGAcuAcTsT	2177
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31211	FLT1:3930L21 siRNA (3912C) stab05 inv	GGAccuuuuuuAGuuuuGGTsT	2178
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31212	FLT1:349U21 siRNA stab07 inv	B cccAcGGAAAAuuuGAGucTT B	2179
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31213	FLT1:2949U21 siRNA stab07 inv	B GuAGucuccGGGAGGAAcGTT B	2180
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31214	FLT1:3912U21 siRNA stab07 inv	B ccAAAAcuAAGAAAGGUcCTT B	2181
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31215	FLT1:367L21 siRNA (349C) stab08 inv	GAcucAAAAuuuuuccGuGGGTsT	2182
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31216	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) stab08 inv	cGuuuccuccGGAGAGAcuAcTsT	2183
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31217	FLT1:3930L21 siRNA (3912C) stab08 inv	GGAccuuuuuuAGuuuuGGTsT	2184
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31270	FLT1:349U21 siRNA stab09 sense	B CUGAGUUUAAAAGGCACCCCTT B	2185
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31271	FLT1:2949U21 siRNA stab09 sense	B GCAAGGAGGGCCUCUGAUGTT B	2186

【表 4 1】

AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31272	FLT1:3912U21 siRNA stab09 sense	B CCUGGAAAGAAUCAAACCCTT B	2187
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31273	FLT1:367L21 siRNA (349C) stab10 antisense	GGGUGCCUUUUAAAACUCAGTsT	2188
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31274	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) stab10 antisense	CAUCAGAGGCCCUUUGCTsT	2189
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31275	FLT1:3930L21 siRNA (3912C) stab10 antisense	GGUUUUGAUUUCUUUCCAGGTsT	2190
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31276	FLT1:349U21 siRNA stab09 inv	B CCCACGGAAAAUUUGAGUCTT B	2191
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31277	FLT1:2949U21 siRNA stab09 inv	B GUAGUCUCCGGGAGGAACGTT B	2192
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31278	FLT1:3912U21 siRNA stab09 inv	B CCAAAACUAAGAAAGGUCCTT B	2193
AACUGAGUUUAAAAGGCACCCAG	2009	31279	FLT1:367L21 siRNA (349C) stab10 inv	GACUCAAAUUUCCGUGGGTsT	2194
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31280	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) stab10 inv	CGUUCCUCCCGGAGACUACTsT	2195
AGCCUGGAAAGAAUCAAACCCUU	2011	31281	FLT1:3930L21 siRNA (3912C) stab10 inv	GGACCUUUCUUUAGUUUUGGTsT	2196
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	31424	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab11 X = 3'-BrdU antisense	uuGuuGuuAuuuuuGuuGGuuGXsX	2197
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31425	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) stab11 X = 3'-BrdU sense	cAucAGAGGGccuccuuGcXsX	2198
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	31442	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab11 X = 3'-BrdU antisense	uuGuuGuuAuuuuuGuuGGuuGXsT	2199
AAGCAAGGAGGGCCUCUGAUGGU	2012	31443	FLT1:2967L21 siRNA (2949C) stab11 X = 3'-BrdU sense	cAucAGAGGGccuccuuGcXsT	2200
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	31449	FLT1:2340U21 siRNA stab09 sense	B CAACCCACAAAAUACAACAATT B	2201
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	31450	FLT1:2340U21 siRNA inv stab09 sense	B AACAAACUAAAAACACCAACTT B	2202
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	31451	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) stab10 antisense	UUGUUGAUUUUUGUGGUUGTsT	2203
AACAACCCACAAAAUACAACAAGA	2010	31452	FLT1:2358L21 siRNA (2340C) inv stab10 antisense	GUUGGUGUUUUUUAUGUUGUUTsT	2204

【表 4 2】

VEGFR2

標的位置	標的	配列番号	別名	配列	配列番号
3302	UGACCUUGGAGCAUCUCAUCUGU	2001	KDR:3304U21 siRNA sense	ACCUUGGAGCAUCUCAUCUTT	2044
3852	UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUUCUG	2002	KDR:3854U21 siRNA sense	UGAGCAUGGAAGAGGAUUUCTT	2045
3892	UCACCUUUUCCUGUAUGGAGGA	2003	KDR:3894U21 siRNA sense	ACCUUUUCCUGUAUGGAGTT	2046
3946	GACAACACAGCAGGAUUCAGUCA	2004	KDR:3948U21 siRNA sense	CAACACAGCAGGAUUCAGUTT	2047
3302	UGACCUUGGAGCAUCUCAUCUGU	2001	KDR:3322L21 siRNA (3304C) antisense	AGAUGAGAUUGCUCUCCAGGUTT	2048
3852	UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUUCUG	2002	KDR:3872L21 siRNA (3854C) antisense	GAAUCCUUCUCCAUUGCUCATT	2049
3892	UCACCUUUUCCUGUAUGGAGGA	2003	KDR:3912L21 siRNA (3894C) antisense	CUCCAUACAGGAAACAGGUTT	2050
3946	GACAACACAGCAGGAUUCAGUCA	2004	KDR:3966L21 siRNA (3948C) antisense	ACUGAUUCCUGCUGUGUUGTT	2051
3302	UGACCUUGGAGCAUCUCAUCUGU	2001	KDR:3304U21 siRNA stab04 sense	B AccuuGGAGcAucucAucutt B	2052
3852	UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUUCUG	2002	KDR:3854U21 siRNA stab04 sense	B uGAGcAuGGAAAGAGGAuucTT B	2053
3892	UCACCUUUUCCUGUAUGGAGGA	2003	KDR:3894U21 siRNA stab04 sense	B AccuGuuuccuGuAuGGAGTT B	2054
3946	GACAACACAGCAGGAUUCAGUCA	2004	KDR:3948U21 siRNA stab04 sense	B cAAcAcAGcAGGAuAcAGuTT B	2055
3302	UGACCUUGGAGCAUCUCAUCUGU	2001	KDR:3322L21 siRNA (3304C) stab05 antisense	AGAUGAGAUGcuccAAGGuTsT	2056
3852	UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUUCUG	2002	KDR:3872L21 siRNA (3854C) stab05 antisense	GAAuccuuccuAuGcucATsT	2057
3892	UCACCUUUUCCUGUAUGGAGGA	2003	KDR:3912L21 siRNA (3894C) stab05 antisense	cuccAuAcAGGAAAcAGGuTsT	2058
3946	GACAACACAGCAGGAUUCAGUCA	2004	KDR:3966L21 siRNA (3948C) stab05 antisense	AcuGAuuccuGcuGuGuuGTsT	2059
3302	UGACCUUGGAGCAUCUCAUCUGU	2001	KDR:3304U21 siRNA stab07 sense	B AccuuGGAGcAucucAucutt B	2060
3852	UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUUCUG	2002	KDR:3854U21 siRNA stab07 sense	B uGAGcAuGGAAAGAGGAuucTT B	2061
3892	UCACCUUUUCCUGUAUGGAGGA	2003	KDR:3894U21 siRNA stab07 sense	B AccuGuuuccuGuAuGGAGTT B	2062
3946	GACAACACAGCAGGAUUCAGUCA	2004	KDR:3948U21 siRNA stab07 sense	B cAAcAcAGcAGGAuAcAGuTT B	2063
3302	UGACCUUGGAGCAUCUCAUCUGU	2001	KDR:3322L21 siRNA (3304C) stab11 antisense	AGAUGAGAUGcuccAAGGuTsT	2064
3852	UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUUCUG	2002	KDR:3872L21 siRNA (3854C) stab11 antisense	GAAuccuuccuAuGcucATsT	2065
3892	UCACCUUUUCCUGUAUGGAGGA	2003	KDR:3912L21 siRNA (3894C) stab11 antisense	cuccAuAcAGGAAAcAGGuTsT	2066
3946	GACAACACAGCAGGAUUCAGUCA	2004	KDR:3966L21 siRNA (3948C) stab11 antisense	AcuGAuuccuGcuGuGuuGTsT	2067

【 0 4 4 6 】

【表 4 3】

VEGFR2

標的	配列番号	RPI 番号	別名	配列	配列 番号
UGUCCACUUACCUGAGGAGCAAG	2017	30785	KDR:3076U21 siRNA stab04 sense	B uccAcuuAccuGAGGAGcATT B	2205
UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUCUG	2002	30786	KDR:3854U21 siRNA stab04 sense	B uGAGcAuGGAAGAGGAuucTT B	2053
AUGGUUCUUGCCUCAGAGAGGCU	2018	30787	KDR:4089U21 siRNA stab04 sense	B GGuucuuGccucAGAAAGAGTT B	2206
UCUGAAGGCUCAAAACCCAGACAAG	2019	30788	KDR:4191U21 siRNA stab04 sense	B uGAAAGGGuuAAAaccAGAcATT B	2207
UGUCCACUUACCUGAGGAGCAAG	2017	30789	KDR:3094L21 siRNA (3076C) stab05 antisense	uGcuuccucAGGuAAAGuGGATsT	2208
UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUCUG	2002	30790	KDR:3872L21 siRNA (3854C) stab05 antisense	GAAuccuuccuuccAuGcuuATsT	2057
AUGGUUCUUGCCUCAGAGAGGCU	2018	30791	KDR:4107L21 siRNA (4089C) stab05 antisense	cucuucuGAGGcAAGAAccTsT	2209
UCUGAAGGCUCAAAACCCAGACAAG	2019	30792	KDR:4209L21 siRNA (4191C) stab05 antisense	uGucuGGuuuGAGGccuucATsT	2210
UGUCCACUUACCUGAGGAGCAAG	2017	31426	KDR:3076U21 siRNA sense	UCCACUuACCUGAGGAGcATT	2211
UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUCUG	2002	31427	KDR:3854U21 siRNA sense	UGAGCAUGGAAGAGGAUUCCTT	2045
AUGGUUCUUGCCUCAGAGAGGCU	2018	31428	KDR:4089U21 siRNA sense	GGUUCUUGCCUCAGAAAGAGTT	2212
UCUGAAGGCUCAAAACCCAGACAAG	2019	31429	KDR:4191U21 siRNA sense	UGAAGGCUCAAAACCAGAcATT	2213
UGUCCACUUACCUGAGGAGCAAG	2017	31430	KDR:3094L21 siRNA (3076C) antisense	UGCUCUCAGGuAAAGUGGATT	2214
UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUCUG	2002	31431	KDR:3872L21 siRNA (3854C) antisense	GAAUCCUCUUCUCCAUUCUCATT	2049
AUGGUUCUUGCCUCAGAGAGGCU	2018	31432	KDR:4107L21 siRNA (4089C) antisense	CUCUUCUGAGGcAAGAAcCCTT	2215
UCUGAAGGCUCAAAACCCAGACAAG	2019	31433	KDR:4209L21 siRNA (4191C) antisense	UGUCUGGUUUUGAGCCUUCATT	2216
UGACCUUGGAGCAUCUCAUCUGU	2001	31434	KDR:3304U21 siRNA sense	ACCUUGGAGCAUCUCAUCUTT	2044
UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUCUG	2002	31435	KDR:3854U21 siRNA sense	UGAGCAUGGAAGAGGAUUCCTT	2045
UCACCUUGUUCUUGUAGGAGGA	2003	31436	KDR:3894U21 siRNA sense	ACCUGUUCUUGUAGGAGTT	2046
GACAAACACAGCAGGAUUCAGUCA	2004	31437	KDR:3948U21 siRNA sense	CAACACAGCAGGAUUCAGUTT	2047
UGACCUUGGAGCAUCUCAUCUGU	2001	31438	KDR:3322L21 siRNA (3304C) antisense	AGAUGAGAUGCUCCAAAGUTT	2048
UUUGAGCAUGGAAGAGGAUUCUG	2002	31439	KDR:3872L21 siRNA (3854C) antisense	GAAUCCUCUUCUCCAUUCUCATT	2049
UCACCUUGUUCUUGUAGGAGGA	2003	31440	KDR:3912L21 siRNA (3894C) antisense	CUCCAUACAGGAAACAGGUTT	2050
GACAAACACAGCAGGAUUCAGUCA	2004	31441	KDR:3966L21 siRNA (3948C) antisense	ACUGAUUCCUCUGUGUUGTT	2051

【 0 4 4 7 】

【表 4 4】

VEGFR3

標的位置	標的	配列番号	別名	配列	配列番号
2009	AGCACUGCCACAAGAAGUACCUG	2005	FLT4:2011U21 siRNA sense	CACUGCCACAAGAAGUACCCTT	2068
3919	CUGAAGCAGAGAGAGAGAAAGGCA	2006	FLT4:3921U21 siRNA sense	GAAGCAGAGAGAGAGAAAGGTT	2069
4036	AAAGAGGAACCCAGGAGGACAAAGA	2007	FLT4:4038U21 siRNA sense	AGAGGAACCCAGGAGGACAAATT	2070
4052	GACAAGAGGAGCAUGAAAGUGGA	2008	FLT4:4054U21 siRNA sense	CAAGAGGAGCAUGAAAGUGTT	2071
2009	AGCACUGCCACAAGAAGUACCUG	2005	FLT4:2029L21 siRNA (2011C) antisense	GGUACUUCUUGUGGCAGUGTT	2072
3919	CUGAAGCAGAGAGAGAGAAAGGCA	2006	FLT4:3939L21 siRNA (3921C) antisense	CCUUCUCUCUCUCUGCUUUCTT	2073
4036	AAAGAGGAACCCAGGAGGACAAAGA	2007	FLT4:4056L21 siRNA (4038C) antisense	UUGUCCUCCUGGUUCCUCUTT	2074
4052	GACAAGAGGAGCAUGAAAGUGGA	2008	FLT4:4072L21 siRNA (4054C) antisense	CACUUUCAUGCUCCUUCUUGTT	2075
2009	AGCACUGCCACAAGAAGUACCUG	2005	FLT4:2011U21 siRNA stab04 sense	B cAcuGccAcAAGAAGuAaccTT B	2076
3919	CUGAAGCAGAGAGAGAGAAAGGCA	2006	FLT4:3921U21 siRNA stab04 sense	B GAAGcAGAGAGAGAGAAAGGTT B	2077
4036	AAAGAGGAACCCAGGAGGACAAAGA	2007	FLT4:4038U21 siRNA stab04 sense	B AGAGGAAccAGGAGGAcAAATT B	2078
4052	GACAAGAGGAGCAUGAAAGUGGA	2008	FLT4:4054U21 siRNA stab04 sense	B cAAGAGAGAGcAuGAAAGuGTT B	2079
2009	AGCACUGCCACAAGAAGUACCUG	2005	FLT4:2029L21 siRNA (2011C) antisense	GGuAcuucuuGuGGcAGuGTsT	2080
3919	CUGAAGCAGAGAGAGAGAAAGGCA	2006	FLT4:3939L21 siRNA (3921C) antisense	ccuucucucucucuGcuucTsT	2081
4036	AAAGAGGAACCCAGGAGGACAAAGA	2007	FLT4:4056L21 siRNA (4038C) antisense	uuGuccuccuGGuuccucuTsT	2082
4052	GACAAGAGGAGCAUGAAAGUGGA	2008	FLT4:4072L21 siRNA (4054C) antisense	cAcuuucAuGcuuccucuGTsT	2083
2009	AGCACUGCCACAAGAAGUACCUG	2005	FLT4:2011U21 siRNA stab07 sense	B cAcuGccAcAAGAAGuAaccTT B	2084
3919	CUGAAGCAGAGAGAGAGAAAGGCA	2006	FLT4:3921U21 siRNA stab07 sense	B GAAGcAGAGAGAGAGAAAGGTT B	2085
4036	AAAGAGGAACCCAGGAGGACAAAGA	2007	FLT4:4038U21 siRNA stab07 sense	B AGAGGAAccAGGAGGAcAAATT B	2086
4052	GACAAGAGGAGCAUGAAAGUGGA	2008	FLT4:4054U21 siRNA stab07 sense	B cAAGAGGAGcAuGAAAGuGTT B	2087
2009	AGCACUGCCACAAGAAGUACCUG	2005	FLT4:2029L21 siRNA (2011C) antisense	GGuAcuucuuGuGGcAGuGTsT	2088
3919	CUGAAGCAGAGAGAGAGAAAGGCA	2006	FLT4:3939L21 siRNA (3921C) antisense	ccuucucucucucuGcuucTsT	2089

10

20

30

40

【表 4 5】

4036	AAAGAGGAACCAAGGAGGACAAGA	2007	FLT4:4056L21 siRNA (4038C) stab11 antisense	uuGuccuccuGGuuccucuTsT	2090
4052	GACAAAGAGGAGCAUGAAAGUGGA	2008	FLT4:4072L21 siRNA (4054C) stab11 antisense	cAuuuucAuGuccuccuuGTsT	2091

大文字 = リボヌクレオチド
u,c = 2'-デオキシ-2'-フルオロ U,C
T = チミン
B = 反転デオキシ無塩基
s = ホスホロチオエート結合
A = デオキシアデニン
G = デオキシグアニン

表IV

化学的に修飾されたsiRNA構築物用の安定化化学の非限定的例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	p=S	鎖
"Stab1"	リボ	リボ	—	5'末端に5 3'末端に1	S/AS
"Stab2"	リボ	リボ	—	全結合	通常はAS
"Stab3"	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常はS
"Stab4"	2'-フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab5"	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab6"	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab7"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab8"	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab9"	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab10"	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab11"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常はAS

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば、図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミン(TT) 残基を含むことができる。

Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21 スクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。

S = センス鎖

AS = アンチセンス鎖

【表 4 7】

表 V

A. 2.5 μ mol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間* DNA	待機時間* 2'-O-メチル	待機時間*RNA
ホスホルアミダイト	6.5	163 μ L	45 sec	2.5 min	7.5 min
S-エチルテトラゾール	23.8	238 μ L	45 sec	2.5 min	7.5 min
無水酢酸	100	233 μ L	5 sec	5 sec	5 sec
N-メチルイミダゾール	186	233 μ L	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	176	2.3 mL	21 sec	21 sec	21 sec
ヨウ素	11.2	1.7 mL	45 sec	45 sec	45 sec
ボーケージ	12.9	645 μ L	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	6.67 mL	NA	NA	NA

10

B. 0.2 μ mol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間* DNA	待機時間* 2'-O-メチル	待機時間*RNA
ホスホルアミダイト	15	31 μ L	45 sec	233 sec	465 sec
S-エチルテトラゾール	38.7	31 μ L	45 sec	233 min	465 sec
無水酢酸	655	124 μ L	5 sec	5 sec	5 sec
N-メチルイミダゾール	1245	124 μ L	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	700	732 μ L	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.6	244 μ L	15 sec	15 sec	15 sec
ボーケージ	7.7	232 μ L	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	2.64 mL	NA	NA	NA

20

C. 0.2 μ mol 合成サイクル 96 ウェル装置

試薬	当量:DNA/2'-O-メチル/リボ	量: DNA/2'-O-メチル/リボ	待機時間* DNA	待機時間* 2'-O-メチル	待機時間* リボ
ホスホルアミダイト	22/33/66	40/60/120 μ L	60 sec	180 sec	360sec
S-エチルテトラゾール	70/105/210	40/60/120 μ L	60 sec	180 min	360 sec
無水酢酸	265/265/265	50/50/50 μ L	10 sec	10 sec	10 sec
N-メチルイミダゾール	502/502/502	50/50/50 μ L	10 sec	10 sec	10 sec
TCA	238/475/475	250/500/500 μ L	15 sec	15 sec	15 sec
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	80/80/80 μ L	30 sec	30 sec	30 sec
ボーケージ	34/51/51	80/120/120	100 sec	200 sec	200 sec
アセトニトリル	NA	1150/1150/1150 μ L	NA	NA	NA

30

40

- ・ 待機時間は輸送の間の接触時間を含まない
- ・ タンデム合成にはリンカー分子のダブルカップリングを利用する

【図面の簡単な説明】

【0 4 5 1】

【図 1】図 1 は、s i N A 分子を合成するスキームの例を示す。

【図 2】図 2 は、本発明の方法により合成された精製 s i N A デュープレックスの M A L D I - T O V 質量分析を示す。

【図 3】図 3 は、R N A i に関する標的 R N A 分解の提唱されるメカニズムの例を示す

50

図である。

【図 4】図 4 は、化学的に修飾された s i N A コンストラクトの例を示す。

【図 5】図 5 は、化学的に修飾された特定の s i N A 配列の例を示す。

【図 6】図 6 は、種々 s i N A コンストラクトの例を示す。

【図 7】図 7 は、s i N A ヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。

【図 8】図 8 は、発現カセットを作製して二本鎖 s i N A コンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。

【図 9】図 9 は、特定の標的核酸配列を決定するために用いられる方法の概略図である。

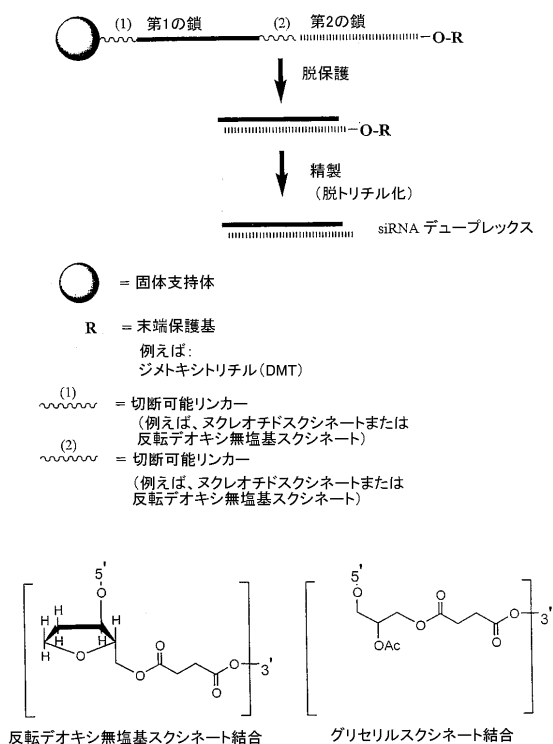
【図 10】図 10 は、s i N A 配列の 3' 末端を安定化させるために用いることができる、種々の安定化化学の例を示す。 10

【図 11】図 11 は、化学的に修飾された s i N A コンストラクトを同定するために用いられる戦略の例を示す。

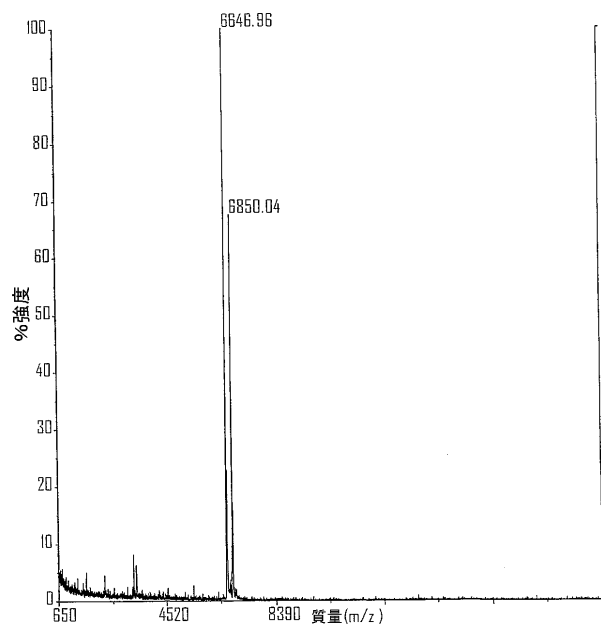
【図 12】図 12 は、血管新生のラット角膜モデルを用いた V E G F 誘導性血管新生の s i N A 媒介阻害の非限定的例を示す。

【図 13】図 13 は、V E G F r m R N A を標的とする化学修飾 s i N A によって媒介される A 3 7 5 細胞における V E G F r 1 m R N A の低減の非限定的例を示す。

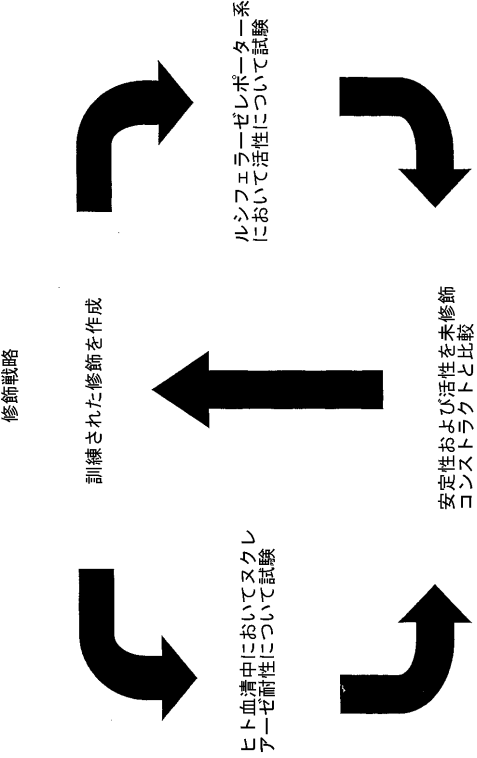
【図 1】



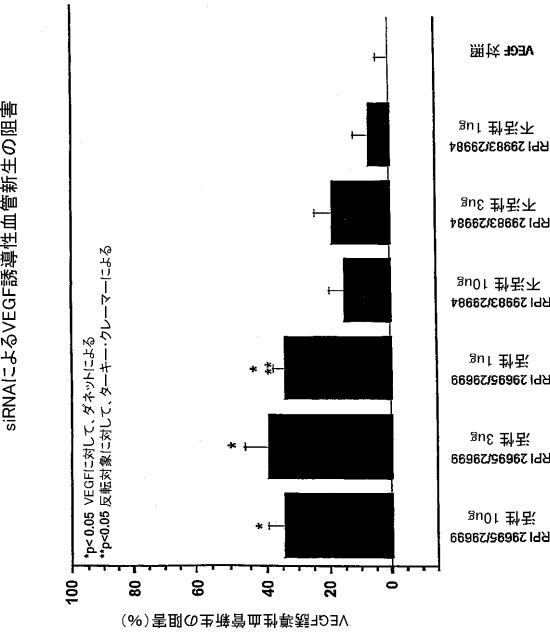
【図 2】



【図 1 1】

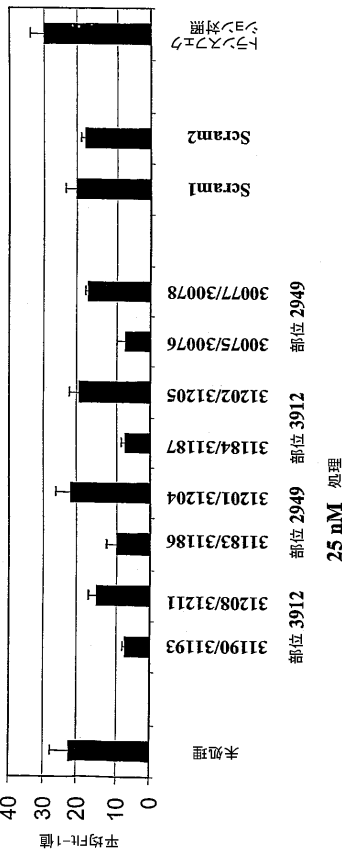


【図 1 2】



【図 1 3】

A375 24h 36B4 VEGFR1 mRNA 発現



【手続補正書】

【提出日】平成16年6月8日(2004.6.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

RNA干渉(RNAi)により血管内皮細胞成長因子レセプター(VEGFr)RNAの切断を指示する化学的に合成された二本鎖短干渉核酸(sina)分子であって、

a. 前記sina分子の各鎖は約19ー約23ヌクレオチドの長さであり；

b. 前記sina分子の一方の鎖は前記VEGFr RNAに対してsina分子がRNA干渉によりVEGFr RNAの切断を指示するのに十分な相補性を有するヌクレオチド配列を含み；および

c. 前記sina分子は少なくとも1つの化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む、

ことを特徴とするsina分子。

【請求項2】

前記sina分子がリボヌクレオチドを含まない、請求項1記載のsina分子。

【請求項3】

前記sina分子が1またはそれ以上のリボヌクレオチドを含む、請求項1記載のsina分子。

【請求項4】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチドを含む、請求項1記載のsina分子。

【請求項5】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含む、請求項1記載のsina分子。

【請求項6】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-O-メチルヌクレオチドを含む、請求項1記載のsina分子。

【請求項7】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドがホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項1記載のsina分子。

【請求項8】

前記非ヌクレオチドが無塩基成分を含む、請求項1記載のsina分子。

【請求項9】

前記無塩基成分が反転デオキシ無塩基成分を含む、請求項8記載のsina分子。

【請求項10】

前記非ヌクレオチドがグリセリル成分を含む、請求項1記載のsina分子。

【請求項11】

前記二本鎖sina分子の一方の鎖はVEGFr遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、前記二本鎖sina分子の第2の鎖は前記VEGFr RNAのヌクレオチド配列またはその一部と実質的に類似するヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のsina分子。

【請求項12】

sina分子の各鎖は約19ー約23ヌクレオチドを含み、各鎖は他方の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む、請求項11記載のsina分子。

【請求項13】

前記 s i N A 分子は V E G F r 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み、前記 s i N A はさらにセンス領域を含み、前記センス領域は、前記 V E G F r 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部と実質的に類似するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 1 4】

前記アンチセンス領域および前記センス領域は約 1 9 – 約 2 3 ヌクレオチドを含み、前記アンチセンス領域はセンス領域のヌクレオチドに相補的な少なくとも約 1 9 ヌクレオチドを含む、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 1 5】

前記 s i N A 分子はセンス領域およびアンチセンス領域を含み、前記アンチセンス領域は V E G F r 遺伝子によりコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、および前記センス領域は前記アンチセンス領域に相補的なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 1 6】

前記 s i N A 分子は 2 つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ、一方のフラグメントは前記 s i N A 分子のセンス領域を含み、第 2 のフラグメントは前記 s i N A 分子のアンチセンス領域を含む、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 1 7】

前記センス領域がリンカー分子を介してアンチセンス領域と連結されている、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 1 8】

前記リンカー分子がポリヌクレオチドリンカーである、請求項 1 7 記載の s i N A 分子。

【請求項 1 9】

前記リンカー分子が非ヌクレオチドリンカーである、請求項 1 7 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 0】

センス領域中のピリミジンヌクレオチドが 2' – オーメチルピリミジンヌクレオチドである、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 1】

センス領域中のプリンヌクレオチドが 2' – デオキシプリンヌクレオチドである、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 2】

センス領域中に存在するピリミジンヌクレオチドが 2' – デオキシ – 2' – フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 3】

前記センス領域を含むフラグメントが、前記センス領域を含むフラグメントの 5' – 末端、3' – 末端、または 5' 末端および 3' 末端の両方に末端キャップ成分を含む、請求項 1 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 4】

前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項 2 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 5】

前記アンチセンス領域のピリミジンヌクレオチドが 2' – デオキシ – 2' – フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 6】

前記アンチセンス領域のプリンヌクレオチドが 2' – オーメチルプリンヌクレオチドである、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 7】

前記アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドが 2' – デオキシ – プリンヌクレオチドを含む、請求項 1 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 8】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の 3' 末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項 13 記載の siNA 分子。

【請求項 29】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の 3' 末端にグリセリル修飾を含む、請求項 13 記載の siNA 分子。

【請求項 30】

前記 siNA 分子の 2 つのフラグメントのそれぞれが 21 ヌクレオチドを含む、請求項 16 記載の siNA 分子。

【請求項 31】

siNA 分子の各フラグメントの約 19 ヌクレオチドが siNA 分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成しており、siNA 分子の各フラグメントの少なくとも 2 つの 3' 末端ヌクレオチドが siNA 分子の他方のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成していない、請求項 30 記載の siNA 分子。

【請求項 32】

siNA 分子の各フラグメントの 2 つの 3' 末端ヌクレオチドが 2'-デオキシピリミジンである、請求項 31 記載の siNA 分子。

【請求項 33】

前記 2'-デオキシピリミジンが 2'-デオキシチミジンである、請求項 32 記載の siNA 分子。

【請求項 34】

siNA 分子の各フラグメントの 21 ヌクレオチドすべてが siNA 分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成している、請求項 30 記載の siNA 分子。

【請求項 35】

アンチセンス領域の約 19 ヌクレオチドが VEGFr 遺伝子によりコードされる RNA のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している、請求項 30 記載の siNA 分子。

【請求項 36】

アンチセンス領域の 21 ヌクレオチドが VEGFr 遺伝子によりコードされる RNA のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している、請求項 30 記載の siNA 分子。

【請求項 37】

前記アンチセンス領域を含むフラグメントの 5' 末端が任意にリン酸基を含む、請求項 16 記載の siNA 分子。

【請求項 38】

許容しうる担体または希釈剤中に請求項 1 記載の siNA 分子を含む医薬組成物。

【請求項 39】

前記 VEGFr RNA が VEGFr 1 RNA である、請求項 1 記載の siNA 分子。

【請求項 40】

前記 VEGFr RNA が VEGFr 2 RNA である、請求項 1 記載の siNA 分子。

【請求項 41】

前記 VEGFr RNA が VEGFr 3 RNA である、請求項 1 記載の siNA 分子。

【国際調査報告】

International application No. PCT/US03/05022*											
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04; C12P 19/34 US CL : 536/23.2, 24.5; 435/91.31 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) U.S. : 536/23.2, 24.5; 435/91.31 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) Please See Continuation Sheet											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,346,398 B1 (PAVCO et al) 12 February 2002 (12.02.2002), see Table II.</td> <td>1-45</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>TUSCHL, T. RNA Interference and Small Interfering RNAs CHEMBIOCHEM 2001, Vol. 2, pages 239-245, especially page 239.</td> <td>1-45</td> </tr> </tbody> </table>		Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 6,346,398 B1 (PAVCO et al) 12 February 2002 (12.02.2002), see Table II.	1-45	A	TUSCHL, T. RNA Interference and Small Interfering RNAs CHEMBIOCHEM 2001, Vol. 2, pages 239-245, especially page 239.	1-45	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	US 6,346,398 B1 (PAVCO et al) 12 February 2002 (12.02.2002), see Table II.	1-45									
A	TUSCHL, T. RNA Interference and Small Interfering RNAs CHEMBIOCHEM 2001, Vol. 2, pages 239-245, especially page 239.	1-45									
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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										
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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										
"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)	"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										
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family										
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report										
12-October-2004 (12.10.2004)	06 JAN 2005										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized Officer Janet L. Epps-Ford, Ph.D. Telephone No. 703-308-0198 <i>Janet Epps-Ford</i>										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/05

Continuation of Item 4 of the first sheet:

Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptor Gene Expression Using Short Interfering Nucleic Acid (siNA)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CaPlus, Medline, Biosis, USPATfull, Petfull

search terms: VEGF, VPF, ribozyme, antisense, siRNA, PTGS, RNAi

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/386,782
 (32)優先日 平成14年6月6日(2002.6.6)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/393,796
 (32)優先日 平成14年7月3日(2002.7.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/399,348
 (32)優先日 平成14年7月29日(2002.7.29)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/406,784
 (32)優先日 平成14年8月29日(2002.8.29)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/408,378
 (32)優先日 平成14年9月5日(2002.9.5)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/409,293
 (32)優先日 平成14年9月9日(2002.9.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 10/287,949
 (32)優先日 平成14年11月4日(2002.11.4)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 10/306,747
 (32)優先日 平成14年11月27日(2002.11.27)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/440,129
 (32)優先日 平成15年1月15日(2003.1.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

- (74)代理人 100114465
 弁理士 北野 健
 (72)発明者 マクスウィゲン, ジェームズ
 アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー, フランクリン ドライブ 4866
 (72)発明者 ベーゲルマン, レオニド
 アメリカ合衆国 80503 コロラド州 ロングモント, コルト ドライブ 5530
 (72)発明者 パブコ, パメラ
 アメリカ合衆国 80026 コロラド州 ラファイエット, バーベリー サークル 705
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA21 CA02 CA05 CA10 CA11 DA03 HA17
 4C084 AA02 AA07 AA13 DC50 NA14 ZB262
 4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26