

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6165158号
(P6165158)

(45) 発行日 平成29年7月19日 (2017. 7. 19)

(24) 登録日 平成29年6月30日 (2017. 6. 30)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	48/00	(2006. 01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 N	1/21	(2006. 01)	C 1 2 N	1/21	Z N A
C 1 2 N	1/19	(2006. 01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/15	(2006. 01)	C 1 2 N	1/15	
A 6 1 P	25/00	(2006. 01)	A 6 1 P	25/00	

請求項の数 35 (全 134 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-542525 (P2014-542525)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月16日 (2012. 11. 16)
 (65) 公表番号 特表2014-534244 (P2014-534244A)
 (43) 公表日 平成26年12月18日 (2014. 12. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/065691
 (87) 国際公開番号 W02013/075035
 (87) 国際公開日 平成25年5月23日 (2013. 5. 23)
 審査請求日 平成27年11月12日 (2015. 11. 12)
 (31) 優先権主張番号 61/561, 710
 (32) 優先日 平成23年11月18日 (2011. 11. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/615, 618
 (32) 優先日 平成24年3月26日 (2012. 3. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505369158
 アルナイラム ファーマシューティカルズ
 , インコーポレイテッド
 ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 142, ケンブリッジ, サード スト
 リート 300
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスサイレチン (TTR) 関連疾患を治療するためのRNA i 剤、組成物、およびこれらの使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含む二本鎖RNA i 剤であって、前記アンチセンス鎖が、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子 (配列番号 1) のヌクレオチド 504-526 に相補的な配列を含み、前記センス鎖が 21ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖が 23ヌクレオチドであり、前記二本鎖RNA i 剤が、式 (I I I) によって表され：
 センス鎖：5' n_p - N_a - (XXX) $_i$ - N_b - YYY - N_b - (ZZZ) $_j$ - N_a - n_q 3'
 アンチセンス鎖：3' n_p' - N_a' - (X'X'X') $_k$ - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z') $_l$ - N_a' - n_q' 5'
 (I I I)

式中、

j は 1 であり、i、k および l は 0 であり；p' は 2 であり、p、q および q' は 0 であり；各 N_a および N_a' は独立して、修飾されているヌクレオチドである 2 ~ 10 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；各 N_b および N_b' は独立して、修飾されているヌクレオチドである 0 ~ 7 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し； n_p は、オーバーハングヌクレオチドを表し；YYY、ZZZ、および Y'Y'Y' はそれぞれ独立して、3つの連続したヌクレオチド

における 3 つの同一の修飾からなる 1 つのモチーフを表し、前記 Y ヌクレオチドは 2' -フルオロ修飾を含み、前記 Y' ヌクレオチドは 2' -O-メチル修飾を含み、前記 Z ヌクレオチドは 2' -O-メチル修飾を含み；かつ

前記センス鎖が、少なくとも 1 つのリガンドにコンジュゲートしており、前記リガンドが、二価または三価分岐リンカーによって付着された 1 つ以上の G a l N A c 誘導体である、二本鎖 R N A i 剤。

【請求項 2】

前記 Y Y Y モチーフが、前記センス鎖の切断部位またはその近傍に存在するか、または前記 Y' Y' Y' モチーフが、前記アンチセンス鎖の 5' 末端から 1 1 位、1 2 位、および 1 3 位に存在する、請求項 1 に記載の R N A i 剤。

10

【請求項 3】

前記 N_a 、 N_a' 、 N_b および N_b' ヌクレオチドの前記修飾がそれぞれ独立して、L N A、H N A、C e N A、2' -メトキシエチル、2' -O-アルキル、2' -O-アリル、2' -C-アリル、2' -フルオロ、2' -デオキシ、2' -ヒドロキシル、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 に記載の R N A i 剤。

【請求項 4】

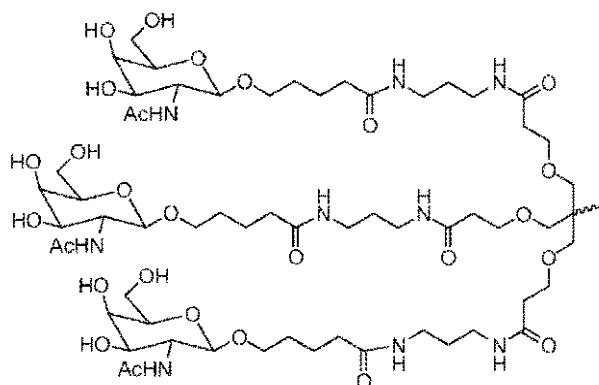
前記 N_a 、 N_a' 、 N_b および N_b' ヌクレオチドの前記修飾が、2' -O-メチル、2' -フルオロ、またはこれらの両方である、請求項 3 に記載の R N A i 剤。

【請求項 5】

前記リガンドが、

20

【化 1】



30

である、請求項 1 に記載の R N A i 剤。

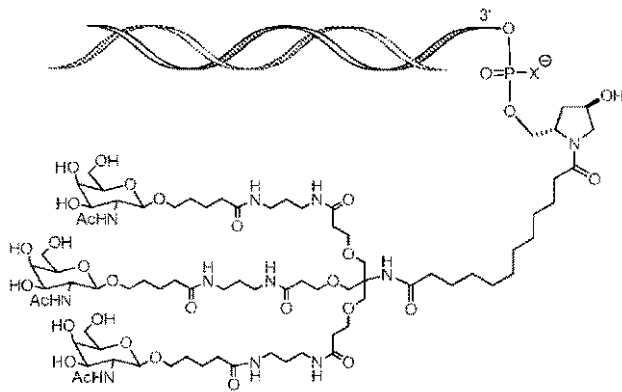
【請求項 6】

前記リガンドが、前記センス鎖の 3' 末端に付着している、請求項 1 に記載の R N A i 剤。

【請求項 7】

前記 R N A i 剤が、以下の式

【化 2】



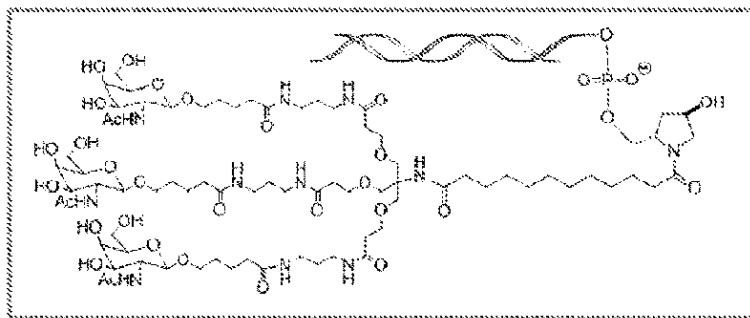
10

に示されているリガンドにコンジュゲートし、
式中、XがOまたはSである、請求項6に記載のRNAi剤。

【請求項 8】

前記RNAi剤が、以下の式

【化 3】



20

に示されているリガンドにコンジュゲートしている、請求項7に記載のRNAi剤。

【請求項 9】

少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合をさらに含む、請求項1に記載のRNAi剤。

30

【請求項 10】

前記ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合が、一方の鎖の3'末端にある、請求項9に記載のRNAi剤。

【請求項 11】

前記鎖が、前記アンチセンス鎖または前記センス鎖である、請求項10に記載のRNAi剤。

【請求項 12】

二重鎖のアンチセンス鎖の5'末端の1位にある塩基対がAU塩基対である、請求項1に記載のRNAi剤。

40

【請求項 13】

p'オーバーハングヌクレオチドが、標的mRNAに相補的であるか、またはp'オーバーハングヌクレオチドが、標的mRNAに相補的でない、請求項1に記載のRNAi剤。

【請求項 14】

少なくとも1つのnp'が、ホスホロチオエート連結によって隣接するヌクレオチドに連結されている、請求項1に記載のRNAi剤。

【請求項 15】

全てのnp'が、ホスホロチオエート連結によって隣接するヌクレオチドに連結されて

50

いる、請求項 1 4 に記載の R N A i 剤。

【請求項 1 6】

前記 R N A i 剤が配列番号：2 2 1 0 のセンス鎖および配列番号：2 2 1 6 のアンチセンス鎖からなる A D - 5 1 5 4 6 および配列番号：2 2 1 1 のセンス鎖および配列番号：2 2 1 7 のアンチセンス鎖からなる A D - 5 1 5 4 7 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の R N A i 剤。

【請求項 1 7】

前記 R N A i 剤が配列番号：2 2 1 1 のセンス鎖および配列番号：2 2 1 7 のアンチセンス鎖からなる A D - 5 1 5 4 7 である、請求項 1 に記載の R N A i 剤。

【請求項 1 8】

センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖 R N A i 剤であって、前記センス鎖はヌクレオチド配列 5' - U f g G f g A f u U f u C f A f U f g U f a a c C f a A f g A f L 9 6 - 3' (配列番号：2) を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 5' - u C f u U f g G f U f U f a C f a u g A f a A f u C f c C f a s U f s c - 3' (配列番号：3) を含み、
a、g、c および u は 2' - O - メチル (2' - O M e) A、G、C および U であり；A f、G f、C f および U f は 2' - フルオロ A、G、C および U であり；s はホスホロチオエート結合であり；L 9 6 は G a l N A c 3 リガンドである、二本鎖 R N A i 剤。

【請求項 1 9】

請求項 1、1 7 および 1 8 の何れか 1 項に記載の R N A i 剤を含む単離された細胞。

【請求項 2 0】

請求項 1、1 7 および 1 8 の何れか 1 項に記載の R N A i 剤を含む医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記 R N A i 剤が、非緩衝液に溶解されて投与される、請求項 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

前記非緩衝液が、生理食塩水または水である、請求項 2 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

前記 R N A i 剤が、緩衝液を用いて投与される、請求項 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記緩衝液が、酢酸塩、クエン酸塩、プロタミン、炭酸塩、リン酸塩、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記緩衝液が、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) である、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

細胞におけるトランスサイレチン (T T R) の発現を阻害するための医薬組成物であって、請求項 1、1 7 および 1 8 の何れか 1 項に記載の R N A i 剤を、前記細胞における前記 T T R の発現を阻害するのに有効な量で含む、医薬組成物。

【請求項 2 7】

対象の T T R 関連疾患を治療するための医薬組成物であって、請求項 1、1 7 および 1 8 の何れか 1 項に記載の R N A i 剤を治療有効量で含む、医薬組成物。

【請求項 2 8】

細胞におけるトランスサイレチン (T T R) の発現を阻害するためのキットであって、
(a) 請求項 1、1 7 および 1 8 の何れか 1 項に記載の R N A i 剤と、
(b) 使用するための取扱説明書と、
を含む、キット。

【請求項 2 9】

対象の T T R 関連疾患を治療するためのキットであって、

(a) 請求項 1、1 7 および 1 8 の何れか 1 項に記載の R N A i 剤と、

(b) 使用するための取扱説明書と、
(c) 任意選択の、前記RNAi剤を前記対象に投与するための手段と、
を含む、キット。

【請求項30】

前記センス鎖が、ヌクレオチド配列 5' - U G G G A U U U C A U G U A A C C A A
G A - 3' (配列番号: 2 2 1 1) を含む、請求項1に記載のRNAi剤。

【請求項31】

前記対象がヒトである、請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項32】

前記対象が、TTR関連疾患の発症に関連したTTR遺伝子突然変異を有する、請求項
27に記載の医薬組成物。 10

【請求項33】

前記TTR関連疾患が、老人性全身性アミロイドーシス(SSA)、全身性家族性アミ
ロイドーシス、家族性アミロイド多発神経障害(FAP)、家族性アミロイド心筋症(F
AC)、軟髄膜/中枢神経系(CNS)アミロイドーシス、および高サイキロシン血症か
らなる群から選択される、請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項34】

前記対象が、TTR関連アミロイドーシスを有し、前記医薬組成物が、前記対象のアミ
ロイドTTR沈着を減少させる、請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項35】

前記RNAi剤が、皮下投与によって前記対象に投与される、請求項27に記載の医薬
組成物。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2011年11月18日出願の米国仮特許出願第61/561,710号、
2012年3月26日出願の同第61/615,618号、および2012年8月6日出
願の同第61/680,098号の優先権を主張するものであり、これら全ての出願は、
参照により全開示内容が本明細書に組み入れられるものとする。 30

【0002】

配列表

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出された配列表を含み、この配
列表は、参照によりその全てが本明細書に組み入れられるものとする。2012年11月
13日に作成された前記ASCIIコピーは、121301WO.txtという名称が付
され、そのサイズは、541,508バイトである。

【背景技術】

【0003】

トランスサイレチン(TTR)(プレアルブミンとしても知られる)は、血清および脳
脊髄液(CSF)に存在する。TTRは、レチノール結合タンパク質(RBP)およびサイ
ロキシン(T4)を輸送し、血液およびCSF中のRBPとの結合によりレチノール(40
ビタミンA)の担体としても機能する。トランスサイレチン(trans thyretin)
は、そのサイロキシン(thyroxineのthy)およびレチノール(reti
nolのretin)の輸送(transportのtrans)から名付けられている。
TTRはまた、プロテアーゼとしても機能し、アポA-I(主要なHDLアポリポタン
パク質)、アミロイドβペプチド、および神経ペプチドYを含むタンパク質を切断する
ことができる。非特許文献1を参照されたい。

【0004】

TTRは、βシート構造が豊富な4つの同一の127個のアミノ酸サブユニット(モノ
マー)からなる四量体である。各モノマーは、2つの4本鎖βシートおよび扁長楕円体の 50

形状を有する。逆平行 β シートの相互作用が、モノマーを連結して二量体にする。各モノマーの短いループが、主要な二量体と二量体との相互作用を形成する。これらの2対のループは、二量体の対向した凸状の β シートを分離させて内部チャンネルを形成する。

【0005】

肝臓は、TTR発現の主要部位である。他の重要な発現部位としては、脈絡叢、網膜（特に、網膜色素上皮）、および脾臓が挙げられる。

【0006】

トランスサイレチンは、アミロイド原線維の形成における前駆タンパク質である少なくとも27種類のタンパク質の1つである。非特許文献2を参照されたい。器官および組織におけるアミロイド原線維の細胞外沈着は、アミロイドーシスの特徴である。アミロイド原線維は、前駆タンパク質の過剰な産生または前駆タンパク質の特定の突然変異から生じ得るミスフォールドタンパク質凝集体から構成される。TTRのアミロイド形成の可能性は、広い β シート構造に関連し得る；X線による結晶学的研究により、特定のアミロイド形成性突然変異が、タンパク質の四量体構造を不安定にすることが示唆されている。例えば、非特許文献3を参照されたい。

【0007】

アミロイドーシスは、アミロイド沈着によって特徴付けられるアミロイド疾患群の一般的な用語である。アミロイド疾患は、その前駆タンパク質に基づいて分類される；例えば、名称は、アミロイド (amyloid) の「A」から始まり、前駆タンパク質の省略形が続く、例えば、ATTRは、アミロイド形成性トランスサイレチン (amyloidogenic transthyretin) の amyloidogenic 中の「a」と transthyretin 中の「t」、「t」、および「r」からなる。同一文献同一頁。

【0008】

多数のTTR関連疾患が存在し、その殆どがアミロイド疾患である。通常の配列のTTRは、高齢者の心アミロイドーシスに関連し、老人性全身性アミロイドーシス (SSA) と呼ばれる（また、老人性心アミロイドーシス (SCA) または心アミロイドーシスとも呼ばれる）。SSAは、しばしば、多くの他の器官における微小沈着物を伴う。TTRアミロイドーシスは、様々な形態で現れる。末梢神経系により顕著に現れる場合、この疾患は、家族性アミロイド多発神経障害 (FAP) と呼ばれる。心臓に主に現れるが、神経系に現れない場合は、この疾患は、家族性アミロイド心筋症 (FAC) と呼ばれる。第3の主要なタイプのTTRアミロイドーシスは、軟髄膜アミロイドーシスであり、軟髄膜もしくは髄膜脳血管アミロイドーシス、中枢神経系 (CNS) アミロイドーシス、またはアミロイドーシス VIL型としても知られている。TTRにおける突然変異は、アミロイド性硝子体混濁、手根管症候群、および甲状腺機能正常型高サイキロシン血症を引き起こすこともある。この甲状腺機能正常型高サイキロシン血症は、サイキロシンに対して高い親和性を有する突然変異TTR分子によるサイロキシンとTTRとの結合の増加によって発症すると考えられる非アミロイド性疾患である。例えば、非特許文献4を参照されたい。

【0009】

異常アミロイド形成性タンパク質は、遺伝性であるか、または体細胞突然変異による後天性であり得る。非特許文献2。トランスサイレチン関連ATTRは、遺伝性全身性アミロイドーシスの最も高頻度の形態である。非特許文献5。TTR突然変異は、TTRアミロイド形成のプロセスを加速させ、ATTRの発生の最も重要な危険因子である。全身性家族性アミロイドーシスを引き起こす85を超えるアミロイド形成性TTR変異体が知られている。TTR突然変異は、通常は、全身性アミロイド沈着を引き起こし、特に末梢神経系に生じるが、一部の突然変異は、心筋症または硝子体混濁に関連する。同一文献同一頁。

【0010】

V30M突然変異は、最も一般的なTTR突然変異である。例えば、非特許文献5を参照されたい。V122I突然変異は、アフリカ系米国人の人口の3.9%が保有者であり

10

20

30

40

50

、そしてFACの最も一般的な原因である。非特許文献6。SSAは、80歳を超える人口の25%超で発症すると推定される。非特許文献7。

【0011】

従って、TTR関連疾患の有用な治療法が当分野で要望されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Liz, M. A. et al. (2010) IUBMB Life, 62 (6): 429-435

【非特許文献2】Guan, J. et al. (Nov. 4, 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, Am J Physiol Heart Circ Physiol, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011 10

【非特許文献3】Saraiva M. J. M. (2002) Expert Reviews in Molecular Medicine, 4 (12): 1-11

【非特許文献4】Moses et al. (1982) J. Clin. Invest., 86, 2025-2033

【非特許文献5】Lobato, L. (2003) J. Nephrol., 16: 438-442

【非特許文献6】Jacobson, D. R. et al. (1997) N. Engl. J. Med. 336 (7): 466-73 20

【非特許文献7】Westermarck, P. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87 (7): 2843-5

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子を標的とするRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を提供する。本発明はまた、TTRの発現を阻害する方法、および本発明のRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を用いて対象のTTR関連疾患を治療または予防する方法を提供する。本発明は、特定の化学修飾を有するRNAi剤がTTRの発現を阻害する優れた能力を示すという発見に少なくとも部分的に基づいている。特定のパターンの化学修飾 (例えば、交互パターン) およびリガンドを有する作用剤は、TTR遺伝子の活性のサイレンシングに有効であることが本明細書で示される。さらに、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフを含み、1つのこのようなモチーフが作用剤の切断部位またはその近傍にある作用剤は、驚くほど強いTTR遺伝子サイレンシング活性を示す。1つのこのような化学モチーフが作用剤に存在する場合は、このような化学モチーフは、遺伝子サイレンシング活性を高めるために切断部位またはその近傍に存在するのが好ましい。切断領域は、切断部位、即ち、切断が起こる標的mRNAにおける部位を取り囲む領域である。 30

【0014】

従って、一態様では、本発明は、トランスサイレチン (TTR) の発現を阻害するためのRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を取り上げる。二本鎖RNAi剤は、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含む。アンチセンス鎖は、トランスサイレチンをコードするmRNAの一部に相補的な領域を含む。各鎖は、14~30のヌクレオチドを有し、二本鎖RNAi剤は、以下の式によって表される：

センス鎖：5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3' 40

アンチセンス鎖：3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'

(III)。

式 I I I では、 i 、 j 、 k 、および l はそれぞれ独立して、0 または 1 であり； p 、 p' 、 q 、および q' はそれぞれ独立して、0 ～ 6 であり；各 N_a および N_a' は独立して、修飾されている、修飾されていない、またはこれらの組み合わせである 0 ～ 25 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み；各 N_b および N_b' は独立して、修飾されている、修飾されていない、またはこれらの組み合わせである 0 ～ 10 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；各 n_p 、 n_p' 、 n_q 、および n_q' は独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し； XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 、および $Z'Z'Z'$ はそれぞれ独立して、3 つの連続したヌクレオチドにおける 3 つの同一の修飾からなる 1 つのモチーフを表し； N_b の修飾が、 Y の修飾とは異なり、かつ N_b' の修飾が、 Y' の修飾とは異なる。一実施形態では、センス鎖は、少なくとも 1 つのリガンド、例えば、少なくとも 1 つのリガンド、例えば、センス鎖の 3' 末端に付着した少なくとも 1 つのリガンドにコンジュゲートしている。他の実施形態では、リガンドは、アンチセンス鎖にコンジュゲートしても良い。

10

【0015】

一部の実施形態では、 i が 1 である； j が 1 である；または i と j の両方が 1 である。

【0016】

一部の実施形態では、 k が 1 である； l が 1 である；または k と l の両方が 1 である。

【0017】

一部の実施形態では、 i が 0 であり； j が 1 である。

20

【0018】

一部の実施形態では、 i が 1 であり； j が 0 である。

【0019】

一部の実施形態では、 k が 0 であり； l が 1 である。

【0020】

一部の実施形態では、 k が 1 であり； l が 0 である。

【0021】

一部の実施形態では、 XXX は、 $X'X'X'$ に相補的であり、 YYY は、 $Y'Y'Y'$ に相補的であり、かつ ZZZ は、 $Z'Z'Z'$ に相補的である。

【0022】

一部の実施形態では、 YYY モチーフは、センス鎖の切断部位またはその近傍に存在する。

30

【0023】

一部の実施形態では、 $Y'Y'Y'$ モチーフは、アンチセンス鎖の 5' 末端から 11 位、12 位、および 13 位に存在する。

【0024】

一部の実施形態では、 Y' は 2'-O-メチルである。

【0025】

一部の実施形態では、 Y' は 2'-フルオロである。

【0026】

一部の実施形態では、式 (I I I) は、式 (I I I a) として表される：

センス鎖： $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$
 アンチセンス鎖： $3' n_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_b' - Z' Z' Z' - N_a' n_q' 5'$

(I I I a)。

式 I I I a では、各 N_b および N_b' は独立して、1 ～ 5 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。

【0027】

一部の実施形態では、式 (I I I) は、式 (I I I b) として表される：

センス鎖： $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

50

アンチセンス鎖：3' n_p ' - N_a ' - X' X' X' - N_b ' - Y' Y' Y' - N_a ' - n_q ' 5'

(I I I b) 。

式 I I I b では、各 N_b および N_b ' は独立して、1～5の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。

【0028】

一部の実施形態では、式 (I I I) は、式 (I I I c) として表される：

センス鎖：5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'
 アンチセンス鎖：3' n_p ' - N_a ' - X' X' X' - N_b ' - Y' Y' Y' - N_b ' - Z' Z' Z' - N_a ' - n_q ' 5'

(I I I c) 。

式 I I I c では、各 N_b および N_b ' は独立して、1～5の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各 N_a および N_a ' は独立して、2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。

【0029】

多くの実施形態では、二重鎖領域は、15～30のヌクレオチド対の長さである。一部の実施形態では、二重鎖領域は、17～23のヌクレオチド対の長さ、17～25のヌクレオチド対の長さ、23～27のヌクレオチド対の長さ、19～21のヌクレオチド対の長さ、または21～23のヌクレオチド対の長さである。

【0030】

特定の実施形態では、各鎖は、15～30のヌクレオチドを有する。

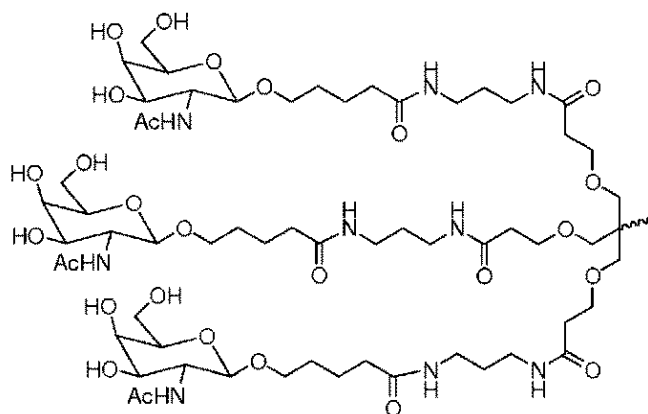
【0031】

一部の実施形態では、ヌクレオチドの修飾は、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-アルキル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。一部の好ましい実施形態では、ヌクレオチドの修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロである。

【0032】

一部の実施形態では、リガンドは、二価または三価分岐リンカーによって付着された1つ以上のN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 誘導体である。特定の実施形態では、このリガンドは

【化1】



である。

【0033】

一部の実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端に付着している。

【0034】

一部の実施形態では、RNAi剤は、以下の式に示されているリガンドにコンジュゲーター

10

20

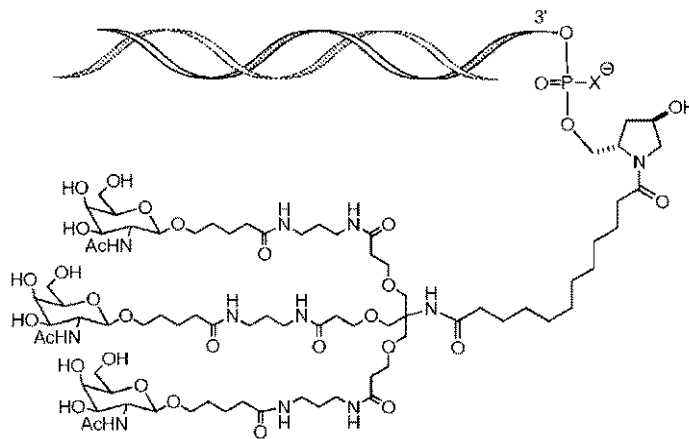
30

40

50

トしている：

【化 2】



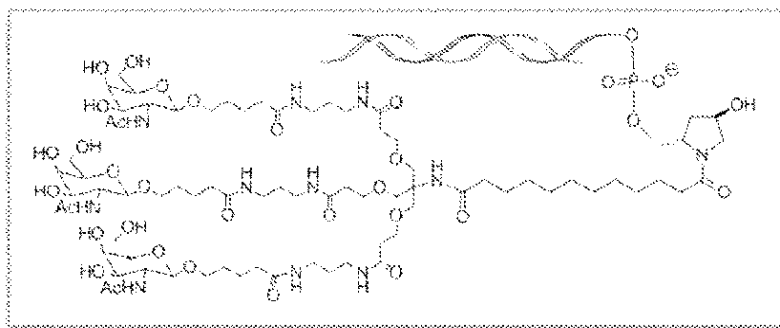
10

式中、XはOまたはSである。

【0035】

一部の実施形態では、RNAi剤は、以下の式

【化 3】



20

に示されているリガンドにコンジュゲートしている。

30

【0036】

一部の実施形態では、RNAi剤は、少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合をさらに含む。一部の実施形態では、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合は、一方の鎖の3'末端にある。一部の実施形態では、この鎖はアンチセンス鎖である。一部の実施形態では、この鎖はセンス鎖である。

【0037】

特定の実施形態では、二重鎖の5'末端の1位にある塩基対がAU塩基対である。

【0038】

一部の実施形態では、Yヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾を含む。

40

【0039】

一部の実施形態では、Y'ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を含む。

【0040】

一部の実施形態では、 $p' > 0$ である。一部の実施形態では、各nは、標的mRNAに相補的である。他のこのような実施形態では、各nは、標的mRNAに相補的でない。一部の実施形態では、p、p'、q、およびq'は1~6である。一部の好ましい実施形態では、 $p' = 1$ または2である。一部の好ましい実施形態では、 $p' = 2$ である。一部のこのような実施形態では、 $q' = 0$ であり、 $p = 0$ であり、 $q = 0$ であり、かつp'オーバーハングヌクレオチドは、標的mRNAに相補的である。他のこのような実施形態では、 $q' = 0$ であり、 $p = 0$ であり、 $q = 0$ であり、かつp'オーバーハングヌクレオチド

50

は、標的mRNAに相補的でない。

【0041】

一部の実施形態では、センス鎖は、合計21のヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖は、合計23のヌクレオチドを有する。

【0042】

特定の実施形態では、 n_p 間の連結は、ホスホロチオエートを含む。一部のこのような実施形態では、この n_p 間の連結は、ホスホロチオエート連結である。

【0043】

一部の実施形態では、RNAi剤は、表1に列記されているRNAi剤の群から選択される。

10

【0044】

好ましい実施形態では、RNAi剤は、AD-51544、AD-51545、AD-51546、およびAD-51547からなる群から選択される。

【0045】

より一層好ましい実施形態では、RNAi剤は、以下の構造を有するAD-51547である：

センス鎖：5'-U f g G f g A f u U f u C f A f U f g U f a a c C f a A f g A f L 9 6-3'（配列番号：2）

アンチセンス鎖：5'-u C f u U f g G f U f U f a C f a u g A f a A f u C f c C f a s U f s c-3'（配列番号：3）

20

配列中、小文字ヌクレオチド（a、u、g、c）は、2'-O-メチルヌクレオチドを示し；Nf（例えば、Af）は、2'-フルオロヌクレオチドを示し；sは、ホスホチオレート（phosphothiorate）連結を示し；L96は、GalNAc₃リガンドを示している。

【0046】

別の態様では、本発明は、TTRの発現を阻害するためのRNAi剤を含む細胞を取り上げる。

【0047】

さらなる態様では、本発明は、TTRの発現を阻害するためのRNAi剤を含む医薬組成物を取り上げる。一部の実施形態では、医薬組成物は、RNAi剤を含む溶液である。一部の実施形態では、RNAi剤を含むこの溶液は、非緩衝液、例えば、生理食塩水または水である。他の実施形態では、この溶液は、緩衝液、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）の溶液である。他の実施形態では、医薬組成物は、リボソームまたは脂質製剤である。一部の実施形態では、脂質製剤は、XTCまたはMC3を含む。

30

【0048】

なお別の態様では、本発明は、細胞におけるトランスサイレチン（TTR）の発現を阻害する方法を取り上げる。この方法は、RNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を、細胞におけるTTRの発現を阻害するのに有効な量、細胞に接触させて、この細胞におけるTTRの発現を阻害するステップを含む。

【0049】

一部の実施形態では、TTRの発現は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%阻害される。

40

【0050】

他の実施形態では、細胞は、RNAi剤に*in vitro*で接触させられる。他の実施形態では、細胞は、対象の体内に存在する。好ましい実施形態では、対象はヒトである。

【0051】

さらなる実施形態では、対象は、TTR関連疾患に罹患している対象であり、有効な量は、治療有効量である。他の実施形態では、対象は、TTR関連疾患の発症のリスクのあ

50

る対象であり、有効な量は、予防有効量である。一部の実施形態では、T T R 関連疾患の発症のリスクのある対象は、T T R 関連疾患の発症に関連したT T R 遺伝子の突然変異を有する対象である。

【0052】

特定の実施形態では、T T R 関連疾患は、老人性全身性アミロイドーシス（S S A）、全身性家族性アミロイドーシス、家族性アミロイド多発神経障害（F A P）、家族性アミロイド心筋症（F A C）、軟髄膜／中枢神経系（C N S）アミロイドーシス、および高サイキロシン血症からなる群から選択される。

【0053】

一部の実施形態では、対象は、T T R 関連アミロイドーシスを有し、この方法は、対象のアミロイドT T R 沈着を減少させる。

10

【0054】

他の実施形態では、R N A i 剤は、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、気管支内投与、胸膜内投与、腹腔内投与、動脈内投与、リンパ管投与、脳脊髄投与、およびこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される投与方法によって対象に投与される。特定の実施形態では、R N A i 剤は、皮下投与または静脈内投与によって対象に投与される。好ましい実施形態では、R N A i 剤は、皮下投与によって対象に投与される。一部のこのような実施形態では、皮下投与は、皮下ポンプまたは皮下貯蔵部（s u b c u t a n e o u s d e p o t）による投与を含む。

【0055】

20

特定の実施形態では、R N A i 剤は、対象の特定の部位に送達されるようにこの対象に投与される。一部の実施形態では、この部位は、肝臓、脈絡叢、網膜、および脾臓からなる群から選択される。好ましい実施形態では、この部位は肝臓である。一部の実施形態では、R N A i 剤の送達は、肝細胞に存在するアシアロ糖タンパク質受容体（A S G P - R）によって媒介される。

【0056】

一部の実施形態では、R N A i 剤は、約0.25mg/kg～約50mg/kgの用量、例えば、約0.25mg/kg～約0.5mg/kg、約0.25mg/kg～約1mg/kg、約0.25mg/kg～約5mg/kg、約0.25mg/kg～約10mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、約5mg/kg～約15mg/kg、約10mg/kg～約20mg/kg、約15mg/kg～約25mg/kg、約20mg/kg～約30mg/kg、約25mg/kg～約35mg/kg、または約40mg/kg～約50mg/kgの用量で投与される。

30

【0057】

一部の実施形態では、R N A i 剤は、約0.25mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約11mg/kg、約12mg/kg、約13mg/kg、約14mg/kg、約15mg/kg、約16mg/kg、約17mg/kg、約18mg/kg、約19mg/kg、約20mg/kg、約21mg/kg、約22mg/kg、約23mg/kg、約24mg/kg、約25mg/kg、約26mg/kg、約27mg/kg、約28mg/kg、約29mg/kg、30mg/kg、約31mg/kg、約32mg/kg、約33mg/kg、約34mg/kg、約35mg/kg、約36mg/kg、約37mg/kg、約38mg/kg、約39mg/kg、約40mg/kg、約41mg/kg、約42mg/kg、約43mg/kg、約44mg/kg、約45mg/kg、約46mg/kg、約47mg/kg、約48mg/kg、約49mg/kg、または約50mg/kgの用量で投与される。

40

【0058】

一部の実施形態では、R N A i 剤は、2回またはそれ以上の投与回数で投与される。特定の実施形態では、R N A i 剤は、約2時間毎、約3時間毎、約4時間毎、約6時間毎、

50

約 8 時間毎、約 1 2 時間毎、約 2 4 時間毎、約 4 8 時間毎、約 7 2 時間毎、約 9 6 時間毎、約 1 2 0 時間毎、約 1 4 4 時間毎、約 1 6 8 時間毎、約 2 4 0 時間毎、約 3 3 6 時間毎、約 5 0 4 時間毎、約 6 7 2 時間毎、および約 7 2 0 時間毎からなる群から選択される時間間隔で投与される。

【0059】

他の実施形態では、この方法は、対象に由来するサンプルにおける T T R m R N A の発現または T T R タンパク質の発現のレベルを評価するステップをさらに含む。

【0060】

好ましい実施形態では、R N A i 剤の投与は、対象に由来するサンプルにおける、G - C S F、I F N - γ 、I L - 1 0、I L - 1 2 (p 7 0)、I L 1 β 、I L - 1 r a、I L - 6、I L - 8、I P - 1 0、M C P - 1、M I P - 1 α 、M I P - 1 β 、T N F α 、およびこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるサイトカインまたはケモカインのレベルに基づいて評価される炎症反応を対象に引き起こさない。

【0061】

一部の実施形態では、R N A i 剤は、医薬組成物を用いて投与される。

【0062】

好ましい実施形態では、R N A i 剤は、溶液に溶解して投与される。一部の実施形態では、この s i R N A は、非緩衝液に溶解して投与される。一実施形態では、s i R N A は、水に溶解されて投与される。他の実施形態では、s i R N A は、緩衝液、例えば、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、プロラミン緩衝液、炭酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはこれらの任意の組み合わせを用いて投与される。一部の実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) である。

【0063】

別の実施形態では、医薬組成物は、S N A L P または X T C を含むリポソームまたは脂質製剤である。一実施形態では、脂質製剤は、M C 3 を含む。

【0064】

別の態様では、本発明は、対象の T T R 関連疾患を治療または予防する方法を提供する。この方法は、治療有効量または予防有効量の R N A i 剤、例えば、二本鎖 R N A i 剤を対象に投与して、対象の T T R 関連疾患を治療または予防するステップを含む。

【0065】

一部の実施形態では、対象に由来するサンプルにおける T T R の発現は、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 9 0 % 阻害される。

【0066】

一部の実施形態では、対象はヒトである。

【0067】

一部の実施形態では、対象は、T T R 関連疾患に罹患している対象である。他の実施形態では、対象は、T T R 関連疾患の発症のリスクのある対象である。

【0068】

一部の実施形態では、対象は、T T R 関連疾患の発症に関連した T T R 遺伝子突然変異を有する対象である。

【0069】

特定の実施形態では、T T R 関連疾患は、老人性全身性アミロイドーシス (S S A)、全身性家族性アミロイドーシス、家族性アミロイド多発神経障害 (F A P)、家族性アミロイド心筋症 (F A C)、軟髄膜／中枢神経系 (C N S) アミロイドーシス、および高サイキロシン血症からなる群から選択される。

【0070】

一部の実施形態では、対象は、T T R 関連アミロイドーシスを有し、この方法は、対象のアミロイド T T R 沈着を減少させる。

【0071】

一部の実施形態では、RNAi剤は、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、気管支内投与、胸膜内投与、腹腔内投与、動脈内投与、リンパ管投与、脳脊髄投与、およびこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される投与方法によって対象に投与される。特定の実施形態では、RNAi剤は、皮下投与または静脈内投与によって対象に投与される。好ましい実施形態では、RNAi剤は、皮下投与によって対象に投与される。一部の実施形態では、皮下投与は、皮下ポンプまたは皮下貯蔵部による投与を含む。

【0072】

特定の実施形態では、RNAi剤は、対象の特定の部位に送達されるように対象に投与される。一部のこのような実施形態では、この部位は、肝臓、脈絡叢、網膜、および脾臓からなる群から選択される。好ましい実施形態では、この部位は肝臓である。一部の実施形態では、RNAi剤の送達は、肝細胞に存在するアシアロ糖タンパク質受容体（ASGP-R）によって媒介される。

10

【0073】

一部の実施形態では、RNAi剤は、約0.25mg/kg～約50mg/kgの用量、例えば、約0.25mg/kg～約0.5mg/kg、約0.25mg/kg～約1mg/kg、約0.25mg/kg～約5mg/kg、約0.25mg/kg～約10mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、約5mg/kg～約15mg/kg、約10mg/kg～約20mg/kg、約15mg/kg～約25mg/kg、約20mg/kg～約30mg/kg、約25mg/kg～約35mg/kg、または約40mg/kg～約50mg/kgの用量で投与される。

20

【0074】

一部の実施形態では、RNAi剤は、約0.25mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約11mg/kg、約12mg/kg、約13mg/kg、約14mg/kg、約15mg/kg、約16mg/kg、約17mg/kg、約18mg/kg、約19mg/kg、約20mg/kg、約21mg/kg、約22mg/kg、約23mg/kg、約24mg/kg、約25mg/kg、約26mg/kg、約27mg/kg、約28mg/kg、約29mg/kg、約30mg/kg、約31mg/kg、約32mg/kg、約33mg/kg、約34mg/kg、約35mg/kg、約36mg/kg、約37mg/kg、約38mg/kg、約39mg/kg、約40mg/kg、約41mg/kg、約42mg/kg、約43mg/kg、約44mg/kg、約45mg/kg、約46mg/kg、約47mg/kg、約48mg/kg、約49mg/kg、または約50mg/kgの用量で投与される。

30

【0075】

一部の実施形態では、RNAi剤は、2回またはそれ以上の投与回数で投与される。特定の実施形態では、RNAi剤は、約2時間毎、約3時間毎、約4時間毎、約6時間毎、約8時間毎、約12時間毎、約24時間毎、約48時間毎、約72時間毎、約96時間毎、約120時間毎、約144時間毎、約168時間毎、約240時間毎、約336時間毎、約504時間毎、約672時間毎、および約720時間毎からなる群から選択される時間間隔で投与される。

40

【0076】

他の実施形態では、この方法は、対象に由来するサンプルにおけるTTR mRNAの発現またはTTRタンパク質の発現のレベルを評価するステップをさらに含む。

【0077】

好ましい実施形態では、RNAi剤の投与は、対象に由来するサンプルにおける、G-CSF、IFN- γ 、IL-10、IL-12（p70）、IL-1 β 、IL-1ra、IL-6、IL-8、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF α 、およびこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるサイトカインまたはケモカイン

50

ンのレベルに基づいて評価される炎症反応を対象に引き起こさない。

【0078】

一部の実施形態では、RNAi剤は、医薬組成物、例えば、リボソームを用いて投与される。

【0079】

一部の実施形態では、RNAi剤は、溶液に溶解して投与される。一部の実施形態では、このsiRNAは、非緩衝液に溶解して投与される。一実施形態では、siRNAは、生理食塩水または水に溶解されて投与される。他の実施形態では、siRNAは、緩衝液、例えば、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、プロタミン緩衝液、炭酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはこれらの任意の組み合わせを用いて投与される。一部の実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）である。

10

【0080】

別の態様では、本発明は、細胞におけるトランスサイレチン（TTR）の発現を阻害する方法であって、RNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を、細胞におけるTTRの発現を阻害するのに有効な量、細胞に接触させるステップを含む、方法を提供する。一態様では、この二本鎖RNAi剤は、表1に列記されている作用剤の群から選択され、これにより、細胞におけるトランスサイレチン（TTR）の発現が阻害される。

【0081】

別の態様では、本発明は、細胞におけるトランスサイレチン（TTR）の発現を阻害する方法であって、RNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を、細胞におけるTTRの発現を阻害するのに有効な量、細胞に接触させるステップを含む、方法を提供する。一態様では、この二本鎖RNAi剤は、AD-51544、AD-51545、AD-51546、およびAD-51547からなる群から選択され、これにより、細胞におけるトランスサイレチン（TTR）の発現が阻害される。

20

【0082】

さらなる態様では、本発明は、対象のTTR関連疾患を治療または予防する方法であって、治療有効量または予防有効量のRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。一態様では、この二本鎖RNAi剤は、表1に列記されている作用剤の群から選択され、これにより、対象のTTR関連疾患が治療または予防される。

30

【0083】

なお別の態様では、本発明は、対象のTTR関連疾患を治療または予防する方法であって、治療有効量または予防有効量のRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。一態様では、二本鎖RNAi剤は、AD-51544、AD-51545、AD-51546、およびAD-51547からなる群から選択され、これにより、対象のTTR関連疾患が治療または予防される。

【0084】

さらなる態様では、本発明は、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。一態様では、本発明は、RNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を、細胞におけるTTRの発現を阻害するのに有効な量、前記細胞に接触させて、この細胞におけるTTRの発現を阻害するステップを含む、細胞におけるトランスサイレチン（TTR）の発現を阻害する方法を実施するためのキットを提供する。このキットは、RNAi剤、使用するための取扱説明書、および、任意選択の、RNAi剤を対象に投与するための手段を含む。

40

【0085】

本発明は、以下の詳細な説明および図面によってさらに例示される。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】TTRを標的とするGalNAcコンジュゲートRNAi剤のマウスへの単回皮下投与により、TTR mRNAの用量依存性の抑制が起こることを示すグラフである。

【図2】7.5mg/kgまたは30mg/kgのTTRを標的とするGalNAcコン

50

ジューゲートRNAi剤のマウスへの単回皮下投与により、TTR mRNAの持続的な抑制が起こることを示すグラフである。

【図3】ヒトTTR mRNAの配列を示している。

【図4】親AD-45163に対して修飾されたRNAi剤の改善されたサイレンシング活性を示すグラフである。

【図5】親AD-45165に対して修飾されたRNAi剤の改善されたサイレンシング活性を示すグラフである。

【図6】親AD-45163に対して修飾されたRNAi剤と共に4時間インキュベートされた後の改善された自由取り込みのサイレンシングを示すグラフである。

【図7】親AD-45163に対して修飾されたRNAi剤と共に24時間インキュベートされた後の改善された自由取り込みのサイレンシングを示すグラフである。

【図8】親AD-45165に対して修飾されたRNAi剤と共に4時間インキュベートされた後の改善された自由取り込みのサイレンシングを示すグラフである。

【図9】親AD-45165に対して修飾されたRNAi剤と共に24時間インキュベートされた後の改善された自由取り込みのサイレンシングを示すグラフである。

【図10】RNAi剤AD-51544、AD-51545、AD-45163、AD-51546、AD-51547、またはAD-45165の単回皮下投与後のhTTR V30Mを発現するトランスジェニックマウスにおけるTTR mRNAのサイレンシングを示すグラフである。

【図11】5mg/kgまたは1mg/kgのRNAi剤AD-51544、AD-51545、またはAD-45163の単回皮下投与後のhTTR V30Mを発現するトランスジェニックマウスにおけるTTRタンパク質の抑制を示すグラフである。

【図12】47、またはAD-45165の単回皮下投与後のhTTR V30Mを発現するトランスジェニックマウスにおけるTTRタンパク質の抑制を示すグラフである。

【図13】5mg/kgのRNAi剤が5回（上側の線）または25mg/kgのRNAi剤が1回（下側の線）投与されたサルにおける投与後の採血のためのプロトコルを示している。

【図14】AD-45163、AD-51544、AD-51545、AD-51546、またはAD-51547の5回の5mg/kg（上のグラフ）または25mg/kgの1回（下のグラフ）の皮下投与後の非ヒト霊長類におけるTTRタンパク質の抑制を示すグラフである。

【図15】1回当たり2.5mg/kg（白い四角形）、5mg/kg（黒い四角形）、もしくは10mg/kg（パターンが形成された四角形）のAD-51547の皮下投与後、または負のコントロールとしてのPBS（グレーの四角形）の投与後の非ヒト霊長類におけるTTRタンパク質の抑制を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0087】

本発明は、トランスサイレチン（TTR）遺伝子を標的とするRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤および組成物を提供する。本発明はまた、TTRの発現を阻害する方法、および本発明のRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を用いて対象のTTR関連疾患を治療または予防する方法を提供する。本発明は、特定の化学修飾を有するRNAi剤がTTRの発現を阻害する優れた能力を示すという発見に少なくとも部分的に基づいている。特定のパターンの化学修飾（例えば、交互パターン）およびリガンドを有する作用剤は、TTR遺伝子の活性のサイレンシングに有効であることが本明細書で示される。さらに、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフを含み、1つのこのようなモチーフが作用剤の切断部位またはその近傍にある作用剤は、驚くほど強いTTR遺伝子サイレンシング活性を示す。1つのこのような化学モチーフが作用剤に存在する場合は、このような化学モチーフは、遺伝子サイレンシング活性を強めるために切断部位またはその近傍に存在するのが好ましい。切断領域は、切断部位、即ち、切断が起こる標的mRNAにおける部位を取り囲む領域である。

【0088】

I. 定義

本明細書で使用される以下の語はそれぞれ、このセクションの語に関連した意味を有する。

【0089】

本明細書で使用される「含む (including)」という語は、「限定されるものではないが、～を含む」という句を意味し、この句と互換的に使用される。

【0090】

本明細書で使用される「または (or)」という語は、特段の記載がない限り、「および/または (and/or)」という意味であり、これと互換的に使用される。

10

【0091】

本明細書で使用される「トランスサイレチン」(「TTR」)は、周知の遺伝子およびタンパク質を指す。TTRは、プレアルブミン、HsT2651、PALB、およびTBPAとしても知られている。TTRは、レチノール結合タンパク質(RBP)、サイクロシン(T4)、およびレチノールの輸送体として機能し、かつプロテアーゼとしても作用する。肝臓は、TTRを血中に分泌し、脈絡叢は、TTRを脳脊髄液中に分泌する。TTRは、膵臓および網膜色素上皮でも発現する。TTRの最も大きな臨床的関連性は、正常なTTRおよび突然変異TTRの両方が、凝集して細胞外沈着物となってアミロイドーシスを引き起こすアミロイド原線維を形成し得ることである。例えば、考察のために Saraiwa M. J. M. (2002) Expert Reviews in Molecular Medicine, 4(12): 1-11を参照されたい。ラットトランスサイレチンの分子クローニングおよびヌクレオチド配列、ならびにmRNA発現の分布が、Dickson, P. W. et al. (1985) J. Biol. Chem. 260(13) 8214-8219に記載されている。ヒトTTRのX線結晶構造が、Blake, C. C. et al. (1974) J. Mol. Biol. 88, 1-12に記載されている。ヒトTTR mRNA転写物の配列は、全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)において、RefSeqアクセッション番号: NM_000371で確認することができる。マウスTTR mRNAの配列は、RefSeqアクセッション番号: NM_013697. 2で確認することができ、ラットTTR mRNAの配列は、RefSeqアクセッション番号: NM_012681. 1で確認することができる。

20

30

【0092】

本明細書で使用される「標的配列」は、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを含む、TTR遺伝子の転写の際に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の連続した部分を指す。

【0093】

本明細書で使用される「配列を含む鎖」という語は、標準的なヌクレオチド命名法を用いて参照されるこの配列によって示されるヌクレオチド鎖を含むオリゴヌクレオチドを指す。

【0094】

「G」、「C」、「A」、および「U」はそれぞれ、一般に、塩基としてグアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルを含むヌクレオチドの略号である。「T」および「dT」は、本明細書では互換的に使用され、核酸塩基がチミジン、例えば、デオキシリボチミン、2'-デオキシチミジン、またはチミジンであるデオキシリボヌクレオチドを指す。しかしながら、「リボヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、または「デオキシリボヌクレオチド」という語は、詳細が後述される修飾ヌクレオチド、または代理置換部分(surrogate replacement moiety)も指すことがあることを理解されたい。当業者であれば、グアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルを、このような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対の特性を実質的に変更することなく、他の部分によって置換できることを十分に認識している。例えば、限定されるものではないが、塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシ

40

50

ン、またはウラシルを含むヌクレオチドと塩基対を形成し得る。従って、ウラシル、グアニン、またはアデニンを含むヌクレオチドは、例えば、イノシンを含むヌクレオチドによって本発明のヌクレオチド配列において置換することができる。このような置換部分を含む配列は、本発明の実施形態である。

【0095】

本明細書で互換的に使用される、「dsRNA剤」、「dsRNA」、「siRNA」、「iRNA剤」とも呼ばれる「二本鎖RNA i剤」、二本鎖RNA (dsRNA) 分子は、以下に定義される2つの逆平行の実質的に相補的な核酸鎖を含む二重鎖構造を有する、リボ核酸分子の複合体を指す。一般に、各鎖のヌクレオチドの殆どは、リボヌクレオチドであるが、本明細書に詳細に記載されるように、それぞれの鎖または両方の鎖は、1つ以上の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチドおよび／または修飾ヌクレオチドも含み得る。加えて、本明細書で使用される「RNA i剤」は、化学修飾されたリボヌクレオチドを含むことができ；RNA i剤は、多数のヌクレオチドに相当数の修飾を有することができる。このような修飾は、本明細書に開示される、または当分野で公知のあらゆる種類の修飾を含み得る。siRNA型分子に使用されるこのような修飾はいずれも、本明細書および請求項の目的のために「RNA i剤」に包含される。

【0096】

別の実施形態では、RNA i剤は、標的mRNAを阻害するために細胞または器官に導入される一本鎖siRNAであっても良い。一本鎖RNA i剤は、後に標的mRNAを切断するRISCエンドヌクレアーゼArgonaute 2に結合する。一本鎖siRNAは、一般に、15～30のヌクレオチドであり、化学修飾されている。一本鎖siRNAのデザインおよび試験は、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,101,348号明細書およびLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載されている。本明細書に記載されるいずれのアンチセンスヌクレオチド配列も、本明細書に記載される一本鎖siRNAとして使用する、またはLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載されている方法によって化学修飾することができる。

【0097】

二重鎖構造を形成する2本の鎖は、1つの大きいRNA分子の異なる部分でも良いし、または別個のRNA分子でも良い。2本の鎖が、1つの大きい分子の一部であり、従って、二重鎖構造を形成する一方の鎖の3'末端と他方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの連続した鎖によって接続されている場合、接続するRNA鎖は、「ヘアピンループ」と呼ばれる。2本の鎖が、二重鎖構造を形成する一方の鎖の3'末端と他方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの連続した鎖以外の手段によって共有結合で接続されている場合、この接続構造は「リンカー」と呼ばれる。RNA鎖は、同数または異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、dsRNAの最も短い鎖のヌクレオチドの数から二重鎖に存在する全てのオーバーハングを減じた値である。二重鎖構造に加えて、RNA i剤は、1つの以上のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。本明細書で使用される「siRNA」という語も、上記のようなRNA i剤を指す。

【0098】

別の態様では、RNA i剤は、一本鎖アンチセンスRNA分子である。アンチセンスRNA分子は、標的mRNA内の配列に相補的である。アンチセンスRNAは、mRNAと塩基対を形成して翻訳機構を物理的に妨げることによって化学量論的に翻訳を阻害することができる。Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355を参照されたい。アンチセンスRNA分子は、標的mRNAに相補的な約15～30のヌクレオチドを有し得る。例えば、アンチセンスRNA分子は、表1の1つのアンチセンス配列の少なくとも15、16、17、18、19、20、またはそれ以上の連続したヌクレオチドの配列を有し得る。

【0099】

本明細書で使用される「ヌクレオチドオーバーハング」は、RNA i剤の一方の鎖の3

10

20

30

40

50

’末端が他方の鎖の5’末端を越えて延びている場合またはその逆の場合に、塩基対を形成していないヌクレオチド、またはRNA i剤の二重鎖構造から突き出たヌクレオチドを指す。「平滑」または「平滑末端」とは、二本鎖RNA i剤の端部に塩基対を形成していないヌクレオチドが存在しない、即ち、ヌクレオチドオーバーハングが存在しないことを意味する。「平滑末端」RNA i剤とは、その全長に亘って二本鎖である、即ち、分子のいずれの端部にもヌクレオチドオーバーハングが存在しないdsRNAのことである。本発明のRNA i剤は、一端にヌクレオチドオーバーハング（即ち、一端がオーバーハングで、他端が平滑末端）を有する、または両端にヌクレオチドオーバーハングを有するRNA i剤を含む。

【0100】

「アンチセンス鎖」という語は、標的配列（例えば、ヒトTTR mRNA）に実質的に相補的な領域を含む二本鎖RNA i剤の鎖を指す。本明細書で使用される「トランスサイレチンをコードするmRNAの一部に相補的な領域」という語は、TTR mRNA配列の一部に実質的に相補的なアンチセンス鎖の領域を指す。相補性の領域が、標的配列に完全には相補的でない場合、ミスマッチは、末端領域で最も許容され、存在する場合は、一般に末端領域、または、例えば、5’および／または3’末端の6、5、4、3、もしくは2ヌクレオチド以内の領域である。

【0101】

本明細書で使用される「センス鎖」という語は、アンチセンス鎖の領域に実質的に相補的な領域を含むdsRNAの鎖を指す。

【0102】

本明細書で使用される「切断領域」という語は、切断部位のすぐ近傍に位置する領域を指す。切断部位は、切断が起こる標的上の部位である。一部の実施形態では、切断領域は、切断部位のいずれかの端部およびこの切断部位のすぐ近傍の3つの塩基を含む。一部の実施形態では、切断領域は、切断部位のいずれかの端部およびこの切断部位のすぐ近傍の2つの塩基を含む。一部の実施形態では、切断部位は、アンチセンス鎖のヌクレオチド10および11によって結合された部位に特異的に存在し、切断領域は、ヌクレオチド11、12、および13を含む。

【0103】

特段の記載がない限り、本明細書で使用される「相補的な」という語は、第2のヌクレオチド配列に対する第1のヌクレオチド配列を説明するために使用される場合、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが、特定の条件下で、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとハイブリダイズして二重鎖構造を形成する能力を指し、当業者には理解される。このような条件は、例えば、ストリンジェント条件とすることができ、このストリンジェント条件は：400 mMのNaCl、40 mMのPIPES pH 6.4、1 mMのEDTA、50 °Cまたは70 °Cで12～16時間、これに続く洗浄を含み得る。他の条件、例えば、生物体内で遭遇し得る生理的に適切な条件を適用することができる。当業者であれば、ハイブリダイズしたヌクレオチドの最終的な適用に従った2つの配列の相補性の試験に最も適切な一連の条件を決定することができる。

【0104】

第1および第2のヌクレオチド配列の全長に亘って、第1のヌクレオチド配列のヌクレオチドと第2のヌクレオチド配列のヌクレオチドとの塩基対合が存在する場合、配列は、互いに対して「完全に相補的」であり得る。しかしながら、本明細書では、第1の配列が、第2の配列に対して「実質的に相補的」とであると述べられる場合、2つの配列が、完全に相補的であり得る、または2つの配列が、最終的な適用に対して最も適した条件下でハイブリダイズする能力を維持したまま、ハイブリダイゼーション時に4つ、3つ、または2つを超えない、1つ以上のミスマッチの塩基対を形成し得る。しかしながら、2つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーション時に1つ以上の一本鎖オーバーハングを形成するようにデザインされている場合、このようなオーバーハングは、相補性の決定に係

10

20

30

40

50

るミスマッチとは見なされるべきではない。例えば、21ヌクレオチド長さの1つのオリゴヌクレオチドと、23ヌクレオチド長さの別のオリゴヌクレオチドを含み、長い方のオリゴヌクレオチドが、短い方のオリゴヌクレオチドに完全に相補的である21ヌクレオチドの配列を含むdsRNAはなお、本明細書に記載される目的のために「完全に相補的」であると言えることができる。

【0105】

本明細書で使用される「相補的な」配列は、相補的な配列のハイブリダイズする能力についての上記の要件が満たされるのであれば、非ワトソン・クリック塩基対および／または非天然の修飾ヌクレオチドから形成された塩基対も含んでも良いし、またはワトソン・クリック塩基対および／または非天然の修飾ヌクレオチドから形成された塩基対から完全に形成されても良い。このような、非ワトソン・クリック塩基対としては、限定されるものではないが、G:Uゆらぎ塩基対形成またはフーグスタイン塩基対形成(Hoogsteen base pairing)が挙げられる。

10

【0106】

本明細書の「相補的な」、「完全に相補的な」、および「実質的に相補的な」という語は、これらの使用の文脈から分かるように、dsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との間の塩基のマッチ、またはdsRNAのアンチセンス鎖と標的配列との間の塩基のマッチに対して使用することができる。

【0107】

本明細書で使用される、メッセンジャーRNA(mRNA)の「少なくとも一部に実質的に相補的な」ポリヌクレオチドは、5'UTR、オープンリーディングフレーム(ORF)、または3'UTRを含む目的のmRNA(例えば、TTRをコードするmRNA)の連続した部分に実質的に相補的なポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、その配列が、TTRをコードするmRNAの連続した部分に実質的に相補的である場合、TTR mRNAの少なくとも一部に相補的である。

20

【0108】

本明細書で使用される「阻害する」という語は、「減少させる」、「サイレンシングする」、「下方制御する」、「抑制する」、および他の同様の語と互換的に使用され、あらゆるレベルの阻害を含む。

【0109】

本明細書で使用される「TTRの発現を阻害する」という句は、あらゆるTTR遺伝子(例えば、マウスTTR遺伝子、ラットTTR遺伝子、サルTTR遺伝子、またはヒトTTR遺伝子など)およびTTR遺伝子の変異体または突然変異体の発現の阻害を含む。従って、TTR遺伝子は、野生型TTR遺伝子、突然変異TTR遺伝子(例えば、全身性アミロイド沈着をもたらす突然変異TTR遺伝子)、または遺伝子操作された細胞、細胞群、もしくは生物の文脈における遺伝子組換えTTR遺伝子であっても良い。

30

【0110】

「TTR遺伝子の発現を阻害する」は、TTR遺伝子の任意のレベルの阻害、例えば、TTR遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制、例えば、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の阻害を含む。

40

【0111】

TTR遺伝子の発現は、TTR遺伝子の発現に関連した任意の変数のレベル、例えば、TTR mRNAのレベル、TTRタンパク質のレベル、レチノール結合タンパク質のレベル、ビタミンAのレベル、またはアミロイド沈着の数もしくは範囲に基づいて評価する

50

ことができる。阻害は、これらの変数の1つ以上の絶対レベル、またはコントロールレベルと比較したこれらの変数の1つ以上の相対レベルの減少によって評価することができる。コントロールレベルは、当分野で利用されるあらゆる種類のコントロールレベル、例えば、投与前基準レベル、または未処置もしくはコントロール（例えば、緩衝液のみのコントロールまたは不活性剤のコントロール）で処置された類似の対象、細胞、もしくはサンプルから決定されるレベルとすることができる。

【0112】

本明細書で使用される「細胞にRNAi剤を接触させる」という句は、任意の可能な手段によって細胞に接触させることを含む。細胞をRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤に接触させることは、*in vitro*の細胞をRNAi剤に接触させること、または *in vivo*の細胞をRNAi剤に接触させることを含む。この接触は、直接的または間接的に行うことができる。従って、例えば、RNAi剤を、この方法を実施する個人が細胞に物理的に接触させても良いし、あるいは、RNAi剤を、後に細胞との接触が可能となる状況、または後に細胞に接触させられる状況においても良い。

【0113】

*in vitro*での細胞の接触は、例えば、細胞をRNAi剤と共にインキュベートすることによって行うことができる。*in vivo*での細胞の接触は、例えば、細胞が位置する組織もしくはその近傍にRNAi剤を注入することによって、または接触させられる細胞が位置する組織にRNAi剤が後に到達するように別の領域、例えば、血流もしくは皮下腔にRNAi剤を注入することによって行うことができる。例えば、RNAi剤は、RNAi剤を目的の部位、例えば、肝臓に誘導するリガンド、例えば、GalNAc₃リガンドを含んでも良いし、かつ／またはリガンドに結合しても良い。接触させる *in vitro*法と *in vivo*法の組み合わせも可能である。本発明の方法に関連して、細胞を *in vitro*でRNAi剤に接触させて、後に対象に移植することができる。

【0114】

本明細書で使用される「患者」または「対象」は、ヒトまたは非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、例えば、サルを含むものとする。最も好ましくは、対象または患者はヒトである。

【0115】

本明細書で使用される「TTR関連疾患」は、TTR遺伝子またはTTRタンパク質に関連したあらゆる疾患を含むものとする。このような疾患は、例えば、TTRタンパク質の過剰な産生、TTR遺伝子の突然変異、TTRタンパク質の異常な切断、TTRと他のタンパク質または他の内因性物質もしくは外因性物質との異常な相互作用によって引き起こされ得る。「TTR関連疾患」は、あらゆる種類のTTRアミロイドーシス（ATTR）を含み、ATTRでは、TTRが、異常な細胞外凝集体またはアミロイド沈着の形成に役割を果たす。TTR関連疾患としては、老人性全身性アミロイドーシス（SSA）、全身性家族性アミロイドーシス、家族性アミロイド多発神経障害（FAP）、家族性アミロイド心筋症（FAC）、軟髄膜／中枢神経系（CNS）アミロイドーシス、アミロイド性硝子体混濁、手根管症候群、および高サイキロシン血症が挙げられる。TTRアミロイドーシスの症状としては、感覚性ニューロパシー（例えば、四肢遠位における錯感覚、感覚鈍麻）、自立性神経障害（例えば、胃腸障害、例えば、胃潰瘍、または起立性底血圧症）、運動神経障害、発作、痴呆、ミエロパシー、多発ニューロパシー、手根管症候群、自律神経不全、心筋症、硝子体混濁、腎不全、腎症、mBMI（修正肥満指数）の実質的な減少、脳神経障害、および格子状角膜変性症が挙げられる。

【0116】

本明細書で使用される「治療有効量」は、TTR関連疾患を治療するために患者に投与されたときに、この疾患を治療する（例えば、既存の疾患または疾患の1つ以上の症状を軽減する、改善する、または維持する）のに十分なRNAi剤の量を含むものとする。「治療有効量」は、RNAi剤、RNAi剤が投与される方法、疾患およびその重症度と病

10

20

30

40

50

歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、T T R発現によって媒介される病的過程の段階、以前の治療または併用療法の種類（存在する場合）、および治療される患者の他の個人的な特徴によって異なり得る。

【0117】

本明細書で使用される「予防有効量」は、T T R関連疾患に罹患していない、またはその症状を示していないがこの疾患に罹患する可能性がある患者に投与されたときに、この疾患またはその1つ以上の症状を防止または改善するのに十分なRNAi剤の量を含むものとする。改善され得る症状としては、感覚性ニューロパシー（例えば、四肢遠位における錯感覚、感覚鈍麻）、自立性神経障害（例えば、胃腸障害、例えば、胃潰瘍、または起立性低血圧症）、運動神経障害、発作、痴呆、ミエロパシー、多発ニューロパシー、手根管症候群、自律神経不全、心筋症、硝子体混濁、腎不全、腎症、mBMI（修正肥満指数）の実質的な減少、脳神経障害、および格子状角膜変性症が挙げられる。この疾患を改善することは、疾患の進行を遅延させること、または後に発症する疾患の重症度を軽減することを含む。「予防有効量」は、RNAi剤、RNAi剤が投与される方法、疾患のリスクの程度、および病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、以前の治療または併用療法の種類（存在する場合）、および治療される患者の他の個人的な特徴によって異なり得る。

10

【0118】

「治療有効量」または「予防有効量」はまた、あらゆる治療に適用可能な妥当な効果／リスク比である程度の望ましい局所効果または全身効果が得られるRNAi剤の量も含む。本発明の方法に利用されるRNAi剤は、このような治療に適用可能な妥当な効果／リスク比をもたらす十分な量を投与することができる。

20

【0119】

本明細書で使用される「サンプル」という語は、対象から単離される同様の液体、細胞、または組織の採取物、および対象の体内に存在する液体、細胞、または組織を含む。生体液の例として、血液、血清、および漿膜液、血漿、脳脊髄液、眼液、リンパ液、尿、および唾液などが挙げられる。組織サンプルとしては、組織、器官、または局所領域からのサンプルを挙げることができる。例えば、サンプルは、特定の器官、器官の一部、またはこれらの器官内の液体もしくは細胞に由来し得る。特定の実施形態では、サンプルは、肝臓（例えば、全肝臓、肝臓の特定の部分、もしくは肝臓の特定の種類の細胞、例えば、肝細胞）、網膜もしくは網膜の一部（例えば、網膜色素上皮）、中枢神経系または中枢神経系の一部（例えば、脳室もしくは脈絡叢）、または脾臓もしくは脾臓の特定の細胞や一部に由来し得る。一部の実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象から採取された脳脊髄液を指す。好ましい実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象から採取された血液または血漿を指す。さらなる実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象に由来する肝組織（もしくはその小成分）または網膜組織（もしくはその小成分）を指す。

30

【0120】

II. RNAi剤

本発明は、優れた遺伝子サイレンシング活性を有するRNAi剤を提供する。3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフを、RNAi剤のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖、特に切断部位またはその近傍に導入することによって優れた結果を得ることができることが、本明細書および米国仮特許出願第61／561,710号明細書（本出願が優先権を主張する）に示されている。RNAi剤のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖は、他の方法で完全に修飾しても良い。このようなモチーフの導入は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖に修飾パターンが存在する場合は、この修飾パターンを阻害する。RNAi剤はまた、任意選択で、例えば、センス鎖のGalNAc誘導体リガンドにコンジュゲートする。得られるRNAi剤は、優れた遺伝子サイレンシング活性を示す。

40

【0121】

本発明者らは、驚くべきことに、RNAi剤のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖

50

が完全に修飾されている場合、RNAi剤の少なくとも一方の鎖の切断部位またはその近傍に3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフを有することにより、RNAi剤の遺伝子サイレンシング活性が著しく高められることを見出した。

【0122】

従って、本発明は、*in vivo*での標的遺伝子（即ち、TTR遺伝子）の発現を阻害することができるRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を提供する。RNAi剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。RNAi剤の各鎖は、12～30のヌクレオチド長さの範囲とすることができる。例えば、各鎖は、14～30のヌクレオチド長さ、17～30のヌクレオチド長さ、25～30のヌクレオチド長さ、27～30のヌクレオチド長さ、17～23のヌクレオチド長さ、17～21のヌクレオチド長さ、17～19のヌクレオチド長さ、19～25のヌクレオチド長さ、19～23のヌクレオチド長さ、19～21のヌクレオチド長さ、21～25のヌクレオチド長さ、または21～23のヌクレオチド長さの範囲とすることができる。

10

【0123】

センス鎖およびアンチセンス鎖は、典型的には、本明細書では「RNAi剤」とも呼ばれる二重鎖RNA（「dsRNA」）を形成する。RNAiの二重鎖領域は、12～30のヌクレオチド対の長さとすることができる。例えば、二重鎖領域は、14～30のヌクレオチド対の長さ、17～30のヌクレオチド対の長さ、27～30のヌクレオチド対の長さ、17～23のヌクレオチド対の長さ、17～21のヌクレオチド対の長さ、17～19のヌクレオチド対の長さ、19～25のヌクレオチド対の長さ、19～23のヌクレオチド対の長さ、19～21のヌクレオチド対の長さ、21～25のヌクレオチド対の長さ、または21～23のヌクレオチド対の長さとすることができる。別の例では、二重鎖領域は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、および27のヌクレオチド対の長さから選択される。

20

【0124】

一実施形態では、RNAi剤は、鎖の3'末端、5'末端、または両末端にRNAi剤の1つ以上のオーバーハング領域および／またはキャッピング基を含み得る。オーバーハングは、1～6のヌクレオチド長さ、例えば、2～6のヌクレオチド長さ、1～5のヌクレオチド長さ、2～5のヌクレオチド長さ、1～4のヌクレオチド長さ、2～4のヌクレオチド長さ、1～3のヌクレオチド長さ、2～3のヌクレオチド長さ、または1～2のヌクレオチド長さとすることができる。オーバーハングは、一方の鎖が他方の鎖よりも長い結果、または同じ長さの2本の鎖がシフトした結果として起こり得る。オーバーハングは、標的mRNAとのミスマッチを形成し得る、またはオーバーハングは、標的とされる遺伝子配列に相補的であっても良いし、もしくは他の配列であっても良い。第1の鎖と第2の鎖は、例えば、ヘアピンを形成する追加の塩基によって、または他の非塩基リンカーによって接続することができる。

30

【0125】

本発明によって提供されるRNAi剤は、例えば、参照によりそれらの全開示内容が本明細書に組み入れられる、2011年11月18日出願の米国仮特許出願第61/561,710号明細書、2010年9月15日出願の国際出願PCT/US2011/051597号明細書、およびPCT国際公開特許WO2009/073809号パンフレットに開示されている化学修飾を有する作用剤を含む。

40

【0126】

一実施形態では、RNAi剤のオーバーハング領域におけるヌクレオチドはそれぞれ独立して、限定されるものではないが、2'-糖修飾、例えば、2'-F、2'-O-メチル、チミジン（T）、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン（Teo）、2'-O-メトキシエチルアデノシン（Aeo）、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン（m5Ceo）、およびこれらの任意の組み合わせを含め、修飾されたヌクレオチドであっても良いし、または非修飾ヌクレオチドであっても良い。例えば、TTは、いずれ

50

かの鎖のいずれかの末端のオーバーハング配列とすることができる。オーバーハングは、標的mRNAとのミスマッチを形成し得る、またはオーバーハングは、標的とされる遺伝子配列に相補的であっても良いし、もしくは他の配列であっても良い。

【0127】

RNAi剤のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖における5'または3'オーバーハングは、リン酸化されても良い。一部の実施形態では、オーバーハング領域は、間にホスホロチオエートを有する2つのヌクレオチドを含み、この2つのヌクレオチドは、同じヌクレオチドでも良いし、異なるヌクレオチドでも良い。一実施形態では、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に存在する。一実施形態では、この3'オーバーハングは、アンチセンス鎖に存在する。一実施形態では、この3'オーバーハングは、センス鎖に存在する。

10

【0128】

RNAi剤は、全体の安定性に影響を与えずに、RNAi剤の干渉活性を高めることができる1つのオーバーハングのみを含み得る。例えば、一本鎖オーバーハングは、センス鎖の3'末端、あるいはアンチセンス鎖の3'末端に位置する。RNAi剤は、アンチセンス鎖の5'末端（またはセンス鎖の3'末端）に位置する平滑末端を有しても良いし、またはこの逆であっても良い。一般に、RNAi剤のアンチセンス鎖は、3'末端のヌクレオチドオーバーハングを有し、5'末端は平滑である。出願者は、理論に拘束されるものではないが、理論的機構では、非対称な、センス鎖の5'末端の平滑末端とアンチセンス鎖の3'末端オーバーハングは、RISCプロセスに添加されるガイド鎖を好む。

20

【0129】

一実施形態では、RNAi剤は、19のヌクレオチド長さの平滑末端二本鎖（double ended bluntmer）であり、センス鎖は、5'末端の7位、8位、9位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端の11位、12位、13位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。

【0130】

一実施形態では、RNAi剤は、20のヌクレオチド長さの平滑末端二本鎖であり、センス鎖は、5'末端の8位、9位、10位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端の11位、12位、13位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。

30

【0131】

一実施形態では、RNAi剤は、21のヌクレオチド長さの平滑末端二本鎖であり、センス鎖は、5'末端の9位、10位、11位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端の11位、12位、13位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。

【0132】

一実施形態では、RNAi剤は、21のヌクレオチド（nt）長さのセンス鎖および23のヌクレオチド（nt）長さのアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、5'末端の9位、10位、11位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含み：アンチセンス鎖は、5'末端の11位、12位、13位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含み、RNAi剤の一方の末端は、平滑であり、他方の末端は、2つのヌクレオチドのオーバーハングを有する。好ましくは、2つのヌクレオチドのオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端にある。任意選択で、RNAi剤は、リガンド（好ましくはGalNAc₃）をさらに含む。

40

【0133】

50

一実施形態では、RNAi 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、25～30のヌクレオチド残基の長さであり、5'末端のヌクレオチド（1位）から始まり、第1の鎖の1位～23位は、少なくとも8つのリボヌクレオチドを含み；アンチセンス鎖は、36～66のヌクレオチド残基の長さであり、3'末端のヌクレオチドから始まり、二重鎖を形成するセンス鎖の1位～23位と対を形成する位置に少なくとも8つのリボヌクレオチドを含み；アンチセンス鎖の少なくとも3'末端のヌクレオチドは、センス鎖と対を形成せず、最大6つの連続した3'末端ヌクレオチドが、センス鎖と対を形成せず、これにより、1～6のヌクレオチドの3'一本鎖オーバーハングが形成され；アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖と対を形成しない10～30の連続したヌクレオチドを含み、これにより、10～30のヌクレオチドの一本鎖5'オーバーハングが形成され；少なくともセンス鎖の5'末端および3'末端のヌクレオチドは、センス鎖とアンチセンス鎖が最大の相補性となるように整列したときに、アンチセンス鎖のヌクレオチドと塩基対を形成し、これにより、センス鎖とアンチセンス鎖との間に実質的に二重鎖領域が形成され；アンチセンス鎖は、二本鎖核酸が哺乳動物の細胞に導入されたときに標的遺伝子の発現を低減するように、アンチセンス鎖の長さの少なくとも19のリボヌクレオチドに沿って標的RNAに十分に相補的であり；センス鎖は、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含み、この少なくとも1つのモチーフが、切断部位またはその近傍に存在する。アンチセンス鎖は、切断部位またはその近傍の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。

10

20

【0134】

一実施形態では、RNAi 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、RNAi 剤は、少なくとも25、最大で29のヌクレオチド長さを有する第1の鎖、および5'末端から11位、12位、13位にある3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを有する、最大で30のヌクレオチド長さを有する第2の鎖を含み；第1の鎖の3'末端および第2の鎖の5'末端は、平滑末端を形成し、第2の鎖は、3'末端で第1の鎖よりも1～4ヌクレオチド長く、二重鎖領域は、少なくとも25のヌクレオチド長さであり、第2の鎖は、RNAi 剤が哺乳動物の細胞に導入されたときに標的遺伝子の発現を低減するように、第2の鎖の長さの少なくとも19のヌクレオチドに沿って標的mRNAに十分に相補的であり、RNAi 剤のダイサー切断（*dicer cleavage*）が、優先的に第2の鎖の3'末端を含むsiRNAをもたらし、これにより、哺乳動物における標的遺伝子の発現が低減する。任意選択で、RNAi 剤は、リガンドをさらに含む。

30

【0135】

一実施形態では、RNAi 剤のセンス鎖は、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含み、モチーフの1つは、センス鎖の切断部位に存在する。

【0136】

一実施形態では、RNAi 剤のアンチセンス鎖も、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含んでも良く、モチーフの1つは、アンチセンス鎖の切断部位またはその近傍に存在する。

40

【0137】

17～23のヌクレオチド長さの二重鎖領域を有するRNAi 剤では、アンチセンス鎖の切断部位は、典型的には、5'末端から10位、11位、および12位の付近である。従って、3つの同一の修飾からなるモチーフは、アンチセンス鎖の9位、10位、11位；10位、11位、12位；11位、12位、13位；12位、13位、14位；13位、14位、15位に存在しても良く、この位置は、アンチセンス鎖の5'末端から、最初のヌクレオチドから数え始められる、またはアンチセンス鎖の5'末端の二重鎖領域内の最初の対を形成したヌクレオチドから数え始められる。アンチセンス鎖の切断部位はまた、5'末端のRNAi 剤の二重鎖領域の長さに従って変更され得る。

50

【0138】

RNA i 剤のセンス鎖は、その鎖の切断部位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含むことができ；アンチセンス鎖は、その鎖の切断部位またはその近傍の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる少なくとも1つのモチーフを有し得る。センス鎖とアンチセンス鎖がdsRNA二重鎖を形成する場合は、センス鎖とアンチセンス鎖は、センス鎖の3つのヌクレオチドからなる1つのモチーフおよびアンチセンス鎖の3つのヌクレオチドからなる1つのモチーフが、少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーラップ、即ち、センス鎖のモチーフの3つのヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、アンチセンス鎖のモチーフの3つのヌクレオチドのうちの少なくとも1つと塩基対を形成するように整列させることができる。あるいは、少なくとも2つのヌクレオチドがオーバーラップする、または3つ全てのヌクレオチドがオーバーラップしても良い。

10

【0139】

一実施形態では、RNA i 剤のセンス鎖は、3つの連続したヌクレオチドの3つの同一の修飾からなる2つ以上のモチーフを含むことができる。第1のモチーフは、センス鎖の切断部位またはその近傍に存在するべきであり、他方のモチーフは、ウィング修飾(wing modification)であっても良い。本明細書の「ウィング修飾」という語は、鎖の切断部位またはその近傍のモチーフから離れた同じ鎖の別の部分に存在するモチーフを指す。ウィング修飾は、第1のモチーフの近傍であるか、または少なくとも1つ以上のヌクレオチドによって離隔している。モチーフが、その性質化学的よりも互いに接近している場合は、モチーフは互いに異なり、モチーフが、その化学的性質よりも1つ以上のヌクレオチドによって離隔している場合は、モチーフは、同じであるか、または異なることもある。2つ以上のウィング修飾が存在しても良い。例えば、2つのウィング修飾が存在する場合、各ウィング修飾は、切断部位もしくはその近傍の第1のモチーフに対する一端に、またはリードモチーフ(lead motif)のいずれかの側に存在し得る。

20

【0140】

センス鎖と同様に、RNA i 剤のアンチセンス鎖は、3つの連続したヌクレオチドの3つの同一の修飾からなる少なくとも2つのモチーフを含み得、少なくとも1つのモチーフは、アンチセンス鎖の切断部位またはその近傍に存在する。このアンチセンス鎖はまた、センス鎖に存在するウィング修飾と同様の配列で1つ以上のウィング修飾も含み得る。

30

【0141】

一実施形態では、RNA i 剤のセンス鎖またはアンチセンス鎖のウィング修飾は、典型的には、鎖の3'末端、5'末端、または両方の末端の最初の1つまたは2つの末端ヌクレオチドを含まない。

【0142】

別の実施形態では、RNA i 剤のセンス鎖またはアンチセンス鎖のウィング修飾は、典型的には、鎖の3'末端、5'末端、または両方の末端の二重鎖領域内の最初の1つまたは2つの塩基対形成ヌクレオチドを含まない。

【0143】

RNA i 剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖がそれぞれ、少なくとも1つのウィング修飾を含む場合、このウィング修飾は、二重鎖領域の同じ末端に存在しても良く、1つ、2つ、または3つのヌクレオチドのオーバーラップを有する。

40

【0144】

RNA i 剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖がそれぞれ、少なくとも2つのウィング修飾を含む場合、センス鎖およびアンチセンス鎖は、1つの鎖の2つの修飾がそれぞれ、二重鎖領域の一端に位置して1つ、2つ、または3つのヌクレオチドのオーバーラップを有する；1つの鎖の2つの修飾がそれぞれ、二重鎖領域の他端に位置して1つ、2つ、または3つのヌクレオチドのオーバーラップを有する；1つの鎖の2つの修飾が、リードモチーフの各側に位置して、二重鎖領域に1つ、2つ、または3つのヌクレオチドのオーバー

50

ラップを有する、ように整列させることができる。

【0145】

一実施形態では、モチーフの一部であるヌクレオチドを含む、RNAi 剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖における各ヌクレオチドを修飾しても良い。各ヌクレオチドは、同じまたは異なる修飾で修飾しても良く、この修飾は、非結合リン酸酸素および／または1つ以上の結合リン酸酸素の一方または両方の1つ以上の変更；リボース糖の成分、例えば、リボース糖の2'ヒドロキシルの変更；リン酸部分の「脱リン酸」リンカー（“dephospho” linker）での大量の置換；天然の塩基の修飾または置換；およびリボースリン酸骨格の置換または修飾を含み得る。

【0146】

核酸がサブユニットの重合体であるため、多くの修飾、例えば、塩基、リン酸部分、またはリン酸部分の非結合Oの修飾は、核酸内の繰り返される位置に存在する。場合によっては、修飾は、核酸内の全ての目的の位置に存在するが、多くの場合はそうではない。一例として、修飾は、3'または5'末端位置のみに存在しても良く、末端領域、例えば、末端ヌクレオチドの位置または鎖の最後の2つ、3つ、4つ、5つ、または10のヌクレオチドのみに存在しても良い。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、または両方に存在し得る。修飾は、RNAの二本鎖領域のみに存在しても良いし、またはRNAの一本鎖領域のみに存在しても良い。例えば、非結合酸素位置でのホスホロチオエート修飾は、一方もしくは両方の末端のみに存在しても良いし、末端領域、例えば、末端ヌクレオチドのある位置、または鎖の最後の2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは10のヌクレオチドのみに存在しても良いし、あるいは二本鎖領域および一本鎖領域、特に末端に存在しても良い。5'末端または両末端は、リン酸化されても良い。

【0147】

例えば、安定性を高めること、オーバーハングに特定の塩基を含めること、あるいは一本鎖オーバーハング、例えば、5'もしくは3'オーバーハング、または両方のオーバーハングに修飾ヌクレオチドもしくはヌクレオチド代用物を含めることが可能であろう。例えば、オーバーハングにプリンヌクレオチドを含めることが望ましい場合もある。一部の実施形態では、3'または5'オーバーハングの全てまたは一部の塩基を、例えば、本明細書に記載される修飾で修飾しても良い。修飾は、例えば、当分野で公知の修飾を用いたリボース糖の2'位での修飾の使用、例えば、核酸塩基のリボ糖ではなくデオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'-F）、または2'-O-メチル修飾の使用、およびリン酸基の修飾、例えば、ホスホチオエート修飾を含み得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

【0148】

一実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は独立して、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アシル、2'-C-アシル、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、または2'-フルオロで修飾される。センス鎖およびアンチセンス鎖は、2つ以上の修飾を含み得る。一実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は独立して、2'-O-メチルまたは2'-フルオロで修飾される。

【0149】

少なくとも2つの異なる修飾が、典型的には、センス鎖およびアンチセンス鎖に存在する。これらの2つの修飾は、2'-O-メチルもしくは2'-フルオロ、または他のものであっても良い。

【0150】

一実施形態では、N_aおよび／またはN_bは、交互パターンの修飾を含む。本明細書で使用される「交互モチーフ」という語は、各修飾が1つの鎖の交互ヌクレオチドに存在する1つ以上の修飾を有するモチーフを指す。交互ヌクレオチドは、1つおきのヌクレオチドに1つ、3つおきのヌクレオチドに1つ、または同様のパターンを指し得る。例えば、A、B、およびCがそれぞれ、ヌクレオチドに対する1種類の修飾を表す場合、交互モチ

ーフは、「A B A B A B A B A B A B . . .」、「A A B B A A B B A A B B . . .」、「A A B A A B A A B A A B . . .」、「A A A B A A A B A A A B . . .」、「A A A B B B A A A B B B . . .」、または「A B C A B C A B C A B C . . .」などであり得る。

【0151】

交互モチーフに含まれる修飾の種類は、同じであっても良いし、または異なっている場合でも良い。例えば、A、B、C、Dがそれぞれ、ヌクレオチドの1種類の修飾を表す場合、交互パターン、即ち、1つおきのヌクレオチドの修飾は、同じでも良いが、センス鎖またはアンチセンス鎖はそれぞれ、交互モチーフ、例えば、「A B A B A B . . .」、「A C A C A C . . .」、「B D B D B D . . .」、または「C D C D C D . . .」などの内部の修飾のいくつかの可能性から選択することができる。

10

【0152】

一実施形態では、本発明のRNAi剤は、アンチセンス鎖における交互モチーフの修飾パターンに対してシフトしている、センス鎖における交互モチーフの修飾パターンを含む。このシフトは、センス鎖のヌクレオチドの修飾基が、アンチセンス鎖のヌクレオチドの異なる修飾基に対応するようなシフトであっても良いし、この逆のシフトでも良い。例えば、センス鎖は、dsRNA二重鎖におけるアンチセンス鎖と塩基対を形成した場合、センス鎖における交互モチーフが、センス鎖の5'から3'へ「A B A B A B」で始まり、アンチセンス鎖における交互モチーフが、二重鎖領域内のアンチセンス鎖の5'から3'へ「B A B A B A」で始まり得る。別の例として、センス鎖における交互モチーフは、センス鎖の5'から3'へ「A A B B A A B B」で始まり、アンチセンス鎖における交互モチーフは、二重鎖領域内のアンチセンス鎖の5'から3'へ「B B A A B B A A」で始まり得るため、センス鎖とアンチセンス鎖との間の修飾パターンの完全な、または部分的なシフトが存在する。

20

【0153】

一実施形態では、RNAi剤は、最初に、センス鎖における2'-O-メチル修飾と2'-F修飾との交互モチーフのパターンを有し、このパターンは、最初に、アンチセンス鎖における2'-O-メチル修飾と2'-F修飾との交互モチーフのパターンに対してシフトを有する、即ち、センス鎖における2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、アンチセンス鎖における2'-F修飾ヌクレオチドと塩基対を形成し、逆の場合も同様である。センス鎖の1位は、2'-F修飾で始まることができ、アンチセンス鎖の1位は、2'-O-メチル修飾で始まることができる。

30

【0154】

3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフのセンス鎖および／またはアンチセンス鎖への導入は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖に存在する最初の修飾パターンを中断する。3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフのセンス鎖および／またはアンチセンス鎖への導入による、センス鎖および／またはアンチセンス鎖に存在する最初の修飾パターンのこの中断は、標的遺伝子に対する遺伝子サイレンシング活性を驚くほど高める。

40

【0155】

一実施形態では、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなるモチーフが、いずれの鎖に導入される場合も、モチーフの次のヌクレオチドの修飾は、モチーフの修飾とは異なる修飾である。例えば、モチーフを含む配列の一部は、「. . . N_a Y Y Y N_b . . .」であり、「Y」は、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなるモチーフの修飾を表し、「N_a」および「N_b」は、Yの修飾とは異なる、モチーフ「Y Y Y」の次のヌクレオチドの修飾を表し、N_aおよびN_bは、同じ修飾でも異なる修飾でも良い。あるいは、N_aおよび／またはN_bは、ウィング修飾が存在する場合は、存在しても存在しなくても良い。

【0156】

RNAi剤は、少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌク

50

レオチド間結合をさらに含み得る。ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合の修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖、または両鎖のいずれかの位置のどのヌクレオチドにも存在し得る。例えば、ヌクレオチド間結合の修飾は、センス鎖およびアンチセンス鎖のどのヌクレオチドにも存在し得る；各ヌクレオチド間結合の修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖における交互パターンに存在し得る；あるいはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は、交互パターンにおける両方のヌクレオチド間結合の修飾を含み得る。センス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じでも異なっても良く、センス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互パターンに対してシフトを有しても良い。

10

【0157】

一実施形態では、RNAi剤は、オーバーハング領域にホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合の修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチド間にホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合を有する2つのヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチド間結合の修飾は、オーバーハングヌクレオチドを二重鎖領域内の末端の塩基対形成ヌクレオチドに結合させるために形成することもできる。例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、または全てのオーバーハングヌクレオチドを、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合によって結合することができ、任意選択で、オーバーハングヌクレオチドをその次の塩基対形成ヌクレオチドに結合する追加的なホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合が存在しても良い。例えば、末端の3つのヌクレオチド間に少なくとも2つのホスホロチオエートのヌクレオチド間結合が存在しても良く、この末端の3つのヌクレオチドのうちの2つは、オーバーハングヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドの次の塩基対形成ヌクレオチドである。好ましくは、これらの末端の3つのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端に存在し得る。

20

【0158】

一実施形態では、RNAi剤は、標的とのミスマッチ（複数可）、二重鎖内のミスマッチ（複数可）、またはこれらの組み合わせを含む。ミスマッチは、オーバーハング領域、または二重鎖領域で生じ得る。塩基対は、解離または融解（例えば、特定の対合の結合または解離の自由エネルギーに対してであり、最も単純なアプローチは、個々の塩基対ベースで塩基対を評価することであるが、類縁または同様の分析を用いることもできる）を促進する傾向に基づいてランク付けすることができる。解離の促進に関しては、A：Uは、G：Cよりも好ましく；G：UはG：Cよりも好ましく；I：CはG：Cよりも好ましい（I＝イノシンである）。ミスマッチ、例えば、非正準な対合または正準以外の対合（本明細書の他の部分に記載）は、正準な対合（A：T、A：U、G：C）よりも好ましく；ユニバーサル塩基を含む塩基対は、正準な対合よりも好ましい。

30

【0159】

一実施形態では、RNAi剤は、A：U、G：U、I：Cの群から独立して選択することができるアンチセンス鎖の5'末端からの二重鎖領域内の最初の1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの塩基対の少なくとも1つ、および二重鎖の5'末端におけるアンチセンス鎖の解離を促進するためのミスマッチ対合、例えば、非正準な対合もしくは正準以外の対合、またはユニバーサル塩基を含む対合を含む。

40

【0160】

一実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端からの二重鎖領域内の1位にあるヌクレオチドは、A、dA、dU、U、およびdTからなる群から選択される。あるいは、アンチセンス鎖の5'末端からの二重鎖領域内の最初の1つ、2つ、または3つの塩基対の少なくとも1つは、AU塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の5'末端からの二重鎖領域内の最初の塩基対は、AU塩基対である。

【0161】

一実施形態では、センス鎖配列は、式（I）で表すことができる：

50



式中、

i および j はそれぞれ独立して、0 または 1 であり；

p および q はそれぞれ独立して、0 ～ 6 であり；

各 N_a は独立して、0 ～ 25 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み；

各 N_b は独立して、0 ～ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

各 n_p および n_q は独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

N_b および Y は、同じ修飾を有しておらず；かつ

XXX、YYY、および ZZZ はそれぞれ独立して、3 つの連続したヌクレオチドにおける 3 つの同一の修飾からなる 1 つのモチーフを表している。好ましくは、YYY は、2' - F 修飾ヌクレオチドである。

【0162】

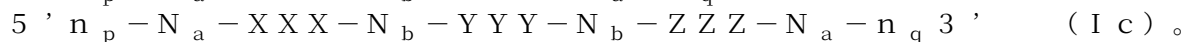
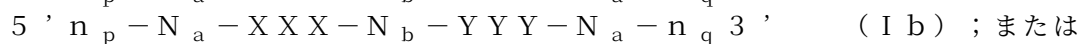
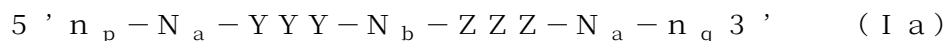
一実施形態では、 N_a および / または N_b は、交互パターンの修飾を含む。

【0163】

一実施形態では、YYY モチーフは、センス鎖の切断部位またはその近傍に存在する。例えば、RNAi 剤が、17 ～ 23 のヌクレオチド長さの二重鎖領域を有する場合、YYY モチーフは、センス鎖の切断部位またはその近傍に存在し得（例えば、6 位、7 位、8 位；7 位、8 位、9 位；8 位、9 位、10 位；9 位、10 位、11 位；10 位、11 位、12 位；または 11 位、12 位、13 位に存在し得）、この位置は、5' 末端から、最初のヌクレオチドから数え始められる；または任意選択で、5' 末端から、二重鎖領域内の最初の塩基対形成ヌクレオチドから数え始められる。

【0164】

一実施形態では、i が 1 で j が 0 である、i が 0 で j が 1 である、または i と j の両方が 1 である。従って、センス鎖は、以下の式で表すことができる：



【0165】

センス鎖が、式 (Ia) で表される場合、 N_b は、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 5、0 ～ 4、0 ～ 2、または 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a は独立して、2 ～ 20、2 ～ 15、または 2 ～ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表すことができる。

【0166】

センス鎖が、式 (Ib) で表される場合、 N_b は、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 10、0 ～ 5、0 ～ 4、0 ～ 2、または 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a は独立して、2 ～ 20、2 ～ 15、または 2 ～ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表すことができる。

【0167】

センス鎖が、式 (Ic) で表される場合、各 N_b は独立して、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 5、0 ～ 4、0 ～ 2、または 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5、または 6 である。各 N_a は独立して、2 ～ 20、2 ～ 15、または 2 ～ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表すことができる。

【0168】

X、Y、および Z はそれぞれ、互いに同じであっても良いし、または異なっても良い。

【0169】

一実施形態では、RNAi 剤のアンチセンス鎖配列は、式 (II) によって表すことが

できる：

$$5' \text{ n}_q - \text{N}_a' - (\text{Z}' \text{Z}' \text{Z}')_k - \text{N}_b' - \text{Y}' \text{Y}' \text{Y}' - \text{N}_b' - (\text{X}' \text{X}' \text{X}')_l - \text{N}'_a - \text{n}_p' 3' \quad (\text{I I})$$

式中、

k および l はそれぞれ独立して、0 または 1 であり；

p' および q' はそれぞれ独立して、0 ～ 6 であり；

各 N_a' は独立して、0 ～ 25 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み；

各 N_b' は独立して、0 ～ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

各 n_p' および n_q' は独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

N_b' および Y' は、同じ修飾を有しておらず；かつ

$\text{X}' \text{X}' \text{X}'$ 、 $\text{Y}' \text{Y}' \text{Y}'$ 、および $\text{Z}' \text{Z}' \text{Z}'$ はそれぞれ独立して、3 つの連続したヌクレオチドにおける 3 つの同一の修飾からなる 1 つのモチーフを表している。

【0170】

一実施形態では、 N_a' および／または N_b' は、交互パターンの修飾を含む。

【0171】

$\text{Y}' \text{Y}' \text{Y}'$ モチーフは、アンチセンス鎖の切断部位またはその近傍に存在する。例えば、RNAi 剤は、17 ～ 23 のヌクレオチド長さの二重鎖領域を有し、 $\text{Y}' \text{Y}' \text{Y}'$ モチーフは、アンチセンス鎖の 9 位、10 位、11 位；10 位、11 位、12 位；11 位、12 位、13 位；12 位、13 位、14 位；または 13 位、14 位、15 位に存在し得、この位置は、5' 末端から、最初のヌクレオチドから数え始められる；または任意選択で、5' 末端から、二重鎖領域内の最初の塩基対形成ヌクレオチドから数え始められる。好ましくは、 $\text{Y}' \text{Y}' \text{Y}'$ モチーフは、11 位、12 位、13 位に存在する。

【0172】

一実施形態では、 $\text{Y}' \text{Y}' \text{Y}'$ モチーフは、2' -OMe 修飾ヌクレオチドである。

【0173】

一実施形態では、k が 1 で l が 0 である、k が 0 で l が 1 である、または k と l の両方が 1 である。

【0174】

従って、アンチセンス鎖は、以下の式で表すことができる：

$$5' \text{ n}_q - \text{N}_a' - \text{Z}' \text{Z}' \text{Z}' - \text{N}_b' - \text{Y}' \text{Y}' \text{Y}' - \text{N}_a' - \text{n}_p' 3' \quad (\text{I I a}) ;$$

$$5' \text{ n}_q - \text{N}_a' - \text{Y}' \text{Y}' \text{Y}' - \text{N}_b' - \text{X}' \text{X}' \text{X}' - \text{n}_p' 3' \quad (\text{I I b}) ;$$

$$5' \text{ n}_q - \text{N}_a' - \text{Z}' \text{Z}' \text{Z}' - \text{N}_b' - \text{Y}' \text{Y}' \text{Y}' - \text{N}_b' - \text{X}' \text{X}' \text{X}' - \text{N}_a' - \text{n}_p' 3' \quad (\text{I I c}) .$$

【0175】

アンチセンス鎖が、式 (I I a) で表される場合、 N_b' は、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 5、0 ～ 4、0 ～ 2、または 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a' は独立して、2 ～ 20、2 ～ 15、または 2 ～ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。

【0176】

アンチセンス鎖が、式 (I I b) で表される場合、 N_b' は、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 5、0 ～ 4、0 ～ 2、または 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a' は独立して、2 ～ 20、2 ～ 15、または 2 ～ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。

【0177】

アンチセンス鎖が、式 (I I c) で表される場合、各 N_b' は独立して、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 10、0 ～ 7、0 ～ 5、0 ～ 4、0 ～ 2、または 0 の修飾ヌクレオチドを含む

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a' は独立して、2～20、2～15、または2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5、または6である。

【0178】

X' 、 Y' 、および Z' はそれぞれ、互いに同じであっても良いし、または異なっているても良い。

【0179】

センス鎖およびアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは独立して、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アシル、2'-C-アシル、2'-ヒドロキシル、2'-デオキシ、または2'-フルオロで修飾され得る。例えば、
10 センス鎖およびアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは独立して、2'-O-メチルまたは2'-フルオロで修飾される。特に、 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' 、および Z' はそれぞれ、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾を表すことができる。

【0180】

一実施形態では、RNAi剤のセンス鎖は、二重鎖領域が21のヌクレオチドである場合にセンス鎖の9位、10位、および11位に存在するYYYモチーフを含むことができ、この位置は、5'末端から、最初のヌクレオチドから数え始められ、または任意選択で、5'末端から、二重鎖領域内の最初の塩基対形成ヌクレオチドから数え始められ；かつ
20 Y は、2'-F修飾を表している。センス鎖は、二重鎖領域の反対の末端におけるウィング修飾としてXXXモチーフまたはZZZモチーフを追加的に含むことができ；かつXXXおよびZZZはそれぞれ独立して、2'-OMe修飾または2'-F修飾を表している。

【0181】

一実施形態では、アンチセンス鎖は、このセンス鎖の11位、12位、および13位に存在する $Y'Y'Y'$ モチーフを含むことができ、この位置は、5'末端から、最初のヌクレオチドから数え始められる、または任意選択で、5'末端から、二重鎖領域内の最初の塩基対形成ヌクレオチドから数え始められ；かつ Y' は、2'-O-メチル修飾を表している。アンチセンス鎖は、二重鎖領域の反対の末端におけるウィング修飾として $X'X'X'$ モチーフまたは $Z'Z'Z'$ モチーフを追加的に含むことができ；かつ $X'X'X'$
30 および $Z'Z'Z'$ はそれぞれ独立して、2'-OMe修飾または2'-F修飾を表している。

【0182】

上記の式(Ia)、(Ib)、および(Ic)の何れか1つによって表されるセンス鎖はそれぞれ、式(IIa)、(IIb)、および(IIc)の何れか1つによって表されるアンチセンス鎖と二重鎖を形成する。

【0183】

従って、本発明のRNAi剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み得、各鎖は、14～30のヌクレオチドを有し、RNAi二重鎖は、式(III)によって表される：

センス鎖： $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'$

アンチセンス鎖： $3' n_{p'} - N_{a'} - (X'X'X')_k - N_{b'} - Y'Y'Y' - N_{b'} - (Z'Z'Z')_l - N_{a'} - n_{q'} 5'$

(III)

式中、

i 、 j 、 k 、および l はそれぞれ独立して、0または1であり；

p 、 p' 、 q 、および q' はそれぞれ独立して、0～6であり；

各 N_a および $N_{a'}$ は独立して、0～25の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み；

各 N_b および $N_{b'}$ は独立して、0～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

10

20

30

40

50

式中、

各 n_p' 、 n_p 、 n_q' 、および n_q は独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；かつ

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 、および $Z'Z'Z'$ はそれぞれ独立して、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つのモチーフを表している。

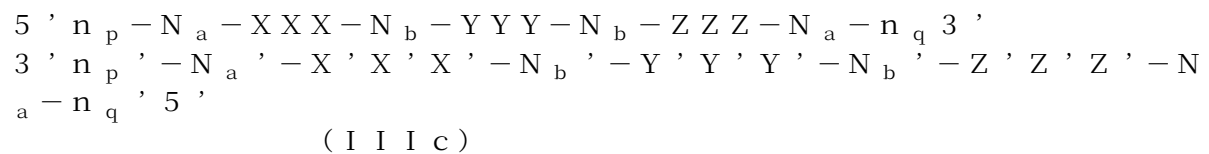
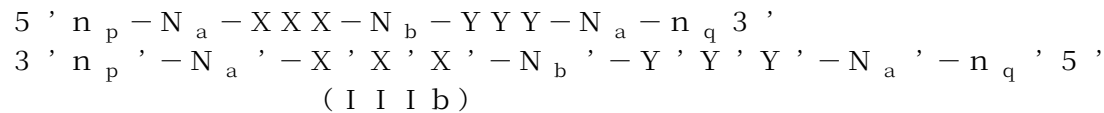
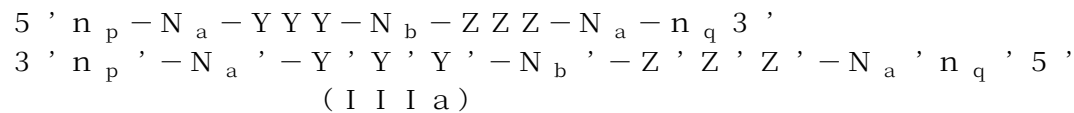
【0184】

一実施形態では、 i が1で、 j が0である； i が0で、 j が1である；または i と j の両方が1である。別の実施形態では、 k が1で、 l が0である； k が0で、 l が1である；または k と l の両方が1である。

10

【0185】

RNA i 二重鎖を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖の例示的な組み合わせは、以下の式を含む：



20

【0186】

RNA i 剤が、式 (IIIa) で表される場合、各 N_b は独立して、1～10、1～7、1～5、または1～4の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a は独立して、2～20、2～15、または2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。

【0187】

RNA i 剤が、式 (IIIb) で表される場合、各 N_b 、 N_b' は独立して、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2、または0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a は独立して、2～20、2～15、または2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。

30

【0188】

RNA i 剤が、式 (IIIc) で表される場合、各 N_b 、 N_b' は独立して、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2、または0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a 、 N_a' は独立して、2～20、2～15、または2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。それぞれの N_a 、 N_a' 、 N_b 、 N_b' は独立して、交互パターンの修飾を含む。

【0189】

式 (III)、(IIIa)、(IIIb)、および (IIIc) における X 、 Y 、および Z はそれぞれ、互いに同じであっても良いし、または異なっても良い。

40

【0190】

RNA i 剤が、式 (III)、(IIIa)、(IIIb)、または (IIIc) で表される場合、 Y ヌクレオチドの少なくとも1つが、 Y' ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、 Y ヌクレオチドの少なくとも2つが、対応する Y' ヌクレオチドと塩基対を形成する；または Y ヌクレオチドの3つ全てが、対応する Y' ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0191】

RNA i 剤が、式 (IIIa) または (IIIc) で表される場合、 Z ヌクレオチドの

50

少なくとも1つが、Z'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、Zヌクレオチドの少なくとも2つが、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成する；またはZヌクレオチドの3つ全てが、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0192】

RNAi剤が、式(IIIb)または(IIIc)で表される場合、Xヌクレオチドの少なくとも1つが、X'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、Xヌクレオチドの少なくとも2つが、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成する；またはXヌクレオチドの3つ全てが、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0193】

一実施形態では、Yヌクレオチドの修飾は、Y'ヌクレオチドの修飾とは異なり、Zヌクレオチドの修飾は、Z'ヌクレオチドの修飾とは異なり、かつ／またはXヌクレオチドの修飾は、X'ヌクレオチドの修飾とは異なる。

【0194】

一実施形態では、RNAi剤は、式(III)、(IIIa)、(IIIb)、または(IIIc)で表される少なくとも2つの二重鎖を含む多量体であり、この二重鎖はリンカーによって結合されている。このリンカーは、切断可能であっても良いし、または切断不可能であっても良い。任意選択で、この多量体は、リガンドをさらに含む。二重鎖はそれぞれ、同じ遺伝子または2つの異なる遺伝子を標的としても良いし；あるいは二重鎖はそれぞれ、2つの異なる標的部位における同じ遺伝子を標的としても良い。

【0195】

一部の実施形態では、RNAi剤は、式(III)、(IIIa)、(IIIb)、または(IIIc)で表される3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上の二重鎖を含む多量体であり、この二重鎖は、リンカーによって結合されている。このリンカーは、切断可能であっても良いし、または切断不可能であっても良い。任意選択で、この多量体は、リガンドをさらに含む。二重鎖はそれぞれ、同じ遺伝子または2つの異なる遺伝子を標的としても良いし；あるいは二重鎖はそれぞれ、2つの異なる標的部位における同じ遺伝子を標的としても良い。

【0196】

一実施形態では、式(III)、(IIIa)、(IIIb)、または(IIIc)で表される2つのRNAi剤は、5'末端で互いに結合され、その3'末端の一方または両方が、任意選択で、リガンドによってコンジュゲートされる。RNAi剤はそれぞれ、同じ遺伝子または2つの異なる遺伝子を標的としても良いし；あるいはRNAi剤はそれぞれ、2つの異なる標的部位における同じ遺伝子を標的としても良い。

【0197】

様々な刊行物が、多量体RNAi剤について記載している。このような刊行物としては、参照によりそれらの全開示内容が本明細書に組み入れられる、国際公開第2007/091269号パンフレット、米国特許第7858769号明細書、国際公開第2010/141511号パンフレット、同第2007/117686号パンフレット、同第2009/014887号パンフレット、および同第2011/031520号パンフレットが挙げられる。

【0198】

1つ以上の糖質部分のRNAi剤に対するコンジュゲーションを含むRNAi剤は、このRNAi剤の1つ以上の特性を最適化し得る。多くの場合、糖質部分は、RNAi剤の修飾サブユニットに付着する。例えば、dsRNA剤の1つ以上のリボヌクレオチドサブユニットのリボース糖を、別の部分、例えば、糖質リガンドが付着する非糖質担体（好ましくは環状）で置換することができる。サブユニットのリボース糖がこのように置換されたリボヌクレオチドサブユニットは、本明細書では、リボース置換修飾サブユニット(RRMS)と呼ばれる。環状担体は、炭素環系、即ち全ての環原子が炭素原子である環系であっても良いし、または複素環系、即ち1つ以上の環原子が、ヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、硫黄であり得る環系であっても良い。環状担体は、単環系であっても良いし、ま

10

20

30

40

50

たは2つ以上の環、例えば、融合環を含んでも良い。環状担体は、完全に飽和した環系であっても良いし、または1つ以上の二重結合を含んでも良い。

【0199】

リガンドは、担体によってポリヌクレオチドに付着することができる。担体は、(i) 少なくとも1つの「骨格付着点 (backbone attachment point)」、好ましくは2つの「骨格付着点」、および(ii) 少なくとも1つの「テザー付着点 (tethering attachment point)」を含む。本明細書で使用する「骨格付着点」は、官能基、例えば、ヒドロキシル基、または一般に、リボ核酸の骨格、例えば、リン酸塩の骨格、もしくは、例えば、硫黄を含有する修飾リン酸塩の骨格への担体の組み込みに利用可能であり、かつ適した結合を指す。「テザー付着点」(TAP)は、一部の実施形態では、選択された部分を接続する環状担体の構成環原子、例えば、炭素原子またはヘテロ原子(骨格付着点を提供する原子とは異なる)を指す。この選択された部分は、例えば、糖質、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、および多糖であり得る。任意選択で、選択された部分は、介在テザー (intervening tether) によって環状担体に接続される。従って、環状担体は、しばしば、官能基、例えば、アミノ基を含む、または、一般に、別の化学物質、例えば、リガンドの構成環への組み込みまたは連結 (tethering) に適した結合を可能にする。

10

【0200】

RNAi 剤は、担体によってリガンドにコンジュゲートすることができ、この担体は、環状基または非環状基であり；好ましくは、環状基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、[1, 3] ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフリル、およびデカリンから選択され；好ましくは、非環状基は、セリノール骨格またはジエタノールアミン骨格から選択される。

20

【0201】

ある特定の実施形態では、本発明のRNAi 剤は、表1に列記され、D1000、D1001、D1002、D1003、D1004、D1005、D1006、D1007、D1008、D1009、D1010、D1011、D1012、D1013、D1014、D1015、D1016、D1017、D1018、D1019、D1020、D1021、D1022、D1023、D1024、D1025、D1026、D1027、D1028、D1029、D1030、D1031、D1032、D1033、D1034、D1035、D1036、D1037、D1038、D1039、D1040、D1041、D1042、D1043、D1044、D1045、D1046、D1047、D1048、D1049、D1050、D1051、D1052、D1053、D1054、D1055、D1056、D1057、D1058、D1059、D1060、D1061、D1062、D1063、D1064、D1065、D1066、D1067、D1068、D1069、D1070、D1071、D1072、D1073、D1074、D1075、D1076、D1077、D1078、D1079、D1080、D1081、D1082、D1083、D1084、D1085、D1086、D1087、D1088、D1089、D1090、D1091、D1092、D1093、D1094、D1095、D1096、D1097、D1098、D1099、D1100、D1101、D1102、D1103、D1104、D1105、D1106、D1107、D1108、D1109、D1110、D1111、D1112、D1113、D1114、D1115、D1116、D1117、D1118、D1119、D1120、D1121、D1122、D1123、D1124、D1125、D1126、D1127、D1128、D1129、D1130、D1131、D1132、D1133、D1134、D1135、D1136、D1137、D1138、D1139、D1140、D1141、D1142、D1143、D1144、D1145、D1146、D1147、D1148、D1149、D1150、D1151、D1152、D1153、D115

30

40

50

4、D1155、D1156、D1157、D1158、D1159、D1160、D1161、D1162、D1163、D1164、D1165、D1166、D1167、D1168、D1169、D1170、D1171、D1172、D1173、D1174、D1175、D1176、D1177、D1178、D1179、D1180、D1181、D1182、D1183、D1184、D1185、D1186、D1187、D1188、D1189、D1190、D1191、D1192、D1193、D1194、D1195、D1196、D1197、D1198、D1199、D1200、D1201、D1202、D1203、D1204、D1205、D1206、D1207、D1208、D1209、D1210、D1211、D1212、D1213、D1214、D1215、D1216、D1217、D1218、D1219、D1220、D1221、D1222、D1223、D1224、D1225、D1226、D1227、D1228、D1229、D1230、D1231、D1232、D1233、D1234、D1235、D1236、D1237、D1238、D1239、D1240、D1241、D1242、D1243、D1244、D1245、D1246、D1247、D1248、D1249、D1250、D1251、D1252、D1253、D1254、D1255、D1256、D1257、D1258、D1259、D1260、D1261、D1262、D1263、D1264、D1265、D1266、D1267、D1268、D1269、D1270、D1271、D1272、D1273、D1274、D1275、D1276、D1277、D1278、D1279、D1280、D1281、D1282、D1283、D1284、D1285、D1286、D1287、D1288、D1289、D1290、D1291、D1292、D1293、D1294、D1295、D1296、D1297、D1298、D1299、D1300、D1301、D1302、D1303、D1304、D1305、D1306、D1307、D1308、D1309、D1310、D1311、D1312、D1313、D1314、D1315、D1316、D1317、D1318、D1319、D1320、D1321、D1322、D1323、D1324、D1325、D1326、D1327、D1328、D1329、D1330、D1331、D1332、D1333、D1334、D1335、D1336、D1337、D1338、D1339、D1340、D1341、D1342、D1343、D1344、D1345、D1346、D1347、D1348、D1349、D1350、D1351、D1352、D1353、D1354、D1355、D1356、D1357、D1358、D1359、D1360、D1361、D1362、D1363、D1364、D1365、D1366、D1367、D1368、D1369、D1370、D1371、D1372、D1373、D1374、D1375、D1376、D1377、D1378、D1379、D1380、D1381、D1382、D1383、D1384、D1385、D1386、D1387、D1388、D1389、D1390、D1391、D1392、D1393、D1394、D1395、D1396、D1397、D1398、D1399、D1400、D1401、D1402、D1403、D1404、D1405、D1406、D1407、D1408、D1409、D1410、D1411、D1412、D1413、D1414、D1415、D1416、D1417、D1418、D1419、D1420、D1421、D1422、D1423、D1424、D1425、D1426、D1427、D1428、D1429、D1430、D1431、D1432、D1433、D1434、D1435、D1436、D1437、D1438、D1439、D1440、D1441、D1442、D1443、D1444、D1445、D1446、D1447、D1448、D1449、D1450、D1451、D1452、D1453、D1454、D1455、D1456、D1457、D1458、D1459、D1460、D1461、D1462、D1463、D1464、D1465、D1466、D1467、D1468、D1469、D1470、D1471、D1472、D1473、D1474、D1475、D1476、D1477、D1478、D1479、D1480、D1481、D1482、D1483、D1484、D1485、D1486、D1487、

D1488、D1489、D1490、D1491、D1492、D1493、D1494、D1495、D1496、D1497、D1498、D1499、D1500、D1501、D1502、D1503、D1504、D1505、D1506、D1507、D1508、D1509、D1510、D1511、D1512、D1513、D1514、D1515、D1516、D1517、D1518、D1519、D1520、D1521、D1522、D1523、D1524、D1525、D1526、D1527、D1528、D1529、D1530、D1531、D1532、D1533、D1534、D1535、D1536、D1537、D1538、D1539、D1540、D1541、D1542、D1543、D1544、D1545、D1546、D1547、D1548、D1549、D1550、D1551、D1552、D1553、D1554、D1555、D1556、D1557、D1558、D1559、D1560、D1561、D1562、D1563、D1564、D1565、D1566、D1567、D1568、D1569、D1570、D1571、D1572、D1573、D1574、D1575、D1576、D1577、D1578、D1579、D1580、D1581、D1582、D1583、D1584、D1585、D1586、D1587、D1588、D1589、D1590、D1591、D1592、D1593、D1594、D1595、D1596、D1597、D1598、D1599、D1600、D1601、D1602、D1603、D1604、D1605、D1606、D1607、D1608、D1609、D1610、D1611、D1612、D1613、D1614、D1615、D1616、D1617、D1618、D1619、D1620、D1621、D1622、D1623、D1624、D1625、D1626、D1627、D1628、D1629、D1630、D1631、D1632、D1633、D1634、D1635、D1636、D1637、D1638、D1639、D1640、D1641、D1642、D1643、D1644、D1645、D1646、D1647、D1648、D1649、D1650、D1651、D1652、D1653、D1654、D1655、D1656、D1657、D1658、D1659、D1660、D1661、D1662、D1663、D1664、D1665、D1666、D1667、D1668、D1669、D1670、D1671、D1672、D1673、D1674、D1675、D1676、D1677、D1678、D1679、D1680、D1681、D1682、D1683、D1684、D1685、D1686、D1687、D1688、D1689、D1690、D1691、D1692、D1693、D1694、D1695、D1696、D1697、D1698、D1699、D1700、D1701、D1702、D1703、D1704、D1705、D1706、D1707、D1708、D1709、D1710、D1711、D1712、D1713、D1714、D1715、D1716、D1717、D1718、D1719、D1720、D1721、D1722、D1723、D1724、D1725、D1726、D1727、D1728、D1729、D1730、D1731、D1732、D1733、D1734、D1735、D1736、D1737、D1738、D1739、D1740、D1741、D1742、D1743、D1744、D1745、D1746、D1747、D1748、D1749、D1750、D1751、D1752、D1753、D1754、D1755、D1756、D1757、D1758、D1759、D1760、D1761、D1762、D1763、D1764、D1765、D1766、D1767、D1768、D1769、D1770、D1771、D1772、D1773、D1774、D1775、D1776、D1777、D1778、D1779、D1780、D1781、D1782、D1783、D1784、D1785、D1786、D1787、D1788、D1789、D1790、D1791、D1792、D1793、D1794、D1795、D1796、D1797、D1798、D1799、D1800、D1801、D1802、D1803、D1804、D1805、D1806、D1807、D1808、D1809、D1810、D1811、D1812、D1813、D1814、D1815、D1816、D1817、D1818、D1819、D1820、D1

821、D1822、D1823、D1824、D1825、D1826、D1827、
D1828、D1829、D1830、D1831、D1832、D1833、D1834、
D1835、D1836、D1837、D1838、D1839、D1840、D1841、
D1842、D1843、D1844、D1845、D1846、D1847、
D

1848、D1849、D1850、D1851、D1852、D1853、D1854、
D1855、D1856、D1857、D1858、D1859、D1860、D1861、
D1862、D1863、D1864、D1865、D1866、D1867、D1868、
D1869、D1870、D1871、D1872、D1873、D1874、D1875、
D1876、D1877、D1878、D1879、D1880、D1881、D1882、
D1883、D1884、D1885、D1886、D1887、D1888、D1889、
D1890、D1891、D1892、D1893、D1894、D1895、D1896、
D1897、D1898、D1899、D1900、D1901、D1902、D1903、
D1904、D1905、D1906、D1907、D1908、D1909、D1910、
D1911、D1912、D1913、D1914、D1915、D1916、D1917、
D1918、D1919、D1920、D1921、D1922、D1923、D1924、
D1925、D1926、D1927、D1928、D1929、D1930、D1931、
D1932、D1933、D1934、D1935、D1936、D1937、D1938、
D1939、D1940、D1941、D1942、D1943、D1944、D1945、
D1946、D1947、D1948、D1949、D1950、D1951、D1952、
D1953、D1954、D1955、D1956、D1957、D1958、D1959、
D1960、D1961、D1962、D1963、D1964、D1965、D1966、
D1967、D1968、D1969、D1970、D1971、D1972、D1973、
D1974、D1975、D1976、D1977、D1978、D1979、D1980、
D1981、D1982、D1983、D1984、D1985、D1986、D1987、
D1988、D1989、D1990、D1991、D1992、D1993、D1994、
D1995、D1996、D1997、D1998、D1999、D2000、D2001、
D2002、D2003、D2004、D2005、D2006、D2007、D2008、
D2009、D2010、D2011、D2012、D2013、D2014、D2015、
D2016、D2017、D2018、D2019、D2020、D2021、D2022、
D2023、D2024、D2025、D2026、D2027、D2028、D2029、
D2030、D2031、D2032、D2033、D2034、D2035、D2036、
D2037、D2038、D2039、D2040、D2041、D2042、D2043、
D2044、D2045、D2046、D2047、D2048、D2049、D2050、
D2051、D2052、D2053、D2054、D2055、D2056、D2057、
D2058、D2059、D2060、D2061、D2062、D2063、D2064、
D2065、D2066、D2067、D2068、D2069、D2070、D2071、
D2072、D2073、D2074、D2075、D2076、D2077、D2078、
D2079、D2080、D2081、D2082、D2083、D2084、D2085、
D2086、D2087、D2088、D2089、D2090、およびD2091からなる作用剤の群から選択される作用剤である。

【0202】

これらの作用剤は、リガンド、例えば、GalNAcリガンドをさらに含み得る。

【0203】

リガンド

本発明のRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤は、任意選択で、1つ以上のリガンドにコンジュゲートし得る。このリガンドは、3'末端、5'末端、または両末端において、センス鎖、アンチセンス鎖、または両鎖に付着し得る。例えば、リガンドは、センス鎖

10

20

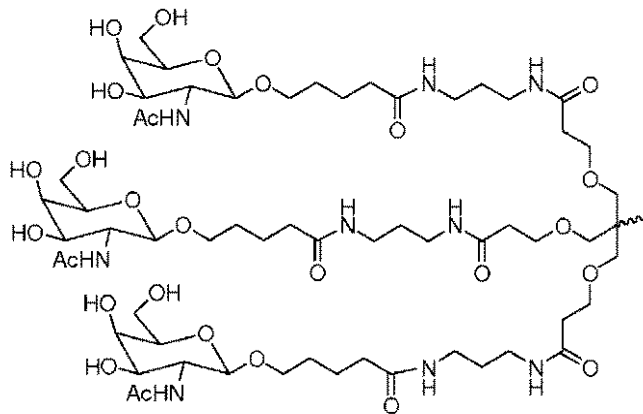
30

40

50

にコンジュゲートし得る。好ましい実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端にコンジュゲートする。好ましい一実施形態では、リガンドは、GalNAcリガンドである。特に好ましい実施形態では、リガンドはGalNAc₃：

【化4】



10

である。

【0204】

多種多様な物質が、本発明のRNAi剤に結合することができる。好ましい部分は、直接的にまたは介在テザーを介して間接的に、好ましくは共有結合で結合されるリガンドである。

20

【0205】

好ましい実施形態では、リガンドは、このリガンドが取り込まれる分子の分布、標的化、または寿命を変更する。好ましい実施形態では、リガンドは、例えば、このようなリガンドが存在しない種と比較して、選択される標的、例えば、分子、細胞もしくは細胞型、区画、受容体、例えば、細胞もしくは器官の区画、組織、器官、または体の領域に対する親和性を高める。選択される標的に対する親和性を高めるリガンドは、標的化リガンドとも呼ばれる。

【0206】

30

一部のリガンドは、エンドソーム溶解特性を有し得る。エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームの溶解、および／または本発明の組成物もしくはその成分のエンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する。エンドソーム溶解リガンドは、pH依存性の膜活性および融合性を示すポリアニオン性ペプチドまたはペプチド模倣体であっても良い。一実施形態では、エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームのpHでその活性型立体構造をとると推定される。「活性型」立体構造とは、エンドソーム溶解リガンドが、エンドソームの溶解、および／または本発明の組成物もしくはその成分のエンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する立体構造のことである。例示的なエンドソーム溶解リガンドとしては、GALAペプチド (Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26:2964-2972)、EALAペプチド (Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118:1581-1586)、およびこれらの誘導体 (Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559:56-68) が挙げられる。一実施形態では、エンドソーム溶解成分は、pHの変化に応じて電荷またはプロトン化の変化を起こす化学基 (例えば、アミノ酸) を含み得る。エンドソーム溶解成分は、直鎖であっても、分岐鎖であっても良い。

40

【0207】

リガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション、および特異性の特性を向上させることができ、結果として得られる天然オリゴリボヌクレオチドもしくは修飾オリゴリボヌクレオチド、または本明細書に記載されるモノマーおよび／もしくは天然リボヌクレオチドもしくは修飾リボヌクレオチドの任意の組み合わせを含むポリマー分子のヌクレアーゼ耐性も

50

向上させることができる。

【0208】

リガンドは、一般に、例えば、取り込みを増強するための治療用修飾因子；例えば、分布を監視するための診断化合物またはレポーター基；架橋剤；およびヌクレアーゼ耐性を付与する部分を含み得る。一般的な例として、脂質、ステロイド、ビタミン、糖、タンパク質、ペプチド、ポリアミン、およびペプチド模倣体が挙げられる。

【0209】

リガンドとしては、天然に存在する物質、例えば、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）、高密度リポタンパク質（HDL）、もしくはグロブリン）；糖質（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、もしくはヒアルロン酸）；または脂質を挙げることができる。リガンドは、組換え分子または合成分子、例えば、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）であっても良い。ポリアミノ酸を含むポリアミノ酸としては、ポリリジン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コグリコリエド（glycolide））コポリマー、ジビニルエーテル無水マレイン酸コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンが挙げられる。ポリアミンの例として、ポリエチレンイミン、ポリリジン（PLL）、スベルミン、スベルミジン、ポリアミン、擬似ペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩、またはアルファヘリックスペプチドが挙げられる。

【0210】

リガンドとして、標的化基、例えば、細胞標的化剤または組織標的化剤、例えば、腎臓細胞などの特定の細胞型に結合するレクチン、糖タンパク質、脂質、もしくはタンパク質、例えば、抗体も挙げることができる。標的化基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤タンパク質A、ムチン糖質、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン（glucosamine）、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸塩、ポリアスパラギン酸塩、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミンB12、ビオチン、RGDペプチド、RGDペプチド模倣体、またはアプタマーであっても良い。

【0211】

リガンドの他の例として、色素、挿入剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ブソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼまたはキレート剤（例えば、EDTA）、親油性分子、例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、もしくはフェノキサジン）およびペプチドコンジュゲート（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸塩、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送/吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート、テトラアザマクロ環のEu³⁺複

合体)、ジニトロフェニル、HRP、またはAPが挙げられる。

【0212】

リガンドは、タンパク質、例えば、糖タンパク質、またはペプチド、例えば、共リガンドに対して特異的な親和性を有する分子、または抗体、例えば、癌細胞、内皮細胞、もしくは骨細胞などの特定の細胞型に結合する抗体であっても良い。リガンドとして、ホルモンおよびホルモン受容体も挙げることができる。リガンドとして、非ペプチド種、例えば、脂質、レクチン、糖質、ビタミン、コファクター、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、またはアプタマーも挙げることができる。リガンドは、例えば、リポ多糖、p38 MAPキナーゼの活性化因子、またはNF- κ Bの活性化因子であっても良い。

10

【0213】

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格を破壊することによって、例えば、細胞の微小管、マイクロフィラメント、および／または中間径フィラメントを破壊することによって、iRNA剤の細胞内への取り込みを増大させることができる物質、例えば、薬物であっても良い。薬物は、例えば、タクソン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド(japlakinolide)、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、またはミオセルビン(myoservin)であっても良い。

【0214】

リガンドは、例えば、炎症反応を活性化することによって、オリゴヌクレオチドの細胞への取り込みを増加させることができる。このような効果を有し得る例示的なリガンドとしては、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターロイキン-1 β 、または γ インターフェロンが挙げられる。

20

【0215】

一態様では、リガンドは、脂質または脂質ベースの分子である。このような脂質または脂質ベースの分子は、好ましくは血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)に結合する。HSA結合リガンドは、コンジュゲートが、標的組織、例えば、体の非腎臓標的組織に分布するのを可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であっても良い。HSAに結合し得る他の分子もリガンドとして使用することができる。例えば、ナプロキセンまたはアスピリンを使用することができる。脂質または脂質ベースのリガンドは、(a)コンジュゲートの分解に対する耐性を増大させ、(b)標的細胞または細胞膜への標的化または輸送を増大させることができ、かつ／または(c)血清タンパク質、例えば、HSAに対する結合を調節するために使用することができる。

30

【0216】

脂質ベースのリガンドは、標的組織に対するコンジュゲートの結合を調節、例えば、制御するために使用することができる。例えば、HSAにより強く結合する脂質または脂質ベースのリガンドは、腎臓を標的とする可能性が低く、従って、体内から除去される可能性が低い。HSAにそれほど強く結合しない脂質または脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートが腎臓を標的にするように使用することができる。

【0217】

好ましい実施形態では、脂質ベースのリガンドはHSAに結合する。好ましくは、脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートが、好ましくは非腎臓組織に分布するように、十分な親和性でHSAに結合する。しかしながら、好ましくは、この親和性は、HSA-リガンド結合が逆行できないほど強力ではない。

40

【0218】

別の好ましい実施形態では、脂質ベースのリガンドは、HSAに対して弱く結合するかまたは全く結合しないため、コンジュゲートが、好ましくは腎臓に分布する。腎臓を標的とする他の部分も、脂質ベースのリガンドの代わりに、またはこれに加えて使用することができる。

【0219】

50

別の態様では、リガンドは、標的細胞、例えば、増殖細胞によって取り込まれる部分、例えば、ビタミンである。これらは、例えば、悪性型または非悪性型、例えば、癌細胞の望ましくない細胞増殖を特徴とする障害を治療するのに特に有用である。例示的なビタミンとしては、ビタミンA、E、およびKが挙げられる。他の例示的なビタミンとしては、ビタミンB、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサル、または癌細胞によって取り込まれる他のビタミンもしくは栄養素が挙げられる。また、HAS、低密度リポタンパク質(LDL)、および高密度リポタンパク質(HDL)もが挙げられる。

【0220】

別の態様では、リガンドは、細胞透過剤、好ましくはヘリックス型の細胞透過剤である。好ましくは、作用剤は両親媒性である。例示的な作用剤は、ペプチド、例えば、tatまたはアンテナペディア(antennopedia)である。作用剤がペプチドである場合、ペプチジル模倣体、反転異性体、非ペプチド結合または偽ペプチド結合、およびD-アミノ酸の使用を含む修飾を施すことができる。好ましくは、このヘリックス型の細胞透過剤は、好ましくは親油性相および疎油性相を有するアルファヘリックス型の作用剤である。

【0221】

リガンドは、ペプチドまたはペプチド模倣体であっても良い。ペプチド模倣体(本明細書ではオリゴペプチド模倣体とも呼ばれる)は、天然ペプチドと同様の定められた3次元構造に折り畳むことができる分子である。ペプチド部分またはペプチド模倣体部分は、約5~50のアミノ酸長さ、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50のアミノ酸長さであっても良い。ペプチドまたはペプチド模倣体は、例えば、細胞透過ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、または疎水性ペプチド(例えば、主にTyr、Trp、もしくはPheから構成される)であっても良い。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、拘束ペプチド、または架橋ペプチドであっても良い。別の代替では、ペプチド部分は、疎水性の膜輸送配列(MTS)を含み得る。例示的な疎水性MTS含有ペプチドは、アミノ酸配列AAVALLPAVLLALLAP(配列番号:4)を有するRFGFである。疎水性MTSを含有するRFGF類似体(例えば、アミノ酸配列AALLPVLLAAP)(配列番号:5)も標的化部分であっても良い。ペプチド部分は、「送達」ペプチドであっても良く、この送達ペプチドは、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質を含む大きな極性分子を、細胞膜を通過して運搬することができる。例えば、HIV Tatタンパク質由来の配列(GRKKRRQRPPQ)(配列番号:6)およびショウジョウバエアンテナペディアタンパク質由来の配列(RQIKIWFQNRRMKWKK)(配列番号:7)は、送達ペプチドとして機能できることが分かっている。ペプチドまたはペプチド模倣体、例えば、ファージディスプレイライブラリー、または1ビーズ1化合物(OBOC)コンビナトリアルライブラリーから特定されたペプチドは、DNAのランダム配列によってコードされても良い(Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991)。好ましくは、組み込まれたモノマー単位を介してiRNA剤に連結されたペプチドまたはペプチド模倣体は、細胞標的化ペプチド、例えば、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)-ペプチドまたはRGD模倣体である。ペプチド部分は、約5つのアミノ酸長さ~約40のアミノ酸長さの範囲とすることができる。ペプチド部分は、例えば、安定性または直接的な立体構造特性を高めるための、構造変化を有し得る。下記の構造変化のいずれも利用することができる。RGDペプチド部分は、内皮腫瘍細胞または乳癌腫瘍細胞などの腫瘍細胞を標的とするために使用することができる(Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002)。RGDペプチドは、肺、腎臓、脾臓、または肝臓を含む種々の他の組織の腫瘍に対するiRNA剤の標的化を促進することができる(Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001)。好ましくは、RGDペプチドは、腎臓に対するiRNA剤の標的化を促進する。RGDペプチドは、直鎖または環状であっても良く、特定の組織に対す

10

20

30

40

50

る標的化を促進するために修飾する、例えば、グリコシル化またはメチル化することができる。例えば、グリコシル化RGDペプチドは、 $\alpha_v\beta_3$ を発現する腫瘍細胞にiRNA剤を送達することができる(Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001)。増殖細胞に豊富なマーカーを標的とするペプチドを使用することができる。例えば、RGD含有ペプチドおよびRGD含有ペプチド模倣体は、癌細胞、特に、インテグリンを提示する細胞を標的とすることができる。従って、RGDペプチド、RGDを含有する環状ペプチド、D-アミノ酸を含むRGDペプチド、および合成RGD模倣体を使用することができる。RGDに加えて、インテグリンリガンドを標的とする他の部分を使用することもできる。一般に、このようなリガンドは、増殖細胞および血管新生(angio genesis)を制御するために使用することができる。この種のリガンドの好ましいコンジュゲートは、PECAM-1、VEGF、または他の癌遺伝子、例えば、本明細書に記載される癌遺伝子を標的とする。

10

【0222】

「細胞透過ペプチド」は、細胞、例えば、微生物細胞、例えば、細菌細胞もしくは真菌細胞、または哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を透過することができる。微生物細胞を透過するペプチドは、例えば、 α -ヘリックス直鎖ペプチド(例えば、LL-37もしくはセロピンP1)、ジスルフィド結合含有ペプチド(例えば、 α -ディフェンシン、 β -ディフェンシン、もしくはバクテネシン)、または1種もしくは2種の優勢なアミノ酸のみを含有するペプチド(例えば、PR-39もしくはインドリシジン)であっても良い。細胞透過ペプチドは、核局在化シグナル(NLS)も含み得る。例えば、細胞透過ペプチドは、HIV-1 gp41の融合ペプチドドメインおよびSV40ラージT抗原のNLSに由来する二部両親媒性ペプチド、例えば、MPGであっても良い(Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003)。

20

【0223】

一実施形態では、標的化ペプチドは、両親媒性 α -ヘリックスペプチドであっても良い。例示的な両親媒性 α -ヘリックスペプチドとしては、限定されるものではないが、セクロピン、リコトキシン(lycotoxin)、パラダキシン(paradoxin)、ブフォリン、CPF、ボンベニン-様ペプチド(BLP)、カテリシジン、セラトトキシン(ceratotoxin)、エボヤ(S. clava)ペプチド、メクラウナギ腸抗菌ペプチド(HFIAAP)、マガイニン、ブレベニン-2、デルマセプチン、メリチン、プレウロシジン、H₂Aペプチド、アフリカツメガエルペプチド、エスクレンチニス-1(esculentin-1)、およびカエリンが挙げられる。好ましくは、多数の因子が、ヘリックス安定性の完全性を維持すると見なされる。例えば、最大数のヘリックス安定化残基(例えばleu、ala、またはlys)を利用し、最小数のヘリックス不安定化残基(例えばプロリン、または環状モノマー単位を利用する。キャッピング残基も考慮される(例えば、Glyは、例示的なN-キャッピング残基であり、かつ/またはC末端アミド化は、追加的な水素結合を実現してヘリックスを安定させるために使用することができる。i±3位、またはi±4位離間した、反対の電荷を有する残基間の塩架橋の形成によって安定させることができる。カチオン性残基、例えば、リジン、アルギニン、ホモアルギニン、オルニチン、またはヒスチジンは、アニオン性残基であるグルタミン酸またはアスパラギン酸と塩架橋を形成し得る。

30

40

【0224】

ペプチドリガンドおよびペプチド模倣体リガンドとしては、天然ペプチドまたは修飾ペプチド、例えば、DペプチドもしくはLペプチド； α ペプチド、 β ペプチド、もしくは γ ペプチド；N-メチルペプチド；アザペプチド；1つ以上の尿素結合、チオ尿素結合、カルバミン酸結合、もしくはスルホニル尿素結合で置換された1つ以上のアミド結合、即ち、ペプチ結合を有するペプチド；または環状ペプチドを有するリガンドが挙げられる。

【0225】

標的化リガンドは、特定の受容体を標的とすることができるあらゆるリガンドであっても良い。例として、葉酸塩、GalNAc、ガラクトース、マンノース、マンノース-6

50

P、糖クラスター、例えば、GalNAcクラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスター、またはアプタマーが挙げられる。クラスターは、2つ以上の糖単位の組み合わせである。標的化リガンドは、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エンドセリン、GCP11、ソマトスタチン、LDLリガンド、およびHDLリガンドも含む。リガンドは、核酸、例えば、アプタマーをベースにしても良い。アプタマーは、未修飾でも良いし、または本明細書に開示される修飾の任意の組み合わせを有しても良い。

【0226】

エンドソーム放出剤としては、イミダゾール、ポリまたはオリゴイミダゾール、PEI、ペプチド、融合性ペプチド、ポリカーボキシレート (polycarboxylate)、ポリカチオン (polycation)、マスクオリゴまたはポリカチオンまたはアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール／ポリケチアル (polyketal)、オルトエステル、マスクまたは非マスクカチオンまたはアニオン電荷を有するポリマー、マスクまたは非マスクカチオンまたはアニオン電荷を有するデンドリマーが挙げられる。

10

【0227】

PKモジュレーターとは、薬物動態学的モジュレーターのことである。PKモジュレーターとしては、脂肪親和物、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、PEG、ビタミンなどが挙げられる。例示的なPKモジュレーターとしては、限定されるものではないが、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアシルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブuprofen、ビタミンE、ビオチンなどが挙げられる。多数のホスホロチオエート連結を含むオリゴヌクレオチドも、血清タンパク質に結合することが知られており、したがって、骨格に多数のホスホロチオエート連結を含む短鎖オリゴヌクレオチド、例えば、約5塩基、10塩基、15塩基、または20塩基のオリゴヌクレオチドも、リガンドとして（例えば、PK調節リガンドとして）本発明に適用可能である。

20

【0228】

加えて、血清成分（例えば、血清タンパク質）に結合するアプタマーも、PK調節リガンドとして本発明に適用可能である。

【0229】

本発明に適用可能な他のリガンドコンジュゲートは、参照によりそれらの全開示内容が本明細書に組み入れられる、2004年8月10日出願の米国特許出願第10/916,185号明細書；2004年9月21日出願の同第10/946,873号明細書；2007年8月3日出願の同第10/833,934号明細書；2005年4月27日出願の同第11/115,989号明細書、および2007年11月21日出願の同第11/944,227号明細書に記載されている。

30

【0230】

2つ以上のリガンドが存在する場合、リガンドは、全て同じ特性を有しても良いし、全てが異なる特性を有しても良く、または一部のリガンドが、同じ特性を有する一方、他のリガンドが異なる特性を有しても良い。例えば、リガンドは、標的化特性を有しても良いし、エンドソーム的活性を有しても良いし、またはPK調節特性を有しても良い。好ましい実施形態では、全てのリガンドが異なる特性を有する。

40

【0231】

リガンドは、様々な位置、例えば3'末端、5'末端、および／または内部位置で、オリゴヌクレオチドに結合することができる。好ましい実施形態では、リガンドは、介在テザー、例えば、本明細書に記載される担体を介してオリゴヌクレオチドに結合している。モノマーが成長している鎖に組み込まれる場合、リガンドまたはテザーリガンドは、このモノマーに存在しても良い。一部の実施形態では、リガンドは、「前駆体」モノマーが、成長している鎖に組み込まれた後で、この「前駆体」モノマーへの結合によって組み込むことができる。例えば、末端がアミノであるテザー（即ち、リガンドが結合されていない

50

)、例えば、 $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ を有するモノマーを、成長しているオリゴヌクレオチド鎖に組み込むことができる。これに続く作業、即ち、前駆体モノマーが鎖に組み込まれた後で、リガンドの求電子基と前駆体モノマーのテザーの末端求核基との結合によって、求電子基、例えば、ペンタフルオロフェニルエステルまたはアルデヒド基を有するリガンドを、その後、前駆体モノマーに結合させることができる。

【0232】

別の例では、クリック化学反応に参加するのに適した化学基を有するモノマーを、例えば、末端がアジドまたはアルキンのテザー／リンカーに組み込むことができる。これに続く作業、即ち、前駆体モノマーが鎖に組み込まれた後で、相補的な化学基、例えば、アルキンまたはアジドを有するリガンドを、アルキンおよびアジドを共に結合することによって前駆体モノマーに結合することができる。

10

【0233】

二本鎖オリゴヌクレオチドの場合、リガンドは、一方または両方の鎖に結合することができる。一部の実施形態では、二本鎖RNA剤は、センス鎖にコンジュゲートされたリガンドを含有する。他の実施形態では、二本鎖RNA剤は、アンチセンス鎖にコンジュゲートされたリガンドを含有する。

【0234】

一部の実施形態では、リガンドは、核酸分子の核酸塩基、糖部分、またはヌクレオシド間結合にコンジュゲートすることができる。プリン核酸塩基またはその誘導体に対するコンジュゲーションは、環内原子および環外原子を含む任意の位置に生じ得る。一部の実施形態では、プリン核酸塩基の2位、6位、7位、または8位が、コンジュゲート部分に結合している。また、ピリミジン核酸塩基またはその誘導体に対するコンジュゲーションは、どの位置で生じていても良い。一部の実施形態では、ピリミジン核酸塩基の2位、5位、および6位を、コンジュゲート部分と置換することができる。ヌクレオシドの糖部分に対するコンジュゲーションは、どの炭素原子で生じていても良い。コンジュゲート部分に結合することができる糖部分の炭素原子の例には、2'、3'、および5'炭素原子が挙げられる。1'位も、コンジュゲート部分、例えば、脱塩基残基に結合することができる。ヌクレオシド間結合も、コンジュゲート部分を保持することができる。リン含有結合（例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート（*phosphorodithioate*）、およびホスホロアミデートなど）の場合、コンジュゲート部分は、リン原子に直接結合する、またはリン原子に結合しているO、N、またはS原子に結合することができる。アミンまたはアミドを含有するヌクレオシド間結合（例えば、PNA）の場合、コンジュゲート部分は、アミンまたはアミドの窒素原子に、または隣接する炭素原子に結合することができる。

20

30

【0235】

RNA干渉の分野におけるあらゆる適切なリガンドを使用することができるが、このようなリガンドは、典型的には、糖質、例えば、単糖（例えば、GalNAc）、二糖、三糖、四糖、多糖である。

【0236】

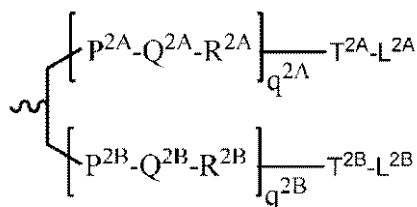
リガンドを核酸にコンジュゲートさせるリンカーは、上述のリンカーを含む。例えば、リガンドは、二価または三価の分岐リンカーによって付着された1つ以上のGalNAc（N-アセチルグルコサミン）誘導体であっても良い。

40

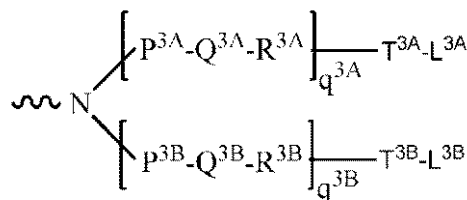
【0237】

一実施形態では、本発明のdsRNAは、次の式（V）～（VII）の何れかに示されている構造を含む二価および三価の分岐リンカーにコンジュゲートする：

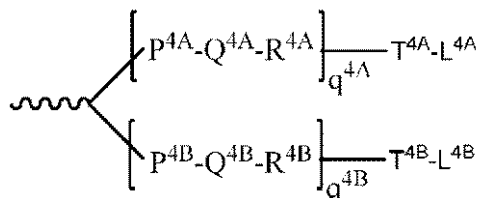
【化 5】



式 (IV)

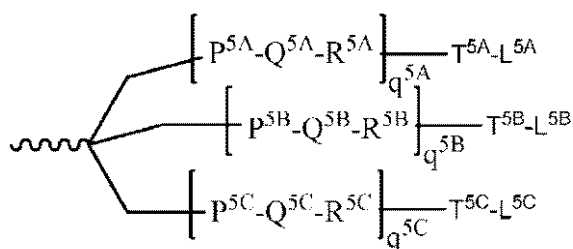


式 (V)



式 (VI)

, または



式 (VII)

式中、

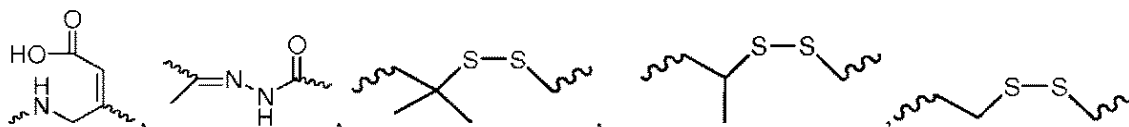
$q^{2\text{A}}$ 、 $q^{2\text{B}}$ 、 $q^{3\text{A}}$ 、 $q^{3\text{B}}$ 、 $q^{4\text{A}}$ 、 $q^{4\text{B}}$ 、 $q^{5\text{A}}$ 、 $q^{5\text{B}}$ 、および $q^{5\text{C}}$ は存在ごとに独立して、0~20を表し、反復単位は、同じであっても良いし、異なっても良く;

$P^{2\text{A}}$ 、 $P^{2\text{B}}$ 、 $P^{3\text{A}}$ 、 $P^{3\text{B}}$ 、 $P^{4\text{A}}$ 、 $P^{4\text{B}}$ 、 $P^{5\text{A}}$ 、 $P^{5\text{B}}$ 、 $P^{5\text{C}}$ 、 $T^{2\text{A}}$ 、 $T^{2\text{B}}$ 、 $T^{3\text{A}}$ 、 $T^{3\text{B}}$ 、 $T^{4\text{A}}$ 、 $T^{4\text{B}}$ 、 $T^{5\text{A}}$ 、 $T^{5\text{B}}$ 、 $T^{5\text{C}}$ はそれぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH、またはCH₂Oを表し;

$Q^{2\text{A}}$ 、 $Q^{2\text{B}}$ 、 $Q^{3\text{A}}$ 、 $Q^{3\text{B}}$ 、 $Q^{4\text{A}}$ 、 $Q^{4\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{A}}$ 、 $Q^{5\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{C}}$ は存在ごとに独立して、存在しないか、アルキレン、置換アルキレンを表し、1つ以上のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡C、またはC(O)の1つ以上によって中断または終了させることができ;

$R^{2\text{A}}$ 、 $R^{2\text{B}}$ 、 $R^{3\text{A}}$ 、 $R^{3\text{B}}$ 、 $R^{4\text{A}}$ 、 $R^{4\text{B}}$ 、 $R^{5\text{A}}$ 、 $R^{5\text{B}}$ 、 $R^{5\text{C}}$ はそれぞれ存在ごとに独立して、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、

【化 6】



、またはヘテロシクリルを表し;

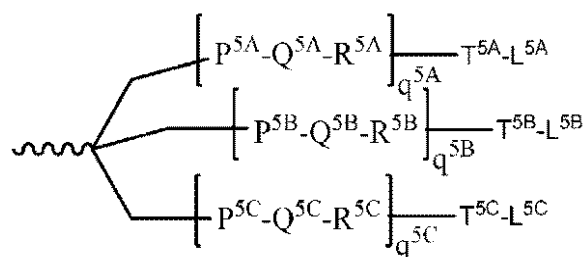
$L^{2\text{A}}$ 、 $L^{2\text{B}}$ 、 $L^{3\text{A}}$ 、 $L^{3\text{B}}$ 、 $L^{4\text{A}}$ 、 $L^{4\text{B}}$ 、 $L^{5\text{A}}$ 、 $L^{5\text{B}}$ 、および $L^{5\text{C}}$ は、リガンドを表す; 即ち、それぞれ存在ごとに独立して、単糖 (例えば、GalNAc)、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、または多糖を表し; かつ

R^a は、Hまたはアミノ酸側鎖である。

【0238】

三価コンジュゲート G a l N A c 誘導体、例えば、式 (V I I) のような誘導体は、標的遺伝子の発現を阻害するための R N A i 剤と共に使用すると特に有用である：

【化7】

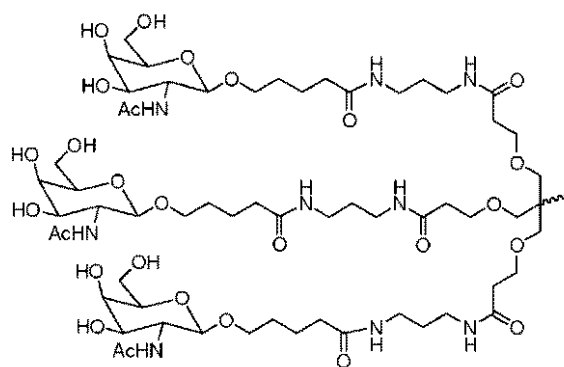


式 (VII)

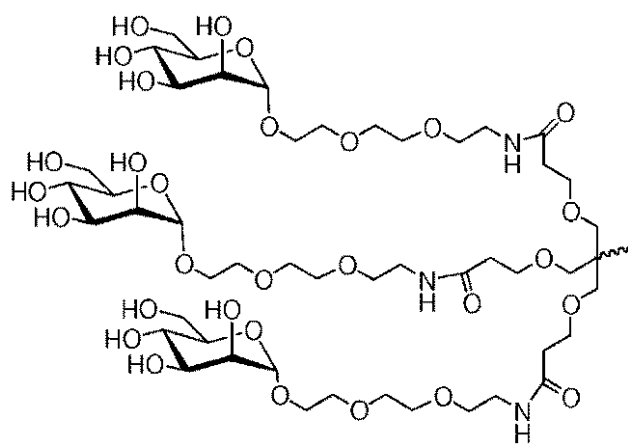
式中、L^{5A}、L^{5B}、およびL^{5C}は、単糖、例えば、G a l N A c 誘導体を表している。

適切な二価および三価分岐リンカー基コンジュゲート G a l N A c 誘導体は、限定されるものではないが、以下の化合物：

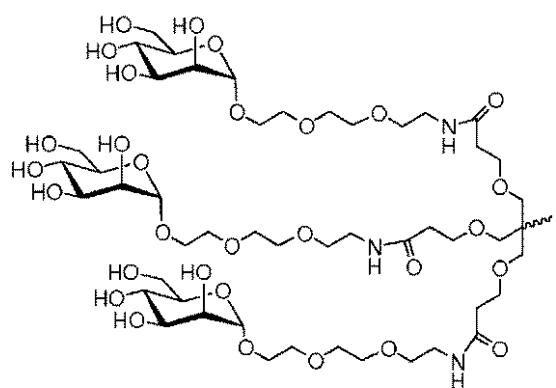
【化 8】



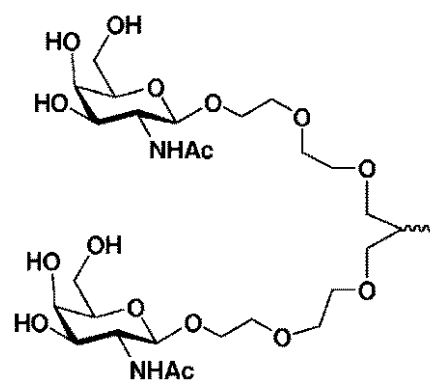
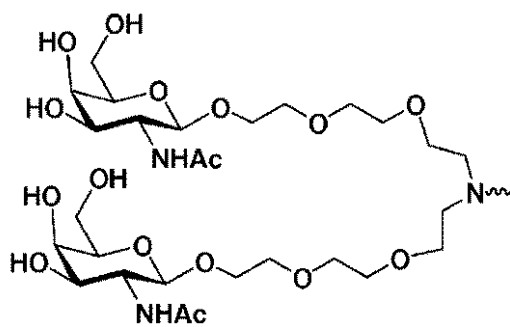
10



20

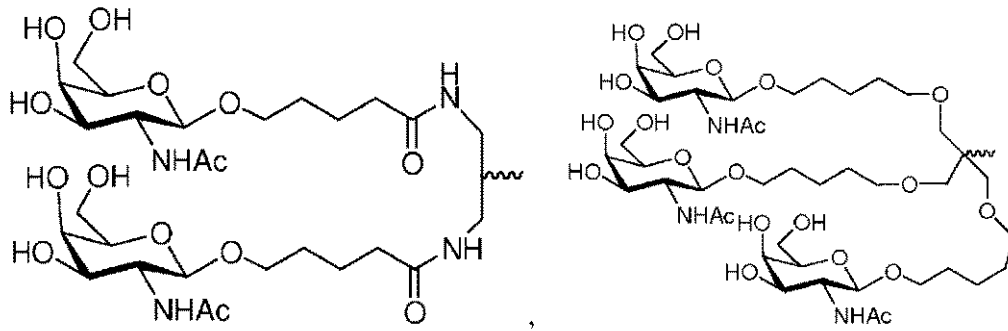


30

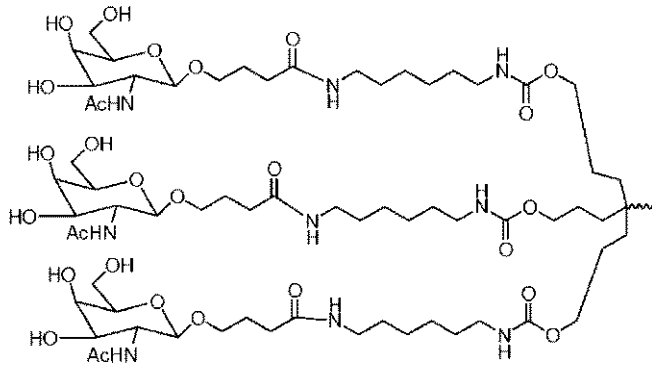


40

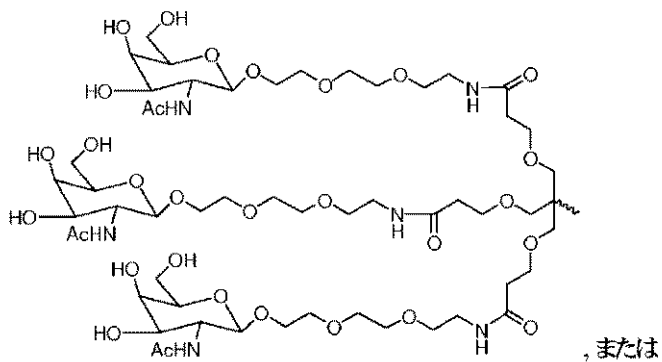
【化 9】



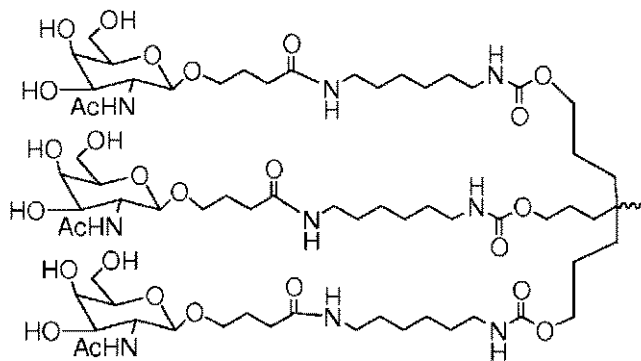
10



20



30



40

を含む。

【0239】

他の実施形態では、本発明のRNAi剤は、AD-45163、AD-45165、AD-51544、AD-51545、AD-51546、およびAD-51547からなる群から選択される作用剤である。

【0240】

III. 医薬組成物

50

本発明のRNAi剤は、他の医薬品との類似性によって、ヒトまたは動物用の薬物に使用される任意の便利な方法で投与するために製剤することができる。本発明のRNAi剤を含む医薬組成物は、例えば、緩衝剤を含むもしくは含まない溶液、または薬学的に許容される担体を含む組成物とすることができる。このような組成物としては、例えば、水溶性または結晶性組成物、リポソーム製剤、ミセル製剤、エマルジョン、および遺伝子治療ベクターが挙げられる。

【0241】

本発明の方法では、RNAi剤は、溶液に溶解して投与することができる。遊離RNAi剤を、非緩衝液、例えば、生理食塩水または水に溶解して投与することができる。あるいは、遊離siRNAは、適切な緩衝液に溶解して投与しても良い。緩衝液としては、酢酸塩、クエン酸塩、プロタミン、炭酸塩、リン酸塩、またはこれらの任意の組み合わせを挙げることができる。好ましい実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）である。RNAi剤を含む緩衝液のpHおよびオスモル濃度は、対象に投与するのに適するように調整することができる。

10

【0242】

一部の実施形態では、緩衝液は、オスモル濃度が、所望の値、例えば、ヒト血漿の生理値に維持されるように、溶液のオスモル濃度を制御するための作用剤をさらに含む。オスモル濃度を制御するために緩衝液に添加することができる溶質としては、限定されるものではないが、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、非代謝性ポリマー、ビタミン、イオン、糖、代謝産物、有機酸、脂質、または塩が挙げられる。一部の実施形態では、溶液のオスモル濃度を制御するための作用剤は塩である。特定の実施形態では、溶液のオスモル濃度を制御するための作用剤は、塩化ナトリウムまたは塩化カリウムである。

20

【0243】

他の実施形態では、RNAi剤は、1つ以上のRNAi剤および薬学的に許容される担体を含む組成物として製剤される。本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という語は、医薬品投与に適合したあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤、および吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質用のこのような媒体および作用剤の使用は、当分野で周知である。あらゆる従来の媒体または作用剤が活性化化合物と適合性でない場合を除き、その組成物中での使用が想定される。補助活性化化合物を組成物に含めても良い。

30

【0244】

一実施形態では、RNAi剤調製物は、少なくとも第2の治療剤（例えば、RNAまたはDNA以外の作用剤）を含む。例えば、TTR関連疾患、例えば、トランスサイレチン関連遺伝性アミロイドーシス（家族性アミロイド多発神経障害（FAP））の治療用のRNAi剤組成物としては、FAPの改善用の公知の薬物、例えば、タファミディス（INN、またはFxr-1006AもしくはVyndaqel）を挙げることができる。

【0245】

製剤RNAi剤組成物は、様々な状態をとり得る。一部の例では、この組成物は、少なくとも部分的に結晶、均一に結晶、および／または無水（例えば、80%未満、50%未満、30%未満、20%未満、または10%未満の水を含む）である。別の例では、RNAi剤は、水相、例えば、水分を含む溶液に溶解される。

40

【0246】

水相および結晶性組成物は、送達ビヒクル、例えば、リポソーム（特に水相の場合）または粒子（例えば、結晶性組成物に適切であり得る微粒子）に含めることができる。一般に、RNAi剤組成物は、本明細書に記載される意図する投与法に適合するように製剤される。例えば、特定の実施形態では、この組成物は、少なくとも1つの次の方法によって調製される：噴霧乾燥、凍結乾燥、真空乾燥、蒸発、流動床乾燥、もしくはこれらの技術の組み合わせ；または脂質を用いた超音波処理、フリーズドライ、凝縮、および他の自己集合。

【0247】

50

RNAi 剤調製物は、別の作用剤、例えば、別の治療剤、または RNAi 剤を安定させる作用剤、例えば、RNAi 剤と複合体を形成して iRNP を形成するタンパク質と組み合わせることで調製することができる。なお他の作用剤としては、キレート剤、例えば、EDTA（例えば、二価のカチオン、例えば、 Mg^{2+} を除去するための）、塩、および RNA 分解酵素阻害剤（例えば、特異性の広い RNA 分解酵素阻害剤、例えば、RNAsin）などが挙げられる。

【0248】

一実施形態では、RNAi 剤調製物は、別の siRNA 化合物、例えば、第 2 の遺伝子または同じ遺伝子に対して RNAi を媒介することができる第 2 の RNAi 剤を含む。なお他の調製物は、少なくとも 3、5、10、20、50、または 100 以上の異なる RNAi 遺伝子種を含み得る。このような RNAi 剤は、同様の数の異なる遺伝子に対して RNAi を媒介することができる。

10

【0249】

本発明の iRNA 剤は、医薬用途用に調製することができる。薬学的に許容される組成物は、単独で、あるいは 1 種以上の薬学的に許容される担体（添加剤）、賦形剤、および／または希釈剤と共に調製される、前述の実施形態の何れかの 1 種以上の dsRNA 剤を、治療効果または予防有効量、含む。

【0250】

本発明の医薬組成物を調製する方法は、本発明の RNAi 剤を担体、および任意選択で 1 種以上の補助成分と結合させるステップを含む。一般に、この組成物は、本発明の RNAi 剤を液体担体、細かく分割された固体担体、または両方を均一に密着させて結合させ、次いで、必要に応じて製品を成形することによって調製する。

20

【0251】

医薬組成物は、以下のように適合された投与を含め、固体または液体の形態で投与されるように特別に調製することができる：（1）例えば、水薬（水性もしくは非水性溶液、または懸濁液）、錠剤、例えば、頬側、舌下、および体内吸収用の錠剤、ボラス、粉末、顆粒、舌に適用するためのペーストの経口投与；（2）例えば、滅菌液もしくは懸濁液、または徐放製剤として、例えば、皮下注射、筋肉注射、静脈注射、もしくは硬膜外注射による非経口投与；（3）例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏、または放出制御パッチもしくはスプレーとしての局所適用；（4）例えば、ペッサリー、クリーム、フォームとして腔内または直腸内投与；（5）舌下投与；（6）眼内投与；（7）経皮的投与；あるいは（8）鼻内投与。皮下または点滴法を用いる送達は、特に有利であり得る。

30

【0252】

「薬学的に許容される」という句は、本明細書では、妥当な効果／リスク比に見合った、過度な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題や合併症が発生することなく、ヒトおよび動物の組織に接触させるのに適した、正当な医学的判断の範囲内である化合物、材料、組成物、および／または剤形を指すために利用される。

【0253】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という句は、目的の化合物をある器官または体の一部から別の器官または体の一部への運搬または輸送に関与する薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクル、例えば、液体もしくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造補助剤（例えば、潤滑剤、タルク、マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、もしくはステアリン酸（stearic acid））、もしくは材料を被包する溶媒を意味する。各担体は、組成物の他成分と適合性であって、患者に有害でないという点で「許容可能」ではなければならない。薬学的に許容される担体として役立つ材料の一部の例として：（1）糖、例えば、ラクトース、グルコース、およびスクロース；（2）デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン；（3）セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロース；（4）粉末トラガcant；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）平滑剤、例えば、マグネシウムステート（magnesium st

40

50

a t e)、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルク；(8) 賦形剤、例えば、ココアバターおよび座薬ワックス；(9) 油、例えば、ピーナッツ油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油；(10) グリコール、例えば、ポリエチレングリコール；(11) ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール；(12) エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；(13) 寒天；(14) 緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；(15) アルギン酸；(16) パイロジェンフリー水；(17) 等張食塩水；(18) リンガー液；(19) エチルアルコール；(20) pH緩衝液；(21) ポリエステル、ポリカーボネート、および／またはポリ無水物；(22) 充填剤、例えば、ポリペプチドおよびアミノ酸；(23) 血清成分、例えば、血清アルブミン、HDL、およびLDL；ならびに(22) 医薬組成物に利用される他の無毒適合物質が挙げられる。

10

【0254】

この組成物は、ユニット剤形で便利に提供することができ、薬学の分野で周知の任意の方法で調製することができる。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができるRNAi剤の量は、治療を受ける者および投与の特定の方式によって異なる。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができるRNAi剤の量は、一般に、所望の効果、例えば、治療効果または予防効果が得られる量である。一般に、100%のうち、この量は、RNAi剤の約0.1%～約99%、好ましくは約5%～約70%、最も好ましくは約10%～約30%の範囲である。

20

【0255】

特定の実施形態では、本発明の組成物としては、シクロデキストリン、セルロース、リポソーム、ミセル形成剤、例えば、胆汁酸、およびポリマー担体、例えば、ポリエステルおよびポリ無水物；および本発明のRNAi剤からなる群から選択される賦形剤が挙げられる。特定の実施形態では、上述の組成物は、本発明のRNAi剤を経口投与可能にする。

【0256】

場合によっては、RNAi剤の効果を持続させるために、皮下注射または筋肉注射によるRNAi剤の吸収を遅延させることが望ましい。これは、水に溶けにくい結晶または非晶質材料の液体懸濁液の使用によって達成することができる。次に、RNAi剤の吸収速度は、結晶のサイズおよび結晶の形態に依存し得る溶解速度によって決まる。あるいは、非経口投与されるRNAi剤の遅延吸収は、油性ビヒクル中にRNAi剤を溶解または懸濁することによって達成することができる。

30

【0257】

リポソーム

本発明のRNAi剤は、膜分子集合体、例えば、リポソームまたはミセルで送達するために製剤することができる。本明細書で使用される「リポソーム」という語は、少なくとも1つの二重層、例えば、1つの二重層または複数の二重層で構成された両親媒性脂質からなる小胞を指す。リポソームは、親油性材料および水性内部から形成される膜を有する単層小胞および多層小胞を含む。水性部分は、RNAi剤組成物を含む。親油性材料は、水性内部を水性外部から隔離し、この水性外部は、典型的にはRNAi剤組成物を含まないが、一部の例では含むこともある。リポソームは、活性成分の作用部位への移送および送達に有用である。リポソーム膜は、生体膜に構造的に類似しているため、リポソームが組織に接触すると、リポソーム二重層が、細胞膜の二重層と融合する。リポソームと細胞との一体化が進むと、RNAi剤を含む内部水性成分が、細胞内に送達され、そこで、RNAi剤は、標的RNAに特異的に結合して、RNAiを媒介することができる。場合によって、リポソームは、特異的に標的化され、例えば、RNAi剤を特定の細胞型に誘導する。

40

【0258】

RNAi剤を含むリポソームは、様々な方法で調製することができる。一例では、リポ

50

ソームの脂質成分は、洗剤に溶解され、これにより、ミセルが脂質成分で形成される。例えば、脂質成分は、両親媒性カチオン脂質または脂質コンジュゲートとすることができる。洗剤は、高い臨界ミセル濃度を有することができ、非イオン性であり得る。例示的な洗剤としては、コール酸塩、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸塩、およびラウロイルサルコシンが挙げられる。次いで、RNAi剤調製物が、脂質成分を含むミセルに添加される。脂質上のカチオン基が、RNAi剤と相互作用して、RNAi剤の周りに凝縮してリポソームを形成する。凝縮後、洗剤が、例えば、透析によって除去され、RNAi剤のリポソーム調製物が得られる。

【0259】

必要に応じて、凝縮を補助する担体化合物を、例えば、制御された添加によって、凝縮反応中に添加することができる。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマー（例えば、スベルミンまたはスベルミジン）とすることができる。pHを、凝縮に適するように調整することもできる。

【0260】

送達ビヒクルの構造成分としてポリヌクレオチド／カチオン脂質複合体を包含する安定なポリヌクレオチド送達ビヒクルを形成するための方法が、参照によりその全開示内容が本明細書に組み入れられる国際公開第96／37194号パンフレットにさらに記載されている。リポソームの形成は、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84:7413-7417, 1987; 米国特許第4,897,355号明細書; 同第5,171,678号明細書; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; および Fukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984に記載されている例示的な方法の1つ以上の態様も含み得る。送達ビヒクルとして使用するのに適切なサイズの脂質凝集体を調製するために一般的に使用される技術は、超音波処理および凍結融解と押し出しを含む（例えば、Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986を参照されたい）。一貫して小さく（50～200nm）比較的均一な凝集体が望ましい場合は、微小流動化を使用することができる（Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984）。このような方法は、RNAi剤調製物をリポソームの中にパッケージングするために容易に適合される。

【0261】

pH感受性または負に帯電したリポソームは、核酸分子と複合体を形成するのではなく、核酸分子を取り込む。核酸分子および脂質の両方が同様に帯電しているため、複合体が形成されるのではなく反発が起きる。とは言え、一部の核酸分子は、これらのリポソームの水性内部内に取り込まれる。pH感受性リポソームは、チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養中の細胞単層に送達するために使用される。外来遺伝子の発現が標的細胞で検出された（Zhou et al., Journal of Controlled Release, 19, (1992) 269-274）。

【0262】

1つの重要な種類のリポソーム組成物は、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。中性リポソーム組成物は、例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（DMPC）またはジパルミチルホスファチジルコリン（DPPC）から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は、一般に、ジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成され、アニオン性融合性リポソームは、主として、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン（DOPC）から形成される。別の種類のリポソーム組成物は、ホスファチジルコリン（PC）、例えば、大豆PCおよび卵PCなどから形成される。別

の種類は、リン脂質および／またはホスファチジルコリンおよび／またはコレステロールの混合物から形成される。

【0263】

リポソームを *in vitro* および *in vivo* で細胞に導入する他の方法の例として、米国特許第 5, 283, 185 号明細書；同第 5, 171, 678 号明細書；国際公開第 94/00569 号パンフレット；同第 93/24640 号パンフレット；同第 91/16024 号パンフレット；Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994；Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993；Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992；Gershon, Biochem. 32:7143, 1993；および Strauss EMBO J. 11:417, 1992 が挙げられる。

10

【0264】

一実施形態では、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームは、細胞膜に融合できるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、効率的には原形質膜と効率的に融合することができないが、*in vivo* でマクロファージによって取り込まれるため、RNAi 剤をマクロファージに送達するために使用することができる。

【0265】

リポソームのさらなる利点としては：天然リン脂質から得られるリポソームが、生体適合性かつ生体分解性であること；リポソームが、種々の水溶性および脂溶性薬物を取り込むことができること；リポソームが、内部区画内に取り込まれた RNAi 剤を代謝および分解から保護できること (Rosoff, in "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger および Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245) が挙げられる。リポソーム製剤の調製における重要な考慮すべき事項は、脂質表面の電荷、小胞サイズ、およびリポソームの水中体積である。

20

【0266】

正に帯電した合成カチオン性脂質、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド (DOTMA) を使用して、核酸と自然に相互作用して脂質-核酸複合体を形成する小型リポソームを形成することができ、この脂質-核酸複合体は、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合し、結果として RNAi 剤を送達することができる (例えば、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987、ならびに DOTMA およびその DNA との使用が記載されている米国特許第 4, 897, 355 号明細書を参照されたい)。

30

【0267】

DOTMA 類似体、1,2-ビス (オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニア)プロパン (DOTAP) をリン脂質と組み合わせて使用して、DNA と複合体を形成する小胞を形成することができる。Lipofectin (商標) Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) は、高度にアニオン性の核酸を生きた組織培養細胞に送達するための有効な作用剤であり、この組織培養細胞は、負に帯電したポリヌクレオチドと自然に相互作用して複合体を形成する正に帯電した DOTMA リポソームを含む。十分に正に帯電したリポソームが使用されると、得られる複合体の正味荷電も正である。このように調製される正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自然に付着し、原形質膜に融合し、そして機能性核酸を、例えば、組織培養細胞に有効に送達する。別の市販のカチオン性脂質、1,2-ビス (オレオイルオキシ)-3,3-(トリメチルアンモニア)プロパン (「DOTAP」) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) は、オレオイル部分が、エーテル結合ではなくエステルによって結合されているという点で DOTMA とは異なる。

40

【0268】

50

他の報告されているカチオン性脂質化合物は、例えば、2種類のうちの1種類の脂質にコンジュゲートして、化合物、例えば、5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタオレオイルアミド（「DOGS」）（Transfectam（商標）、Promega, Madison, Wisconsin）およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスベルミルアミド（「DPPEs」）を含むカルボキシスベルミンを含め、様々な部分にコンジュゲートしたものを含む（例えば、米国特許第5, 171, 678号明細書を参照されたい）。

【0269】

別のカチオン性脂質コンジュゲートは、DOPEと組み合わせてリポソーム内に含まれて製剤されたコレステロール（「DC-Chol」）による脂質の誘導体を含む（Ga 10
o, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991を参照されたい）。ポリリシンをDOPEにコンジュゲートさせることによって形成されたリポポリリジンは、血清の存在下でのトランスフェクションに有効であることが報告されている（Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991）。特定の細胞株では、コンジュゲートカチオン性脂質を含むこのようなリポソームは、DOTMA含有組成物よりも低い毒性を示し、かつより効率的なトランスフェクションを実現されている。他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIEおよびDMRIE-HP（Vical, La Jolla, California）およびLipofectamine（DOSPA）（Life Technology, Inc., Gaithersburg, 20
Maryland）が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に適した他のカチオン性脂質は、国際公開第98/39359号明細書および同第96/37194号明細書に記載されている。

【0270】

リポソーム製剤は、局所投与に特に適しており、リポソームには、他の製剤よりもいくつかの利点が存在する。このような利点は、投与された薬物の高い全身吸収に関連した副作用の低下、所望の標的における投与された薬物の蓄積の増加、およびRNAi剤を皮膚に投与する能力が挙げられる。一部の実施では、リポソームは、RNAi剤を上皮細胞に送達するために、そしてRNAi剤の皮膚組織、例えば、皮膚への浸透を促進するためにも使用される。例えば、リポソームは、局所的に適用することができる。リポソームとして製剤された薬物の皮膚への局所送達の実証されている（例えば、Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, vol. 2, 405-410 and du Plessis et al., Antiviral Research, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., Biotechniques 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. Gene 56:267-276. 1987; Nicolau, C. et al. Meth. Enz. 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. Meth. Enz. 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:78 40
51-7855, 1987を参照されたい）。

【0271】

非イオン性リポソーム系もまた、特に、非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含む系において、薬物の皮膚への送達における実用性を決定するために試験された。Novasome I（ジラウリル酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル）およびNovasome II（ジステアリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル）を含む非イオン性リポソーム製剤が、マウスの皮膚の真皮に薬物を送達するために使用された。RNAi剤を含むこのような製剤は、皮膚障害を治療するのに有用である。

【0272】

RNAi 剤を含むリポソームは、高度に変形可能に形成することができる。このような変形性は、リポソームの平均半径よりも小さい孔にリポソームが進入するのを可能にし得る。例えば、トランスファーソームは、変形可能なリポソームの 1 種である。トランスファーソームは、表面縁活性化因子、通常は界面活性剤を標準的なリポソーム組成物に添加することによって作製することができる。RNAi 剤を含むトランスファーソームは、RNAi 剤を皮膚内のケラチノサイトに送達するために、例えば、皮下注射によって送達することができる。無傷の哺乳動物の皮膚を通過するためには、脂質小胞は、適当な経皮勾配の影響下で、直径がそれぞれ 50 nm 未満の一連の微孔を通して通過しなければならない。加えて、脂質の特性により、このようなトランスファーソームは、自己最適化性（例えば、皮膚の孔の形状に適応すること）、自己修復性であり得ると共に、多くの場合、断片化されずに標的に到達することができ、しばしば自己負荷性（self-loading）であり得る。

10

【0273】

本発明に適用可能な他の製剤は、2008 年 1 月 2 日出願の米国仮特許出願第 61/018,616 号明細書；2008 年 1 月 2 日出願の同第 61/018,611 号明細書；2008 年 3 月 26 日出願の同第 61/039,748 号明細書；2008 年 4 月 22 日出願の同第 61/047,087 号明細書；および 2008 年 5 月 8 日出願の同第 61/051,528 号明細書に記載されている。2007 年 10 月 3 日出願の国際出願 PCT/US2007/080331 号パンフレットにも、本発明に適用可能な製剤が記載されている。

20

【0274】

界面活性剤

界面活性剤は、製剤、例えば、エマルション（マイクロエマルションを含む）およびリポソーム（上記）において幅広い用途が見出されている。RNAi 剤（または前駆体、例えば、プロセシングして siRNA にすることができるより大きな dsRNA、または siRNA もしくは前駆体をコードする DNA）組成物は、界面活性剤を含み得る。一実施形態では、siRNA は、界面活性剤を含むエマルションとして製剤される。多数の異なる種類の天然および合成の両方の界面活性剤の特性を分類およびランク付けする最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス（HLB）の使用によるものである。親水性基の性質は、製剤に使用される異なる界面活性剤を分類するための最も有用な手段となる（Rieger, in “Pharmaceutical Dosage Forms,” Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285）。

30

【0275】

界面活性剤分子がイオン化されない場合、この界面活性剤分子は、非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は、薬学的製品において幅広い用途が見出されており、広範囲の pH 値に対して使用可能である。一般に、これらの HLB 値は、その構造によって 2 ～ 約 18 の範囲である。非イオン性界面活性剤としては、非イオン性エステル、例えば、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、およびエトキシ化エステルが挙げられる。非イオン性アルカノールアミドおよびエーテル、例えば、脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール、およびエトキシ化／プロポキシ化ブロックポリマーもこのクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤クラスのうち最も一般的なメンバーである。

40

【0276】

界面活性剤分子が、水に溶解または分散されたときに負の電荷を有する場合、この界面活性剤分子は、アニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤としては、カルボン酸塩、例えば、石鹸、アシル乳酸塩、アミノ酸のアシルアミド、硫酸のエステル、例えば、硫酸アルキルおよび硫酸エトキシ化アルキル、スルホン酸塩、例えば、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アシルイセチオン酸塩、アシルタウレート、およびスルホコハク酸塩

50

、ならびにリン酸塩が挙げられる。アニオン性界面活性剤クラスのうち最も重要なメンバーは、硫酸アルキルおよび石鹸である。

【0277】

界面活性剤分子が、水に溶解または分散されたときに正の電荷を有する場合、この界面活性剤分子は、カチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤としては、四級アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが挙げられる。四級アンモニウム塩は、このクラスのうちで最も使用されるメンバーである。

【0278】

界面活性剤分子が、正または負のいずれの電荷も有する能力がある場合、この界面活性剤分子は、両性として分類される。両性界面活性剤としては、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタイン、およびホスファチドが挙げられる。

10

【0279】

薬物製品、製剤、およびエマルションにおける界面活性剤の使用が概説されている (Rieger, in "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285)。

【0280】

ミセルおよび他の膜状製剤

本発明のRNAi剤は、ミセル製剤としても提供することができる。「ミセル」は、本明細書では、特定の種類の分子集合体として定義され、この分子集合体では、両親媒性分子の全ての疎水性部分が内側を向き、親水性部分が周囲の水相に接触するように両親媒性分子が球体構造に構成されている。環境が疎水性である場合は、反対の構成で存在する。

20

【0281】

経皮膜を通る送達に適した混合ミセル製剤は、siRNA組成物の水溶液とアルカリ金属C₈~C₂₂アルキル硫酸塩とミセル形成化合物との混合によって調製することができる。例示的なミセル形成化合物としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容される塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレエート、モノラウレート、ルリヂサ油、月見草油、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシンおよびその薬学的に許容される塩、グリセリン、ポリグリセリン、リジン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテルおよびその類似体、ポリドカノールアルキルエーテルおよびその類似体、ケノデオキシコール酸塩、デオキシコール酸塩、およびこれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属アルキル硫酸塩と同時にまたは添加後に、添加することができる。混合ミセルは、実質的にあらゆる種類の成分の混合で形成されるが、より小さいサイズのミセルを提供するためには激しい混合が行われる。

30

【0282】

一方法では、siRNA組成物および少なくともアルカリ金属アルキル硫酸塩を含有する第1のミセル組成物が調製される。次いで、第1のミセル組成物が、少なくとも3種類のミセル形成化合物と混合されて混合ミセル組成物が形成される。別の方法では、ミセル組成物は、siRNA組成物とアルカリ金属アルキル硫酸塩と少なくとも1種類のミセル形成化合物と混合され、次いで、残りのミセル形成化合物を添加して激しく混合することによって調製される。

40

【0283】

フェノールおよび／またはm-クレゾールを混合ミセル組成物に添加して、製剤を安定させて、細菌の増殖から保護することができる。あるいは、フェノールおよび／またはm-クレゾールは、ミセル形成成分と共に添加しても良い。等張剤、例えば、グリセリンを、混合ミセル組成物の形成後に添加しても良い。

【0284】

ミセル製剤を噴霧として送達するために、製剤をエアロゾルディスペンサーに入れることができ、このディスペンサーに噴霧剤を充填する。加圧下の噴霧剤は、ディスペンサー

50

内で液体の形態である。水相と噴霧剤相とが1つになる、即ち、1つの相のみが存在するように、成分比が調整される。2つの相が存在する場合、内容物の一部を、例えば、計量弁によってディスペンスする前にディスペンサーを振盪する必要がある。医薬品のディスペンス量が、計量弁から微細な霧状で噴霧される。

【0285】

噴霧剤としては、水素含有クロロフルオロカーボン、水素含有フルオロカーボン、ジメチルエーテル、およびジエチルエーテルを挙げることができる。特定の実施形態では、HFA 134a (1, 1, 1, 2テトラフルオロエタン) を使用しても良い。

【0286】

必須成分の特定濃度を、比較的簡単な実験によって決定することができる。口腔からの吸収では、多くの場合、注射による投与または胃腸管を介した投与の投与量を、例えば、少なくとも2倍または3倍に増量するのが望ましい。

【0287】

粒子

別の実施形態では、本発明のRNAi剤は、粒子、例えば、微粒子の中に含めることができる。微粒子は、噴霧乾燥によって製造することができるが、凍結乾燥、蒸発、流動床乾燥、真空乾燥、またはこれらの技術の組み合わせを含む他の方法によって製造しても良い。

【0288】

IV. TTR発現を阻害するための方法

本発明は、細胞におけるトランスサイレチン(TTR)の発現を阻害するための方法も提供する。この方法は、細胞におけるTTRの発現を阻害するのに有効な量のRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を細胞に接触させて、細胞におけるTTRの発現を阻害するステップを含む。

【0289】

細胞にRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を接触させるステップは、*in vitro*または*in vivo*で行うことができる。*in vivo*の細胞をRNAi剤に接触させるステップは、対象、例えば、ヒト対象の体内の細胞または細胞群にRNAi剤を接触させるステップを含む。細胞を接触させる*in vitro*法と*in vivo*法の組み合わせも可能である。細胞を接触させるステップは、上述のように、直接的でも間接的でも良い。さらに、細胞を接触させるステップは、本明細書に記載される、または当分野で公知のあらゆるリガンドを含む標的化リガンドを介して達成することができる。好ましい実施形態では、標的化リガンドは、糖質部分、例えば、GalNAc₃リガンド、またはRNAi剤を目的の部位、例えば、対象の肝臓に誘導する任意の他のリガンドである。

【0290】

本明細書で使用される「阻害する」という語は、「低減する」、「サイレンシングする」、「下方制御する」、「抑制する」、および他の同様の語と互換的に使用され、あらゆるレベルの阻害を含む。

【0291】

「TTRの発現を阻害する」という句は、あらゆるTTR遺伝子(例えば、マウスTTR遺伝子、ラットTTR遺伝子、サルTTR遺伝子、またはヒトTTR遺伝子)およびTTR遺伝子の変異体または突然変異体の発現の阻害を指すものとする。従って、TTR遺伝子は、野生型TTR遺伝子、突然変異TTR遺伝子(例えば、全身性アミロイド沈着をもたらす突然変異TTR遺伝子)、または遺伝子操作された細胞、細胞群、もしくは生物の文脈における遺伝子組換えTTR遺伝子であっても良い。

【0292】

「TTR遺伝子の発現を阻害する」は、TTR遺伝子の任意のレベルの阻害、例えば、TTR遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を含む。TTR遺伝子の発現は、TTR遺伝子の発現に関連した任意の変数のレベル、例えば、TTR mRNAのレベル、TTR

10

20

30

40

50

タンパク質のレベル、またはアミロイド沈着の数もしくは範囲に基づいて評価することができる。このレベルは、例えば、対象に由来するサンプルを含む個々の細胞または細胞群で評価することができる。

【0293】

阻害は、T T R の発現に関連した1つ以上の変数のコントロールレベルに対する絶対または相対レベルの低下によって評価することができる。コントロールレベルは、当分野で利用されるあらゆる種類のコントロールレベル、例えば、投薬前基準レベル、または未処置もしくはコントロール（例えば、緩衝液のみのコントロールまたは不活性剤のコントロール）で処置された類似の対象、細胞、もしくはサンプルから決定されるレベルであっても良い。

10

【0294】

本発明の方法の一部の実施形態では、T T R 遺伝子の発現は、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%阻害される。

【0295】

20

T T R 遺伝子の発現の阻害は、第1の細胞または細胞群（このような細胞は、例えば、対象に由来するサンプル中に存在し得る）によって発現されるm R N A の量の減少によって示すことができる。この第1の細胞または細胞群は、T T R 遺伝子が記述され、かつT T R 遺伝子の発現が、第1の細胞または細胞群と実質的に同一であるが処置されていない第2の細胞または細胞群（コントロール細胞（複数可））と比較して阻害されるように処置されている（例えば、1つまたは複数の細胞に本発明のR N A i 剤を接触させることによって、または本発明のR N A i 剤を、この細胞が存在する、もしくは存在した対象に投与することによって）。好ましい実施形態では、この阻害は、以下の式を用いて、コントロール細胞におけるm R N A のレベルのパーセンテージとして、処置された細胞におけるm R N A のレベルを表すことによって評価される：

30

【数1】

$$\frac{(\text{コントロール細胞におけるmRNA}) - (\text{処置細胞におけるmRNA})}{(\text{コントロール細胞におけるmRNA})} \cdot 100\%$$

【0296】

あるいは、T T R 遺伝子の発現の阻害は、T T R 遺伝子の発現に機能的に関連したパラメーター、例えば、T T R タンパク質の発現、レチノール結合タンパク質のレベル、ビタミンAのレベル、またはT T R を含むアミロイド沈着の存在の減少の観点から評価することができる。T T R 遺伝子のサイレンシングは、当分野で公知の任意のアッセイによって、構成的にまたはゲノム工学によってT T R を発現するあらゆる細胞で決定することができる。肝臓は、T T R の発現の主な部位である。発現の他の顕著な部位としては、脈絡叢、網膜、および脾臓が挙げられる。

40

【0297】

T T R タンパク質の発現の阻害は、細胞または細胞群によって発現されるT T R タンパク質のレベル（例えば、対象に由来するサンプルで発現されるタンパク質のレベル）の低下によって示すことができる。m R N A の抑制の評価について上記説明されたように、処置された細胞または細胞群におけるタンパク質の発現レベルの阻害は、コントロール細胞またはコントロール細胞群におけるタンパク質のレベルのパーセンテージとして同様に表すことができる。

【0298】

50

T T R 遺伝子の発現の阻害を評価するために使用できるコントロール細胞またはコントロール細胞群は、本発明のRNA i 剤に接触されていない細胞または細胞群を含む。例えば、コントロール細胞またはコントロール細胞群は、対象がRNA i 剤で処置される前の個々の対象（例えば、ヒトまたは動物対象）に由来し得る。

【0299】

細胞または細胞群によって発現されるT T R mRNAのレベル、または循環T T R mRNAのレベルを、mRNAの発現を評価するために当分野で公知の任意の方法を用いて決定することができる。一実施形態では、サンプルにおけるT T Rの発現レベルは、転写されたポリヌクレオチド、例えば、T T R 遺伝子のmRNA、またはその一部を検出することによって決定される。RNAは、RNA抽出技術、例えば、酸性フェノール／グアニジンイソチオシアネート抽出（RNAzol B； Biogenesis）、RNeasy RNA調製キット（Qiagen）、またはPAXgene（PreAnalytix, Switzerland）を用いて細胞から抽出することができる。リボ核酸ハイブリダイゼーションを利用する典型的なアッセイ形式としては、核ランオンアッセイ（nuclear run-on assay）、RT-PCR、RNA分解酵素保護アッセイ（Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035）、ノーザンブロット法、in situハイブリダイゼーション、およびマイクロアッセイ分析が挙げられる。循環T T R mRNAは、参照によりその全開示内容が本明細書に組み入れられる国際出願PCT/US2012/043584に記載されている方法を用いて検出することができる。

【0300】

一実施形態では、T T Rの発現レベルは、核酸プローブを用いて決定される。本明細書で使用される「プローブ」という語は、特定のT T Rに選択的に結合することができるあらゆる分子を指す。プローブは、当業者が合成しても良いし、または適切な生物学的標本に由来しても良い。プローブは、標識されるように特別にデザインしても良い。プローブとして利用することができる分子の例として、限定されるものではないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体、および有機分子が挙げられる。

【0301】

単離mRNAを、限定されるものではないが、サザン分析、ノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析、およびプローブアッセイを含むハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイに使用することができる。mRNAレベルの決定のための1つの方法では、単離mRNAを、T T R mRNAにハイブリダイズすることができる核酸分子（プローブ）に接触させる。一実施形態では、mRNAを、固体表面に固定し、例えば、単離mRNAをアガロースゲル上を移動させてmRNAをゲルから膜、例えば、ニトロセルロースに移すことによってプローブに接触させる。代替の実施形態では、プローブ（複数可）を固体表面に固定し、mRNAを、例えば、Affymetrix遺伝子チップアレイのプローブ（複数可）に接触させる。当業者であれば、T T R mRNAのレベルの決定に使用するために公知のmRNA検出方法を容易に適応させることができる。

【0302】

サンプルにおけるT T Rの発現レベルを決定するための代替の方法では、サンプルにおける、例えば、mRNAの核酸増幅および／または逆転写酵素（cDNAを調製するための）のプロセスが、例えば、RT-PCR（Mullis, 1987, 米国特許第4,683,202号明細書に記載されている実験の実施形態）、リガーゼ連鎖反応（Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193）、自立的配列複製（Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）、転写増幅システム（Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）、Q-Beta Replicase（Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197）、ローリングサークル複製（Lizardi et al., 米国特許第5,854,033号明細書）、

または任意の他の核酸増幅法によって行われ、続いて、当業者に周知の技術を用いて増幅された分子の検出が行われる。これらの検出スキームは、このような分子の存在数が非常に少ない場合は、核酸分子の検出に特に有用である。本発明の特定の態様では、T T Rの発現レベルは、定量蛍光R T - P C R（即ち、T a q M a n（商標）システム）によって決定される。

【0303】

T T R m R N Aの発現レベルは、膜ブロット（ハイブリダイゼーション分析に使用されるようなもの、例えば、ノーザン、サザン、およびドット）、またはマイクロウェル、サンプルチューブ、ゲル、ビーズ、もしくはファイバー（または結合した核酸を含む任意の固体支持体）を用いて監視することができる。参照により本明細書に組み入れられる、
10
米国特許第5, 770, 722号明細書、同第5, 874, 219号明細書、同第5, 744, 305号明細書、同第5, 677, 195号明細書、および同第5, 445, 934号明細書を参照されたい。T T Rの発現レベルの決定は、溶液中の核酸プローブを使用することも含み得る。

【0304】

好ましい実施形態では、m R N Aの発現レベルは、分岐D N A（b D N A）アッセイまたはリアルタイムP C R（q P C R）を用いて評価される。このような方法の使用は、本明細書に記載される実施例で説明され、例示される。

【0305】

T T Rタンパク質の発現レベルは、タンパク質レベルの測定用の当分野で公知の任意の方法を用いて決定することができる。このような方法としては、例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー（H P L C）、薄層クロマトグラフィー（T L C）、高拡散クロマトグラフィー、液体またはゲル沈降反応、吸光分光法、比色分析、分光学的定量法、フローサイトメトリー、免疫拡散法（一元または二重）、免疫電気泳動法、ウェスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ（R I A）、酵素結合免疫測定法（E L I S A）、免疫蛍光分析、および電気化学発光分析などが挙げられる。
20

【0306】

一部の実施形態では、本発明の方法の有効性は、アミロイドT T R沈着の減少の検出または監視によって監視することができる。本明細書で使用される、アミロイドT T R沈着の減少には、当分野で公知の任意の方法を用いて*i n v i t r o*または*i n v i v o*
30
で評価できる、対象の器官または領域内のT T R沈着のサイズ、数、または重症度におけるあらゆる軽減、またはT T R沈着の形成の予防もしくは低減が含まれる。例えば、アミロイド沈着を評価するいくつかの方法が、G e r t z, M. A. & R a j u k u m a r, S. V.（E d i t o r s）（2010）, *A m y l o i d o s i s : D i a g n o s i s a n d T r e a t m e n t*, New York: H u m a n a P r e s sに記載されている。アミロイド沈着を評価する方法としては、生化学分析、および視覚化されるアミロイド沈着の視覚的評価またはコンピュータ評価を挙げることができ、この視覚化は、例えば、免疫組織化学的染色、蛍光標識、光学顕微鏡検査、電子顕微鏡検査、蛍光顕微鏡検査、または他の種類の顕微鏡検査を用いて行われる。侵襲性または非侵襲性画像診断方式は、例えば、C T、P E T、もしくはN M R / M R I 画像診断を含め、アミロイド沈着
40
を評価するために利用することができる。

【0307】

本発明の方法は、限定されるものではないが、心臓、肝臓、脾臓、食道、胃、腸（回腸、十二指腸、および結腸）、脳、坐骨神経、後根神経節、腎臓、および網膜を含む体の様々な組織または器官におけるT T R沈着を減少させることができる。

【0308】

本明細書で使用される「サンプル」という語は、対象から単離される類似の液体、細胞、または組織、および対象の体内に存在する液体、細胞、または組織の採取物を指す。生体液の例としては、血液、血清および漿膜液、血漿、リンパ液、尿、脳脊髄液、唾液、および眼液などが挙げられる。組織サンプルとしては、組織、器官、または局所領域に由来
50

するサンプルを挙げることができる。例えば、サンプルは、特定の器官、器官の一部、またはこのような器官内の液体もしくは細胞に由来し得る。特定の実施形態では、サンプルは、肝臓（例えば、全肝、肝臓の特定の部分、または肝臓の特定の種類の細胞、例えば、肝細胞など）、網膜または網膜の一部（例えば、網膜色素上皮）、中枢神経系または中枢神経解の一部（例えば、脳室または脈絡叢）、あるいは脾臓または脾臓の特性の細胞もしくは一部に由来し得る。好ましい実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象から採取された血液または血漿を指す。さらなる実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象に由来する肝組織または網膜組織を指す。

【0309】

本発明の方法の一部の実施形態では、RNAi剤は、このRNAi剤が対象の体内の特定の部位に送達されるように対象に投与される。TTRの発現の阻害は、対象の体内の特定の部位からの液体または組織に由来するサンプルにおけるTTR mRNAまたはTTRタンパク質のレベルもしくはレベルの変化の測定を用いて評価することができる。好ましい実施形態では、この部位は、肝臓、脈絡叢、網膜、および脾臓からなる群から選択される。この部位は、前述の部位（例えば、肝細胞または網膜色素上皮）の何れか1つに由来する細胞の小区分または部分群であっても良い。この部位は、特定の種類の受容体を発現する細胞（例えば、アシアロ糖タンパク質受容体を発現する肝細胞）も含み得る。

【0310】

V. TTR関連疾患を治療または予防するための方法

本発明は、対象のTTR関連疾患を治療または予防するための方法も提供する。この方法は、治療有効量または予防有効量のRNAi剤を対象に投与するステップを含む。

【0311】

本明細書で使用される「対象」は、ヒトまたは非ヒト動物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物を含む。対象は、トランスジェニック生物を含み得る。最も好ましくは、対象は、ヒト、例えば、TTR関連疾患に罹患している、またはTTR関連疾患に罹患しやすいヒトである。

【0312】

一部の実施形態では、対象は、TTR関連疾患に罹患している。他の実施形態では、対象は、TTR関連疾患を発症するリスクのある対象、例えば、TTR関連疾患の発症に関連したTTR遺伝子突然変異を有する対象、TTR関連疾患の家族歴のある対象、またはTTRアミロイドーシスの発症を示す徴候または症状を有する対象である。

【0313】

本明細書で使用される「TTR関連疾患」には、原線維前駆体が変異型または野生型TTRタンパク質からなるアミロイド沈着の形成によって引き起こされるあらゆる疾患、またはこれに関連したあらゆる疾患が含まれる。突然変異型および野生型TTRは、様々な形態のアミロイド沈着（アミロイドーシス）を引き起こす。アミロイドーシスは、ミスフォールドタンパク質の形成および凝集を伴い、器官の機能を低下させる細胞外沈着をもたらす。TTR凝集に関連した臨床症候群（clinical syndrome）としては、例えば、老人性全身性アミロイドーシス（SSA）；家族性アミロイド多発神経障害（FAP）；家族性アミロイド心筋症（FAC）；および、軟髄膜もしくは髄膜の脳血管アミロイドーシス、中枢神経系（CNS）アミロイドーシス、またはアミロイドーシスVLI型としても知られている軟髄膜アミロイドーシスが挙げられる。

【0314】

本発明の方法の一部の実施形態では、本発明のRNAi剤は、家族性アミロイド心筋症（FAC）および老人性全身性アミロイドーシス（SSA）に罹患している対象に投与される。通常の配列のTTRは、高齢者に心アミロイドーシスを引き起こし、この心アミロイドーシスは、老人性全身性アミロイドーシス（SSA）（老人性心アミロイドーシス（SCA）または心アミロイドーシスとも呼ばれる）と呼ばれる。SSAは、しばしば、多くの他の器官における微細な沈着物を伴う。TTR突然変異は、TTRアミロイド形成の

プロセスを加速させ、臨床的に顕著なTTRアミロイドーシス(ATTR(アミロイドーシストランスサイレチン型))とも呼ばれる)の発症の最も重要な危険因子である。85を超えるアミロイド生成性TTR変異体は、全身性家族性アミロイドーシスを引き起こすことが知られている。

【0315】

本発明の方法の一部の実施形態では、本発明のRNAi剤は、トランスサイレチン(TTR)関連家族性アミロイド多発神経障害(FAP)に罹患している対象に投与される。このような対象は、眼の症状、例えば、硝子体混濁および緑内障に罹患し得る。網膜色素上皮(RPE)によって合成されたアミロイド生成性トランスサイレチン(ATTR)が、眼アミロイドーシスの進行において重要な役割を果たすことは、当業者には知られている。10
以前の研究が、レーザーによる凡網膜光凝固が、RPE細胞を減少させ、硝子体におけるアミロイド沈着の進行を防止することが示され、RPEにおけるATTRの発現の有効な抑制が、眼アミロイドーシスの新たな療法になり得ることを示唆している(例えば、Kawaji, T., et al., Ophthalmology, (2010) 117: 552-555を参照されたい)。本発明の方法は、TTR関連FAP、例えば、眼アミロイドーシスの眼の症状の治療に有用である。RNAi剤は、特定の組織、例えば、眼を標的とするのに適した方式で送達することができる。眼送達の方式としては、眼球後方、皮下眼瞼、結膜下、テノン嚢下、前房、または硝子体内の注射(または、内部注射もしくは注入)が挙げられる。眼送達専用の製剤としては、点眼薬または軟膏が挙げられる。

【0316】

別のTTR関連疾患は、「異常トランスサイレチン性高サイロキシン血症(dys transthyretinemic hyperthyroxinemia)」または「異常プレアルブミン性高サイロキシン血症(dysprealbuminemic hyperthyroxinemia)」としても知られている高サイロキシン血症である。このタイプの高サイロキシン血症は、サイロキシンに対して高い親和性を有する突然変異TTR分子によるサイロキシンとTTRとの結合の増加によって発症し得る。例えば、Moses et al. (1982) J. Clin. Invest., 86, 2025-2033を参照されたい。

【0317】

本発明のRNAi剤は、例えば、限定されるものではないが、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、眼内投与、気管支内投与、胸膜内投与、腹腔内投与、動脈内投与、リンパ管投与、脳脊髄投与、およびこれらの任意の組み合わせを含む、当分野で公知の任意の投与方式で投与することができる。好ましい実施形態では、RNAi剤は、皮下投与される。

【0318】

一部の実施形態では、投与は蓄積注射によって行われる。蓄積注射は、長期間に亘ってRNAi剤を一貫して放出することができる。従って、蓄積注射は、所望の効果、例えば、TTRの所望の阻害、または治療効果もしくは予防効果を得るために必要な投与の頻度を下げることができる。蓄積注射は、より一定の血清濃度を実現することもできる。蓄積注射としては、皮下注射または筋肉注射を挙げることができる。好ましい実施形態では、蓄積注射は、皮下注射である。

【0319】

一部の実施形態では、投与は、ポンプによって行われる。ポンプは、外部ポンプであっても良いし、または外科的に移植されたポンプであっても良い。特定の実施形態では、ポンプは、皮下移植された浸透圧ポンプである。他の実施形態では、ポンプは輸液ポンプである。輸液ポンプは、静脈内注射、皮下注射、動脈注射、または硬膜外注射に使用することができる。好ましい実施形態では、輸液ポンプは、皮下注入ポンプである。他の実施形態では、ポンプは、RNAi剤を肝臓に送達する、外科的に移植されたポンプである。

【0320】

他の投与方式としては、硬膜外投与、脳内投与、脳室内投与、経鼻投与、動脈内投与、心臓内投与、骨内注入、くも膜下腔投与、硝子体内投与、および肺内投与が挙げられる。

投与方式は、局所治療または全身治療が望ましいか、および治療される領域に基づいて選択することができる。投与の経路および部位は、標的化を向上させるために選択することができる。

【0321】

一部の実施形態では、RNAi剤は、対象の体内の細胞におけるTTRの発現を阻害するのに有効な量、対象に投与される。対象の体内の細胞におけるTTRの発現を阻害するのに有効な量は、TTR mRNA、TTRタンパク質、または関連変数、例えば、アミロイド沈着の阻害の評価を行う方法を含む上述の方法を用いて評価することができる。

【0322】

一部の実施形態では、RNAi剤は、治療有効量または予防有効量、対象に投与される。

10

【0323】

本明細書で使用される「治療有効量」は、TTR関連疾患を治療するために患者に投与されたときに、この疾患を治療する（例えば、既存の疾患または疾患の1つ以上の症状を軽減する、改善する、または維持する）のに十分なRNAi剤の量を含むものとする。「治療有効量」は、RNAi剤、RNAi剤が投与される方法、疾患およびその重症度と病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、TTR発現によって媒介される病的過程の段階、以前の治療または併用療法の種類（存在する場合）、および治療される患者の他の個人的な特徴によって異なり得る。

【0324】

20

本明細書で使用される「予防有効量」は、TTR関連疾患に罹患していない、またはその症状を示していないがこの疾患に罹患する可能性がある患者に投与されたときに、この疾患またはその1つ以上の症状を防止または改善するのに十分なRNAi剤の量を含むものとする。改善され得る症状としては、感覚性ニューロパシー（例えば、四肢遠位における錯感覚、感覚鈍麻）、自立性神経障害（例えば、胃腸障害、例えば、胃潰瘍、または起立性低血圧症）、運動神経障害、発作、痴呆、ミエロパシー、多発ニューロパシー、手根管症候群、自律神経不全、心筋症、硝子体混濁、腎不全、腎症、mBMI（修正肥満指数）の実質的な減少、脳神経障害、および格子状角膜変性症が挙げられる。この疾患を改善することは、疾患の進行を遅延させること、または後に発症する疾患の重症度を軽減することを含む。「予防有効量」は、RNAi剤、RNAi剤が投与される方法、疾患のリスクの程度、および病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、以前の治療または併用療法の種類（存在する場合）、および治療される患者の他の個人的な特徴によって異なり得る。

30

【0325】

「治療有効量」または「予防有効量」はまた、あらゆる治療に適用可能な妥当な効果／リスク比である程度の望ましい局所効果または全身効果が得られるRNAi剤の量も含む。本発明の方法に利用されるRNAi剤は、このような治療に適用可能な妥当な効果／リスク比が得られる十分な量を投与することができる。

【0326】

本明細書で使用される「治療有効量」および「予防有効量」という句はまた、TTRの発現によって媒介される病的過程または病的過程の症状（複数可）の治療、予防、または管理に恩恵を与える量も含む。TTRアミロイドーシスの症状としては、感覚性ニューロパシー（例えば、四肢遠位における錯感覚、感覚鈍麻）、自立性神経障害（例えば、胃腸障害、例えば、胃潰瘍、または起立性低血圧症）、運動神経障害、発作、痴呆、ミエロパシー、多発ニューロパシー、手根管症候群、自律神経不全、心筋症、硝子体混濁、腎不全、腎症、mBMI（修正肥満指数）の実質的な減少、脳神経障害、および格子状角膜変性症が挙げられる。

40

【0327】

対象に投与されるRNAi剤の用量は、特定の用量のリスクと恩恵のバランスをとるため、例えば、不所望の副作用を回避すると同時に、所望のレベルのTTR遺伝子の抑制（例えば、上記定義されたように、TTR mRNAの抑制、TTRタンパク質の発現、ま

50

たはアミロイド沈着の減少に基づいて評価される) または所望の治療効果もしくは予防効果を得るために調製することができる。

【0328】

一実施形態では、RNA i 剤は、約0.25mg/kg～約50mg/kgの用量、例えば、約0.25mg/kg～約0.5mg/kg、約0.25mg/kg～約1mg/kg、約0.25mg/kg～約5mg/kg、約0.25mg/kg～約10mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、約5mg/kg～約15mg/kg、約10mg/kg～約20mg/kg、約15mg/kg～約25mg/kg、約20mg/kg～約30mg/kg、約25mg/kg～約35mg/kg、または約40mg/kg～約50mg/kgの用量で投与される。

10

【0329】

一部の実施形態では、RNA i 剤は、約0.25mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約11mg/kg、約12mg/kg、約13mg/kg、約14mg/kg、約15mg/kg、約16mg/kg、約17mg/kg、約18mg/kg、約19mg/kg、約20mg/kg、約21mg/kg、約22mg/kg、約23mg/kg、約24mg/kg、約25mg/kg、約26mg/kg、約27mg/kg、約28mg/kg、約29mg/kg、30mg/kg、約31mg/kg、約32mg/kg、約33mg/kg、約34mg/kg、約35mg/kg、約36mg/kg、約37mg/kg、約38mg/kg、約39mg/kg、約40mg/kg、約41mg/kg、約42mg/kg、約43mg/kg、約44mg/kg、約45mg/kg、約46mg/kg、約47mg/kg、約48mg/kg、約49mg/kg、または約50mg/kgの用量で投与される。

20

【0330】

一部の実施形態では、RNA i 剤は、2回以上の投与で投与される。繰り返しまたは頻繁な注入を容易にすることが望ましい場合は、送達装置、例えば、ポンプ、半永久ステント（例えば、静脈内、腹腔内、嚢内、もしくは関節包内）、またはレザバーの移植が望ましいであろう。一部の実施形態では、次の投与の回数または量は、所望の効果、例えば、TTR遺伝子の抑制の達成、または治療効果もしくは予防効果の達成、例えば、アミロイド沈着の低減もしくはTTR関連疾患の症状の軽減によって決まる。一部の実施形態では、RNA i 剤は、計画に従って投与される。例えば、RNA i 剤は、週2回、週3回、週4回、または週5回投与することができる。一部の実施形態では、この計画は、一定間隔の投与、例えば、1時間毎、4時間毎、6時間毎、8時間毎、12時間毎、1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、1週間毎、2週間毎、または1ヶ月毎を含む。他の実施形態では、この計画は、時間間隔の短い投与、これに続くRNA i 剤が投与されない長い期間を含む。例えば、この計画は、比較的短い時間間隔（例えば、約6時間毎、約12時間毎、約24時間毎、約48時間毎、または約72時間毎）で投与される最初の一連の投与、これに続くRNA i 剤が投与されない比較的長い期間（例えば、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、または約8週間）を含み得る。一実施形態では、RNA i 剤は、最初は時間毎に投与され、次いで、長い時間間隔（例えば、1日毎、1週間毎、2週間毎、または1ヶ月毎）で投与される。別の実施形態では、RNA i 剤は、最初は毎日投与され、次いで、長い時間間隔（例えば、1週間毎、2週間毎、または1ヶ月毎）で投与される。特定の実施形態では、長い時間間隔は、時間と共に長くなる、または所望の効果の達成に基づいて決定される。特定の実施形態では、RNA i 剤は、最初の週は1日1回投与され、次いで、投与の8日目から週に1回である。別の特定の実施形態では、RNA i 剤は、最初の週は1日おきに投与され、次いで、投与の8日目から週に1回である。

30

40

【0331】

これらの計画はいずれも、任意選択で、1回以上の反復を繰り返しても良い。反復の回

50

数は、所望の効果の達成、例えば、T T R 遺伝子の抑制、レチノール結合タンパク質のレベル、ビタミンAのレベル、および／または治療効果もしくは予防効果の達成、例えば、アミロイド沈着の減少もしくはT T R 関連疾患の症状の軽減によって異なり得る。

【0332】

一部の実施形態では、RNA i 剤は、他の治療剤または他の治療法で投与される。例えば、T T R 関連疾患の治療に適した他の作用剤または他の治療法としては、体内の突然変異T T R のレベルを低下させることができる肝臓移植；T T R 四量体を動力的に安定させて、T T R アミロイド生成性に必要なT T R 四量体の解離を防止するタファミディス（V y n d a q e l）；および、例えば、心臓障害を伴うT T R アミロイドーシスにおける浮腫を低減するために利用することができる利尿薬を挙げることができる。

10

【0333】

一実施形態では、対象に、初回量および1回以上の維持量のRNA i 剤が投与される。1回または複数回の維持量は、初回量と同じ、または初回量よりも少なくする、例えば、初回量の半分とすることができる。維持療法は、1日に付き体重1 k g 当たり0. 01 μ g ~ 15 m g の範囲、例えば、1日に付き体重1 k g 当たり10 m g、1 m g、0. 1 m g、0. 01 m g、0. 001 m g、または0. 00001 m g の1回または複数回の用量を用いて対象を治療するステップを含み得る。維持量は、例えば、2日に1回以下、5日に1回以下、7日に1回以下、10日に1回以下、14日に1回以下、21日に1回以下、または30日に1回以下投与される。さらに、治療法は、一定期間継続することができる、この期間は、特定の疾患の性質、その重症度、および患者の全体的な状態によって異なり得る。特定の実施形態では、用量を、1日に1回以下、例えば、24時間、36時間、48時間、またはそれ以上に1回、例えば、5日もしくは8日に1回投与することができる。治療後、患者の状態の変化について、患者を監視することができる。RNA i 剤の用量は、患者が現在の用量レベルに有意に応答しない場合は増量しても良いし、あるいは、疾患の状態の症状の緩和が観察された場合、疾患の状態が軽減された場合、または不所望の副作用が観察された場合は減量しても良い。

20

【0334】

V I. キット

本発明はまた、本発明の任意の方法を実施するためのキットも提供する。このようなキットは、1種以上のRNA i 剤（複数可）、および使用のための取扱説明書、例えば、T T R の発現を阻害するのに有効な量のRNA i 剤（複数可）を細胞に接触させることによって細胞におけるT T R の発現を阻害するための取扱説明書を含む。キットは、任意選択で、細胞をRNA i 剤に接触させるための手段（例えば、注射器具）、またはT T R の阻害を測定するための手段（例えば、T T R m R N A もしくはT T R タンパク質の阻害を測定するための手段）をさらに含み得る。T T R の阻害を測定するためのこのような手段としては、サンプル、例えば、血漿サンプルを対象から得るための手段を挙げることができる。本発明のキットは、任意選択で、RNA i 剤（複数可）を対象に投与するための手段、または治療有効量もしくは予防有効量を決定するための手段をさらに含み得る。

30

【0335】

本発明は、限定として解釈すべきではない以下の実施例によってさらに例示される。本明細書に記載される全ての参考文献、公開特許文献、および特許出願の内容は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

40

【実施例】

【0336】

実施例1：T T R - G a l N A c コンジュゲートを用いたT T R の阻害

1回量のT T R RNA i 剤AD-43527をマウスに皮下投与して、投与から72時間後に、T T R m R N A のレベルを決定した。

【0337】

マウス／ラット交差反応性G a l N A c -コンジュゲート、AD-43527を、肝臓におけるT T R m R N A のサイレンシングについての、W T C 57 B L / 6 マウスに

50

における *in vivo* での評価のために選択した。AD-43527の各鎖の配列が以下に示される。

【0338】

【表1】

鎖:s=センス鎖;as=アンチセンス鎖

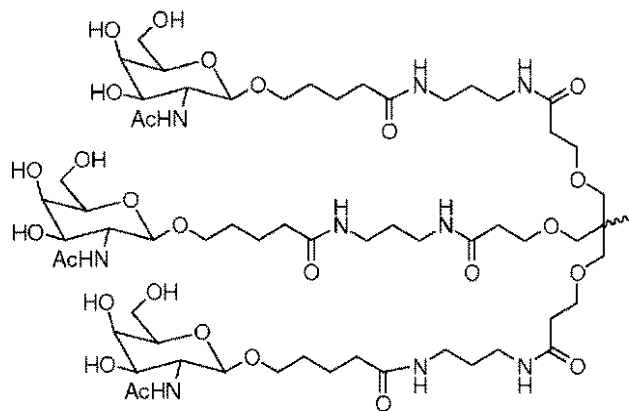
二重鎖 #	鎖	オリゴ #	配列5'-3'
AD-43527	s	A-89592	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAfl96 (配列番号: 8)
	as	A-83989	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu (配列番号: 9)
			L96 = GalNAc3であり; 小文字のヌクレオチド(a,u,g,c)は 2'-O-メチルヌクレオチドであり、Nf(即ち, Af)は a 2'-フルオロヌクレオチドである

10

【0339】

使用されたリガンドはGalNAc₃ :

【化10】



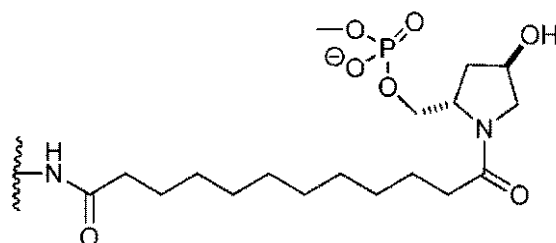
20

30

であった。

このGalNAc₃リガンドは、以下に示されるリンカーおよびテザー:

【化11】

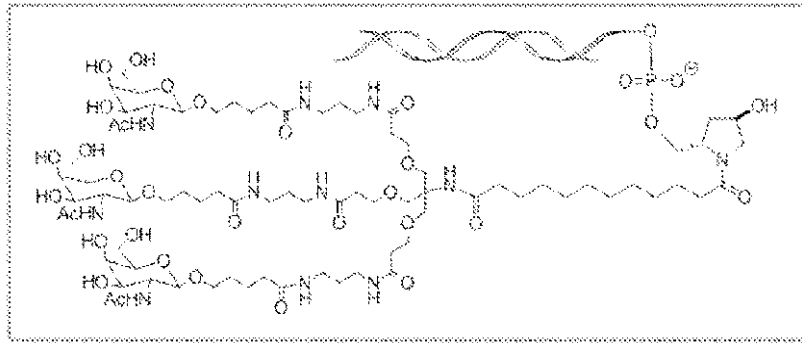


40

を用いてセンス鎖の3'末端にコンジュゲートさせた。

得られたGalNAc₃がコンジュゲートしたセンス鎖の構造は、以下の式:

【化 1 2】



10

で示される。

TTRを標的とし、かつ以下の配列および修飾を有する追加的なRNAi剤を合成してアッセイした。

【0340】

【表 2】

マウス/ラット交差反応性 TTR RNAi 剤

二重鎖	センス鎖 5'-3'	アンチセンス鎖 5'-3'
AD-43528	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAfQ11L96 (配列番号: 10)	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu (配列番号: 11)

20

【0341】

ヒト/イヌ交差反応性 TTR RNAi 剤；親二重鎖は、AD-18328 [GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT (配列番号: 12) のセンス鎖 5'-3' 配列、および次の修飾：ASにおける交互 2' F/2' OMe w/2' PSを有する AUGGA AuACUCUUGGUuACdTdT (配列番号: 13) アンチセンス鎖 5'-3' 配列を有する。

【0342】

【表 3】

二重鎖	センス鎖 5'-3'	アンチセンス鎖 5'-3'
AD-45163	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUfL96 (配列番号: 14)	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa (配列番号: 16)
AD-45164	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUfQ11L96 (配列番号: 15)	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa (配列番号: 17)

30

【0343】

L96 = GalNAc₃であり；小文字のヌクレオチド (a、u、g、c) は 2'-O-メチルヌクレオチドであり、Nf (即ち、Af) は 2'-フルオロヌクレオチドであり；Q11 はコレステロールであり；s はホスホロチオエートである。

【0344】

30 mg/kg、15 mg/kg、7.5 mg/kg、3.5 mg/kg、1.75 mg/kg、または 0.5 mg/kg の AD-43527 を 10 μl/g の投与量で皮下注射により雌 C57BL/6 マウス (6~10 週間、1 群当たり 5 匹) に投与した。コントロール動物には、PBS を同じ投与量で皮下投与した。

40

【0345】

約 72 時間後に、マウスを 200 μl のケタミンで麻酔し、次いで、右尾動脈を切断して全採血した。肝組織を採取して、急速冷凍し、処置まで -80 °C で保存した。

【0346】

治療の効果を、投与の 72 時間後に肝臓における TTR mRNA の測定によって評価した。肝臓の TTR mRNA のレベルを、分岐 DNA アッセイ - Quant i Gene

50

1. 0 (Panomics) を用いてアッセイした。簡単に述べると、マウス肝臓サンプルを粉碎して、組織溶解物を調製した。肝臓溶解混合物 (1 倍量の溶解混合物、2 倍量のヌクレアーゼフリー水、および $10 \mu\text{l}$ のプロテインキナーゼ-K/ml の最終濃度が 20mg/ml の混合物) を、 65°C で 35 分間インキュベートした。 $5 \mu\text{l}$ の肝臓溶解物および $95 \mu\text{l}$ の機能プローブセット (working probe set) (遺伝子標的用の TTR プローブおよび内在性コントロール用の GAPDH) を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを $53^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ でインキュベートした (約 16 ~ 20 時間)。翌日、捕捉プレートを、1 × 洗浄緩衝液 (ヌクレアーゼフリー水、緩衝液成分 1、および洗浄緩衝液成分 2) で 3 回洗浄し、次いで、 240g で 1 分間の遠心分離により乾燥させた。1 ウェルにつき $100 \mu\text{l}$ の増幅プローブミックスを捕捉プレートに添加し、この捕捉プレートをアルミ箔で密閉し、 $46^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。1 時間のインキュベーション後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、1 ウェルにつき $100 \mu\text{l}$ の標識プローブミックスを添加した。捕捉プレートを、 $46^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。次いで、捕捉プレートを 1 × 洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、1 ウェルにつき $100 \mu\text{l}$ の基質を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを 46°C で 30 分間インキュベートし、次いで、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを、インキュベーション後に SpectraMax Luminometer を用いて読み取った。bDNA データを、各 2 つ組サンプルから平均バックグラウンドを減じ、得られた 2 つ組 GAPDH (コントロールプローブ) および TTR (実験プローブ) の値を平均し、次いで、比: (実験プローブのバックグラウンド) / (コントロールプローブのバックグラウンド) を計算することによって分析した。平均 TTR mRNA のレベルを、各群について計算し、この値を PBS 群の平均に対して正規化して、PBS コントロール群の % として相対的な TTR mRNA を得た。

【0347】

この結果は図 1 に示されている。TTR を標的とする GalNAc コンジュゲート RNAi 剤は、TTR mRNA ノックダウンに対して約 5mg/kg の ED_{50} を有していた。これらの結果は、TTR を標的とする GalNAc コンジュゲート RNAi 剤が、TTR mRNA の発現の障害に有効であることを実証している。

【0348】

実施例 2: TTR-GalNAc コンジュゲートを用いた TTR の障害は持続性である

マウスに、皮下投与量 (7.5mg/kg または 30.0mg/kg) の AD-43527、TTR を標的とする GalNAc コンジュゲート RNAi 剤を投与した。肝臓における TTR mRNA のレベルを、実施例 1 で説明された方法を用いて処置から 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後、10 日後、13 日後、15 日後、19 日後、26 日後、33 日後、および 41 日後に評価した。

【0349】

この結果は図 2 に示されている。19 日目に、 30.0mg/kg の GalNAc コンジュゲート RNAi 剤の投与は、なお約 50 % のサイレンシングを示した。発現の完全な回復は、41 日目であった。

【0350】

これらの結果は、TTR を標的とする GalNAc コンジュゲート siRNA によってもたらされる障害が、持続性であり、処置から最大 3 日間、5 日間、7 日間、10 日間、13 日間、15 日間、19 日間、26 日間、33 日間持続する。

【0351】

実施例 3. RNA 合成および二重鎖アニーリング

1. オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチドを、AKTA oligopilot 合成機または ABI 394 合成機で合成した。特段の記載がない限り、オリゴヌクレオチドの合成には、市販の制御された孔を有するガラス固体支持体 (dT-CPG, $500 \text{\AA}$, Prime Synthesis)、および標準的な保護基を有する RNA ホスホラミダイト、5'-O-ジメ

トキシトリチル N6-ベンゾイル-2'-t-ブチルジメチルシリル-アデノシン-3'-O-N, N'-ジイソプロピル-2-シアノエチルホスホラミダイト、5'-O-ジメトキシトリチル-N4-アセチル-2'-t-ブチルジメチルシリル-シチジン-3'-O-N, N'-ジイソプロピル-2-シアノエチルホスホラミダイト、5'-O-ジメトキシトリチル-N2-イソブチル(isobutryl)-2'-t-ブチルジメチルシリル-グアノシン-3'-O-N, N'-ジイソプロピル-2-シアノエチルホスホラミダイト、および5'-O-ジメトキシトリチル-2'-t-ブチルジメチルシリル-ウリジン-3'-O-N, N'-ジイソプロピル-2-シアノエチルホスホラミダイト(Pierce Nucleic Acids Technologies)を用いた。2'-F ホスホラミダイト、5'-O-ジメトキシトリチル-N4-アセチル-2'-フルオロ-シチジン-3'-O-N, N'-ジイソプロピル-2-シアノエチル-ホスホラミダイトおよび5'-O-ジメトキシトリチル-2'-フルオロ-ウリジン-3'-O-N, N'-ジイソプロピル-2-シアノエチル-ホスホラミダイトは(Promega)から購入した。全てのホスホラミダイトは、10% THF/ANC(v/v)中、0.2Mの濃度で使用したグアノシンを除いて、アセトニトリル(CH₃CN)中、0.2Mの濃度で使用した。16分のカップリング/リサイクリング時間を使用した。活性化物質は、5-エチルチオテトラゾール(0.75M、American International Chemicals)であり、PO酸化用にはヨウ素/水/ピリジンを使用し、PS酸化用には2,6-ルチジン/ACN(1:1 v/v)に溶解したPADS(2%)を使用した。

【0352】

リガンドコンジュゲート鎖を、対応するリガンドを含む固体支持体を用いて合成した。例えば、配列の3'末端の糖質部分/リガンド(例えば、GalNAc用)の導入は、対応する糖質固体支持体で合成を開始することによって達成した。同様に、3'末端のコレステロール部分を、コレステロール支持体で合成を開始することによって導入した。一般に、リガンド部分は、前述の実施例で説明されたものから選択されるテザーを介してトランス-4-ヒドロキシプロリノールに連結してヒドロキシプロリノール-リガンド部分を得た。次いで、ヒドロキシプロリノール-リガンド部分を、コハク酸リンカーを介して固体支持体に結合する、または標準的なホスフィチル化条件によってホスホラミダイトに変換して、所望の糖質コンジュゲート構成要素を得た。フルオロフォア標識siRNAを、Biosearch Technologiesから購入した対応するホスホラミダイトまたは固体支持体で合成した。オレイルリトコール酸(GalNAc)₃ポリマー支持体を、38.6 μmol/グラムの添加(loadings)で社内で作製した。マンノース(Man)₃ポリマー支持体も、42.0 μmol/グラムの添加で社内で作製した。

【0353】

所望の位置、例えば、配列の5'末端での、選択されたリガンドのコンジュゲーションは、特段の記載がない限り、標準的なホスホラミダイト結合条件下で、対応するホスホラミダイトを成長中の鎖に結合させることによって達成した。固体結合オリゴヌクレオチドに対する、5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール活性化物質の存在下での無水CH₃CN中の0.1Mのホスホラミダイト溶液の15分間の長時間の結合を行った。Beaucage, S. L. (2008) Solid-phase synthesis of siRNA oligonucleotides. Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 11, 203-216; Mueller, S., Wolf, J. and Ivanov, S. A. (2004) Current Strategies for the Synthesis of RNA. Curr. Org. Synth., 1, 293-307; Xia, J., Noronha, A., Toudjarska, I., Li, F., Akinc, A., Braich, R., Frank-Kamenetsky, M., Rajeev, K. G., Egli, M. and Manoharan, M. (2006) Gene Silencing Activity of siRNAs with a Ribo-difluorotoluy l Nucleoti

10

20

30

40

50

de. ACS Chem. Biol., 1, 176-183に報告されているように標準的なヨウ素水を用いて、または10分の酸化待ち時間でコンジュゲートオリゴヌクレオチドをtert-ブチルヒドロペルオキシド/アセトニトリル/水(10:87:3)を用いる処理によって、ヌクレオチド間亜リン酸塩のリン酸塩への酸化を行なった。ホスホロチオエートは、硫黄転移試薬、例えば、DDTT (AM Chemicals社から購入)、PADS、およびまたはBeaucage試薬を用いて、亜リン酸塩からホスホロチオエートへの酸化によって導入した。コレステロールホスホラミダイトは、社内で合成し、ジクロロメタン中、0.1Mの濃度で使用した。コレステロールホスホラミダイトの結合時間は16分とした。

【0354】

10

2. 脱保護-I (ヌクレオ塩基脱保護)

合成の完了後、支持体を100mlガラスボトル(VWR)に移した。80mLのエタノールアンモニア[アンモニア:エタノール(3:1)]の混合物を用いて、55℃で6.5時間、塩基とリン酸基を脱保護すると同時にオリゴヌクレオチドを支持体から切断した。ボトルを氷上で短時間冷却し、次いで、エタノールアンモニア混合物を濾過して、新しい250mLのボトルに入れた。CPGを2×40mL部のエタノール/水(1:1 v/v)で洗浄した。次いで、混合物の容量をロトバップで約30mLにまで減らした。次いで、この混合物をドライアイス上で凍結させ、スピードバックにより真空下で乾燥させた。

【0355】

20

3. 脱保護-II (2'-TBDMS基の除去)

乾燥残渣を26mlのトリエチルアミン、トリエチルアミン三フッ化水素酸塩(TEA·3HF)、またはピリジン-HFとDMSO(3:4:6)に再懸濁し、60℃で90分間加熱して、2'位のtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)基を除去した。次いで、反応を50mlの20mM酢酸ナトリウムでクエンチし、pHを6.5に調整し、精製までフリーザーで保存した。

【0356】

4. 分析

オリゴヌクレオチドは、精製の前に高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析し、緩衝液とカラムの選択は、配列およびまたはコンジュゲートしたリガンドの性質によって決まる。

30

【0357】

5. HPLCの精製

リガンドがコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを、逆相分取HPLCによって精製した。非コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、社内で充填されたTSKゲルカラム上のアニオン交換HPLCによって精製した。緩衝液は、10%CH₃CN(緩衝液A)中の20mMのリン酸ナトリウム(pH8.5)および10%CH₃CN、1MのNaBr(緩衝液B)中の20mMのリン酸ナトリウム(pH8.5)とした。完全長オリゴヌクレオチドを含む分画をプールし、脱塩し、そして凍結乾燥させた。ODが約0.15の脱塩オリゴヌクレオチドを150μlになるまで水で希釈し、次いで、CGEおよびLC/MS分析用の特殊なバイアルにピペットで移した。最後に、化合物をLC-ESMSおよびCGEによって分析した。

40

【0358】

6. RNAi剤の調製

RNAi剤の調製のために、等モル量のセンス鎖およびアンチセンス鎖を、1×PBS中、95℃で5分間加熱し、ゆっくりと冷却して室温にした。二重鎖の完全性をHPLC分析によって確認した。以下の表1は、ヒトまたはげっ歯類TTR mRNAを標的とするRNAi剤を示している。

【0359】

【表 4】

表1: RNAi 剤および*In Vitro*でのスクリーニングの結果

二重鎖 ID	SID	配列番号:	センス鎖 (S)	AS ID	配列番号:	アンチセンス鎖 (AS)	siRNAの残存mRNAの濃度(%)			IC50 (nM)
							1 nM	0.1 nM	0.01 nM	
D1000	S1000	18	AfuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1000	1110	AfuGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.1	0.47	0.006
D1001	S1001	19	AfsuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1001	1111	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.10	0.49	0.0065
D1002	S1002	20	AfuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1002	1112	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgsUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.10	0.46	0.0068
D1003	S1003	21	AfuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1003	1113	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgUfsuAfcAfusGfsa	0.05	0.12	0.56	0.0073
D1004	S1004	22	aUGuaACccAGagUAuuCCasu	AS1004	1114	AUGGAuaCUcuUGguUAcaUsGsa	0.07	0.13	0.44	0.008
D1005	S1005	23	AfuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1005	1115	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgsUfsuAfcAfusGfsa	0.06	0.11	0.53	0.0093
D1006	S1006	24	AfuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1006	1116	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfguuAfcAfusGfsa	0.05	0.16	0.55	0.0095
D1007	S1007	25	AfuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1007	1117	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfguuAfcAfusGfsa	0.05	0.14	0.48	0.0098
D1008	S1008	26	auguaaccaadGadGudAudAcdGasu	AS1008	1118	aUfgGfaAfaUfcUfcUfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.11	0.33	0.010
D1009	S1009	27	UfgGfaAfuUfuCfaUfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1009	1119	uCfuugGfuUfaCfaugAfaAfuuccCfasUfsc	0.03	0.14	0.56	0.0101
D1010	S1010	28	UfgGfaUfuCfaUfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1010	1120	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.03	0.14	0.65	0.0101
D1011	S1011	29	aUfgfuAfaCfaAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1011	1121	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfguuAfaUfsgsa	0.06	0.10	0.55	0.011
D1012	S1012	30	UfgGfaUfuCfaUfUfgUfaaCfaAfgsAf	AS1012	1122	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.13	0.54	0.0114
D1013	S1013	31	auguaaccaadGadGudAudAcdGasu	AS1013	1123	aUfgGfaAfaUfcUfcUfgudGudTadCadTsgsa	0.11	0.19	0.49	0.011
D1014	S1014	32	AfuGfuuaCfaAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1014	1124	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.16	0.59	0.013
D1015	S1015	33	AfuguAfaCfaAfGfaGfuAfuUfcCcdAsu	AS1015	1125	dAUdGgdAadTafuUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.15	0.51	0.013
D1016	S1016	34	auGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1016	1126	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.14	0.64	0.013
D1017	S1017	35	UfgGfaUfuCfaUfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1017	1127	uCfuUfgGfuuaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.41	0.74	0.0133
D1018	S1018	36	AfuguAfaCfaAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1018	1128	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.14	0.61	0.014
D1019	S1019	37	AfuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1019	1129	aUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.02	0.2	0.7	0.014
D1020	S1020	38	AfsuGfuAfaCfaAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1020	1130	asUfgGfaAfaUfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.16	0.67	0.0156

【表 5】

D1021	S1021	39	aUfguAfaAfcAfaAfgaUfaUfaCfcasUf	AS1021	1131	aUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.11	0.24	0.64	0.016
D1022	S1022	40	dTdGggdAdTuudCdAugdTdAacdCdAagsdA	AS1022	1132	udCdTugdGdTudCdAugdAdAaadCdCcsdTsc	0.08	0.27	0.64	0.0161
D1023	S1023	41	AfsuGfuAfaCfaCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1023	1133	aUfgsGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.03	0.19	0.63	0.0163
D1024	S1024	42	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaCfaAfgsAf	AS1024	1134	uCuUfgGfuUfaAfcfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.05	0.25	0.69	0.0164
D1025	S1025	43	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1025	1135	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.18	0.75	0.0166
D1026	S1026	44	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1026	1136	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.19	0.66	0.0178
D1027	S1027	45	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1027	1137	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.19	0.69	0.018
D1028	S1028	46	dAdTgudAdAccdAdAgadGdTaudTdccasdT	AS1028	1138	adTdGgadAdTacdTdCuudGdGuudAdCausdGsa	0.15	0.29	0.72	0.018
D1029	S1029	47	AdTgdtAdACdCdAdAgdTAdTUDCCdAsU	AS1029	1139	dAUdGgdAdAdTAdCuUdCuUdTGdGdUdTAdCdTsGsdA	0.1	0.27	0.61	0.018
D1030	S1030	48	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1030	1140	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.21	0.64	0.0187
D1031	S1031	49	AfuGfuAfaAfcCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1031	1141	AfuGfgAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.06	0.15	0.62	0.019
D1032	S1032	50	AfsuGfuAfaCfaCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1032	1142	asUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.09	0.34	0.78	0.021
D1033	S1033	51	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1033	1143	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.06	0.26	0.57	0.0212
D1034	S1034	52	AfuGfuAfaAfcCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1034	1144	aUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.11	0.39	0.82	0.0216
D1035	S1035	53	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1035	1145	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.16	0.56	0.0222
D1036	S1036	54	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1036	1146	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.06	0.31	0.78	0.0234
D1037	S1037	55	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1037	1147	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.03	0.14	0.62	0.0235
D1038	S1038	56	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1038	1148	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.39	0.78	0.0239
D1039	S1039	57	AfuGfuAfaCfaCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1039	1149	aUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.03	0.14	0.59	0.025
D1040	S1040	58	AfuGfuAfaCfaCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1040	1150	aUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.03	0.13	0.56	0.025
D1041	S1041	59	AfsuGfuAfaCfaCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1041	1151	asUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.06	0.27	0.79	0.0252
D1042	S1042	60	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1042	1152	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.05	0.27	0.67	0.0259
D1043	S1043	61	AfuGfuAfaCfaCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1043	1153	aUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.02	0.16	0.63	0.027
D1044	S1044	62	AfsuGfuAfaCfaCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1044	1154	asUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.06	0.30	0.81	0.0271
D1045	S1045	63	aUfguAfaAfcCfaAfgaGfuUfCfasUf	AS1045	1155	aUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.12	0.29	0.8	0.028
D1046	S1046	64	AfuGfuAfaCfaCfaAfgaGfuAfuucCfasUf	AS1046	1156	aUfgGfAfaUfaCfuUfCfuUfgGfuUfaAfcAfaUfgsa	0.03	0.15	0.59	0.030
D1047	S1047	65	UfgGfgAfuUfuCfaUfUfgaUfaAfcCfaAfgsAf	AS1047	1157	uCuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.08	0.44	0.83	0.0324

【表 6】

D1048	S1048	66	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1048	1158	aUfgGfaAfuAfcUfcuUfgUfuAfcAfuGfsa	0.07	0.23	0.67	0.036
D1049	S1049	67	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1049	1159	AfuGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.08	0.23	0.73	0.037
D1050	S1050	68	UfgGfaAfuUfcUfcUfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1050	1160	uCfuugGfuUfaCfaUfgAfaAfuAfcCfaCfasUfsc	0.06	0.29	0.78	0.0372
D1051	S1051	69	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1051	1161	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.12	0.41	0.86	0.040
D1052	S1052	70	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1052	1162	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.1	0.22	0.72	0.042
D1053	S1053	71	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1053	1163	aUdGGdAfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.09	0.31	0.69	0.044
D1054	S1054	72	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1054	1164	adTGGGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.1	0.45	0.75	0.047
D1055	S1055	73	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1055	1165	aUdGGdAfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.12	0.26	0.7	0.049
D1056	S1056	74	AuGuAaCcaAaGaGuAuUcCasU	AS1056	1166	aUgGaAuAcUcUuGgUuAcAusGsa	0.08	0.24	0.65	0.050
D1057	S1057	75	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1057	1167	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.14	0.42	0.62	0.051
D1058	S1058	76	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1058	1168	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.12	0.36	0.86	0.053
D1059	S1059	77	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1059	1169	aUdGGdAfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.09	0.27	0.7	0.054
D1060	S1060	78	adTgudAdAccdAdAgagdTadTudCcasdT	AS1060	1170	adTgudAdAccdAdAgagdTadTudCcasdT	0.11	0.37	0.66	0.056
D1061	S1061	79	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1061	1171	adTGGGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.1	0.31	0.77	0.059
D1062	S1062	80	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1062	1172	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.1	0.27	0.65	0.059
D1063	S1063	81	adTGuadAdCcdAdGagdTadTudCcdCasu	AS1063	1173	dAdTggdAdAuadCdTadTudCcdCasu	0.12	0.44	0.82	0.064
D1064	S1064	82	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1064	1174	adTGGGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.12	0.32	0.83	0.064
D1065	S1065	83	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1065	1175	aUdGGdAfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.13	0.34	0.72	0.066
D1066	S1066	84	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1066	1176	adTGGGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.11	0.33	0.72	0.067
D1067	S1067	85	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1067	1177	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.11	0.37	0.62	0.070
D1068	S1068	86	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1068	1178	aUdGGdAfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.16	0.33	0.64	0.072
D1069	S1069	87	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	AS1069	1179	AfuGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.14	0.43	0.73	0.074
D1070	S1070	88	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1070	1180	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.08	0.42	0.94	0.075
D1071	S1071	89	UfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	AS1071	1181	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuAfcCfaUfsc	0.14	0.28	0.83	0.0797
D1072	S1072	90	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1072	1182	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.05	0.26	0.8	0.082
D1073	S1073	91	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1073	1183	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.12	0.41	0.73	0.083
D1074	S1074	92	AfuGfuAfaCfaCfaAfAGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1074	1184	aUfgGfaAfuAfcUfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.14	0.44	0.75	0.086

【表 7】

D1075	S1075	93	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1075	1185	aUfgGfdAdAdTdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.41	0.72	0.088
D1076	S1076	94	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAdAdTdCcCfasUf	AS1076	1186	aUfgdGdAdAdTdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.45	0.86	0.088
D1077	S1077	95	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1077	1187	AfuGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.46	0.95	0.092
D1078	S1078	96	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1078	1188	dAUdGGdAdAdTdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.32	0.76	0.093
D1079	S1079	97	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAdAdTdCcCfasUf	AS1079	1189	dAUdGGdAdAdTdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.38	0.76	0.095
D1080	S1080	98	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1080	1190	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.42	0.86	0.099
D1081	S1081	99	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1081	1191	dAUdGGdAdAdTdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.47	0.9	0.105
D1082	S1082	100	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1082	1192	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.44	0.83	0.106
D1083	S1083	101	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1083	1193	adTdGGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.34	0.74	0.109
D1084	S1084	102	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1084	1194	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.93	0.117
D1085	S1085	103	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1085	1195	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.42	0.78	0.120
D1086	S1086	104	aUfgUfaAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1086	1196	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.45	0.83	0.1197
D1087	S1087	105	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1087	1197	AfuGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.3	0.7	0.120
D1088	S1088	106	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1088	1198	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.46	0.8	0.120
D1089	S1089	107	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1089	1199	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.49	0.85	0.122
D1090	S1090	108	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1090	1200	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.41	0.85	0.125
D1091	S1091	109	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAdAdTdCcCfasUf	AS1091	1201	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.38	0.77	0.125
D1092	S1092	110	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1092	1202	AfuGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.31	0.93	0.126
D1093	S1093	111	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1093	1203	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.33	0.9	0.135
D1094	S1094	112	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1094	1204	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.39	0.85	0.142
D1095	S1095	113	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1095	1205	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.39	0.76	0.146
D1096	S1096	114	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1096	1206	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.38	0.85	0.147
D1097	S1097	115	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1097	1207	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.47	0.87	0.147
D1098	S1098	116	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1098	1208	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.42	0.85	0.151
D1099	S1099	117	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1099	1209	dAUdGGdAdAdTdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.41	0.85	0.152
D1100	S1100	118	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1100	1210	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.48	0.72	0.152
D1101	S1101	119	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1101	1211	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.38	0.94	0.158

【表 9】

D1129	S1129	147	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1129	1239	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.23	0.76	0.98
D1130	S1130	148	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1130	1240	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.21	0.64	0.9
D1131	S1131	149	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1131	1241	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.17	0.7	1.01
D1132	S1132	150	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1132	1242	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.17	0.58	0.87
D1133	S1133	151	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1133	1243	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.33	0.89	1.05
D1134	S1134	152	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1134	1244	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.16	0.64	0.96
D1135	S1135	153	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1135	1245	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.12	0.53	0.96
D1136	S1136	154	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1136	1246	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.16	0.58	0.98
D1137	S1137	155	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1137	1247	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.16	0.6	0.91
D1138	S1138	156	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1138	1248	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.1	0.54	0.91
D1139	S1139	157	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1139	1249	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.24	0.68	0.98
D1140	S1140	158	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1140	1250	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.13	0.75	0.9
D1141	S1141	159	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1141	1251	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.15	0.52	1.05
D1142	S1142	160	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1142	1252	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.16	0.66	0.89
D1143	S1143	161	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1143	1253	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.12	0.51	0.89
D1144	S1144	162	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1144	1254	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.25	0.71	0.95
D1145	S1145	163	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1145	1255	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.17	0.74	0.98
D1146	S1146	164	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1146	1256	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.11	0.51	0.86
D1147	S1147	165	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1147	1257	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.1	0.52	0.83
D1148	S1148	166	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1148	1258	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.14	0.63	0.98
D1149	S1149	167	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1149	1259	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.13	0.58	0.88
D1150	S1150	168	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1150	1260	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.15	0.62	0.94
D1151	S1151	169	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1151	1261	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.18	0.73	0.94
D1152	S1152	170	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1152	1262	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.13	0.53	0.97
D1153	S1153	171	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1153	1263	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuGfsa	0.13	0.53	0.98
D1154	S1154	172	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcAfaGfsa	AS1154	1264	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgUfaAfcAfaGfsa	0.09	0.5	0.78
D1155	S1155	173	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcAfaGfsa	AS1155	1265	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgUfaAfcAfaGfsa	0.13	0.62	0.89

【表 10】

D1156	S1156	174	UfgGfgAfuuuCfaUfgUfaAfaCfaAfgsAf	AS1156	1266	uCuUfgGfuUfacaUfgAfaAfaUfcCfasUfsc	0.12	0.65	0.85
D1157	S1157	175	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfaCfaAfgsAf	AS1157	1267	uCuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfaUfcCfasUfsc	0.11	0.54	0.85
D1158	S1158	176	UfgGfgAfuuuCfaUfgUfaAfaCfaAfgsAf	AS1158	1268	uCuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfaUfcCfasUfsc	0.13	0.53	0.8
D1159	S1159	177	UfgGfgAfuUfuUfcAfuGfuAfaCfaAfgsAf	AS1159	1269	uCuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfaUfcCfasUfsc	0.59	0.89	0.81
D1160	S1160	178	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfaCfaAfgsAf	AS1160	1270	uCuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfaUfcCfasUfsc	0.16	0.72	0.9
D1161	S1161	179	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfaCfaAfgsAf	AS1161	1271	uCuUfgGfuUfacaUfgAfaAfaUfcCfasUfsc	0.27	0.69	0.86
D1162	S1162	180	AfuGfuAfaCfaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1162	1272	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.12	0.6	0.95
D1163	S1163	181	AfuGfuAfaCfaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1163	1273	aUfgGfaaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.05	0.56	1.02
D1164	S1164	182	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1164	1274	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.13	0.55	1
D1165	S1165	183	AfuGfuAfaCfaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1165	1275	aUfgGfaaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.09	0.6	0.97
D1166	S1166	184	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1166	1276	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.15	0.59	0.91
D1167	S1167	185	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1167	1277	aUfgGfaaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.11	0.59	1
D1168	S1168	186	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1168	1278	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.13	0.57	0.94
D1169	S1169	187	auGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1169	1279	aUfgGfaaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.08	0.5	0.9
D1170	S1170	188	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1170	1280	aUfgGfaaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.06	0.53	0.91
D1171	S1171	189	auGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1171	1281	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.07	0.56	0.89
D1172	S1172	190	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1172	1282	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.13	0.59	0.98
D1173	S1173	191	AfuGfuAfaCfaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1173	1283	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.2	0.65	1.03
D1174	S1174	192	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1174	1284	aUfgGfaaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.07	0.51	0.95
D1175	S1175	193	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1175	1285	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.2	0.53	0.76
D1176	S1176	194	auGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1176	1286	augGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.74	0.98	0.81
D1177	S1177	195	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1177	1287	augGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.43	0.64	0.88
D1178	S1178	196	auguaaccAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1178	1288	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.17	0.49	0.81
D1179	S1179	197	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1179	1289	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.22	0.65	0.73
D1180	S1180	198	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1180	1290	augGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.6	1.09	0.8
D1181	S1181	199	auGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1181	1291	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.3	0.78	0.78
D1182	S1182	200	auguaaccAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1182	1292	aUfgGfaAfuAfaCfaUfcUfuGfgUfuAfaCfasGfsa	0.35	0.73	0.84

【表 1 1】

D1183	S1183	201	AfuGfuAfaCcaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1183	1293	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.19	0.6	0.94
D1184	S1184	202	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1184	1294	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.61	1.08	0.8
D1185	S1185	203	auGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1185	1295	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.16	0.52	0.72
D1186	S1186	204	auguaaccaagaGfuAfuUfcCfasUf	AS1186	1296	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.2	0.53	0.74
D1187	S1187	205	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1187	1297	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.34	0.66	0.85
D1188	S1188	206	AfuGfuAfaCcaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1188	1298	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.61	0.98	1.02
D1189	S1189	207	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1189	1299	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.3	0.73	0.85
D1190	S1190	208	auguaaccaagaGfuAfuUfcCfasUf	AS1190	1300	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.28	0.69	0.78
D1191	S1191	209	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1191	1301	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.33	0.88	0.64
D1192	S1192	210	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1192	1302	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.31	0.64	0.83
D1193	S1193	211	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1193	1303	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.64	0.82	0.92
D1194	S1194	212	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1194	1304	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.21	0.62	0.77
D1195	S1195	213	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1195	1305	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.17	0.7	0.95
D1196	S1196	214	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1196	1306	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.19	0.71	0.65
D1197	S1197	215	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1197	1307	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.64	0.82	0.93
D1198	S1198	216	auguAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1198	1308	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.19	0.65	0.72
D1199	S1199	217	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1199	1309	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.15	0.52	0.64
D1200	S1200	218	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1200	1310	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.48	0.74	0.92
D1201	S1201	219	auguAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1201	1311	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.17	0.71	0.77
D1202	S1202	220	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1202	1312	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.43	0.69	0.85
D1203	S1203	221	auguaaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1203	1313	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.14	0.61	0.76
D1204	S1204	222	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1204	1314	adTdGGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.16	0.56	0.89
D1205	S1205	223	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1205	1315	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.13	0.57	0.9
D1206	S1206	224	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1206	1316	adTdGdGdAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.29	0.73	0.89
D1207	S1207	225	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1207	1317	adTdGGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.16	0.56	0.78
D1208	S1208	226	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1208	1318	aUfdGdGdAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.22	0.67	0.89
D1209	S1209	227	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1209	1319	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcusGfsa	0.14	0.55	0.78

【表 1 2】

D1210	S1210	228	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1210	1320	aUfgdGdAdAdTafCufCfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.5	0.84
D1211	S1211	229	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1211	1321	aUfgGfadAdTadAdCufCfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.59	0.72
D1212	S1212	230	auguaaccaaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1212	1322	aUfgGfaAfaUfcUfcUfgdGudTadCadTsgsa	0.21	0.74	0.77
D1213	S1213	231	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1213	1323	adTdGdGdAdAfaUfcUfcUfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.53	0.91
D1214	S1214	232	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1214	1324	aUfgGfaAfaUfcUfcUfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.71	0.87
D1215	S1215	233	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1215	1325	aUfdGdGdAdAfaUfcUfcUfgUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.67	0.97
D1216	S1216	234	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1216	1326	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.36	0.87	1.07
D1217	S1217	235	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1217	1327	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.37	0.73	1.03
D1218	S1218	236	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1218	1328	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.23	0.42	0.84
D1219	S1219	237	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1219	1329	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.43	0.71	1.03
D1220	S1220	238	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1220	1330	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.37	0.63	0.99
D1221	S1221	239	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1221	1331	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.29	0.84	0.88
D1222	S1222	240	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1222	1332	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.31	0.8	0.99
D1223	S1223	241	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1223	1333	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.09	0.52	0.82
D1224	S1224	242	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1224	1334	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.22	0.79	1
D1225	S1225	243	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1225	1335	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.31	0.76	0.84
D1226	S1226	244	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1226	1336	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.26	0.64	0.87
D1227	S1227	245	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1227	1337	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.33	0.79	0.81
D1228	S1228	246	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1228	1338	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.464	0.932	0.978
D1229	S1229	247	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1229	1339	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.453	1.047	1.178
D1230	S1230	248	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1230	1340	aUfgGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.831	0.967	1.151
D1231	S1231	249	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1231	1341	AfuGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.09	0.5	1.07
D1232	S1232	250	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1232	1342	AfuGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.11	0.54	1.1
D1233	S1233	251	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1233	1343	AfuGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.19	0.61	0.74
D1234	S1234	252	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1234	1344	AfuGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.22	0.61	0.98
D1235	S1235	253	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1235	1345	AfuGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.27	0.69	0.92
D1236	S1236	254	AfuGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1236	1346	AfuGfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	0.54	1.08	0.8

【表 1 3】

D1237	S1237	255	augUfaAfccaAfgaAfguafuUfcCfasu	AS1237	1347	AfuGfgAfaUfaAfccuUfcUfgGfgUfaCfaUfsgsa	0.29	0.61	0.79	
D1238	S1238	256	AfugUfaAfccaAfgaAfguafuUfcCfasu	AS1238	1348	AfuGfgAfaUfaAfccuUfcUfgGfgUfaCfaUfsgsa	0.31	0.6	0.88	
D1239	S1239	257	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1239	1349	dAUdGgdAauAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.2	0.67	0.85	
D1240	S1240	258	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1240	1350	dAUdGgdAauAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.23	0.58	0.68	
D1241	S1241	259	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1241	1351	dAUdGgdAauAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.25	0.65	0.78	
D1242	S1242	260	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1242	1352	dAUdGgdAadTafUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.18	0.64	0.84	
D1243	S1243	261	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1243	1353	dAUdGgdAafUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.19	0.72	0.87	
D1244	S1244	262	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1244	1354	dAUdGgdAadTafUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.16	0.55	0.8	
D1245	S1245	263	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1245	1355	dAUdGgdAauAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.22	0.51	0.9	
D1246	S1246	264	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1246	1356	dAUdGgdAadTafUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.27	0.78	0.66	
D1247	S1247	265	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1247	1357	dAdTdGdGaaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.16	0.57	0.97	
D1248	S1248	266	AfacaAfuguUfcUfuGfgUfuCudAudAfa	AS1248	1358	dTUdAudAgdAGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.06	0.09	0.36	0.0047
D1249	S1249	267	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1249	1359	UfuUfaUfaGfagcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.06	0.10	0.47	0.005
D1250	S1250	268	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1250	1360	uUfaaGfaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.07	0.14	0.55	0.005
D1251	S1251	269	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1251	1361	uUfaaGfaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.07	0.14	0.49	0.006
D1252	S1252	270	cAGuGuucuuGcucuAuAdTdT	AS1252	1362	UuAuAGAGcAAGAcACUGdTdT				0.006
D1253	S1253	271	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1253	1363	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.05	0.12	0.43	0.006
D1254	S1254	272	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1254	1364	UfuUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.06	0.13	0.39	0.006
D1255	S1255	273	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1255	1365	UfuUfaUfagaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.08	0.17	0.48	0.007
D1256	S1256	274	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1256	1366	UfuUfaUfaGfaGfcaAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.08	0.14	0.40	0.007
D1257	S1257	275	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1257	1367	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.07	0.12	0.40	0.007
D1258	S1258	276	AfaCfaguGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1258	1368	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.08	0.13	0.41	0.007
D1259	S1259	277	AfaCfAfGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1259	1369	uUfaUfaGfAfGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.05	0.11	0.35	0.008
D1260	S1260	278	AfacaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1260	1370	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.06	0.12	0.40	0.008
D1261	S1261	279	AfacaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1261	1371	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.06	0.13	0.42	0.008
D1262	S1262	280	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfgUfuCfaUfsgsa	AS1262	1372	uUfaUfaGfAfGfcAfaGfaAfaUfcUfuGfgUfuAfaUfsgsa	0.06	0.13	0.37	0.008
D1263	S1263	281	cAGuGuucuuGcucuAuAdTdT	AS1263	1373	UuAuAGAGcAAGAcACUGdTdT				0.008

10

20

30

40

【表 1 4】

D1264	S1264	282	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1264	1374	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.12	0.50	0.008
D1265	S1265	283	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1265	1375	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.12	0.13	0.48	0.009
D1266	S1266	284	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1266	1376	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.51	0.009
D1267	S1267	285	AfacaAfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1267	1377	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.48	0.0088
D1268	S1268	286	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1268	1378	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.09	0.35	0.009
D1269	S1269	287	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1269	1379	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.009
D1270	S1270	288	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1270	1380	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.49	0.009
D1271	S1271	289	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1271	1381	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.10	0.36	0.009
D1272	S1272	290	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1272	1382	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.009
D1273	S1273	291	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1273	1383	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.51	0.009
D1274	S1274	292	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1274	1384	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.46	0.010
D1275	S1275	293	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1275	1385	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.010
D1276	S1276	294	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1276	1386	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.47	0.010
D1277	S1277	295	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1277	1387	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.50	0.010
D1278	S1278	296	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1278	1388	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.43	0.010
D1279	S1279	297	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1279	1389	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.010
D1280	S1280	298	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1280	1390	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.06	0.14	0.45	0.010
D1281	S1281	299	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1281	1391	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.46	0.011
D1282	S1282	300	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1282	1392	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.55	0.011
D1283	S1283	301	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1283	1393	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.12	0.45	0.011
D1284	S1284	302	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1284	1394	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.48	0.011
D1285	S1285	303	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1285	1395	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguuusUfsu	0.06	0.11	0.40	0.011
D1286	S1286	304	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1286	1396	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.16	0.47	0.011
D1287	S1287	305	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1287	1397	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.19	0.46	0.012
D1288	S1288	306	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1288	1398	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.17	0.46	0.012
D1289	S1289	307	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1289	1399	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.09	0.31	0.012
D1290	S1290	308	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1290	1400	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguuusUfsu	0.06	0.16	0.49	0.013

【表 1 5】

D1291	S1291	309	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1291	1401	uUfaUfaGfaGfcAfagaAfcAfCufUfuUfsUf	0.06	0.11	0.32	0.013
D1292	S1292	310	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1292	1402	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfuUfsUfsu	0.06	0.14	0.44	0.013
D1293	S1293	311	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasa	AS1293	1403	UfUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.39	0.013
D1294	S1294	312	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1294	1404	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfuUfsUfsu	0.07	0.18	0.41	0.014
D1295	S1295	313	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1295	1405	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.47	0.014
D1296	S1296	314	adAdCagTdTGuudCdTugdcCdTcudAdTasa	AS1296	1406	dTdTaudAdGagdTadAagAdAcadCdTgudTsdTsu	0.12	0.21	0.68	0.0146
D1297	S1297	315	AfacaGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1297	1407	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.06	0.15	0.50	0.016
D1298	S1298	316	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1298	1408	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.50	0.016
D1299	S1299	317	AfaCfaguGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1299	1409	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.50	0.018
D1300	S1300	318	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1300	1410	uUfaUfaGfaGfcacGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.43	0.020
D1301	S1301	319	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1301	1411	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.45	0.021
D1302	S1302	320	AfaCfaGfugUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1302	1412	uUfaUfaGfaGfcacGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.49	0.021
D1303	S1303	321	AfaCfaguGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1303	1413	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.24	0.51	0.022
D1304	S1304	322	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1304	1414	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.27	0.47	0.033
D1305	S1305	323	aaCdCdAgudGdTucdTdTgcdTcudTdTasa	AS1305	1415	udTadTdAgadGdCaadGdaacdAdCugdTdTtsusu	0.19	0.36	0.86	0.045
D1306	S1306	324	AfacaGfuguUfcUfuGfCufCufCudAudAasa	AS1306	1416	dTudAUadAGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.22	0.61	
D1307	S1307	325	AfacaGfuguUfcUfaTGfCufCufCudAudAasa	AS1307	1417	dTudAUadAGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.39	0.84	
D1308	S1308	326	AfacaGfuguUfcUfuGfCufCufCudAudAasa	AS1308	1418	dTudAUadAGdGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.13	0.48	
D1309	S1309	327	AfacaGfuguUfcUfaTGfCufCufCudAudAasa	AS1309	1419	dTudAUadAGdAGfdCafafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.13	0.58	
D1310	S1310	328	AfacaGfuguUfcUfaTGfCufCufCudAudAasa	AS1310	1420	dTudAUadAGdAGfdCafafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.55	
D1311	S1311	329	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfCufCufAdTdAasda	AS1311	1421	dTdTadTdAgfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.30	0.66	
D1312	S1312	330	AfacaGfuguUfcUfuGfCufCufCudAudAasa	AS1312	1422	dTudAUadAGdGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.13	0.48	
D1313	S1313	331	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1313	1423	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.38	0.74	
D1314	S1314	332	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1314	1424	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.19	0.54	
D1315	S1315	333	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1315	1425	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.55	
D1316	S1316	334	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1316	1426	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.53	
D1317	S1317	335	AfacaGfuGfuUfcUfuGfCufCufUfaUfasAf	AS1317	1427	uUfaUfaGfaGfcAfafaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.55	

【表 1 6】

D1318	S1318	336	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1318	1428	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfguusUfsu	0.10	0.32	0.61
D1319	S1319	337	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1319	1429	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfususu	0.08	0.16	0.53
D1320	S1320	338	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1320	1430	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfususu	0.08	0.16	0.61
D1321	S1321	339	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1321	1431	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.58
D1322	S1322	340	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1322	1432	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.15	0.49	0.84
D1323	S1323	341	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1323	1433	uUfaUfAFGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfususu	0.07	0.20	0.62
D1324	S1324	342	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1324	1434	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfguusUfsu	0.08	0.25	0.78
D1325	S1325	343	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1325	1435	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfguusUfsu	0.08	0.18	0.80
D1326	S1326	344	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1326	1436	uUfauaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.07	0.21	0.66
D1327	S1327	345	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1327	1437	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.10	0.31	0.70
D1328	S1328	346	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfauasAf	AS1328	1438	uUfAUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfguusUfsu	0.07	0.15	0.55
D1329	S1329	347	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1329	1439	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.71
D1330	S1330	348	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1330	1440	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.09	0.27	0.76
D1331	S1331	349	AfaCfaGfugufUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1331	1441	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.07	0.21	0.65
D1332	S1332	350	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1332	1442	uUfaUfAFGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfguusUfsu	0.07	0.17	0.53
D1333	S1333	351	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1333	1443	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.08	0.25	0.73
D1334	S1334	352	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1334	1444	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.54
D1335	S1335	353	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1335	1445	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfususu	0.14	0.38	0.57
D1336	S1336	354	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1336	1446	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.16	0.50	0.96
D1337	S1337	355	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfauasAf	AS1337	1447	uUfAUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.54
D1338	S1338	356	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1338	1448	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfguusUfsu	0.08	0.20	0.69
D1339	S1339	357	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1339	1449	uUfaUfaGfaGfcAfagaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.55
D1340	S1340	358	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1340	1450	uUfaUfAFGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.57
D1341	S1341	359	AfaCfaGfugufUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1341	1451	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfususu	0.08	0.22	0.63
D1342	S1342	360	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1342	1452	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfguusUfsu	0.21	0.56	0.86
D1343	S1343	361	AfacagfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1343	1453	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.14	0.37	0.73
D1344	S1344	362	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1344	1454	uUfaUfaGfaGfaaGfaAfCfaAfCfaUfgUfusUfsu	0.08	0.20	0.66

【表 1 7】

D1345	S1345	363	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1345	1455	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.12	0.34	0.73
D1346	S1346	364	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1346	1456	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.42	0.90
D1347	S1347	365	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1347	1457	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.17	0.43	0.85
D1348	S1348	366	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1348	1458	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.08	0.21	0.58
D1349	S1349	367	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1349	1459	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.21	0.39	0.88
D1350	S1350	368	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1350	1460	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.52
D1351	S1351	369	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1351	1461	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.08	0.21	0.58
D1352	S1352	370	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1352	1462	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.18	0.49	0.84
D1353	S1353	371	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1353	1463	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.25	0.68
D1354	S1354	372	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1354	1464	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.52
D1355	S1355	373	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1355	1465	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.26	0.63
D1356	S1356	374	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1356	1466	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.33	0.79
D1357	S1357	375	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1357	1467	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfusUfsUf	0.09	0.19	0.51
D1358	S1358	376	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1358	1468	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.22	0.48	0.71
D1359	S1359	377	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1359	1469	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.10	0.17	0.61
D1360	S1360	378	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1360	1470	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.40	0.87
D1361	S1361	379	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1361	1471	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.52
D1362	S1362	380	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1362	1472	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.28	0.81
D1363	S1363	381	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1363	1473	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.16	0.68
D1364	S1364	382	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1364	1474	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.26	0.67
D1365	S1365	383	aaCaguguuucugcucuaaasa	AS1365	1475	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.20	0.59	0.95
D1366	S1366	384	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1366	1476	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.53
D1367	S1367	385	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1367	1477	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.08	0.16	0.53
D1368	S1368	386	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1368	1478	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.54
D1369	S1369	387	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1369	1479	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.23	0.56	0.89
D1370	S1370	388	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1370	1480	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.55
D1371	S1371	389	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1371	1481	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.58

【 0 3 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 8】

D1372	S1372	390	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1372	1482	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.15	0.56
D1373	S1373	391	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1373	1483	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.21	0.51	0.89
D1374	S1374	392	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1374	1484	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.21	0.64
D1375	S1375	393	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1375	1485	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.15	0.40	0.94
D1376	S1376	394	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1376	1486	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.40	0.96
D1377	S1377	395	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1377	1487	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.64
D1378	S1378	396	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1378	1488	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.18	0.50	0.97
D1379	S1379	397	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1379	1489	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.24	0.79
D1380	S1380	398	aaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1380	1490	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.58
D1381	S1381	399	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1381	1491	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.34	0.96
D1382	S1382	400	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1382	1492	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.18	0.69
D1383	S1383	401	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1383	1493	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.38	0.85
D1384	S1384	402	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1384	1494	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.54
D1385	S1385	403	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1385	1495	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.20	0.75
D1386	S1386	404	aaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1386	1496	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.25	0.56	0.90
D1387	S1387	405	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1387	1497	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.70
D1388	S1388	406	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1388	1498	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.14	0.60
D1389	S1389	407	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1389	1499	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.62
D1390	S1390	408	aaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1390	1500	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.27	0.76
D1391	S1391	409	aaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1391	1501	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.18	0.36	0.81
D1392	S1392	410	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1392	1502	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.55
D1393	S1393	411	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1393	1503	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.57
D1394	S1394	412	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1394	1504	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.26	0.68	1.06
D1395	S1395	413	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1395	1505	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.18	0.58
D1396	S1396	414	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1396	1506	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.27	0.73
D1397	S1397	415	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1397	1507	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.20	0.51	0.73
D1398	S1398	416	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1398	1508	uUfaUaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.34	0.86

【表 19】

D1399	S1399	417	dAacadGugudTcuudGcurcdTaaudA	AS1399	1509	udTdAdTdAdGdAdGcdAdAdGadAdCdAcdTdGdTusdTsu	0.24	0.42	0.82
D1400	S1400	418	AfaCfaAfugFuUfcUfuGfdCdAdCdTaUfasAf	AS1400	1510	uUfaUfdAdGdAdGcAfaGfaGfcAfcAfguUfusUfsu	0.49	0.85	0.78
D1401	S1401	419	AfaCfaAfugFuUfcUfudGdCdAdCUfaUfasAf	AS1401	1511	uUfaUfadGdAdGdCAfaGfaGfcAfcAfguUfusUfsu	0.67	0.83	0.85
D1402	S1402	420	aaCfAfguGfuUfcUfugCfUfcfuaUfAfsa	AS1402	1512	uUfaUfaUfagaGfCfaaGfAfacAfCfugUfUfsusu	0.18	0.47	0.80
D1403	S1403	421	AfaCfaAfugFuUfcUfuGfdAdCUfadTdAsAf	AS1403	1513	udTdAUfadGdAGfcAfaGfaGfcAfcAfguUfusUfsu	0.73	0.89	0.77
D1404	S1404	422	aaAgugUucuuUgcuCuaauAasa	AS1404	1514	uUaUagAGCaAGaACaCuGUUususu	0.12	0.39	0.79
D1405	S1405	423	AacaGugUucuuGcurcUauasa	AS1405	1515	uUaUaGAGCaAGaACaCuGUJusUsu	0.12	0.37	0.77
D1406	S1406	424	AfaCfaAfugFuUfcUfudGdCAfcAfcdTdAdTdAsAf	AS1406	1516	udTdAUfaGfadGdCAfaGfaGfcAfcAfguUfusUfsu	0.59	0.93	0.89
D1407	S1407	425	aACagUGuucUugCUcuAUasa	AS1407	1517	UUauAGagCAagAAcaCUguUusUsu	0.09	0.16	0.55
D1408	S1408	426	AfaCfaAfugFuUfcUfuGfcAfcdTdAdTdAsAf	AS1408	1518	udTdAdTdAGfaGfcAfaGfaAfcAfcAfguUfusUfsu	0.22	0.64	0.86
D1409	S1409	427	aaCAGuGUucUugCUcuAUasa	AS1409	1519	uUaUAagaGCaaGAacACugUUususu	0.13	0.31	0.76
D1410	S1410	428	AfaCfaAfugFuUfcUfuGfcAfcdTdAdTdAsAf	AS1410	1520	udTdAdTdAdGaGfcAfaGfaGfcAfcAfguUfusUfsu	0.77	0.94	0.93
D1411	S1411	429	aaAfugUfucuuUfgcuCfuaufAfsa	AS1411	1521	uUfaUfAfagAfGfCfaAfGfAfaCfaCfugUfUfsusu	0.23	0.53	1.04
D1412	S1412	430	aacdAgugdTucudTgcurdCuauadAasa	AS1412	1522	udTdAdTdAgadGdCadAdGdAdCdAdCudGdTususu	0.30	0.64	0.90
D1413	S1413	431	AfaCfaGfugFuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1413	1523	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.19	0.63
D1414	S1414	432	AfaCfaGfugFuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1414	1524	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaaAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.28	0.66
D1415	S1415	433	AfaCfaGfugFuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1415	1525	UfUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.53
D1416	S1416	434	aacaguguuucugcucuaaasa	AS1416	1526	UfUfaUfAfagAfGfCfAfAfGfAfAfCfAfCfUfGfUfusu	0.20	0.53	0.99
D1417	S1417	435	AfaCfaGfugFuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1417	1527	UfUfaaaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.53
D1418	S1418	436	aaAfCfagUfgfuUfcUfugCfUfcuAfufasa	AS1418	1528	UfUfaaUfGfagCfAfagAfAfcaCfUfguUfusUfsu	0.08	0.20	0.70
D1419	S1419	437	AfaCfaGfugFuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1419	1529	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfusUfsUf	0.08	0.20	0.70
D1420	S1420	438	GfaCfuUfcUfcUfcUfcUfcAfugGfaCfcUfl96	AS1420	1530	aGfgUfccAfCfcUfGfgagGfaGfaAfguUfcsCfsc			
D1421	S1421	439	GfaCfuUfcUfcUfcUfcUfcUfgGfaCfcUfl96	AS1421	1531	aGfgUfccuCfuGfgagGfaGfaAfguUfcsCfsc			
D1422	S1422	440	AfcUfuCfcUfcUfcCfaGfuggAfCfcUgfl96	AS1422	1532	cAfGgUfcCfAfCfUfggaGfagAfagAfagUfcsCfsc			
D1423	S1423	441	AfcUfuCfcUfcUfcCfaGfugGfGfAfCfcUgfl96	AS1423	1533	cAfGgUfccAfCfcUfggaGfagAfagAfagUfcsCfsc			
D1424	S1424	442	CfuUfcUfcUfcUfcUfcUfgGfaCfcUfgAfL96	AS1424	1534	uCfaGfgUfcCfAfCfUfggaGfagAfagAfagUfcsCfsc			
D1425	S1425	443	CfuUfcUfcUfcUfcUfcUfgGfAfCfcUfgAfL96	AS1425	1535	uCfaGfgucCfaCfuggAfagGfaGfaAfagUfcsCfsc			

【表 2 1】

D1453	S1453	471	GfaCfcUfgAfaGfGfAfcGfaGfGfGfaUfgGfl96	AS1453	1563	cCfaUfcccUfcGfuuccUfuCfaGfGfUfcsCfsa			
D1454	S1454	472	AfcCfuGfaAfgGfAfcGfAfgGfaUfgGfl96	AS1454	1564	cCfaAfuCfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1455	S1455	473	AfcCfuGfaAfgGfAfcGfAfgGfaUfgGfl96	AS1455	1565	cCfaAfuCfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1456	S1456	474	CfcUfgAfaGfGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1456	1566	uCfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1457	S1457	475	CfcUfgAfaGfGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1457	1567	uCfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1458	S1458	476	CfuGfaAfgGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1458	1568	aUfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1459	S1459	477	CfuGfaAfgGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1459	1569	aUfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1460	S1460	478	UfgAfaGfGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1460	1570	aAfuCfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1461	S1461	479	UfgAfaGfGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1461	1571	aAfuCfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1462	S1462	480	GfaAfgGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1462	1572	aAfuCfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1463	S1463	481	GfaAfgGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1463	1573	aAfuCfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1464	S1464	482	AfaGfAfcGfAfcGfGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1464	1574	gAfaAfuCfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1465	S1465	483	AfaGfAfcGfAfcGfGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1465	1575	gAfaAfuCfcCfaUfcCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1466	S1466	484	AfgGfaCfcGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1466	1576	uGfaAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1467	S1467	485	AfgGfaCfcGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1467	1577	uGfaAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1468	S1468	486	GfgAfcGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1468	1578	aUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1469	S1469	487	GfgAfcGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1469	1579	aUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1470	S1470	488	GfaCfcGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1470	1580	cAfuGfaAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1471	S1471	489	GfaCfcGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1471	1581	cAfuGfaAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1472	S1472	490	AfcGfaGfGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1472	1582	aCfaUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1473	S1473	491	AfcGfaGfGfAfcGfAfgGfGfaUfgGfl96	AS1473	1583	aCfaUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1474	S1474	492	CfgAfgGfAfuGfGfGfAfuUfuCfaUfgGfl96	AS1474	1584	uAfaUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1475	S1475	493	CfgAfgGfAfuGfGfGfAfuUfuCfaUfgGfl96	AS1475	1585	uAfaUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1476	S1476	494	GfaGfGfAfuGfGfGfAfuUfuCfaUfgGfl96	AS1476	1586	uUfaCfaUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1477	S1477	495	GfaGfGfAfuGfGfGfAfuUfuCfaUfgGfl96	AS1477	1587	uUfaCfaUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1478	S1478	496	AfgGfAfuGfGfGfAfuUfuCfaUfgGfl96	AS1478	1588	gUfuAfaUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			
D1479	S1479	497	AfgGfAfuGfGfGfAfuUfuCfaUfgGfl96	AS1479	1589	gUfuAfaUfgAfaUfcCfcAfuCfcUfcGfuCfcUfcAfgGfUfcsCfsc			

【表 2 2】

D1480	S1480	498	GfgGfaUfgGfgAfuUfuCfaugUfaAfcCfl96	AS1480	1590	gGfuUfaCfaUfgAfaauCfcCfaUfcCfcsUfsc			
D1481	S1481	499	GfgGfaUfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfl96	AS1481	1591	gGfuUfaCfaUfgAfaauCfcCfaUfcCfcsUfsc			
D1482	S1482	500	GfgAfuGfgGfaUfuUfcAfuGfaAfcCfaAfl96	AS1482	1592	uGfgUfuAfcAfuGfaaaUfcCfcAfuCfcsCfsu			
D1483	S1483	501	GfgAfuGfgGfaUfuUfcAfuGfaAfcCfaAfl96	AS1483	1593	uGfgUfuacAfuGfaaaUfcCfcAfuCfcsCfsu			
D1484	S1484	502	GfaUfgGfgAfuUfuCfaUfguaAfcCfaAfl96	AS1484	1594	uUfgGfuUfaCfaUfgaaAfuCfcCfaUfcsCfsc			
D1485	S1485	503	GfaUfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfl96	AS1485	1595	uUfgGfuuaCfaUfgaaAfuCfcCfaUfcsCfsc			
D1486	S1486	504	AfuGfgGfaUfuUfcAfuGfuuaCfcAfaGfl96	AS1486	1596	cUfuGfgUfuAfcAfuGfaAfuUfcCfcAfuCfsc			
D1487	S1487	505	AfuGfgGfaUfuUfcAfuGfuAfcCfaAfaGfl96	AS1487	1597	cUfuGfguuAfcAfuGfaAfuUfcCfcAfuCfsc			
D1488	S1488	506	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaaCfaAfgAfl96	AS1488	1598	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc			
D1489	S1489	507	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfaGfl96	AS1489	1599	uCfuUfgguUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc			
D1490	S1490	508	GfgGfaUfuUfcAfuGfuAfaCfaAfaGfaGfl96	AS1490	1600	cUfcUfuGfgUfuAfcuGfaAfuUfcCfcsAfsu			
D1491	S1491	509	GfgGfaUfuUfcAfuGfuAfaCfaAfaGfaGfl96	AS1491	1601	cUfcUfuggUfuAfcuGfaAfuUfcCfcsAfsu			
D1492	S1492	510	GfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcAfaAfgUfl96	AS1492	1602	aCfuCfuUfgGfuUfacaUfgAfaAfuCfcsCfsa			
D1493	S1493	511	GfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcAfaAfgUfl96	AS1493	1603	aCfuCfuugGfuUfacaUfgAfaAfuCfcsCfsa			
D1494	S1494	512	GfaUfuUfcAfuGfuAfaCfaaGfaGfaAfl96	AS1494	1604	uAfcUfcUfuUfgGfuUfuacAfuGfaAfuUfcsCfsc			
D1495	S1495	513	GfaUfuUfcAfuGfuAfaCfaAfaGfaAfl96	AS1495	1605	uAfcUfcuuGfgUfuacAfuGfaAfuUfcsCfsc			
D1496	S1496	514	AfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaaGfaUfl96	AS1496	1606	aUfaCfuCfuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfuCfsc			
D1497	S1497	515	AfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfaGfaUfl96	AS1497	1607	aUfaCfuuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfuCfsc			
D1498	S1498	516	UfuUfcAfuGfuAfaCfaAfaGfaUfl96	AS1498	1608	aAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfuGfaAfasUfsc			
D1499	S1499	517	UfuUfcAfuGfuAfaCfaAfaGfaUfl96	AS1499	1609	aAfuAfcuUfuGfguuAfcAfuGfaAfasUfsc			
D1500	S1500	518	UfuCfaUfgUfaAfcCfaAfaGfaUfl96	AS1500	1610	gAfaUfaCfuUfcUfuUfgguUfaCfaUfgAfasAfsu			
D1501	S1501	519	UfuCfaUfgUfaAfcCfaAfaGfaUfl96	AS1501	1611	gAfaUfaCfuUfgguUfaCfaUfgAfasAfsu			
D1502	S1502	520	UfcAfuGfuAfaCfaAfaGfaUfscCfl96	AS1502	1612	gGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfuGfasAfsa			
D1503	S1503	521	UfcAfuGfuAfaCfaAfaGfaUfscCfl96	AS1503	1613	gGfaAfuacUfcUfuggUfuAfcAfuGfasAfsa			
D1504	S1504	522	CfaUfgUfaAfcCfaAfaGfaUfscCfl96	AS1504	1614	uGfgAfaUfaCfuCfuugGfuUfaCfaUfgsAfsa			
D1505	S1505	523	CfaUfgUfaAfcCfaAfaGfaUfscCfl96	AS1505	1615	uGfgAfaaCfuCfuugGfuUfaCfaUfgsAfsa			
D1506	S1506	524	AfuGfuAfaCfaAfaGfaGfuuaUfcCfaUfl96	AS1506	1616	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfuGfas			

【表 2 3】

D1507	S1507	S25	AfuGfuAfaCfaCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1507	1617	aUfgGfaaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfcGfsa			
D1508	S1508	526	UfgUfaAfcCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1508	1618	aAfuGfgAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfaCfasUfsg			
D1509	S1509	527	UfgUfaAfcCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1509	1619	aAfuGfgaaUfaCfcUfuUfgGfuUfaCfasUfsg			
D1510	S1510	528	GfuAfaCfaCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1510	1620	aAfuUfgGfaAfaAfcUfuUfgGfuUfaCfasUfsc			
D1511	S1511	529	GfuAfaCfaCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1511	1621	aAfuUfggaAfuAfcUfuUfgGfuUfaCfasUfsc			
D1512	S1512	530	UfaAfcCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1512	1622	aAfaAfuGfgAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasCfsa			
D1513	S1513	531	UfaAfcCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1513	1623	aAfaAfuGfgAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasCfsa			
D1514	S1514	532	AfaCfaCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1514	1624	aAfaAfuUfgGfaAfuAfcUfuUfgGfuUfasUfsc			
D1515	S1515	533	AfaCfaCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1515	1625	aAfaAfuGfgAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasUfsc			
D1516	S1516	534	AfcCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1516	1626	uAfaAfaAfuUfgGfaAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasUfsc			
D1517	S1517	535	AfcCfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1517	1627	uAfaAfaAfuUfgGfaAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasUfsc			
D1518	S1518	536	CfcAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1518	1628	gUfaAfaAfuUfgGfaAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasUfsc			
D1519	S1519	537	CfcAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1519	1629	gUfaAfaAfuUfgGfaAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasUfsc			
D1520	S1520	538	CfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1520	1630	aGfuAfaAfaAfuUfgGfaAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasUfsc			
D1521	S1521	539	CfaAfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1521	1631	aGfuAfaAfaAfuUfgGfaAfaUfaCfcUfuUfgGfuUfasUfsc			
D1522	S1522	540	AfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1522	1632	uAfgUfaAfaAfaUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1523	S1523	541	AfaGfaGfaUfaUfUfcCfaUfL96	AS1523	1633	uAfgUfaAfaAfaUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1524	S1524	542	AfgAfgUfaUfUfcCfaUfL96	AS1524	1634	uUfaGfuAfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1525	S1525	543	AfgAfgUfaUfUfcCfaUfL96	AS1525	1635	uUfaGfuAfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1526	S1526	544	GfaGfuAfuUfcCfaUfL96	AS1526	1636	uUfuAfgUfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1527	S1527	545	GfaGfuAfuUfcCfaUfL96	AS1527	1637	uUfuAfguaAfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1528	S1528	546	AfgUfaUfuCfaAfuUfUfUfcCfaUfL96	AS1528	1638	uUfuUfaGfuAfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1529	S1529	547	AfgUfaUfuCfaAfuUfUfUfcCfaUfL96	AS1529	1639	uUfuUfaguAfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1530	S1530	548	GfuAfuUfcCfaUfUfUfUfcCfaUfL96	AS1530	1640	gCfuUfuAfgUfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1531	S1531	549	GfuAfuUfcCfaUfUfUfUfcCfaUfL96	AS1531	1641	gCfuUfuagUfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1532	S1532	550	UfaUfuCfaAfuUfUfUfUfcCfaUfL96	AS1532	1642	uGfcUfuUfAfgUfaAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			
D1533	S1533	551	UfaUfuCfaAfuUfUfUfUfcCfaUfL96	AS1533	1643	uGfcUfuuaGfuAfaAfuUfggaAfuAfcUfuUfasUfsc			

【表 2 6】

D1588	S1588	606	CfaCfcUfcAfuAfuGfcUfauGfuUfuAfgAfl96	AS1588	1698	uCfuAfaCfaUfaGfcuAfuGfaGfgUfgsAfsa			
D1589	S1589	607	CfaCfcUfcAfuAfuGfcUfauGfuUfuAfgAfl96	AS1589	1699	uCfuAfaCfaUfaGfcuAfuGfaGfgUfgsAfsa			
D1590	S1590	608	AfcCfuCfaUfaUfGfcUfuAfuGfaAfl96	AS1590	1700	uUfcUfaAfcAfuAfgcaUfaUfgAfgGfusGfsa			
D1591	S1591	609	AfcCfuCfaUfaUfGfcUfuAfuGfaAfl96	AS1591	1701	uUfcUfaaCfaUfaGfcUfuAfgAfgGfusGfsa			
D1592	S1592	610	CfcUfcAfuAfuGfcUfauGfuUfuAfgAfl96	AS1592	1702	cUfuCfuAfaCfaUfagcAfuAfuGfaGfgUfsg			
D1593	S1593	611	CfcUfcAfuAfuGfcUfauGfuUfuAfgAfl96	AS1593	1703	cUfuCfuuaCfaUfagcAfuAfuGfaGfgUfsg			
D1594	S1594	612	CfuCfaUfaUfGfcUfuAfuGfuuaGfaAfgUfl96	AS1594	1704	aCfuUfcUfaAfaCfaUagCfaUfaUfgAfgGfsu			
D1595	S1595	613	CfuCfaUfaUfGfcUfuAfuGfuuaGfaAfgUfl96	AS1595	1705	aCfuUfcuaAfcAfuagCfaUfaUfgAfgGfsu			
D1596	S1596	614	UfcAfuAfuGfcUfauGfuUfuagAfaGfuCfl96	AS1596	1706	gAfcUfuCfuAfaCfaCfaGfcAfuAfuGfasGfsg			
D1597	S1597	615	UfcAfuAfuGfcUfauGfuUfuAfaGfaGfuCfl96	AS1597	1707	gAfcUfcuaAfaCfaCfaGfcAfuAfuGfasGfsg			
D1598	S1598	616	CfaUfaUfGfcUfuAfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1598	1708	gGfaCfuUfcUfauAfcuAfgCfaUfaUfgsAfg			
D1599	S1599	617	CfaUfaUfGfcUfuAfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1599	1709	gGfaCfuucUfaAfcuAfgCfaUfaUfgsAfg			
D1600	S1600	618	AfuAfuGfcUfaUfGfuUfuAfgaaGfuCfcfl96	AS1600	1710	uGfgAfcUfUfcUfaAfaCfaUfaGfcAfuAfuGfsa			
D1601	S1601	619	AfuAfuGfcUfaUfGfuUfuAfgAfaGfuCfcfl96	AS1601	1711	uGfgAfcuUfcUfaAfaCfaUfaGfcAfuAfuGfsa			
D1602	S1602	620	UfaUfGfcUfuAfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1602	1712	cUfgGfaCfuUfcUfaaCfaUfaGfcAfuAfuGfsa			
D1603	S1603	621	UfaUfGfcUfuAfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1603	1713	cUfgGfaCfuUfcUfaaCfaUfaGfcAfuAfuGfsa			
D1604	S1604	622	AfuGfcUfaUfGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1604	1714	cCfuGfgAfcUfuCfuuaCfaUfaGfcAfuAfuGfsa			
D1605	S1605	623	AfuGfcUfaUfGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1605	1715	cCfuGfgacUfuCfuuaCfaUfaGfcAfuAfuGfsa			
D1606	S1606	624	UfgCfuAfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1606	1716	gCfcUfgGfaCfuUfcuaAfcAfuAfgCfasUfsa			
D1607	S1607	625	UfgCfuAfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1607	1717	gCfcUfggaCfuUfcuaAfcAfuAfgCfasUfsa			
D1608	S1608	626	GfcUfaUfGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1608	1718	uGfcCfuGfgAfcUfcuaAfaCfaUfaGfcAfsu			
D1609	S1609	627	GfcUfaUfGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1609	1719	uGfcCfuggaAfcUfcuaAfaCfaUfaGfcAfsu			
D1610	S1610	628	CfuAfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1610	1720	cUfgCfcUfGfgAfcUfcuaAfaCfaUfaGfcAfsu			
D1611	S1611	629	CfuAfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1611	1721	cUfgCfcugGfaCfuucUfaAfaCfaUfaGfcAfsu			
D1612	S1612	630	UfaUfGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1612	1722	uCfuGfcCfuUfGfgAfcuUfcuaAfaCfaUfaGfsc			
D1613	S1613	631	UfaUfGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1613	1723	uCfuGfcuGfgAfcuUfcuaAfaCfaUfaGfsc			
D1614	S1614	632	AfuGfuUfagaAfgUfcfl96	AS1614	1724	cUfcUfgCfcUfgGfaCfuUfcuaAfaCfaUfaGfsc			

【表 27】

D1615	S1615	633	AfuGfuUfaGfaAfaGfuUfcCfaGfGfCfaGfaGfl96	AS1615	1725	cUfcUfgccUfgGfacuUfcUfaAfaAfaAfsag		
D1616	S1616	634	UfgUfuAfgAfaGfuUfcCfaAfgacAfaAfaAfl96	AS1616	1726	uCfuCfuGfCfcUfgGacUfuCfuAfaCfasUfsa		
D1617	S1617	635	UfgUfuAfgAfaGfuUfcCfaAfgCfaAfaAfl96	AS1617	1727	uCfuCfugCfuGfGacUfuCfuAfaCfasUfsa		
D1618	S1618	636	GfuUfaGfaAfaUfcCfaGfGcaGfaGfaCfl96	AS1618	1728	gUfcUfcUfgCfcUfgGcaCfuUfcUfaAfaAfsu		
D1619	S1619	637	GfuUfaGfaAfaUfcCfaGfGcaGfaGfaCfl96	AS1619	1729	gUfcUfcUfgCfcUfgGcaCfuUfcUfaAfaAfsu		
D1620	S1620	638	UfuAfgAfaGfuCfaAfgCfagAfaAfaAfl96	AS1620	1730	uGfuCfuCfuUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1621	S1621	639	UfuAfgAfaGfuCfaAfgCfagAfaAfaAfl96	AS1621	1731	uGfuCfuCfuUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1622	S1622	640	UfaGfaAfaUfcCfaAfgCfagAfaAfaAfl96	AS1622	1732	uUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1623	S1623	641	UfaGfaAfaUfcCfaAfgCfagAfaAfaAfl96	AS1623	1733	uUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1624	S1624	642	AfgAfaGfuCfaAfgCfagAfaAfaAfl96	AS1624	1734	aUfuGfuCfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1625	S1625	643	AfgAfaGfuCfaAfgCfagAfaAfaAfl96	AS1625	1735	aUfuGfuCfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1626	S1626	644	GfaAfgUfcCfaGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1626	1736	uAfuUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1627	S1627	645	GfaAfgUfcCfaGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1627	1737	uAfuUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1628	S1628	646	AfaGfuCfaAfgCfagAfaGfaAfaAfl96	AS1628	1738	uUfaUfuGfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1629	S1629	647	AfaGfuCfaAfgCfagAfaGfaAfaAfl96	AS1629	1739	uUfaUfuGfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1630	S1630	648	AfgUfcCfaGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1630	1740	uUfuAfuUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1631	S1631	649	AfgUfcCfaGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1631	1741	uUfuAfuUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1632	S1632	650	GfuCfaAfgGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1632	1742	uUfuUfaUfuGfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1633	S1633	651	GfuCfaAfgGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1633	1743	uUfuUfaUfuGfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1634	S1634	652	UfcCfaGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1634	1744	gUfuUfuAfuUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1635	S1635	653	UfcCfaGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1635	1745	gUfuUfuAfuUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1636	S1636	654	CfaAfgGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1636	1746	uGfuUfuUfaUfuGfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1637	S1637	655	CfaAfgGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1637	1747	uGfuUfuUfaUfuGfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1638	S1638	656	CfaGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1638	1748	aUfgUfuUfuAfuUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1639	S1639	657	CfaGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1639	1749	aUfgUfuUfuAfuUfgUfcUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1640	S1640	658	AfgGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1640	1750	aAfuGfuUfuUfaUfuGfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		
D1641	S1641	659	AfgGfGfCfaGfaGfaAfaAfl96	AS1641	1751	aAfuGfuUfuUfaUfuGfuUfcUfgCfcUfgGacUfuCfuAfaAfsa		

【表 28】

D1642	S1642	660	GfgCfaGfaGfaCfaAfaAfaaCfaUfuCfl96	AS1642	1752	gAfaUfgUfuUfuAfaUfuUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsg				
D1643	S1643	661	GfgCfaGfaGfaCfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1643	1753	gAfaUfguuUfuAfaUfuUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsg				
D1644	S1644	662	GfcAfgAfgAfaAfaUfaAfaaCfaUfuCfl96	AS1644	1754	gGfaAfuGfuUfuUfaUfuUfaUfuGfuCfuGfcsCfsu				
D1645	S1645	663	GfcAfgAfgAfaAfaUfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1645	1755	gGfaAfuGfuUfuUfaUfuUfaUfuGfuCfuGfcsCfsu				
D1646	S1646	664	CfaGfaGfaCfaAfaUfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1646	1756	aGfgAfaUfgUfuUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfsc				
D1647	S1647	665	CfaGfaGfaCfaAfaUfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1647	1757	aGfgAfaUfgUfuUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfsc				
D1648	S1648	666	AfgAfgAfaAfaUfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1648	1758	cAfgGfaAfuGfuUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsGfsc				
D1649	S1649	667	AfgAfgAfaAfaUfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1649	1759	cAfgGfaaGfuUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsGfsc				
D1650	S1650	668	GfaGfaCfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1650	1760	aCfaGfgAfaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsg				
D1651	S1651	669	GfaGfaCfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1651	1761	aCfaGfgaaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsg				
D1652	S1652	670	AfgAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1652	1762	cAfaAfgGfaAfaUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsCfsu				
D1653	S1653	671	AfgAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1653	1763	cAfaAfggaAfaUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsCfsu				
D1654	S1654	672	GfaCfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1654	1764	uCfaCfaGfgAfaUfguuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1655	S1655	673	GfaCfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1655	1765	uCfaCfaggAfaUfguuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1656	S1656	674	AfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1656	1766	uUfaAfaCfaGfaAfaUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsCfsu				
D1657	S1657	675	AfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1657	1767	uUfaAfaCfaGfaAfaUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsCfsu				
D1658	S1658	676	CfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1658	1768	uUfaCfaCfaGfgAfaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1659	S1659	677	CfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1659	1769	uUfaCfaCfaGfgAfaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1660	S1660	678	AfaUfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1660	1770	cUfuUfaCfaCfaGfgAfaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1661	S1661	679	AfaUfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1661	1771	cUfuUfaCfaCfaGfgAfaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1662	S1662	680	AfaUfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1662	1772	cCfuUfuCfaCfaGfgaaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsg				
D1663	S1663	681	AfaUfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1663	1773	cCfuUfuCfaCfaGfgaaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsg				
D1664	S1664	682	UfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1664	1774	gCfuUfuCfaCfaAfaGfgaaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1665	S1665	683	UfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1665	1775	gCfuUfuCfaCfaAfaGfgaaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1666	S1666	684	AfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1666	1776	uGfcCfuUfuCfaCfaGfgaaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1667	S1667	685	AfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1667	1777	uGfcCfuUfuCfaCfaGfgaaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				
D1668	S1668	686	AfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaCfaUfuCfl96	AS1668	1778	gUfgCfuUfuCfaCfaGfgaaUfgUfuUfaUfuUfgUfcUfcUfgCfcsUfsc				

【表 29】

D1669	S1669	687	AfaAfaUfcCfuUfcGfuGfaAfaGfcGfaCfl96	AS1669	1779	gUfgCfuUfcAfcagGfaAfuGfuUfusUfsa			
D1670	S1670	688	AfaCfaUfuCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1670	1780	aGfuGfcCfuUfuCfacaGfcAfaUfgUfusUfsu			
D1671	S1671	689	AfaCfaUfuCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1671	1781	aGfuGfcCfuUfuCfacaGfcAfaUfgUfusUfsu			
D1672	S1672	690	AfaCfaUfuCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1672	1782	aAfgUfgCfuUfuUfcacAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1673	S1673	691	AfaCfaUfuCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1673	1783	aAfgUfgCfuUfuUfcacAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1674	S1674	692	CfaUfuCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1674	1784	aAfaGfuGfcCfuUfucaCfaGfcAfaUfgsUfsu			
D1675	S1675	693	CfaUfuCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1675	1785	aAfaGfuGfcCfuUfucaCfaGfcAfaUfgsUfsu			
D1676	S1676	694	AfuUfcCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1676	1786	aAfaAfgUfgCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1677	S1677	695	AfuUfcCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1677	1787	aAfaAfgUfgCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1678	S1678	696	UfuCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1678	1788	gAfaAfaGfuGfcCfuUfucaCfaGfcAfaUfgsUfsu			
D1679	S1679	697	UfuCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1679	1789	gAfaAfaGfuGfcCfuUfucaCfaGfcAfaUfgsUfsu			
D1680	S1680	698	UfcCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1680	1790	uGfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1681	S1681	699	UfcCfuUfcGfuUfcGfaAfaGfcAfcUfl96	AS1681	1791	uGfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1682	S1682	700	CfcUfgUfgAfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1682	1792	aUfgAfaAfaGfuGfcCfuUfucaCfaGfcAfaUfgsUfsu			
D1683	S1683	701	CfcUfgUfgAfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1683	1793	aUfgAfaAfaGfuGfcCfuUfucaCfaGfcAfaUfgsUfsu			
D1684	S1684	702	CfuGfuGfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1684	1794	aAfuGfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1685	S1685	703	CfuGfuGfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1685	1795	aAfuGfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1686	S1686	704	UfgUfgAfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1686	1796	gAfaUfgAfaAfaGfuGfcCfuUfucaCfaGfcAfaUfgsUfsu			
D1687	S1687	705	UfgUfgAfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1687	1797	gAfaUfgAfaAfaGfuGfcCfuUfucaCfaGfcAfaUfgsUfsu			
D1688	S1688	706	GfuGfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1688	1798	gGfaAfuGfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1689	S1689	707	GfuGfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1689	1799	gGfaAfuGfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1690	S1690	708	UfgAfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1690	1800	uGfgAfaUfgAfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1691	S1691	709	UfgAfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1691	1801	uGfgAfaUfgAfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1692	S1692	710	GfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1692	1802	gUfgGfaAfuGfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1693	S1693	711	GfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1693	1803	gUfgGfaAfuGfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1694	S1694	712	AfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1694	1804	aGfuGfaAfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			
D1695	S1695	713	AfaAfaGfcAfcUfuUfuCfaUfl96	AS1695	1805	aGfuGfaAfaAfaAfaGfuGfcCfuUfucaAfcAfgGfaAfuGfusUfsu			

【表 3 0】

D1696	S1696	714	AfaGfgCfaCfuUfuUfCfaUfuUfCfaUfuUfL96	AS1696	1806	aAfgUfgGfAfaUgfaaaAfgUfgCfcUfusUfsc			
D1697	S1697	715	AfaGfgCfaCfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1697	1807	aAfgUfggaAfuGfaaaAfgUfgCfcUfusUfsc			
D1698	S1698	716	AfgGfcAfcUfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1698	1808	aAfaGfuGfGfAfaUfgaaAfaGfuGfcCfusUfsu			
D1699	S1699	717	AfgGfcAfcUfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1699	1809	aAfaGfuggAfaUfgaaAfaGfuGfcCfusUfsu			
D1700	S1700	718	GfgCfaCfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1700	1810	uAfaAfgUfgGfAfaUfgaaAfaGfuGfcCfusUfsu			
D1701	S1701	719	GfgCfaCfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1701	1811	uAfaAfgugGfaAfuGaAfaAfgUfgCfcUfsu			
D1702	S1702	720	GfcAfcUfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1702	1812	uUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaGfuGfcCfusUfsu			
D1703	S1703	721	GfcAfcUfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1703	1813	uUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaGfuGfcCfusUfsu			
D1704	S1704	722	CfaCfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1704	1814	gUfuAfaAfgUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfgCfcsc			
D1705	S1705	723	CfaCfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1705	1815	gUfuAfaagUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfgCfcsc			
D1706	S1706	724	AfcUfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1706	1816	aGfuUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaGfuGfcsc			
D1707	S1707	725	AfcUfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1707	1817	aGfuUfaaaGfuGfAfaUfgaaAfaGfuGfcsc			
D1708	S1708	726	CfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1708	1818	aAfgUfuAfaAfgUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1709	S1709	727	CfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1709	1819	aAfgUfuuaAfgUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1710	S1710	728	UfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1710	1820	cAfaGfuUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1711	S1711	729	UfuUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1711	1821	cAfaGfuuaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1712	S1712	730	UfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1712	1822	uCfaAfgUfuUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1713	S1713	731	UfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1713	1823	uCfaAfguuAfaAfgUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1714	S1714	732	UfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1714	1824	aUfCfaGfUfuUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1715	S1715	733	UfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1715	1825	aUfCfaaguUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1716	S1716	734	UfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1716	1826	aAfuCfaAfgUfuUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1717	S1717	735	UfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1717	1827	aAfuCfaagUfuUfaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1718	S1718	736	CfaUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1718	1828	aAfaUfCfaAfgUfuUfaaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1719	S1719	737	CfaUfuUfCfaUfuUfCfaCfuUfL96	AS1719	1829	aAfaUfcaaGfuUfaaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1720	S1720	738	AfuUfCfaCfuUfuUfCfaCfuUfL96	AS1720	1830	aAfaAfuCfaAfgUfuuaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1721	S1721	739	AfuUfCfaCfuUfuUfCfaCfuUfL96	AS1721	1831	aAfaAfucaAfgUfuuaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			
D1722	S1722	740	UfuUfCfaCfuUfuUfCfaCfuUfL96	AS1722	1832	aAfaAfuUfCfaAfgUfuuaAfaGfUfgGfAfaUfgaaAfaAfgUfg			

【表 3 1】

D1723	S1723	741	UfuCfAfcUfuUfaAfcUfuGfAfuUfuUfL96	AS1723	1833	aAfaAfaucAfaGfuuaAfaGfuGfAfasUfsg			
D1724	S1724	742	UfcCfaCfuUfuAfaCfuUfgauUfuUfuUfL96	AS1724	1834	aAfaAfaUfCfaAfguuAfaAfgUfgGfasAfsu			
D1725	S1725	743	UfcCfaCfuUfuAfaCfuUfgAfuUfuUfuUfL96	AS1725	1835	aAfaAfaaUcfaAfguuAfaAfgUfgGfasAfsu			
D1726	S1726	744	CfcAfcUfuUfaAfcUfuGfaUfuUfuUfL96	AS1726	1836	uAfaAfaAfaUfcaAfgUfaAfaGfuGfGfsAfsa			
D1727	S1727	745	CfcAfcUfuUfaAfcUfuGfaUfuUfuUfL96	AS1727	1837	uAfaAfaaaUfcaAfgUfaAfaGfuGfGfsAfsa			
D1728	S1728	746	CfaCfuUfuAfaCfuUfgAfuUfuUfaAfl96	AS1728	1838	uUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1729	S1729	747	CfaCfuUfuAfaCfuUfgAfuUfuUfaAfl96	AS1729	1839	uUfaAfaaaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1730	S1730	748	AfcUfuUfaAfcUfuGfaUfuUfuUfaAfl96	AS1730	1840	uUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1731	S1731	749	AfcUfuUfaAfcUfuGfaUfuUfuUfaAfl96	AS1731	1841	uUfaAfaaaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1732	S1732	750	CfuUfuAfaCfuUfgAfuUfuUfaAfl96	AS1732	1842	aUfuUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1733	S1733	751	CfuUfuAfaCfuUfgAfuUfuUfaAfl96	AS1733	1843	aUfuUfaaaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1734	S1734	752	UfuUfaAfcUfuGfaUfuUfuUfaAfl96	AS1734	1844	aAfuUfuAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1735	S1735	753	UfuUfaAfcUfuGfaUfuUfuUfaAfl96	AS1735	1845	aAfuUfuuaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1736	S1736	754	UfuAfaCfuUfgAfuUfuUfuUfaAfl96	AS1736	1846	gAfaUfuUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1737	S1737	755	UfuAfaCfuUfgAfuUfuUfuUfaAfl96	AS1737	1847	gAfaUfuuaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1738	S1738	756	UfaAfcUfuGfaUfuUfuUfuUfaAfl96	AS1738	1848	gGfaAfuUfuUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1739	S1739	757	UfaAfcUfuGfaUfuUfuUfaAfl96	AS1739	1849	gGfaAfuuaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1740	S1740	758	AfaCfuUfgAfuUfuUfuUfaAfl96	AS1740	1850	gGfgAfaUfuUfuUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1741	S1741	759	AfaCfuUfgAfuUfuUfuUfaAfl96	AS1741	1851	gGfgAfauuUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1742	S1742	760	AfcUfuGfaUfuUfuUfaAfl96	AS1742	1852	aGfgGfaAfuUfuUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1743	S1743	761	AfcUfuGfaUfuUfuUfaAfl96	AS1743	1853	aGfgGfaaUfuUfaAfaAfaAfuCfaagUfuAfaAfgUfGfsGfsa			
D1744	S1744	762	CfuUfgAfuUfuUfaAfaAfuCfcUfuUfL96	AS1744	1854	aAfgGfgAfaUfuUfaAfaAfaAfuCfaAfgsUfsu			
D1745	S1745	763	CfuUfgAfuUfuUfaAfaAfuCfcUfuUfL96	AS1745	1855	aAfgGfgaaUfuUfaAfaAfaAfuCfaAfgsUfsu			
D1746	S1746	764	UfuGfaUfuUfuUfaAfaAfuCfcUfuUfL96	AS1746	1856	uAfaGfgGfAfaUfuUfaAfaAfaAfuCfaAfgsUfsu			
D1747	S1747	765	UfuGfaUfuUfuUfaAfaAfuCfcUfuUfL96	AS1747	1857	uAfaGfggaAfuUfuUfaAfaAfaAfuCfaAfgsUfsu			
D1748	S1748	766	UfgAfuUfuUfaAfaAfuCfcUfuUfL96	AS1748	1858	aUfaAfgGfgAfaUfuUfaAfaAfaAfuCfaAfgsUfsu			
D1749	S1749	767	UfgAfuUfuUfaAfaAfuCfcUfuUfL96	AS1749	1859	aUfaAfgggAfaUfuUfaAfaAfaAfuCfaAfgsUfsu			

【表 3 2】

D1750	S1750	768	GfaUfuUfuUfaAfaAfaUfcccUfuAfuUfl96	AS1750	1860	aAfaUfaGfGfGfaAfuUfaAfaUfcsAfsa			
D1751	S1751	769	GfaUfuUfuUfaAfaAfaUfcCfcUfuAfuUfl96	AS1751	1861	aAfaUfaggGfaAfuUfaAfaUfcsAfsa			
D1752	S1752	770	AfuUfuUfuUfaAfaAfaUfcCfcUfuAfuUfl96	AS1752	1862	cAfaUfaAfaGfGfaAfuUfaAfaAfsCfsa			
D1753	S1753	771	AfuUfuUfuUfaAfaAfaUfcCfcUfuAfuUfl96	AS1753	1863	cAfaUfaagGfGfaAfuUfaAfaAfsCfsa			
D1754	S1754	772	UfuUfuUfuAfaAfaUfuUfcCfcUfuAfuUfl96	AS1754	1864	aCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuAfaAfaAfsUfsc			
D1755	S1755	773	UfuUfuUfuAfaAfaUfuUfcCfcUfuAfuUfl96	AS1755	1865	aCfaAfaUfaGfGfaUfuAfaAfaAfsUfsc			
D1756	S1756	774	UfuUfuUfaAfaAfaUfuUfcCfcUfuAfuUfl96	AS1756	1866	gAfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfaAfsAfsu			
D1757	S1757	775	UfuUfuUfaAfaAfaUfuUfcCfcUfuAfuUfl96	AS1757	1867	gAfaAfaUfaGfGfaUfuUfaAfaAfsAfsu			
D1758	S1758	776	UfuUfuAfaAfaUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1758	1868	gGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuAfaAfsAfsa			
D1759	S1759	777	UfuUfuAfaAfaUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1759	1869	gGfaCfaUfaAfaGfGfaUfuAfaAfsAfsa			
D1760	S1760	778	UfuUfaAfaUfuUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1760	1870	gGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1761	S1761	779	UfuUfaAfaUfuUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1761	1871	gGfaCfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1762	S1762	780	UfuAfaAfaUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1762	1872	aGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1763	S1763	781	UfuAfaAfaUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1763	1873	aGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1764	S1764	782	UfaAfaUfuCfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1764	1874	aAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1765	S1765	783	UfaAfaUfuCfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1765	1875	aAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1766	S1766	784	AfaAfaUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1766	1876	gAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1767	S1767	785	AfaAfaUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1767	1877	gAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1768	S1768	786	AfaUfuCfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1768	1878	gGfaAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1769	S1769	787	AfaUfuCfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1769	1879	gGfaAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1770	S1770	788	AfuUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1770	1880	uGfGfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1771	S1771	789	AfuUfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1771	1881	uGfGfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1772	S1772	790	UfuCfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1772	1882	uUfgGfaAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1773	S1773	791	UfuCfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1773	1883	uUfgGfaAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1774	S1774	792	UfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1774	1884	uUfuGfaAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1775	S1775	793	UfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1775	1885	uUfuGfaAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			
D1776	S1776	794	CfcCfcUfuAfuUfgUfcCfl96	AS1776	1886	uUfuUfgGfaAfaGfGfaCfaAfaUfaAfaGfGfaUfuUfaAfsAfsa			

【表 3 5】

D1831	S1831	849	GfaAfuCfaAfaAfUfuUfuUfaCfaAfaGfaAfl96	AS1831	1941	uUfcUfuugUfaAfaauUfuUfgAfuUfcsUfsc		
D1832	S1832	850	AfaUfcAfaAfaUfuUfuUfaAfaaAfgAfaUfl96	AS1832	1942	aUfuCfuUfUfgUfaAfaaUfuUfuGfaUfusCfsu		
D1833	S1833	851	AfaUfcAfaAfaUfuUfuUfaAfaAfaAfgAfaUfl96	AS1833	1943	aUfuCfuUfuGfaAfaaUfuUfuGfaUfusCfsu		
D1834	S1834	852	AfuCfaAfaAfuUfuUfuUfaAfaaGfaAfuCfl96	AS1834	1944	gAfuUfcUfuUfgUfaaAfaUfuUfuUfgAfuUfsc		
D1835	S1835	853	AfuCfaAfaAfuUfuUfuUfaAfaAfaAfgAfaUfl96	AS1835	1945	gAfuUfcUfuUfgUfaaAfaUfuUfuUfgAfuUfsc		
D1836	S1836	854	UfcAfaAfaUfuUfuUfaAfaaAfaUfcAfl96	AS1836	1946	uGfaUfuCfuUfuGfaaAfaUfuUfuGfasUfsu		
D1837	S1837	855	UfcAfaAfaUfuUfuUfaAfaAfaAfgAfaUfcAfl96	AS1837	1947	uGfaUfuCfuUfuGfaaAfaUfuUfuGfasUfsu		
D1838	S1838	856	CfaAfaAfuUfuUfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1838	1948	uUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1839	S1839	857	CfaAfaAfuUfuUfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1839	1949	uUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1840	S1840	858	AfaAfaUfuUfuUfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1840	1950	uUfuGfaUfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1841	S1841	859	AfaAfaUfuUfuUfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1841	1951	uUfuGfaUfuUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1842	S1842	860	AfaAfuUfuUfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1842	1952	cUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1843	S1843	861	AfaAfuUfuUfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1843	1953	cUfuUfguaUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1844	S1844	862	AfaUfuUfuUfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1844	1954	cUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1845	S1845	863	AfaUfuUfuUfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1845	1955	cUfuUfguaUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1846	S1846	864	AfuUfuUfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1846	1956	uCfcUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1847	S1847	865	AfuUfuUfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1847	1957	uCfcUfuugAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1848	S1848	866	UfuUfuAfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1848	1958	uUfcCfuUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1849	S1849	867	UfuUfuAfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1849	1959	uUfcCfuUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1850	S1850	868	UfuUfaCfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1850	1960	aUfuCfcUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1851	S1851	869	UfuUfaCfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1851	1961	aUfuCfcUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1852	S1852	870	UfuUfaCfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1852	1962	aAfuUfcCfuUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1853	S1853	871	UfuUfaCfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1853	1963	aAfuUfcCfuUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1854	S1854	872	UfaCfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1854	1964	gAfaUfuCfcUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1855	S1855	873	UfaCfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1855	1965	gAfaUfuUfcCfuUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1856	S1856	874	AfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1856	1966	aGfaAfuUfcCfuUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		
D1857	S1857	875	AfaAfaAfaAfaAfaAfuCfaAfl96	AS1857	1967	aGfaAfuUfcCfuUfuUfgAfuUfcUfuUfguaAfaAfuUfuUfcsAfsu		

【表 3 6】

D1858	S1858	876	CfaAfaGfaAfaCfaAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1858	1968	uAfgAfaUfuCfcUfuugAfaUfcUfuUfsgUfsa			
D1859	S1859	877	CfaAfaGfaAfaCfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1859	1969	uAfgAfaUfuCfcUfuugAfaUfcUfuUfsgUfsa			
D1860	S1860	878	AfaAfgAfaUfcAfaAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1860	1970	cUfaGfaAfaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsgUfsu			
D1861	S1861	879	AfaAfgAfaUfcAfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1861	1971	cUfaGfaaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsgUfsu			
D1862	S1862	880	AfaGfaAfaCfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1862	1972	uCfuAfgAfaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1863	S1863	881	AfaGfaAfaCfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1863	1973	uCfuAfgaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1864	S1864	882	AfgAfaUfcAfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1864	1974	uUfcUfaGfaAfaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsg			
D1865	S1865	883	AfgAfaUfcAfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1865	1975	uUfcUfagaAfaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsg			
D1866	S1866	884	GfaAfaCfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1866	1976	uUfcUfaGfaAfaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1867	S1867	885	GfaAfaCfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1867	1977	uUfuCfuagAfaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1868	S1868	886	AfaUfcAfaAfgGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1868	1978	cUfuUfcUfaGfaAfaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsg			
D1869	S1869	887	AfaUfcAfaAfgGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1869	1979	cUfuUfuaGfaAfaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsg			
D1870	S1870	888	AfuCfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1870	1980	aCfuUfuCfuAfaGfaAfaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1871	S1871	889	AfuCfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1871	1981	aCfuUfuaGfaAfaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1872	S1872	890	UfcAfaAfgGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1872	1982	uAfcUfuUfcUfaGfaaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsg			
D1873	S1873	891	UfcAfaAfgGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1873	1983	uAfcUfuUfaGfaaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsg			
D1874	S1874	892	CfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1874	1984	aUfaCfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1875	S1875	893	CfaAfaGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1875	1985	aUfaCfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1876	S1876	894	AfaAfgGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1876	1986	gAfaUfcUfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsg			
D1877	S1877	895	AfaAfgGfaAfaUfuCfuAfl96	AS1877	1987	gAfaUfcUfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugGfaUfuCfuUfsg			
D1878	S1878	896	AfaGfgAfaUfuCfuAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1878	1988	aGfaUfaCfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1879	S1879	897	AfaGfgAfaUfuCfuAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1879	1989	aGfaUfaCfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1880	S1880	898	AfgGfaAfaUfuCfuAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1880	1990	cAfgAfaUfcUfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1881	S1881	899	AfgGfaAfaUfuCfuAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1881	1991	cAfgAfaUfcUfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1882	S1882	900	GfgAfaUfuCfuAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1882	1992	cCfaGfaUfaCfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1883	S1883	901	GfgAfaUfuCfuAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1883	1993	cCfaGfaaCfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			
D1884	S1884	902	GfaAfaUfuCfuAfaGfaaUfuCfuAfl96	AS1884	1994	cCfaAfaUfaCfuUfuCfuAfaGfaaUfuCfcUfuugUfgAfaUfcUfuUfsg			

【表 3 7】

D1885	S1885	903	GfaAfuUfcUfaGfaAfaGfaAfuUfcUfGfGfL96	AS1885	1995	cCfcAfgauAfcUfuucUfaGfaAfuUfcscCfsu			
D1886	S1886	904	AfaUfuCfuAfgAfaAfaUfaUfaucUfgGfGfL96	AS1886	1996	gCfcCfaGfaUfaCfuUfaCfuAfuAfaUfusCfsc			
D1887	S1887	905	AfaUfuCfuAfgAfaAfaUfaUfcUfgGfGfL96	AS1887	1997	gCfcCfagaUfaCfuUfaCfuAfuAfaUfusCfsc			
D1888	S1888	906	AfuUfcUfaGfaAfaGfaAfuUfcUfgGfGfAfl96	AS1888	1998	uGfcCfcAfgAfaAfuUfcUfaGfaAfuUfsc			
D1889	S1889	907	AfuUfcUfaGfaAfaGfaAfuUfcUfgGfGfAfl96	AS1889	1999	uGfcCfcagAfaAfuUfcUfaGfaAfuUfsc			
D1890	S1890	908	UfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1890	2000	uUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaAfaUfsc			
D1891	S1891	909	UfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1891	2001	uUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaAfaUfsc			
D1892	S1892	910	UfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1892	2002	uCfuGfcCfcAfgAfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1893	S1893	911	UfuCfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1893	2003	uCfuGfcCfcAfgAfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1894	S1894	912	CfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1894	2004	uUfcUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaAfaAfu			
D1895	S1895	913	CfuAfgAfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1895	2005	uUfcUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaAfaAfu			
D1896	S1896	914	UfaGfaAfaGfaAfuUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1896	2006	gUfuCfuGfcCfcAfgAfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1897	S1897	915	UfaGfaAfaGfaAfuUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1897	2007	gUfuCfuGfcCfcAfgAfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1898	S1898	916	AfgAfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1898	2008	cGfuUfcUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1899	S1899	917	AfgAfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1899	2009	cGfuUfcUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1900	S1900	918	GfaAfaGfaAfuUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1900	2010	gCfuUfuCfuUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1901	S1901	919	GfaAfaGfaAfuUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1901	2011	gCfuUfuCfuUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1902	S1902	920	AfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1902	2012	aGfcGfuUfcUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1903	S1903	921	AfaAfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1903	2013	aGfcGfuUfcUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1904	S1904	922	AfaGfuAfuCfuGfGfCfaGfL96	AS1904	2014	uAfgCfuUfuCfuUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1905	S1905	923	AfaGfuAfuCfuGfGfCfaGfL96	AS1905	2015	uAfgCfuUfuCfuUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1906	S1906	924	AfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1906	2016	uAfgCfuUfuCfuUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1907	S1907	925	AfgUfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1907	2017	uAfgCfuUfuCfuUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1908	S1908	926	GfuAfuCfuGfGfCfaGfL96	AS1908	2018	cCfuAfgCfuUfuCfuUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1909	S1909	927	GfuAfuCfuGfGfCfaGfL96	AS1909	2019	cCfuAfgCfuUfuCfuUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1910	S1910	928	UfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1910	2020	uCfuUfaGfCfuUfcUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			
D1911	S1911	929	UfaUfcUfgGfGfCfaGfL96	AS1911	2021	uCfuUfaGfCfuUfcUfgCfcCfaGfaUfaCfuUfcUfaGfaAfu			

【 0 3 9 3 】

10

20

30

40

【表 3 8】

D1912	S1912	930	AfuCfuGfgGfcAfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1912	2022	cUfcCfuAfgCfGfUfucUgfcCfcAfgAfusAfsC			
D1913	S1913	931	AfuCfuGfgGfcAfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1913	2023	cUfcCfuagCfGfUfucUgfcCfcAfgAfusAfsC			
D1914	S1914	932	UfcUfgGfgCfaGfaAfaCfGcuAfgAfaL96	AS1914	2024	uCfuCfcUfaAfgCfGfuUfgCfcCfaGfasUfSa			
D1915	S1915	933	UfcUfgGfgCfaGfaAfaCfGcuAfgAfaL96	AS1915	2025	uCfuCfuaGfcGfuUfgCfcCfaGfasUfSa			
D1916	S1916	934	CfuGfgGfcAfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1916	2026	cUfcUfcCfuAfgCfGcuCfuGfcCfcAfgAfsu			
D1917	S1917	935	CfuGfgGfcAfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1917	2027	cUfcUfcuAfgCfGcuCfuGfcCfcAfgAfsu			
D1918	S1918	936	UfgGfgCfaGfaAfaCfGcuAfgAfaL96	AS1918	2028	uCfuCfuCfUfaGfgUfucUfgCfcCfasGfSa			
D1919	S1919	937	UfgGfgCfaGfaAfaCfGcuAfgAfaL96	AS1919	2029	uCfuCfuCfUfaGfgUfucUfgCfcCfasGfSa			
D1920	S1920	938	GfgGfcAfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1920	2030	aUfcUfcUfcCfuAfgUfucUfgCfcCfasAfsG			
D1921	S1921	939	GfgGfcAfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1921	2031	aUfcUfcuCfuAfgUfucUfgCfcCfasAfsG			
D1922	S1922	940	GfgCfaGfaAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1922	2032	gAfuCfuCfuCfcUfagCfGfuUfgCfcCfas			
D1923	S1923	941	GfgCfaGfaAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1923	2033	gAfuCfuCfcUfagCfGfuUfgCfcCfas			
D1924	S1924	942	GfcAfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1924	2034	gGfaUfcUfcUfCfuAfgCfGfuUfgCfcCfas			
D1925	S1925	943	GfcAfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1925	2035	gGfaUfcuUfcCfuagCfGfuUfgCfcCfas			
D1926	S1926	944	CfaGfaAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1926	2036	uGfgAfuCfuCfuCfuAfgGfuUfgCfcCfas			
D1927	S1927	945	CfaGfaAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1927	2037	uGfgAfuCfuCfuCfuAfgGfuUfgCfcCfas			
D1928	S1928	946	AfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1928	2038	uUfgGfaUfcUfCfuAfgCfGfuUfgCfcCfas			
D1929	S1929	947	AfgAfaCfGcuAfgGfaGfL96	AS1929	2039	uUfgGfaucUfcUfCfuAfgCfGfuUfgCfcCfas			
D1930	S1930	948	GfaAfcGfcUfaGfgAfgAfaL96	AS1930	2040	uUfuGfgAfuCfuCfuCfuAfgGfuUfgCfcCfas			
D1931	S1931	949	GfaAfcGfcUfaGfgAfgAfaL96	AS1931	2041	uUfuGfgauCfuCfuCfuAfgGfuUfgCfcCfas			
D1932	S1932	950	AfaCfGcuAfgGfaGfaGfaUfL96	AS1932	2042	aUfuUfgGfaUfCfuCfuCfuAfgCfGfuUfsc			
D1933	S1933	951	AfaCfGcuAfgGfaGfaGfaUfL96	AS1933	2043	aUfuUfggaUfcUfCfuCfuAfgCfGfuUfsc			
D1934	S1934	952	AfcGfcUfaGfgAfgAfaL96	AS1934	2044	aAfuUfuGfgAfuCfuCfuCfuAfgGfuUfsc			
D1935	S1935	953	AfcGfcUfaGfgAfgAfaL96	AS1935	2045	aAfuUfuggAfuCfuCfuCfuAfgGfuUfsc			
D1936	S1936	954	CfgCfuAfgGfaGfaGfaUfL96	AS1936	2046	aAfaUfuUfgGfaUfCfuCfuAfgCfGfuUfsc			
D1937	S1937	955	CfgCfuAfgGfaGfaGfaUfL96	AS1937	2047	aAfaUfuugGfaUfCfuCfuAfgCfGfuUfsc			
D1938	S1938	956	GfcUfaGfgAfgAfaCfaaAfuUfL96	AS1938	2048	gAfaAfuUfUfgAfuCfuCfuAfgGfuUfsc			

【0 3 9 4】

10

20

30

40

【表 3 9】

D1939	S1939	957	GfuUfaGfgAfgAfGfAfUfCfCfAfAfAfUfUfCfL96	AS1939	2049	gAfaAfauuGfgAfUfuCfuCfuUfaGfcsGfsu			
D1940	S1940	958	CfuAfgGfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1940	2050	gGfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1941	S1941	959	CfuAfgGfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1941	2051	gGfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1942	S1942	960	UfaGfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1942	2052	uGfgAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1943	S1943	961	UfaGfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1943	2053	uGfgAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1944	S1944	962	AfgGfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1944	2054	aUfgGfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1945	S1945	963	AfgGfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1945	2055	aUfgGfaaaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1946	S1946	964	GfgAfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1946	2056	aAfuGfgAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1947	S1947	965	GfgAfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1947	2057	aAfuGfgaaAfuUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1948	S1948	966	GfaGfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1948	2058	cAfaUfgGfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1949	S1949	967	GfaGfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1949	2059	cAfaUfggaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1950	S1950	968	AfgAfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1950	2060	aCfaAfuGfgAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1951	S1951	969	AfgAfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1951	2061	aCfaAfuGfgAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1952	S1952	970	GfgAfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1952	2062	gAfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1953	S1953	971	GfgAfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1953	2063	gAfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1954	S1954	972	AfgAfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1954	2064	aGfaCfaAfuUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1955	S1955	973	AfgAfgAfgAfUfCfCfAfaUfuUfCfL96	AS1955	2065	aGfaCfaaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1956	S1956	974	GfaUfgCfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1956	2066	aAfgAfaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1957	S1957	975	GfaUfgCfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1957	2067	aAfgAfaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1958	S1958	976	AfuCfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1958	2068	cAfaGfaCfaAfuUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1959	S1959	977	AfuCfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1959	2069	cAfaGfaCfaAfuUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1960	S1960	978	UfgCfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1960	2070	gCfaAfgAfaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1961	S1961	979	UfgCfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1961	2071	gCfaAfgAfaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1962	S1962	980	CfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1962	2072	uGfaAfgAfaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1963	S1963	981	CfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1963	2073	uGfaAfgAfaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1964	S1964	982	CfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1964	2074	uUfgCfaAfgAfaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			
D1965	S1965	983	CfaAfaUfUfUfgGfaucUfcUfcUfL96	AS1965	2075	uUfgCfaAfgAfaUfUfgGfaucUfcUfcUfAfgsCfsg			

【表 4 0】

D1966	S1966	984	AfaAfuUfuCfcAfuUfuUfgUfcuuGfcAfaGfl96	AS1966	2076	cUfuGfcAfaGfaCfaauGfgAfaAfuUfusGfsg			
D1967	S1967	985	AfaAfuUfuCfcAfuUfuUfgUfcAfaGfl96	AS1967	2077	cUfuGfcAaGfaCfaauGfgAfaAfuUfusGfsg			
D1968	S1968	986	AfaUfuUfcCfaUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1968	2078	gCfuUfgCfaAfaGfaCfaaUfgGfaAfaUfusUfsg			
D1969	S1969	987	AfaUfuUfcCfaUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1969	2079	gCfuUfgCfaAfaGfaCfaaUfgGfaAfaUfusUfsg			
D1970	S1970	988	AfuUfuCfcAfuUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1970	2080	uGfcUfuGfcAfaGfaCfaaUfuGfgAfaAfuUfusUfsg			
D1971	S1971	989	AfuUfuCfcAfuUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1971	2081	uGfcUfuGfcAfaGfaCfaaUfuGfgAfaAfuUfusUfsg			
D1972	S1972	990	UfuUfcCfaUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1972	2082	uUfgCfuUfgCfaAfaGfaCfaaUfgGfaAfaUfusUfsg			
D1973	S1973	991	UfuUfcCfaUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1973	2083	uUfgCfuUfgCfaAfaGfaCfaaUfgGfaAfaUfusUfsg			
D1974	S1974	992	UfuUfcCfaUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1974	2084	uUfuGfcUfuUfgCfaAfaGfaCfaaUfgGfaAfaUfusUfsg			
D1975	S1975	993	UfuUfcCfaUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1975	2085	uUfuGfcUfuUfgCfaAfaGfaCfaaUfgGfaAfaUfusUfsg			
D1976	S1976	994	UfuUfcCfaUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1976	2086	cUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1977	S1977	995	UfuUfcCfaUfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfl96	AS1977	2087	cUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1978	S1978	996	CfcAfuUfgUfcUfuUfgUfcAfaGfaAfaGfl96	AS1978	2088	gCfuUfuGfcUfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1979	S1979	997	CfcAfuUfgUfcUfuUfgUfcAfaGfaAfaGfl96	AS1979	2089	gCfuUfuGfcUfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1980	S1980	998	CfaUfuGfuCfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1980	2090	uGfcUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1981	S1981	999	CfaUfuGfuCfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1981	2091	uGfcUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1982	S1982	1000	AfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1982	2092	gUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1983	S1983	1001	AfuUfgUfcUfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1983	2093	gUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1984	S1984	1002	UfuGfuCfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1984	2094	cGfuGfcUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1985	S1985	1003	UfuGfuCfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1985	2095	cGfuGfcUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1986	S1986	1004	UfuGfuCfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1986	2096	aCfuUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1987	S1987	1005	UfuGfuCfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1987	2097	aCfuUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1988	S1988	1006	GfuCfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1988	2098	uAfcGfuGfcUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1989	S1989	1007	GfuCfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1989	2099	uAfcGfuGfcUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1990	S1990	1008	UfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1990	2100	aUfaCfuUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1991	S1991	1009	UfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1991	2101	aUfaCfuUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			
D1992	S1992	1010	CfuUfgCfaAfaGfaAfaGfl96	AS1992	2102	aAfuAfcGfuUfgCfuUfuUfgCfuUfgCfaaGfaCfaaUfgGfasAfsa			

【表 4 1】

D1993	S1993	1011	CfuUfgCfaAfgCfaAfaGfcAfcGfuAfuUfL96	AS1993	2103	aAfuAfcguGfcUfuugCfuUfgCfaAfgsAfcsc			
D1994	S1994	1012	UfuGfcAfaGfcAfaAfaGfcAfcgUfaUfuAfl96	AS1994	2104	uAfaUfaCfGfUfgCfuuuGfcUfuGfcAfasGfsa			
D1995	S1995	1013	UfuGfcAfaGfcAfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS1995	2105	uAfaUfagCfUfgCfuuuGfcUfuGfcAfasGfsa			
D1996	S1996	1014	UfgCfaAfgCfaAfaAfaGfcAfcgUfaUfuAfl96	AS1996	2106	uUfaAfuAfcCfGfuGfcuuUfgCfuUfgCfasAfg			
D1997	S1997	1015	UfgCfaAfgCfaAfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS1997	2107	uUfaAfuacGfuGfcuuUfgCfuUfgCfasAfg			
D1998	S1998	1016	GfcAfaGfcAfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS1998	2108	uUfuAfaUfaCfGfuGfcuUfuGfcUfuGfcsAfsa			
D1999	S1999	1017	GfcAfaGfcAfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS1999	2109	uUfuAfaaCfGfuGfcuUfuGfcUfuGfcsAfsa			
D2000	S2000	1018	CfaAfgCfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS2000	2110	aUfuUfaAfuAfcGfuGfcUfuUfgCfuUfgsCfsa			
D2001	S2001	1019	CfaAfgCfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS2001	2111	aUfuUfaaAfcGfuGfcUfuUfgCfuUfgsCfsa			
D2002	S2002	1020	AfaGfcAfaAfgCfaCfGfuAfuAfl96	AS2002	2112	uAfuUfuAfaUfaCfGfuGfcUfuGfcUfusGfsc			
D2003	S2003	1021	AfaGfcAfaAfgCfaCfGfuAfuAfl96	AS2003	2113	uAfuUfaaUfaCfGfuGfcUfuGfcUfusGfsc			
D2004	S2004	1022	AfgCfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS2004	2114	aUfaUfuUfaAfaAfcgUfuGfcUfuUfgCfusUfg			
D2005	S2005	1023	AfgCfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS2005	2115	aUfaUfuuaAfaAfcgUfuGfcUfuUfgCfusUfg			
D2006	S2006	1024	GfcAfaAfgCfaCfGfuAfuAfl96	AS2006	2116	cAfuAfuUfuUfaAfaCfGfuGfcUfuUfgCfusUfu			
D2007	S2007	1025	GfcAfaAfgCfaCfGfuAfuAfl96	AS2007	2117	cAfuAfuuuAfaUfagCfuGfcUfuUfgCfusUfu			
D2008	S2008	1026	CfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS2008	2118	uCfaUfaUfuUfaAfaAfcGfuGfcUfuUfgsCfsu			
D2009	S2009	1027	CfaAfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS2009	2119	uCfaUfauuUfaAfaAfcGfuGfcUfuUfgsCfsu			
D2010	S2010	1028	AfaAfgCfaCfGfuAfuAfl96	AS2010	2120	aUfcAfuAfuUfuAfaAfaCfGfuGfcUfuUfusGfsc			
D2011	S2011	1029	AfaAfgCfaCfGfuAfuAfl96	AS2011	2121	aUfcAfuauUfuAfaaCfGfuGfcUfuUfusGfsc			
D2012	S2012	1030	AfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS2012	2122	gAfuCfaUfaUfuUfaaAfcGfuGfcUfusUfg			
D2013	S2013	1031	AfaGfcAfcGfuAfuAfl96	AS2013	2123	gAfuCfaaUfuUfaaAfcGfuGfcUfusUfg			
D2014	S2014	1032	AfgCfaCfGfuAfuAfaAfaUfaUfgAfuCfuL96	AS2014	2124	aGfaUfcAfuAfuUfaaUfaCfGfuGfcUfusUfu			
D2015	S2015	1033	AfgCfaCfGfuAfuAfaAfaUfaUfgAfuCfuL96	AS2015	2125	aGfaUfcuAfuUfuuaUfaCfGfuGfcUfusUfu			
D2016	S2016	1034	GfcAfcGfuAfuAfaAfaUfaUfgAfuCfuL96	AS2016	2126	cAfgAfuCfaUfaUfuuaAfuAfcGfuGfcUfusUfu			
D2017	S2017	1035	GfcAfcGfuAfuAfaAfaUfaUfgAfuCfuL96	AS2017	2127	cAfgAfucaUfaUfuuaAfuAfcGfuGfcUfusUfu			
D2018	S2018	1036	CfaCfGfuAfuAfaAfaUfaUfgAfuCfuL96	AS2018	2128	gCfaGfaUfcAfuAfuuaAfaUfaCfGfuGfcUfusUfu			
D2019	S2019	1037	CfaCfGfuAfuAfaAfaUfaUfgAfuCfuL96	AS2019	2129	gCfaGfaucAfuAfuuaAfaUfaCfGfuGfcUfusUfu			

【表 4 2】

D2020	S2020	1038	AfcGfuAfuUfaAfaUfaUfgauCfuGfcAfl96	AS2020	2130	uGfcAfgUfcCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2021	S2021	1039	AfcGfuAfuUfaAfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2021	2131	uGfcAfgauCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2022	S2022	1040	CfgUfaUfaAfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2022	2132	cUfgCfaGfAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2023	S2023	1041	CfgUfaUfaAfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2023	2133	cUfgCfaGfAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2024	S2024	1042	GfuAfuUfaAfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2024	2134	gCfuGfcAfgAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2025	S2025	1043	GfuAfuUfaAfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2025	2135	gCfuGfcagAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2026	S2026	1044	UfaUfaAfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2026	2136	gGfcUfgCfaGfAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2027	S2027	1045	UfaUfaAfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2027	2137	gGfcUfgcaGfaUfcAfuUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2028	S2028	1046	AfuAfaUfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2028	2138	uGfcCfuGfcAfgAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2029	S2029	1047	AfuAfaUfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2029	2139	uGfcCfuGfcAfgAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2030	S2030	1048	UfuAfaUfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2030	2140	aUfgGfcUfgCfaGfAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2031	S2031	1049	UfuAfaUfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2031	2141	aUfgGfcugCfaGfAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2032	S2032	1050	UfaAfaUfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2032	2142	aAfuGfcCfuGfcAfgAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2033	S2033	1051	UfaAfaUfaUfaUfgAfuCfuGfcAfl96	AS2033	2143	aAfuGfcuGfcAfgAfuCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2034	S2034	1052	AfaAfuAfuGfaUfcUfgCfagCfaUfaUfl96	AS2034	2144	uAfaUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2035	S2035	1053	AfaAfuAfuGfaUfcUfgCfagCfaUfaUfl96	AS2035	2145	uAfaUfggCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2036	S2036	1054	AfaUfaUfgAfuCfuGfcAfgCfaUfaUfl96	AS2036	2146	uUfaAfuGfcCfuGfcAfgCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2037	S2037	1055	AfaUfaUfgAfuCfuGfcAfgCfaUfaUfl96	AS2037	2147	uUfaAfuGfcCfuGfcAfgCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2038	S2038	1056	AfuAfuGfaUfcUfgCfagCfaUfaUfl96	AS2038	2148	uUfaAfuUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2039	S2039	1057	AfuAfuGfaUfcUfgCfagCfaUfaUfl96	AS2039	2149	uUfaAfuUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2040	S2040	1058	UfaUfgAfuCfuGfcAfgCfaUfaUfl96	AS2040	2150	uUfaAfuUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2041	S2041	1059	UfaUfgAfuCfuGfcAfgCfaUfaUfl96	AS2041	2151	uUfaAfuUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2042	S2042	1060	AfuGfaUfcUfgCfagCfaUfaUfl96	AS2042	2152	uUfaAfuUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2043	S2043	1061	AfuGfaUfcUfgCfagCfaUfaUfl96	AS2043	2153	uUfaAfuUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2044	S2044	1062	UfgAfuCfuGfcAfgCfaUfaUfl96	AS2044	2154	cUfuUfuUfaUfaUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2045	S2045	1063	UfgAfuCfuGfcAfgCfaUfaUfl96	AS2045	2155	cUfuUfuUfaUfaUfgCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			
D2046	S2046	1064	GfaUfcUfgCfaGfcCfaUfaUfl96	AS2046	2156	uCfuUfuUfaUfaUfggCfcUfgCfagCfaUfaUuUfaAfuAfcGfusGfsc			

【表 4 3】

D2047	S2047	1065	GfaUfcUfgCfaGfcCfaUfuAfaAfaAfaAfaAfl96	AS2047	2157	uCfuUfuuuAfaUfggcUfgCfaGfaUfcsAfsu			
D2048	S2048	1066	AfuCfuGfcAfgCfCfaUfuAfaaaAfaGfaCfl96	AS2048	2158	gUfcUfuUfuUfaAfuuggCfuGfcAfgAfusCfsa			
D2049	S2049	1067	AfuCfuGfcAfgCfCfaUfuAfaAfaAfaGfaCfl96	AS2049	2159	gUfcUfuuuUfaAfuuggCfuGfcAfgAfusCfsa			
D2050	S2050	1068	UfcUfgCfaGfcCfCfaUfuAfaaaAfaAfl96	AS2050	2160	uGfuCfuUfuUfuAfaugGfcUfgCfaGfasUfsc			
D2051	S2051	1069	UfcUfgCfaGfcCfCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2051	2161	uGfuCfuuuUfuAfaugGfcUfgCfaGfasUfsc			
D2052	S2052	1070	CfuGfcAfgCfCfaUfuAfaaaGfaCfaCfl96	AS2052	2162	gUfgUfcUfuUfuUfaaGfgCfuGfcAfgsAfsu			
D2053	S2053	1071	CfuGfcAfgCfCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2053	2163	gUfgUfcuuUfuUfaaGfgCfuGfcAfgsAfsu			
D2054	S2054	1072	UfgCfaGfcCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2054	2164	uGfuGfuCfuUfuUfaaaUfgGfcUfgCfasGfsa			
D2055	S2055	1073	UfgCfaGfcCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2055	2165	uGfuGfucuUfuUfaaaUfgGfcUfgCfasGfsa			
D2056	S2056	1074	GfcAfgCfCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2056	2166	aUfgUfgUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2057	S2057	1075	GfcAfgCfCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2057	2167	aUfgUfgucUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2058	S2058	1076	CfaGfcCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2058	2168	aAfuGfuGfuCfuUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2059	S2059	1077	CfaGfcCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2059	2169	aAfuGfuguCfuUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2060	S2060	1078	AfgCfCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2060	2170	gAfaUfgUfgUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2061	S2061	1079	AfgCfCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2061	2171	gAfaUfgugUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2062	S2062	1080	GfcCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2062	2172	aGfaAfuGfuGfuCfuUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2063	S2063	1081	GfcCfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2063	2173	aGfaAfuGfuGfuCfuUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2064	S2064	1082	CfcAfuUfaAfaAfaAfaAfl96	AS2064	2174	cAfgAfaUfgUfgUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2065	S2065	1083	CfcAfuUfaAfaAfaAfaAfl96	AS2065	2175	cAfgAfaugUfgUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2066	S2066	1084	CfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2066	2176	aCfaGfaAfuGfuGfuCfuUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2067	S2067	1085	CfaUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2067	2177	aCfaGfaaGfuGfuCfuUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2068	S2068	1086	AfuUfaAfaAfaAfaAfl96	AS2068	2178	uAfcAfgAfaUfgUfgUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2069	S2069	1087	AfuUfaAfaAfaAfaAfl96	AS2069	2179	uAfcAfgaaUfgUfgUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2070	S2070	1088	UfuAfaAfaAfaAfaAfl96	AS2070	2180	uUfaCfaGfaAfuGfuGfuCfuUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2071	S2071	1089	UfuAfaAfaAfaAfaAfl96	AS2071	2181	uUfaCfagaAfuGfuGfuCfuUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2072	S2072	1090	UfaAfaAfaAfaAfaAfl96	AS2072	2182	uUfaAfcAfcAfaUfgUfgUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			
D2073	S2073	1091	UfaAfaAfaAfaAfaAfl96	AS2073	2183	uUfaAfcagAfaUfgUfgUfcUfuUfaaaAfuGfgCfuGfcsAfsu			

【表 4 4】

D2074	S2074	1092	AfaAfaAfgAfcAfcAfaUfcuUfaAfaAfl96	AS2074	2184	uUfuUfaCfaCfaAfaUfguGfuCfuUfuUfusAfsa			
D2075	S2075	1093	AfaAfaAfgAfcAfcAfaUfcuUfguUfaAfaAfl96	AS2075	2185	uUfuUfaCfaAfaUfguGfuCfuUfuUfusAfsa			
D2076	S2076	1094	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2076	2186	uUfuUfuAfcAfaAfaUfgUfcUfuUfusUfsa			
D2077	S2077	1095	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2077	2187	uUfuUfuacAfaAfaUfgUfcUfuUfusUfsa			
D2078	S2078	1096	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2078	2188	uUfuUfuUfaCfaAfaUfguGfuCfuUfusUfsu			
D2079	S2079	1097	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2079	2189	uUfuUfuuaCfaAfaUfguGfuCfuUfusUfsu			
D2080	S2080	1098	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2080	2190	uUfuUfuUfuAfaAfaUfgUfcUfuUfusUfsu			
D2081	S2081	1099	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2081	2191	uUfuUfuuuAfaAfaUfgUfcUfuUfusUfsu			
D2082	S2082	1100	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2082	2192	uUfuUfuUfuUfaCfaAfaUfguGfuCfuUfusUfsu			
D2083	S2083	1101	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2083	2193	uUfuUfuuuUfaCfaAfaUfguGfuCfuUfusUfsu			
D2084	S2084	1102	GfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2084	2194	uUfuUfuUfuUfuAfaAfaUfgUfcUfuUfusUfsu			
D2085	S2085	1103	GfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2085	2195	uUfuUfuuuUfuAfaAfaUfgUfcUfuUfusUfsu			
D2086	S2086	1104	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2086	2196	uUfuUfuUfuUfuUfaCfaAfaUfguGfuCfuUfusUfsu			
D2087	S2087	1105	AfaAfaGfaCfaCfaUfuCfuUfguAfaAfaAfl96	AS2087	2197	uUfuUfuuuUfuUfaCfaAfaUfguGfuCfuUfusUfsu			
D2088	S2088	1106	CfaCfaUfuCfuUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2088	2198	uUfuUfuUfuUfuUfuacAfaAfaUfgUfcUfuUfusUfsu			
D2089	S2089	1107	CfaCfaUfuCfuUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2089	2199	uUfuUfuuuUfuUfuacAfaAfaUfgUfcUfuUfusUfsu			
D2090	S2090	1108	AfaAfaUfuCfuUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2090	2200	uUfuUfuUfuUfuUfuuaCfaAfaAfaUfguGfuCfuUfusUfsu			
D2091	S2091	1109	AfaAfaUfuCfuUfuAfaAfaAfaAfl96	AS2091	2201	uUfuUfuuuUfuUfuuaCfaAfaAfaUfguGfuCfuUfusUfsu			

小文字ヌクレオチド(a,u,g,c)は、2'-O-メチルヌクレオチドであり;Nf(例えば、Af)は、2'-フルオロヌクレオチドであり;sは、ホスホチオレート結合であり;L96は、GalNAc₃リガンドを示している。

実施例4：RNAi剤の*in vitro*でのスクリーニング 細胞培養およびトランスフェクション

ヒトHep3B細胞またはラットH. IL. 4. E細胞(ATCC, Manassas, VA)を、10% FBS、ストレプトマイシン、およびグルタミン(ATCC)が添加されたRPMI(ATCC)中、5% CO₂の大気で、37℃でほぼコンフルエンスになるまで増殖させてから、トリプシン処理によりプレートから剥離させた。1ウェルにつき14.8 μlのOpti-MEMと0.2 μlのLipofectamine RNAi Max(Invitrogen, Carlsbad CA, cat #13778-150)を、96ウェルプレートの5 μlのsiRNA二重鎖が入っている各ウェルに添加し、室温で15分間インキュベートすることによってトランスフェクションを行った。約2 × 10⁴ Hep3B細胞を含む、抗生物質無添加の80 μlの完全増殖培地をsiRNA混合物に添加した。細胞を、24時間または120時間インキュベートしてから、RNAを精製した。単回投与実験を、10 nMおよび0.1 nMの最終二重鎖濃度で行い、用量反応実験を、10 nMの最終二重鎖濃度の最大投与量で8倍、4倍の段階希釈を用いて行った。

【0401】

DYNABEADS mRNA単離キット(Invitrogen, part #: 610-12)を用いた全RNAの単離

細胞を採取し、150 μlの溶解/結合緩衝液中で溶解し、次いで、Eppendorf Thermomixerを用いて850 rpmで5分間混合した(混合速度を全過程で同じとした)。10 μlの磁気ビーズおよび80 μlの溶解/結合緩衝液の混合物を丸底プレートに添加し、1分間混合した。磁気ビーズを、磁気スタンドを用いて捕捉し、ビーズをかく乱せずに上清を除去した。上清を除去した後、溶解した細胞を残りのビーズに添加し、5分間混合した。上清を除去した後、磁気ビーズを、150 μlの洗浄緩衝液Aで2回洗浄し、1分間混合した。ビーズを再び捕捉し、上清を除去した。次いで、ビーズを150 μlの洗浄緩衝液Bで洗浄し、ビーズを捕捉し、上清を除去した。次いで、ビーズを150 μlの溶出緩衝液で洗浄し、捕捉し、上清を除去した。次に、ビーズを150 μlの溶出緩衝液で洗浄し、捕捉し、上清を除去した。ビーズを2分間乾燥させた。乾燥後、50 μlの溶出緩衝液を添加し、70℃で5分間混合した。ビーズを磁気上に5分間捕捉した。40 μlの上清を取り出し、別の96ウェルプレートに添加した。

【0402】

ABI高性能cDNA逆転写キット(Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat #4368813)を用いたcDNA合成

1回の反応につき、1 μlの10×緩衝液、0.4 μlの25×dNTP、1 μlのランダムプライマー、0.5 μlの逆転写酵素、0.5 μlのRNA分解酵素阻害剤、および1.6 μlのH₂Oを含むマスターミックスを5 μlの全RNAに添加した。cDNAを、Bio-Rad C-1000またはS-1000サーマルサイクラーを用いて、25℃で10分、37℃で120分、85℃で5秒、4℃に保持するステップによって作製した。

【0403】

リアルタイムPCR

2 μlのcDNAを、384ウェルプレート((Roche cat #04887301001)の各ウェルの0.5 μlのGAPDH TaqManプローブ(Applied Biosystems Cat #4326317E(ヒト) Cat #4308313(げっ歯類))、0.5 μlのTTR TaqManプローブ(Applied Biosystems cat #HS00174914_m1(ヒト) cat #Rn00562124_m1(ラット))、および5 μlのLightcycler 480プローブマスターミックス(Roche Cat #04887301001)を含むマスターミックスに添加した。リアルタイムPCRを、Roche LC 480 Real Time PCR装置(Roche)で行った。特段の記載がない限り、各二重鎖を、少なくと

10

20

30

40

50

も2つの別個のトランスフェクションで試験し、各トランスフェクションを二連でアッセイした。

【0404】

相対的な倍数変化を計算するために、リアルタイムデータを $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて分析し、10 nM AD-1955でトランスフェクトされた細胞または模擬トランスフェクト細胞を用いて行われたアッセイに対して正規化した。 IC_{50} を、XLFitを使用する4パラメーターフィットモデルを用いて計算し、同じ用量範囲もしくはそれ自体の最低用量に対して、AD-1955（センス配列：cuuAcGcuGAGuAcuu cGAdTsdT（配列番号：2202）；アンチセンス配列：UCGAAGuCUcAGCGuAAGdTsdT（配列番号：2203））でトランスフェクトされた細胞または未処置細胞に対して正規化した。 IC_{50} を、個々のトランスフェクションおよび組み合わせに対して計算し、1つの IC_{50} を両方のトランスフェクションからのデータに対してフィットさせた。

10

【0405】

本発明の様々なモチーフ修飾を有する例示的なsiRNA二重鎖の遺伝子サイレンシングの結果が、上の表1に示されている。

【0406】

実施例5：TTRを標的とする化学修飾RNAi剤のin vitroでのサイレンシング活性

以下の実験は、TTRを標的とするRNAi剤のサイレンシング活性に対する、GalNAc₃リガンドと共に三塩基反復モチーフを導入することを含む化学修飾の有利な効果を実証した。調べる作用剤の配列は、下の表2に示されている。TTR mRNAに相補的な領域は次の通りである：RNAi剤AD-45165、AD-51546、およびAD-51547の相補的な領域は、GGATGGGATTTTCATGTAACCAAGA（配列番号：2204）であり、RNAi剤AD-45163、AD-51544、およびAD-51545の相補的な領域は、TTCATGTAACCAAGAGTATTCCAT（配列番号：2205）である。

20

【0407】

Hep3B細胞の IC_{50} の評価用のプロトコル

各修飾siRNAの IC_{50} は、Lipofectamine RNAiMAXを用いた標準的な逆トランスフェクションによってHep3B細胞（ヒト肝癌細胞株）で決定した。簡単に述べると、逆トランスフェクションは、96ウェルプレートの各ウェルの5 μ LのsiRNA二重鎖に5 μ LのOpti-MEMを、10 μ LのOpti-MEMと0.5 μ LのLipofectamine RNAiMax（Invitrogen, Carlsbad CA, cat #13778-150）と共に添加し、室温で15～20分間インキュベートすることによって行った。インキュベーション後、12,000～15,000のHep3B細胞を含む、抗生物質無添加の100 μ Lの完全増殖培地を各ウェルに添加した。細胞を、5%CO₂の大気、37℃で24時間インキュベートしてから溶解し、bDNA（Quantigene）によりTTRおよびGAPDH mRNAを分析した。10 nM～0.6 pMの範囲の7つの異なるsiRNA濃度を、 IC_{50} の決定のために評価し、siRNAトランスフェクト細胞のTTR/GAPDHを、10 nMのLuc siRNAでトランスフェクトされた細胞に対して正規化した。この結果は表2に示されている。

30

40

【0408】

自由取り込みの IC_{50} の評価のためのプロトコル

カニクイザル初代肝細胞における自由取り込みのサイレンシングを、TTR siRNAと共に4時間または24時間インキュベーションした後に評価した。サイレンシングは、最初の曝露から24時間後に測定した。簡単に述べると、96ウェル培養プレートを、実験の開始の24時間前に、0.05%～0.1%コラーゲン（Sigma C3867-1VL）を用いて室温で被覆した。アッセイの日に、siRNAを、GIBCO's

50

Maintenance Media Kit (Serum-Free, Life Technologies CM4000) が添加された DMEM からなる、予め温められた プレーティング培地で希釈し、コラーゲン被覆 96 ウェル培養プレートに添加した。凍結保存カニクイザル初代肝細胞を、37℃ の水槽で急速に解凍し、速やかに プレーティング培地で 360,000 細胞/mL の濃度まで希釈した。一定量の細胞懸濁液を、最終細胞数が 18,000 細胞/ウェルとなるように、予め プレーティングされた siRNA の上部にピペットでそっと添加した。プレートを軽く回転させて混合し、細胞をウェル全体に均等に分散させ、37℃ の 5% CO₂ インキュベータに 24 時間入れてから、細胞を溶解し、bDNA (Quantigene, Affymetrix) により TTR および GAPDH mRNA を分析した。siRNA との 4 時間のインキュベーションの場合は、細胞に 4 時間曝露した後に培地をデカントし、残りの 20 時間のインキュベーションのために新しい プレーティング培地を入れた。TTR および GAPDH mRNA の下流分析は上記と同様とした。典型的な用量反応曲線を得るために、siRNA を、4 倍段階希釈によって段階的に 1 μM から 0.24 nM にした。

【0409】

【表 4 5】

表2: 三塩基モチーフを有する交互TTR-GalNAcおよび変異体の*in vitro*での活性の要約

二重鎖 ID	S (5'-3')	AS (5'-3')	白巾取り込みの IC50 (μM)		Hep3B IC50 (nM)
			4時間	24時間	
AD-45163	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUfl.96 (配列番号: 2206)	aUfgGfaAfuAfcUfcUfgUfuAfcAfusGfisa (配列番号: 2212)	0.04101	0.00820	0.0115
AD-51544	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUfl.96 (配列番号: 2207)	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfisa (配列番号: 2213)	0.00346	0.00374	0.0014
AD-51545	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfaUfl.96 (配列番号: 2208)	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfguuAfcAfusGfisa (配列番号: 2214)	0.00395	0.00389	0.0018
AD-45165	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAfl.96 (配列番号: 2209)	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc (配列番号: 2215)	0.02407	0.00869	0.0112
AD-51546	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAfl.96 (配列番号: 2210)	uCfuugGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc (配列番号: 2216)	0.00317	0.00263	0.0017
AD-51547	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAfl.96 (配列番号: 2211)	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc (配列番号: 2217)	0.00460	0.00374	0.0028

小文字ヌクレオチド(a,u,g,c)は、2'-O-メチルヌクレオチドを示し;Nf(例えば、Af)は、2'-フルオロヌクレオチドを示し;sは、ホスホチオレート連結を示し;L96は、GalNAc₃リガンドを示し;太字のヌクレオチドは、対応する組作用剤に対する変化を示している。各太字のヌクレオチドは、三塩基モチーフの中心にある。

【0 4 1 0】

この結果は、表 2 に示され、T T R を標的とする修飾 R N A i 剤がサイレンシング活性

10

20

30

40

50

を高めることを実証した。

【0411】

結果：修飾RNAi剤の改善された活性

交互化学修飾を有する親RNAi剤およびGalNAc₃リガンドは、Hep3B細胞のIC₅₀を約0.01nMにした。図4～図5および表2に示されているように、例えば、2'-フルオロ修飾および2'-メチル修飾の1つ以上の反復三塩基の添加により親RNAi剤に対して修飾されたRNAi剤は、予想外に高いサイレンシング活性を示し、対応する親RNAi剤よりも5～8倍優れたIC₅₀値をHep3B細胞で達成した。

【0412】

結果：Hep3B細胞における自由取り込みのIC₅₀

10

表2および図6～図7に示されているように、親AD-45163に対して修飾されたRNAi剤も、自由取り込みのサイレンシングの増大を示した。修飾されたRNAi剤は、インキュベーションの24時間後に親RNAi剤のサイレンシング活性の2倍を超えるサイレンシング活性を示し、インキュベーションの4時間後には、親RNAi剤のサイレンシング活性のほぼ10倍のサイレンシング活性を示した。

【0413】

表2および図8～図9に示されているように、親AD-45165に対して修飾されたRNAi剤も、自由取り込みのサイレンシングの増大を示した。修飾されたRNAi剤は、インキュベーションの24時間後に親RNAi剤のサイレンシング活性の2～3倍のサイレンシング活性を示し、インキュベーションの4時間後には、親RNAi剤のサイレンシング活性の5～8倍のサイレンシング活性を示した。

20

【0414】

まとめると、これらの結果は、本明細書に記載される修飾されたRNAi剤、例えば、AD-51544、AD-51545、AD-51546、およびAD-51547はすべて、*in vitro*でのサイレンシング実験において予想外に優れたTTR mRNAの阻害を示すことを実証した。

【0415】

実施例6：トランスジェニックマウスにおけるTTR mRNAのサイレンシングおよびTTRタンパク質の抑制

RNAi剤AD-45163、AD-51544、AD-51545、AD-45165、AD-51546、およびAD-51547の効果を評価するために、これらのRNAi剤を、V30M突然変異を有するヒトトランスサイレチンを発現するトランスジェニックマウスに投与した(Santos, S.D., Fernandes, R., and Saraiva, M.J. (2010) *Neurobiology of Aging*, 31, 280-289を参照されたい)。V30M突然変異は、家族性アミロイド多発ニューロパシーI型をヒトに引き起こすことが知られている。例えば、Lobato, L. (2003) *J Nephrol.*, 16 (3): 438-42を参照されたい。

30

【0416】

RNAi剤(PBS緩衝液中)またはPBSコントロールを、5mg/kgまたは1mg/kgの単回皮下投与により18～24カ月齢のマウス(2匹の雄と2匹の雌)に投与した。約48時間後、200μlのケタミンでマウスを麻酔し、次いで、右尾動脈を切断して全採血した。全血を単離し、血漿を単離し、アッセイまで-80℃で保存した。肝組織を採取して、急速冷凍し、処置まで-80℃で保存した。

40

【0417】

治療の効果を、(i)投与の48時間後の肝臓におけるTTR mRNAの測定、および(ii)採血前および投与の48時間後の血漿中のTTRタンパク質の測定によって評価した。肝臓のTTR mRNAレベルを、分岐DNAアッセイ-Quantigene 2.0 (Panomics cat # : QS0011)を利用してアッセイした。簡単に述べると、マウス肝臓サンプルを粉碎して、組織溶解物を調製した。肝臓溶解混合物(1倍量の溶解混合物、2倍量のヌクレアーゼフリー水、および10μlのプロテイン

50

キナーゼ-K/m lを含む20mg/m lの最終濃度の混合物)を、65℃で35分間インキュベートした。次いで、20μ lの機能プローブセット(遺伝子標的用のTTRプローブおよび内在性コントロール用のGAPDH)および80μ lの組織溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを、55℃±1℃でインキュベートした(約16~20時間)。翌日、捕捉プレートを、1×洗浄緩衝液(ヌクレアーゼフリー水、緩衝液成分1、および洗浄緩衝液成分2)で3回洗浄し、次いで、240gで1分間の遠心分離により乾燥させた。100μ lの前増幅機能試薬(pre-Amplifier Working Reagent)を捕捉プレートに添加し、この捕捉プレートをアルミ箔で密閉し、55℃±1℃で1時間インキュベートした。1時間のインキュベーション後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、100μ lの前増幅機能試薬を添加した。1時間後、洗浄ステップおよび乾燥ステップを繰り返し、100μ lの標識プローブを添加した。捕捉プレートを、50℃±1℃で1時間インキュベートした。次いで、捕捉プレートを1×洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、100μ lの基質を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを、5~15分のインキュベーション後にSpectraMax Luminometerを用いて読み取った。bDNAデータを、各3つ組サンプルから平均バックグラウンドを減じ、得られた3つ組GAPDH(コントロールプローブ)およびTTR(実験プローブ)の値を平均し、次いで、比:(実験プローブのバックグラウンド)/(コントロールプローブのバックグラウンド)を計算することによって分析した。

【0418】

血漿TTRレベルを、製造者のガイドラインに従って市販のキット「AssayMax Human Prealbumin ELISA Kit」(AssayPro, St. Charles, MO, Catalog#EP3010-1)を利用してアッセイした。簡単に述べると、マウス血漿を、1×混合希釈剤で1:10,000に希釈し、キットの基準に従って前被覆プレートに添加し、室温で2時間インキュベートし、次いで、キットの洗浄緩衝液で5回洗浄した。50μ lのビオチン化プレアルブミン抗体を各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートし、次いで、キットの洗浄緩衝液で5回洗浄した。50μ lのストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲートを各ウェルに添加し、プレートを室温で30分間インキュベートし、次いで、上記のように洗浄した。50μ l/ウェルの色素原基質の添加によって反応を引き起こし、50μ l/ウェルの停止溶液の添加によって反応を停止させた状態で、室温で10分間インキュベートした。450nmでの吸光度を、Versamaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で読み取り、データを、Softmax 4.6ソフトウェアパッケージ(Molecular Devices)を用いて分析した。

【0419】

この結果は図10~図12に示されている。図10は、親RNAi剤AD-45163およびAD-45165に対して修飾されたRNAi剤が、親RNAi剤のRNAサイレンシング活性と比較して同等またはそれ以上に強いRNAサイレンシング活性を示したことを示している。図11は、RNAi剤AD-51544およびAD-51545が、用量依存性サイレンシング活性を示し、5mg/kgの用量でのこれらのRNAi剤のサイレンシング活性が、対応する親AD-45163のサイレンシング活性と同様であったことを示している。図12は、RNAi剤AD-51546およびAD-51547も、用量依存性サイレンシング活性を示したことを示している。さらに、5mg/kgの用量でのAD-51546およびAD-51547のサイレンシング活性は、対応する親AD-45165のサイレンシング活性よりも優れていた。

【0420】

実施例7:マウスにおけるTTRを標的とするRNAi剤の血清および肝臓の薬物動態プロファイル

RNAi剤AD-45163、AD-51544、AD-51545、AD-51546、およびAD-51547の薬物動態プロファイルの薬物動態プロファイルを評価する

ために、P B S 緩衝液中のこれらのRNA i 剤を、単回I V ボーラス投与または皮下（S C）投与によりC 5 7 B L / 6 マウスに投与した。RNA i 剤の血漿濃度および肝臓濃度を、投与後の様々な時点で評価した。

【0 4 2 1】

血漿薬物動態パラメーターが、以下の表3および表4に示されている。血漿中での平均滞留時間（M R T）は、I V 投与後は約0. 2 時間であり、S C 投与後は約1 時間であった。2 5 m g / k g の用量では、RNA i 剤A D - 5 1 5 4 4、A D - 5 1 5 4 5、A D - 5 1 5 4 6、およびA D - 5 1 5 4 7 は、同様の血漿薬物動態特性を示した。これらの各RNA i 剤は、皮下腔で7 5 %を超えるバイオアベイラビリティを有していた。これらのバイオアベイラビリティは、3 0 m g / k g のより高い用量で投与された親RNA i 剤A D - 4 5 1 6 3 のバイオアベイラビリティよりも優れていた。A D - 5 1 5 4 4 およびA D - 5 1 5 4 7 の皮下バイオアベイラビリティは、約1 0 0 %であったが、A D - 5 1 5 4 5 では約9 0 %で、A D - 5 1 5 4 6 では約7 6 %であった。

【0 4 2 2】

【表 4 6】

表3: TTR-GalNAc siRNAsのマウスへのSC投与後の血漿PKパラメーターの推定値の要約

パラメーター	30 mpk AD-45163 (h/c TTR- GalNAc)	25 mpk AD-51544 (h/c TTR- GalNAc)	25 mpk AD-51545 (h/c TTR- GalNAc)	25 mpk AD-51546 (h/c TTR- GalNAc)	25 mpk AD-51547 (h/c TTR- GalNAc)
血漿 Tmax (h)	0.25	1	0.5	1	0.5
血漿 Cmax (μg/mL)	9.6	11.7	10.9	11.7	12.1
血漿 AUC (h*μg/mL)	12.4	21.9	19.9	20.9	25.3
F _{sc} (%)	79	100	90.1	76.0	99.2

【0 4 2 3】

【表 4 7】

表 4: 25 mg/kg での AD-51544, 51545, 51546, または 51547 の IV ボーラス投与
または SC 投与後のマウスにおける血漿 siRNA PK パラメーター

被験物質	AD-51544		AD-51545		AD-51546		AD-51547
siRNA 投与量 (mg/kg)	25		25		25		25
投与経路	IV	SC	IV	SC	IV	SC	SC
$t_{\max}$ (h)	0.083	1	0.083	0.5	0.083	1	0.5
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	96.5a	11.7	108a	10.9	128a	10.9	12.1
$AUC_{0-\text{last}}$ (h $\mu\text{g/mL}$)	21.6	21.9	22.1	19.9	27.5	20.9	25.3
$MRT_{0-\text{last}}$ (h)	0.17	1.2	0.16	1.1	0.22	1.4	1.3
見かけ $t_{1/2\beta}$ (h) ^b	ND	ND	ND	0.49	ND	1.2	0.56
FSC (%) ^c	-	102	-	90.1	-	76.0	99.2

a: IV 投与後の1回目のサンプリング時間(5分)における濃度
b: 濃度-時間プロファイルの最終段階を明確に決定することができなかったため、見かけの消失半減期($t_{1/2\beta}$)を、IV 投与後に4つ全ての被験物質について決定することができなかった(ND)。結果として、 $t_{1/2\beta}$ -関連 PK パラメーター(例えば、 $AUC_{0-\infty}$, CL , および V_{ss})が報告されなかった。
c: 25 mg/kg の用量での SC 投与および IV 投与後の $AUC_{0-\text{last}}$ のパーセント比として計算される SC バイオアベイラビリティ

【0 4 2 4】

この結果はまた、RNAi 剤 AD-45163、AD-51544、AD-51545

10

20

30

40

50

、AD-51546、およびAD-51547が、IVボラスにより投与されたときよりも皮下投与されたときに肝臓で同等以上の濃度を達成したことも示した。肝臓の薬物動態パラメーターが、下の表5および表6に示されている。同一用量での同一作用剤のIV投与と比較すると、皮下投与後に、肝臓におけるピーク濃度 (C_{max}) および曲線の下面積 (AUC_{0-last}) が2倍～3倍大きかった。肝臓の曝露は、AD-51547で最も高く、AD-51545で最も低かった。平均滞留時間 (MRT) および消失半減期は、AD-51544およびAD-51545と比較してAD-51546およびAD-51547で長かった。皮下投与後、概算のMRTは、AD-51546で40時間、AD-51547で25時間であったが、AD-51544およびAD-51545のMRTは、より短かった (約6～9時間)。AD-51546およびAD-51547の消失半減期 (41～53時間) は、AD-51544およびAD-51545の消失半減期 (6～10時間) よりも長かった。

【0425】

【表 4 8】

表5: TTR-GalNAc siRNAsのマウスへのSC投与後の肝臓のPKパラメーターの推定値の要約

パラメーター	30 mpk AD-45163 (h/c TTR- GalNAc)	25 mpk AD-51544 (h/c TTR- GalNAc)	25 mpk AD-51545 (h/c TTR- GalNAc)	25 mpk AD-51546 (h/c TTR- GalNAc)	25 mpk AD-51547 (h/c TTR- GalNAc)
肝臓 Tmax (h)	8	4	4	2	8
肝臓 Cmax (μg/g)	313	126	80	117	174
肝臓 AUC (h*μg/g)	4519	1092	763	2131	4583

【表 4 9】

表 6: 25 mg/kg での AD-51544, 51545, 51546, または 51547 の IV ポーラス投与または SC 投与後のマウスの肝臓の siRNA PK パラメーター

被験物質	AD-51544		AD-51545		AD-51546		AD-51547
siRNA 投与量(mg/kg)	25		25		25		25
投与経路	IV	SC	IV	SC	IV	SC	SC
t _{max} (h)	1	4	1	4	4	2	8
C _{max} (μg/g)	67.9	126	37.0	80.5	35.3	73.8	174
AUC _{0-_{last}} (h・μg/g)	632	1092	324	763	984	1429	4583
MRT _{0-_{last}} (h)	8.7	6.5	5.9	8.5	45.7	29.4	25.3
見かけ t _{1/2β} (h)	8.1	8.2	5.7	10.0	51.1	41.1	52.7

【0 4 2 7】

実施例 8 : サル血清における RNA i 剤の in vitro での安定性

10

20

30

40

50

RNAi 剤 AD-51544、AD-51545、AD-51546、および AD-51547 の血清安定性をサルでも評価した。この結果は、AD-51544、AD-51545、および AD-51547 のアンチセンス鎖およびセンス鎖が、約 24 時間の期間に亘る血清安定性を示したことを実証した（データは不図示）。

【0428】

実施例 9：RNAi 剤は非ヒト霊長類における TTR タンパク質の抑制を持続させる

RNAi 剤 AD-45163、AD-51544、AD-51545、AD-51546、および AD-51547 の RNA サイレncing 活性を、5 mg/kg での 5 回（1 日 1 回で 5 日間）または 25 mg/kg での 1 回の皮下投与後に、カンクイザルの血清中の TTR タンパク質の抑制を測定することによって評価した。投与前の血清中の TTR タンパク質のレベルを、最初の投与の 11 日前、最初の投与の 7 日前、および最初の投与の 1 日前のレベルを平均することによって評価した。投与後の TTR タンパク質の血清レベルを、最終投与から 1 日後（即ち、5 回の 5 mg/kg の群では試験 5 日目であり、1 回の 25 mg/kg の群では試験 1 日目である）から最終投与から 49 日後（即ち、5 回の 5 mg/kg の群では試験 53 日目であり、1 回の 25 mg/kg の群では試験 49 日目である）まで、血清中のレベルを決定することによって評価した。図 13 を参照されたい。

10

【0429】

TTR タンパク質のレベルは、実施例 6 に記載されたように評価した。この結果は、図 14 ならびに表 7 および表 8 に示されている。

20

【0430】

最大約 50% の TTR タンパク質の最大抑制が、25 mg/kg の AD-45163、AD-51544、AD-51546、および AD-51547 が投与された群で達成された（表 8 を参照）。約 70% の TTR タンパク質のより大きい最大抑制が、5 回の 5 mg/kg の AD-45163、AD-51544、AD-51546、および AD-51547 が投与された群で達成された（表 7 を参照）。RNAi 剤 AD-51545 は、両方の投与プロトコルでより低い抑制しかもたらさなかった。約 20% 以上の有意な抑制が、1 回の 25 mg/kg および 5 回の 5 mg/kg の両方のプロトコルでの AD-51546 および AD-51547 の最終投与から 49 日目まで持続した。一般に、優れた抑制は、1 回の 25 mg/kg のプロトコルよりも 5 回の 5 mg/kg のプロトコルで達成された。

30

【0431】

【表 5 0】

表7 カニクイザルにおける投与前に対する分画血清トランスサイレチン(毎日5 mg/kgで5日間)

	D-11	D-7	D-1	D5	D7	D9	D11	D14	D18	D22	D26	D32	D39	D46	D53
AD-45163	0.98	0.99	1.03	0.71	0.52	0.40	0.34	0.27	0.31	0.39	0.48	0.64	0.68	0.81	0.88
AD-51544	1.02	0.99	0.99	0.60	0.47	0.37	0.35	0.39	0.48	0.58	0.66	0.74	0.83	0.91	0.92
AD-51545	1.03	0.97	1.00	0.73	0.65	0.63	0.69	0.68	0.78	0.87	0.97	1.00	1.03	1.06	1.09
AD-51546	1.01	0.97	1.02	0.59	0.42	0.35	0.30	0.32	0.43	0.58	0.66	0.77	0.92	0.93	0.97
AD-51547	0.99	0.99	1.02	0.74	0.54	0.41	0.34	0.34	0.39	0.49	0.51	0.53	0.65	0.70	0.77

【表 5 1】

表8 カニクイザルにおける投与後に対する分画血清トランスサイレチン(25 mg/kg)

	D-11	D-7	D-1	D1	D3	D5	D7	D10	D14	D18	D22	D28	D35	D42	D49
AD-45163	1.04	1.01	0.95	0.99	0.84	0.67	0.57	0.44	0.45	0.51	0.58	0.66	0.72	0.78	0.85
AD-51544	1.01	1.04	0.95	0.92	0.69	0.57	0.49	0.48	0.56	0.65	0.69	0.77	0.83	0.87	0.94
AD-51545	0.98	1.02	0.99	0.87	0.77	0.69	0.71	0.72	0.84	0.90	0.92	0.99	1.00	1.00	1.00
AD-51546	1.04	1.03	0.93	0.89	0.71	0.62	0.53	0.50	0.55	0.70	0.70	0.69	0.72	0.79	0.84
AD-51547	0.96	1.03	1.01	1.19	0.90	0.70	0.54	0.48	0.50	0.50	0.52	0.58	0.62	0.70	0.72

【0 4 3 3】

実施例 10 : T T R を標的とする R N A i 剤の認容性

10

20

30

40

50

全血アッセイでのサイトカインの評価

TTRを標的とするRNAi剤（AD-45163、AD-51544、AD-51545、AD-51546、およびAD-51547を含む）の認容性を評価するために、各RNAi剤を、3人のヒトドナーからの血液を用いて全血アッセイで試験した。RNAi剤は、300nMのDOTAPでトランスフェクトされるか、またはトランスフェクション剤を含まない1μMの（遊離siRNA）とした。次のサイトカイン／ケモカイン：G-CSF、IFN-γ、IL-10、IL-12（p70）、IL1β、IL-1ra、IL-6、IL-8、IP-10、MCP-1、MIP-1α、MIP-1β、TNFαでは2倍未満の変化であった（結果は不図示）。

【0434】

in vivoでの評価

in vivoでの認容性を評価するために、RNAi剤を、125mg/kgの用量でCD1マウスに皮下注射した。サイトカインの誘導は、AD-45163の皮下注射から2時間後、4時間後、6時間後、24時間後、および48時間後にも全く観察されなかった。有意なサイトカインの誘導は、AD-51544、AD-51545、AD-51546、またはAD-51547の皮下注射から6時間後にも24時間後にも全く観察されなかった。

【0435】

in vivoでの認容性をさらに評価するために、複数のRNAi剤（AD-45163、AD-51544、AD-51545、AD-51546、およびAD-51547を含む）を、1部位当たり1～2mlの投与容量を用いた非ヒト霊長類（カニクイザル）への5～25mgの皮下注射によって試験した。紅斑も浮腫も、注射部位で全く観察されなかった。

【0436】

単回SC投与によるラット認容性試験

毒性を評価するために、ラットに、100mg/kg、250mg/kg、500mg/kg、または750mg/kgのAD-45163を単回皮下注射した（表9を参照されたい）。次の評価を行った；毒性の臨床的徴候、体重、血液学、臨床化学および凝固、器官の重量（肝臓および脾臓）；巨視的および顕微鏡的評価（腎臓、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、睾丸、胸腺、大動脈、心臓、腸（小腸および大腸）。

【0437】

【表52】

表9: 単回SC投与によるラット認容性試験:SDラットに100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg, および750 mg/kgのAD-45163

群	投与レベル (mg/kg)	投与量 (ml/kg)	経路 & 療法	雄SDラットの数	剖検の日
PBS	0	10	SC注射 1日目 (2部位)	7/群 (5匹のTox 動物, 2匹のTK 動物)	4日目
AD-45163 親	100				
	250				
	500				
	750				

【0438】

この結果は、被験物質に関連した毒性の臨床的徴候が、体重、器官の重量、または臨床化学に全く影響を与えないことを示した。組織病理学は、心臓、腎臓、睾丸、脾臓、肝臓、および胸腺で全く観察されなかった。750mg/kgでのWBCにおける有害ではない被験物質に関連した僅かな増加が見られた（↑68%、NEUTおよびMONOにおけ

10

20

30

40

50

る増加に主に起因する)。これらの結果は、ラットでは最大750mg/kgの単回投与が十分に認容性であることを示している。

【0439】

ラットにおける反復皮下投与の認容性

AD-45163の反復皮下投与の認容性を評価するために、300mg/kgの皮下投与を毎日5日間行い、6日目に剖検を行った。試験デザインは表10に示されている。

【0440】

【表53】

表10: ラットにおける5日間の反復投与による認容性試験

10

群	投与レベル (kg/kg)	濃度 (mg/mL)	Tox 動物の数	6日目に剖検
PBS	0	0	2M, 2F	2M, 2F
AD-45163	300	150	2M, 2F	2M, 2F

【0441】

次の結果因子を評価した：臨床的徴候、体重、血液学、臨床化学および凝固、器官の重量、巨視的および顕微鏡的評価（肝臓、脾臓、腎臓、肺、胃腸管、および最初と最後の注射部位）。この結果は、被験物質に関連した臨床的徴候、体重、または器官の重量のいずれも影響を与えず、また被験物質に関連した所見が、臨床血液学および化学に全く見られないことを示した。6日目の活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）がやや長期化する可能性がある（20.4秒対17.4秒）。組織病理学によると、肝臓、脾臓、心臓、および胃腸管には被験物質に関連した所見が全く見られなかった。腎臓では、最小限から軽度の尿細管上皮の肥大（有害ではない）が観察された。最後の注射部位には、有害ではない最小限の多発性単核浸潤が見られた。これらの結果は、親RNAi剤AD-45163の1日5回の300mg/kgの投与がラットでは十分に許容されることを示している。

20

30

【0442】

実施例11：RNAi剤は非ヒト霊長類におけるTTRタンパク質の抑制を持続させる

RNAi剤AD-51547のRNAサイレンシング活性を、このRNAi剤の「負荷段階（loading phase）」の皮下投与：5日間毎日の2.5mg/kg、5mg/kg、または10mg/kgの投与（1日1回を5日間）、これに続くRNAi剤の「維持段階」；毎週2.5mg/kg、5mg/kg、または10mg/kgの4週間の投与後に、カンクイザルの血清中のTTRタンパク質の抑制を測定することによって評価した。投与前のTTRタンパク質の血清レベルを、最初の投与の11日前、最初の投与の7日前、および最初の投与の1日前のレベルを平均することによって評価した。投与後のTTRタンパク質の血清レベルを、負荷段階の1日後から維持段階の最終投与から40

40

【0443】

TTRタンパク質のレベルは、実施例6に記載されているように評価した。この結果は、図15に示されている。

【0444】

最大約80%のTTRタンパク質の最大の抑制は、2.5mg/kg、5mg/kg、または10mg/kgのAD-51547が投与された全ての群で達成された。ナディアノックダウン（nadir knock down）が、約14日目までに全ての群で達成され、抑制が、2.5mg/kg、5mg/kg、または10mg/kgのAD-515

50

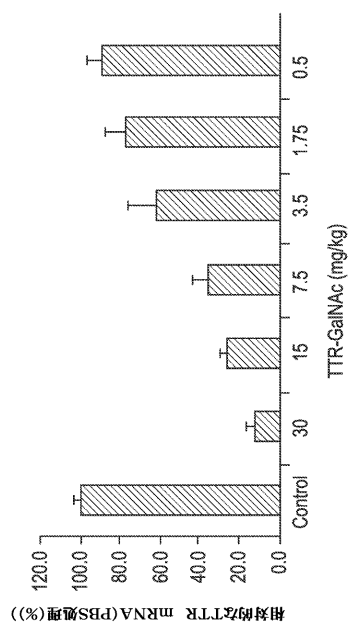
47の毎週の維持投与でナディアノックダウンレベルに維持された。TTRのレベルは、5 mg/kgおよび2.5 mg/kgの投与レベルの最後の維持投与の日から40日を超えても基準値に戻らなかった。

【0445】

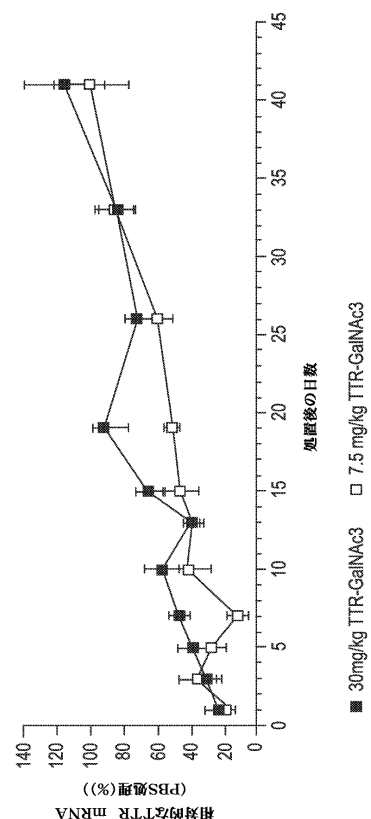
等価物：

当業者であれば、本明細書に記載される特定の実施形態および方法の様々な等価物を認識し、単なる通常の実験を用いてこのような等価物を確かめることができるであろう。このような等価物は、添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。

【図1】

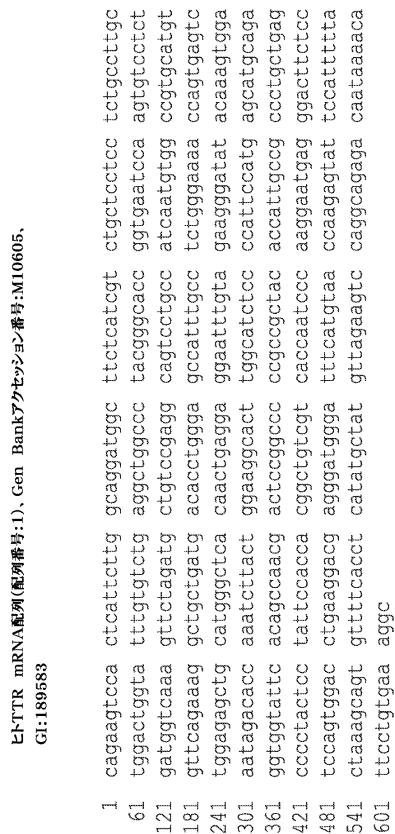


【図2】



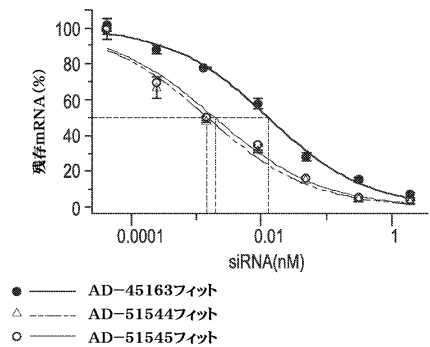
【図 3】

図3



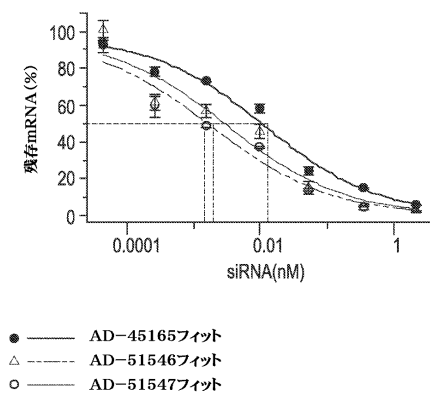
【図 4】

図4



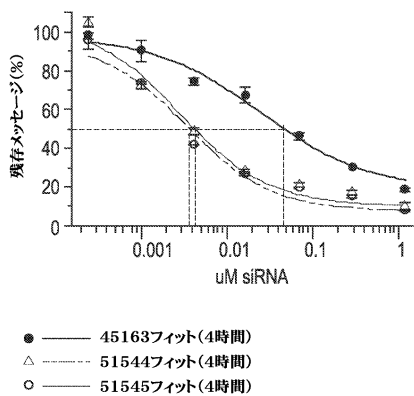
【図 5】

図5

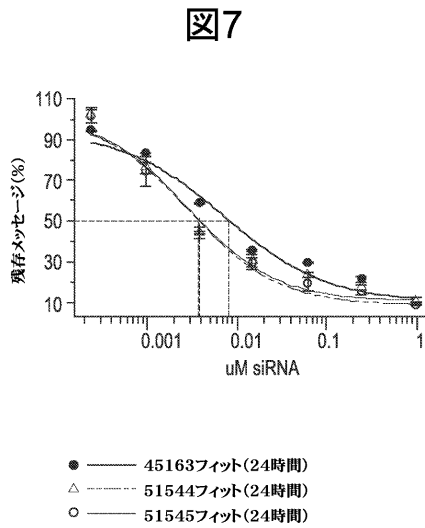


【図 6】

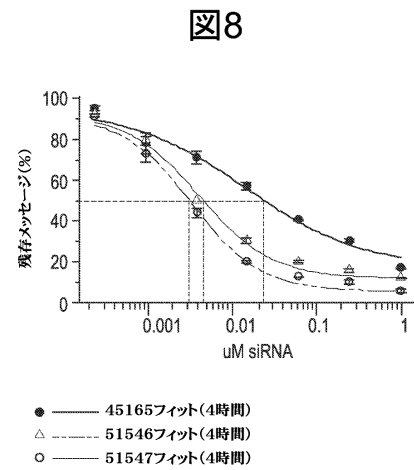
図6



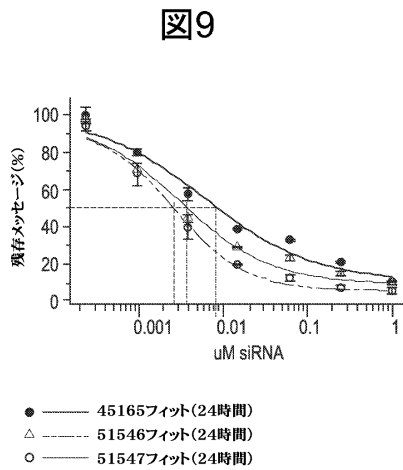
【図 7】



【図 8】



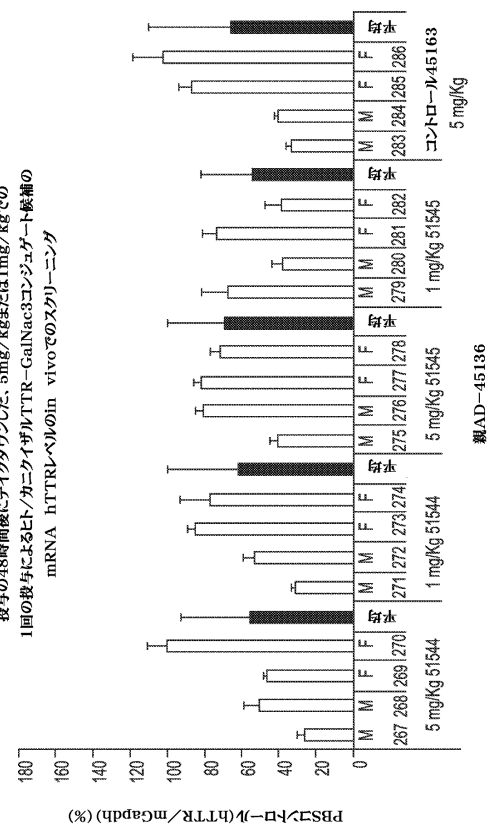
【図 9】



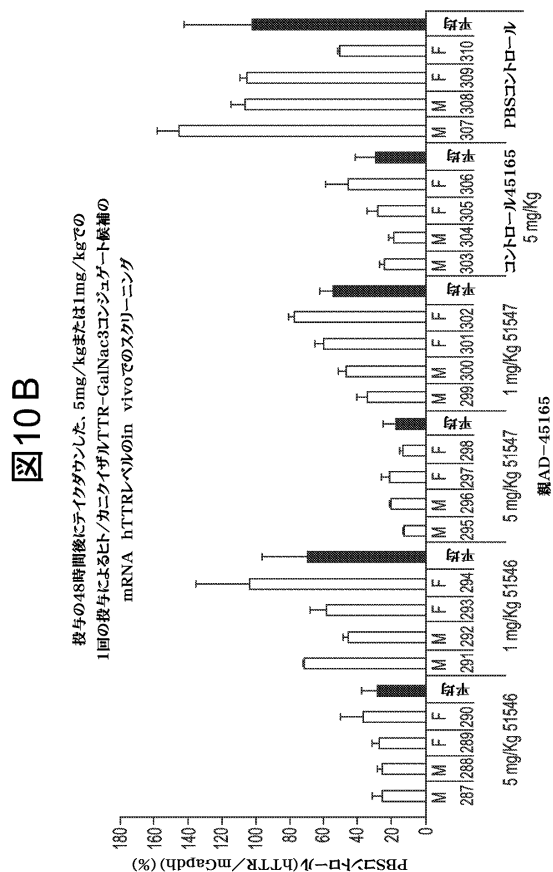
【図 10 A】

図 10 A

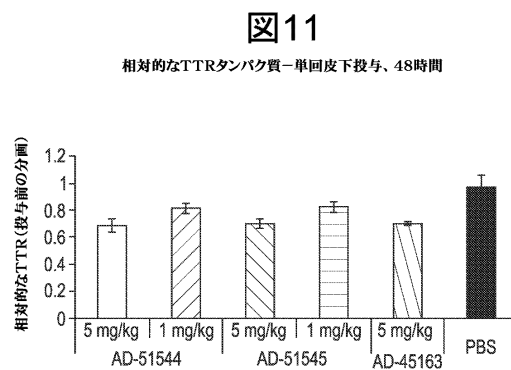
投与の48時間後にテイクダウンした、5mg/kgまたは1mg/kgでの
1回の投与によるヒト/カニクイザルTTR-GalNac3コンジュゲート候補の
mRNA hTTRレベルのin vivoでのスクリーニング



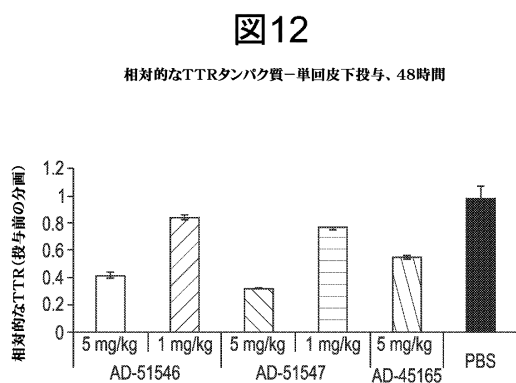
【図 10 B】



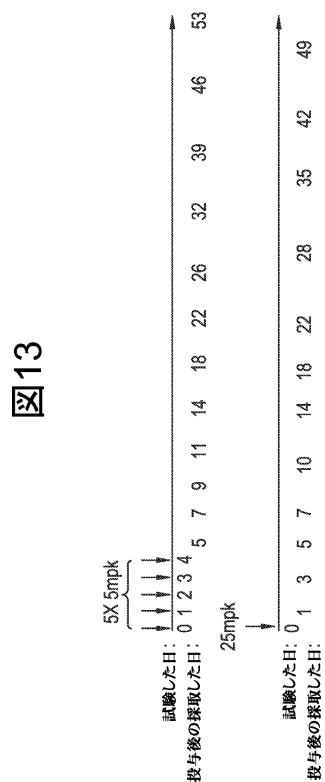
【図 1 1】



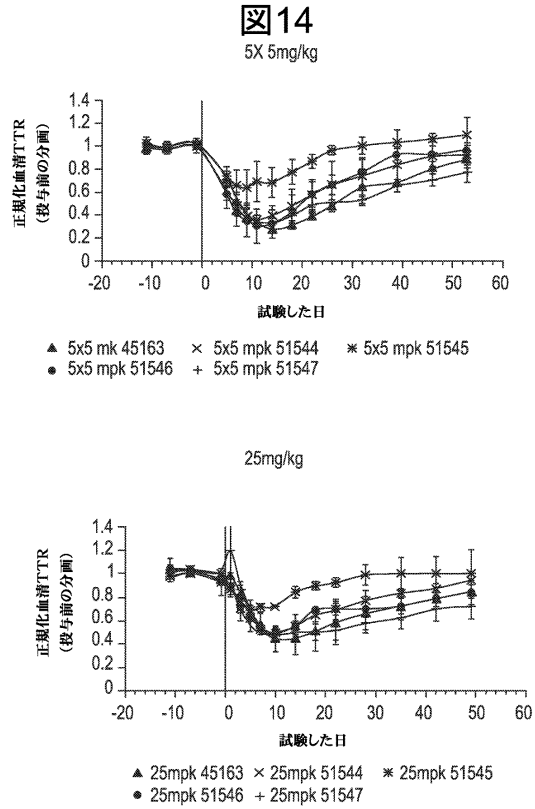
【図 1 2】



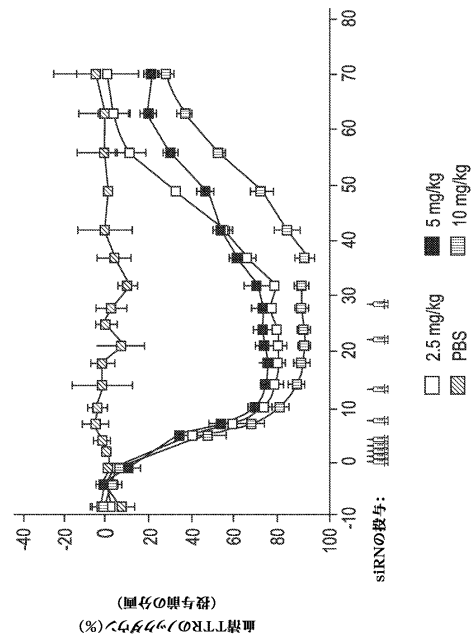
【図 13】



【図 14】



【図 15】

図15

【配列表】

0006165158000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K 31/7105

(31)優先権主張番号 61/680,098

(32)優先日 平成24年8月6日(2012.8.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 カラントッタティル・ジー・ラジーブ
アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 トレイシー・ジーマーマン
アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 ムティア・マノハラン
アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 マルティン・マイアー
アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 サティアナラヤーナ・クチマンチ
アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 クラウス・カリセ
アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

審査官 石井 裕美子

(56)参考文献 国際公開第2011/123468 (WO, A1)
特表2011-505425 (JP, A)
国際公開第2010/048228 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7105
A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	43/00
C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)