

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-521907
(P2024-521907A)

(43)公表日 令和6年6月4日(2024.6.4)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 C 0 8 6
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00		
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全385頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-574468(P2023-574468)			(71)出願人	505369158
(86)(22)出願日	令和4年5月31日(2022.5.31)				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
(85)翻訳文提出日	令和6年1月25日(2024.1.25)				A L N Y L A M P H A R M A C E U T I C A L S , I N C .
(86)国際出願番号	PCT/US2022/031519				アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート675、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(87)国際公開番号	WO2022/256290				
(87)国際公開日	令和4年12月8日(2022.12.8)				
(31)優先権主張番号	63/196,791				
(32)優先日	令和3年6月4日(2021.6.4)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(71)出願人	597160510
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く				リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
					R E G E N E R O N P H A R M A C E U T I C A L S , I N C .
					アメリカ合衆国10591-6707ニ最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト9番染色体オープンリーディングフレーム72 (C9ORF72) iRNA剤組成物及びその使用方法

(57)【要約】

本開示は、ヒト9番染色体オープンリーディングフレーム72 (C9orf72) 遺伝子を標的とする二本鎖リボ核酸 (dsRNAi) 剤及び組成物、並びにC9orf72遺伝子の発現を阻害する方法、及びC9orf72関連疾患又は障害、例えば、C9orf72筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、又はC9orf72拡張に起因するハンチントン様症候群を有する対象を、かかるdsRNAi剤及び組成物を使用して治療する方法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C 9 o r f 7 2 アンチセンス RNA 転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤であって、前記 d s R N A 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖が、配列番号 1 7 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号 1 8 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤。

10

【請求項 2】

C 9 o r f 7 2 アンチセンス RNA 転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤であって、前記 d s R N A 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖が、配列番号 1 9 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号 2 0 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤。

20

【請求項 3】

C 9 o r f 7 2 アンチセンス RNA 転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤であって、

前記 d s R N A 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖が、表 2、3、1 0 A、1 0 C、1 1、及び 1 2 のうちのいずれか 1 つにあるセンス鎖及びアンチセンス鎖のいずれかからなる群から選択されるセンス鎖又はアンチセンス鎖であり、

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤。

【請求項 4】

C 9 o r f 7 2 アンチセンス RNA 転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤であって、前記 d s R N A 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

30

前記センス鎖が、配列番号 1 3 のヌクレオチド 2 7 5 7 3 2 9 6 ~ 2 7 5 7 3 3 1 8、2 7 5 7 3 3 1 4 ~ 2 7 5 7 3 3 3 6、2 7 5 7 3 3 1 9 ~ 2 7 5 7 3 3 4 1、2 7 5 7 3 5 6 2 ~ 2 7 5 7 3 5 8 4、2 7 5 7 3 5 8 5 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 1 4、2 7 5 7 3 5 9 9 ~ 2 7 5 7 3 6 2 1、2 7 5 7 3 6 0 8 ~ 2 7 5 7 3 6 3 0、2 7 5 7 3 6 1 6 ~ 2 7 5 7 3 6 3 8、2 7 5 7 3 6 1 9 ~ 2 7 5 7 3 6 4 1、2 7 5 7 3 6 2 2 ~ 2 7 5 7 3 6 4 4、2 7 5 7 3 6 3 3 ~ 2 7 5 7 3 6 5 5、2 7 5 7 3 6 9 0 ~ 2 7 5 7 3 7 1 2、又は 2 7 5 7 3 7 1 7 ~ 2 7 5 7 3 7 3 9 とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含み、

40

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤。

【請求項 5】

前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖が、A D - 1 4 4 6 2 1 3 . 1、A D - 1 4 4 6 2 1 7 . 1、A D - 1 4 4 6 2 2 2 . 1、A D - 1 4 4 6 2 3 4 . 1、A D - 1 4 4 6 2 4 3 . 1、A D - 1 4 4 6 2 4 6 . 1、A D - 1 4 4 6 2 5 2 . 1、A D - 1 4 4 6 2 5 9 . 1、A D - 1 4 4 6 2 6 5 . 1、A D - 1 4 4 6 2 6 8 . 1、A D - 1 4 4 6 2 7 1 . 1、A D - 1 4 4 6 2 7 9 . 1、A D - 1 4 4 6 2 8 9 . 1、及び A D - 1 4 4 6 2 9 4 . 1 からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖から選択されるセンス鎖又はアンチセンス鎖である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

50

【請求項 6】

前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖が、AD-1446213.1、AD-1446246.1、及びAD-1446268.1からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖から選択されるセンス鎖又はアンチセンス鎖である、請求項1～5のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項 7】

C9orf72センスRNA転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、

前記dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

前記アンチセンス鎖が、表5、6、10B、及び10Dのうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤。

【請求項 8】

c9orf72 RNAのレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、

前記dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

前記センス鎖が、配列番号1のヌクレオチド1～23、15～37、33～55、37～59、59～81、62～84、又は62～91のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

前記アンチセンス鎖が、配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤。

【請求項 9】

前記アンチセンス鎖が、AD-1446073.1、AD-1446075.1、AD-1285246.2、AD-1446084.1、AD-1446087.1、AD-1446090.1、及びAD-1446095.1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項7又は8に記載のdsRNA剤。

【請求項 10】

c9orf72センスRNA転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、

前記dsRNAが、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

前記センス鎖が、配列番号15のヌクレオチド5197～5219、5213～5235、5223～5245、5226～5248、5227～5249、5228～5250、5229～5251、5230～5252、5231～5253、5233～5255、5235～5256、5241～5263、5245～5267、5248～5270、5539～5561、5547～5569、5917～5939、5936～5958、5954～5976、6008～6030、6021～6043、6036～6058、6043～6065、又は6048～6070のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

前記アンチセンス鎖が、配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤。

【請求項 11】

前記アンチセンス鎖が、AD-1285231.1、AD-1285232.1、AD

10

20

30

40

50

－1285233.1、AD－1285235.1、AD－1285237.1、AD－1285239.1、AD－1285240.1、AD－1285242.1、AD－1285244.1、AD－1285238.1、AD－1285243.1、AD－1285234.1、AD－1285241.1、AD－1285236.1、AD－1446111.1、AD－1446117.1、AD－1446147.1、AD－1446157.1、AD－1446168.1、AD－1446180.1、AD－1446189.1、AD－1446196.1、AD－1446202.1、AD－1446205.1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項7又は10に記載のdsRNA剤。

10

【請求項12】

前記アンチセンス鎖が、AD－1285238.1及びAD－1285234.1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項7、10、及び11のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項13】

c9orf72センスRNA転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、

前記dsRNAが、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

前記センス鎖が、配列番号15のヌクレオチド5015～5052、5017～5040、5032～5059、5032～5055、5033～5055、5035～5059、5036～5059、5058～5087、5059～5087、5059～5084、5064～5087、5197～5222、5213～5267、5223～5252、5229～5252、5233～5263、5516～5570、5539～5565、5539～5562、5545～5570、5545～5569、5593～5616、5883～5950、5917～5950、5919～5950、5923～5950、5934～5977、5934～5957、5938～5977、5938～5965、5938～5961、5947～5977、5947～5973、5972～6001、5973～5997、6006～6029、6011～6070、6011～6039、6011～6038、6015～6038、6019～6045、6019～6042、6033～6070、6035～6065、6035～6059、又は6040～6063のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

20

30

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤。

【請求項14】

c9orf72センスRNA転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、

前記dsRNAが、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

前記センス鎖が、配列番号1のヌクレオチド15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は64～87のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

40

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤。

【請求項15】

c9orf72アンチセンスRNA転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、

50

前記 d s R N A が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

前記センス鎖が、配列番号 13 のヌクレオチド 27573296～27573584、
27573296～27573575、27573301～27573338、2757
3318～27573342、27573555～27573583、27573581
～27573607、27573584～27573607、27573588～275
73671、27573588～27573666、27573588～2757362
4、27573592～27573624、27573592～27573617、27
573598～27573624、27573599～27573623、275736
06～27573655、27573606～27573652、27573606～2
7573647、27573654～27573712、又は27573707～275
73740のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる
少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号14
の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

10

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方
が、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸（d s R N A）剤。

【請求項16】

C9orf72センスRNA転写産物のレベルを低減させるための二本鎖リボ核酸（d
s R N A）剤であって、

前記 d s R N A 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

前記アンチセンス鎖が、表8及び9のうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオ
チド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連
続するヌクレオチドを含み、

20

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方
が、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸（d s R N A）剤。

【請求項17】

前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方
が、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる、請求項1～16のいずれか一項に記
載の d s R N A 剤。

【請求項18】

前記親油性部分が、前記 d s R N A 剤の前記二本鎖領域内の1つ以上の内部位置にコン
ジュゲートされる、請求項1～17のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

30

【請求項19】

前記親油性部分が、リンカー又は担体を介してコンジュゲートされる、請求項1～18
のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

【請求項20】

l o g K o w によって測定した前記親油性部分の親油性が、0を超える、請求項1～1
9のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

【請求項21】

前記二本鎖RNA i 剤の血漿タンパク質結合アッセイにおいて非結合画分によって測定
した前記二本鎖RNA i 剤の疎水性が、0.2を超える、請求項1～20のいずれか一項
に記載の d s R N A 剤。

40

【請求項22】

前記血漿タンパク質結合アッセイが、ヒト血清アルブミンタンパク質を使用する電気泳
動移動度シフトアッセイである、請求項21に記載の d s R N A 剤。

【請求項23】

前記センス鎖ヌクレオチドのうちの5個以下及び前記アンチセンス鎖の前記ヌクレオチ
ドのうちの5個以下が、非修飾ヌクレオチドである、請求項1に記載の d s R N A 剤。

【請求項24】

前記センス鎖の前記ヌクレオチドの全て及び前記アンチセンス鎖の前記ヌクレオチドの
全てが、修飾ヌクレオチドである、請求項1に記載の d s R N A 剤。

50

【請求項 25】

前記修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも1個が、デオキシヌクレオチド、3'末端デオキシチミン(dT)ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシルヌクレオチド、2'-ホスフェートヌクレオチド、2'-5'連結リボヌクレオチド(3'-RNA)、ロックドヌクレオチド、アンロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束されたエチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、逆方向脱塩基残基、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-O-アリル修飾ヌクレオチド、2'-C-アルキル修飾ヌクレオチド、2'-ヒドロキシ修飾ヌクレオチド、2'-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、2', 3'-セコ修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、非天然塩基を含むヌクレオチド、テトラヒドロピラン修飾ヌクレオチド、1, 5-アンヒドロヘキシトール修飾ヌクレオチド、シクロヘキセニル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、5'-メチルホスホネート基を含むヌクレオチド、5'ホスフェート又は5'ホスフェート模倣体を含むヌクレオチド、ビニルホスホネートを含むヌクレオチド、グリコール核酸(GNA)を含むヌクレオチド、グリコール核酸S異性体(S-GNA)を含むヌクレオチド、2'-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-5-ホスフェートを含むヌクレオチド、2'-デオキシチミジン-3'ホスフェートを含むヌクレオチド、2'-デオキシグアノシン-3'-ホスフェートを含むヌクレオチド、並びにコレステリル誘導体及びドデカン酸ビスデシルアミド基に連結した末端ヌクレオチド、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1、23、及び24のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項 26】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、3'末端デオキシチミンヌクレオチド(dT)、ロックドヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシルヌクレオチド、2'-ホスフェートヌクレオチド、グリコールヌクレオチド、ビニル-ホスホネートヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、及び非天然塩基を含むヌクレオチドからなる群から選択される、請求項25に記載のdsRNA剤。

【請求項 27】

前記修飾ヌクレオチドが、3'末端デオキシチミンヌクレオチド(dT)の短い配列を含む、請求項25に記載のdsRNA剤。

【請求項 28】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、GNA修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシル修飾ヌクレオチド、2'-ホスフェート修飾ヌクレオチド、ビニル-ホスホネート修飾ヌクレオチド、及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチドである、請求項25に記載のdsRNA剤。

【請求項 29】

少なくとも1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、請求項1～28のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項 30】

前記dsRNA剤が、6～8個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、請求項29に記載のdsRNA剤。

【請求項 31】

各鎖が、30ヌクレオチド以下の長さである、請求項1～30のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項 32】

少なくとも1つの鎖が、少なくとも1個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項1～31のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項 33】

少なくとも1つの鎖が、少なくとも2個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項1～31のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項34】

前記二本鎖領域が、15～30ヌクレオチド対の長さである、請求項1～33のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項35】

前記二本鎖領域が、17～23ヌクレオチド対の長さである、請求項34に記載のdsRNA剤。

【請求項36】

前記二本鎖領域が、17～25ヌクレオチド対の長さである、請求項34に記載のdsRNA剤。

【請求項37】

前記二本鎖領域が、23～27ヌクレオチド対の長さである、請求項34に記載のdsRNA剤。

【請求項38】

前記二本鎖領域が、19～21ヌクレオチド対の長さである、請求項34に記載のdsRNA剤。

【請求項39】

前記二本鎖領域が、21～23ヌクレオチド対の長さである、請求項34に記載のdsRNA剤。

【請求項40】

各鎖が、19～30ヌクレオチドの長さである、請求項1～39のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項41】

各鎖が、19～23ヌクレオチドの長さである、請求項1～39のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項42】

各鎖が、21～23ヌクレオチドの長さである、請求項1～40のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項43】

前記1つ以上の親油性部分が、リンカー又は担体を介して、少なくとも1つの鎖上の1つ以上の内部位置にコンジュゲートされる、請求項18に記載のdsRNA剤。

【請求項44】

前記内部位置が、前記少なくとも1つの鎖の各端から末端2つの位置を除く全ての位置を含む、請求項43に記載のdsRNA剤。

【請求項45】

前記内部位置が、前記少なくとも1つの鎖の各端から末端3つの位置を除く全ての位置を含む、請求項43に記載のdsRNA剤。

【請求項46】

前記内部位置が、前記センス鎖の切断部位領域を除く、請求項43に記載のdsRNA剤。

【請求項47】

前記内部位置が、前記センス鎖の5'末端から数えて9～12位を除く全ての位置を含む、請求項46に記載のdsRNA剤。

【請求項48】

前記内部位置が、前記センス鎖の3'末端から数えて11～13位を除く全ての位置を含む、請求項46に記載のdsRNA剤。

【請求項49】

前記内部位置が、前記アンチセンス鎖の切断部位領域を除く、請求項43に記載のdsRNA剤。

【請求項 50】

前記内部位置が、前記アンチセンス鎖の 5' 末端から数えて 12～14 位を除く全ての位置を含む、請求項 49 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 51】

前記内部位置が、3' 末端から数えて前記センス鎖上の 11～13 位及び 5' 末端から数えて前記アンチセンス鎖上の 12～14 位を除く全ての位置を含む、請求項 49 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 52】

前記 1 つ以上の親油性部分が、各鎖の 5' 末端から数えて、前記センス鎖上の 4～8 位及び 13～18 位並びに前記アンチセンス鎖上の 6～10 位及び 15～18 位からなる群から選択される内部位置のうちの 1 つ以上にコンジュゲートされる、請求項 18～51 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

10

【請求項 53】

前記 1 つ以上の親油性部分が、各鎖の 5' 末端から数えて、前記センス鎖上の 5、6、7、15、及び 17 位、並びに前記アンチセンス鎖上の 15 及び 17 位からなる群から選択される内部位置のうちの 1 つ以上にコンジュゲートされる、請求項 52 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 54】

前記二本鎖領域中の前記内部位置が、前記センス鎖の切断部位領域を除く、請求項 18 に記載の dsRNA 剤。

20

【請求項 55】

前記センス鎖が、21ヌクレオチドの長さであり、前記アンチセンス鎖が、23ヌクレオチドの長さであり、前記親油性部分が、5' 末端から数えて、前記センス鎖の 21 位、20 位、15 位、1 位、7 位、6 位、若しくは 2 位、又は前記アンチセンス鎖の 16 位にコンジュゲートされる、請求項 18～54 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 56】

前記親油性部分が、5' 末端から数えて、前記センス鎖の 21 位、20 位、15 位、1 位、又は 7 位にコンジュゲートされる、請求項 55 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 57】

前記親油性部分が、5' 末端から数えて、前記センス鎖の 21 位、20 位、又は 15 位にコンジュゲートされる、請求項 55 に記載の dsRNA 剤。

30

【請求項 58】

前記親油性部分が、5' 末端から数えて、前記センス鎖の 20 位又は 15 位にコンジュゲートされる、請求項 55 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 59】

前記親油性部分が、5' 末端から数えて、前記アンチセンス鎖の 16 位にコンジュゲートされる、請求項 55 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 60】

前記親油性部分が、脂肪族化合物、脂環式化合物、又は多環脂環式化合物である、請求項 18～59 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

40

【請求項 61】

前記親油性部分が、脂質、コレステロール、レチノイン酸、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サノール、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、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、又はフェノキサジンからなる群から選択される、請求項 60 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 62】

前記親油性部分が、飽和又は不飽和 C4～C30 炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホネート、ホスフェート、チオール、アジド、及びアルキンからなる

50

群から選択される任意選択の官能基と、を含む、請求項 60 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 63】

前記親油性部分が、飽和又は不飽和 C6～C18 炭化水素鎖を含む、請求項 62 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 64】

前記親油性部分が、飽和又は不飽和 C16 炭化水素鎖を含む、請求項 62 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 65】

前記飽和又は不飽和 C16 炭化水素鎖が、前記鎖の 5' 末端から数えて 6 位にコンジュゲートされる、請求項 64 に記載の dsRNA 剤。

10

【請求項 66】

前記親油性部分が、前記内部位置又は前記二本鎖領域内の 1 つ以上のヌクレオチドを代替する担体を介してコンジュゲートされる、請求項 18～65 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 67】

前記担体が、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] ジオキソラニル、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、テトラヒドロフラニル、及びデカリニルからなる群から選択される環式基であるか、又はセリノール骨格若しくはジエタノールアミン骨格系の非環式部分である、請求項 66 に記載の dsRNA 剤。

20

【請求項 68】

前記親油性部分が、前記二本鎖 dsRNA 剤に、エーテル、チオエーテル、尿素、炭酸塩、アミン、アミド、マレイミド、チオエーテル、ジスルフィド、ホスホジエステル、スルホンアミド連結、クリック反応の生成物、又はカルバメートを含むリンカーを介してコンジュゲートされる、請求項 18～65 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 69】

前記親油性部分が、核酸塩基、糖部分、又はヌクレオシド間連結にコンジュゲートされる、請求項 18～68 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 70】

前記親油性部分又は標的化リガンドが、DNA、RNA、ジスルフィド、アミド、官能化された単糖又はオリゴ糖であって、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖又はオリゴ糖、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される生化学的に切断可能なリンカーを介してコンジュゲートされる、請求項 18～69 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

30

【請求項 71】

前記センス鎖の 3' 末端が、アミンを有する環式基である末端キャップを介して保護され、前記環式基が、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] ジオキソラニル、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、テトラヒドロフラニル、及びデカリニルからなる群から選択される、請求項 18～70 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

40

【請求項 72】

神経細胞、神経組織中の細胞、中枢神経系組織中の細胞、又は肝臓組織を標的とする標的化リガンドを更に含む、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 73】

前記標的化リガンドが、GalNAc コンジュゲートである、請求項 72 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 74】

連結リン原子が Sp 配置である、前記アンチセンス鎖の 3' 末端における第 1 のヌクレ

50

オチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子が R p 配置である、前記アンチセンス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、及び
連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、前記センス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 1 ～ 73 のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

【請求項 75】

連結リン原子が S p 配置である、前記アンチセンス鎖の 3' 末端における前記第 1 及び第 2 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子が R p 配置である、前記アンチセンス鎖の 5' 末端における前記第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに
連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、前記センス鎖の 5' 末端における前記第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 1 ～ 73 のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

10

【請求項 76】

連結リン原子が S p 配置である、前記アンチセンス鎖の 3' 末端における前記第 1、第 2、及び第 3 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子が R p 配置である、前記アンチセンス鎖の 5' 末端における前記第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに
連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、前記センス鎖の 5' 末端における前記第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 1 ～ 73 のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

20

【請求項 77】

連結リン原子が S p 配置である、前記アンチセンス鎖の 3' 末端における前記第 1 及び第 2 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子が R p 配置である、前記アンチセンス鎖の 3' 末端における前記第 3 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子が R p 配置である、前記アンチセンス鎖の 5' 末端における前記第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに
連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、前記センス鎖の 5' 末端における前記第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 1 ～ 73 のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

30

【請求項 78】

連結リン原子が S p 配置である、前記アンチセンス鎖の 3' 末端における前記第 1 及び第 2 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子が R p 配置である、前記アンチセンス鎖の 5' 末端における前記第 1 及び第 2 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに
連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、前記センス鎖の 5' 末端における前記第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 1 ～ 73 のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

40

【請求項 79】

前記アンチセンス鎖の 5' 末端にホスフェート又はホスフェート模倣体を更に含む、請求項 1 ～ 78 のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

【請求項 80】

前記ホスフェート模倣体が、5'-ビニルホスホネート (V P) である、請求項 79 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 81】

前記二本鎖の前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 つの位置にある塩基対が、A U 塩基対である、請求項 1 ～ 80 のいずれか一項に記載の d s R N A 剤。

【請求項 82】

50

前記センス鎖が、21ヌクレオチドの長さであり、前記アンチセンス鎖が、23ヌクレオチドの長さである、請求項1～81のいずれか一項に記載のdsRNA剤。

【請求項83】

請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤を含む、細胞。

【請求項84】

請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤を含む、C9orf72の発現を阻害するための医薬組成物。

【請求項85】

請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤と、脂質製剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項86】

dsRNA剤が、非緩衝溶液中にある、請求項84又は85に記載の医薬組成物。

【請求項87】

前記非緩衝溶液が、生理食塩水又は水である、請求項86に記載の医薬組成物。

【請求項88】

前記dsRNA剤が、緩衝溶液中にある、請求項84又は85に記載の医薬組成物。

【請求項89】

前記緩衝溶液が、酢酸塩、クエン酸塩、プロタミン、炭酸塩、若しくはリン酸塩、又はそれらのいずれかの組み合わせを含む、請求項88に記載の医薬組成物。

【請求項90】

前記緩衝溶液が、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である、請求項88に記載の医薬組成物。

【請求項91】

C9orf72の発現を阻害するための2つ以上の二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を含む組成物であって、

各dsRNA剤が、独立して、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

C9orf72の前記アンチセンス鎖を標的とする第1のdsRNA剤が、

a) 配列番号17のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号18のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

b) 配列番号19のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号20のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

c) 表2、3、10A、10C、11、及び12のうちのいずれか1つにあるアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれかからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアンチセンスを含む、dsRNA剤、

d) 配列番号13のヌクレオチド27573296～27573318、27573314～27573336、27573319～27573341、27573562～27573584、27573585～27573607、27573592～27573614、27573599～27573621、27573608～27573630、27573616～27573638、27573619～27573641、27573622～27573644、27573633～27573655、27573690～27573712、又は27573717～27573739とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、センス鎖を含む、dsRNA剤、並びに

e) 配列番号13のヌクレオチド27573296～27573584、27573296～27573575、27573301～27573338、27573318～2

10

20

30

40

50

7 5 7 3 3 4 2、2 7 5 7 3 5 5 5～2 7 5 7 3 5 8 3、2 7 5 7 3 5 8 1～2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 8 4～2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 8 8～2 7 5 7 3 6 7 1、2 7 5 7 3 5 8 8～2 7 5 7 3 6 6 6、2 7 5 7 3 5 8 8～2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 2～2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 2～2 7 5 7 3 6 1 7、2 7 5 7 3 5 9 8～2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 9～2 7 5 7 3 6 2 3、2 7 5 7 3 6 0 6～2 7 5 7 3 6 5 5、2 7 5 7 3 6 0 6～2 7 5 7 3 6 5 2、2 7 5 7 3 6 0 6～2 7 5 7 3 6 4 7、2 7 5 7 3 6 5 4～2 7 5 7 3 7 1 2、又は2 7 5 7 3 7 0 7～2 7 5 7 3 7 4 0のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号14の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、からなる群から選択され、

10

C 9 o r f 7 2の前記センス鎖を標的とする第2のdsRNA剤が、

a) 配列番号1のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号5のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

b) 配列番号15のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号16のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

20

c) 表5、6、10B、及び10Dのうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖を含む、dsRNA剤、

d) 配列番号1のヌクレオチド1～23、15～37、33～55、37～59、59～81、62～84、又は69～91のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

e) 配列番号15のヌクレオチド5197～5219、5213～5235、5223～5245、5226～5248、5227～5249、5228～5250、5229～5251、5230～5252、5231～5253、5233～5255、5235～5256、5241～5263、5245～5267、5233～5255、5248～5270、5539～5561、5547～5569、5917～5939、5936～5958、5954～5976、6008～6030、6021～6043、6036～6058、6043～6065、又は6048～6070のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

30

f) 配列番号15のヌクレオチド5015～5052、5017～5040、5032～5059、5032～5055、5033～5055、5035～5059、5036～5059、5058～5087、5059～5087、5059～5084、5064～5087、5197～5222、5213～5267、5223～5252、5229～5252、5233～5263、5516～5570、5539～5565、5539～5562、5545～5570、5545～5569、5593～5616、5883～5950、5917～5950、5919～5950、5923～5950、5934～5977、5934～5957、5938～5977、5938～5965、5938～5961、5947～5977、5947～5973、5972～6001、5973～5997、6006～6029、6011～6070、6011～6039、6011～6038、6015～6038、6019～6045、6019～6042、6033～6070、6035～6065、6035～6059、又は6040～6063のヌク

40

50

レオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

g) 配列番号1のヌクレオチド15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は64～87のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、並びに

10

h) 表8及び9のうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖を含む、dsRNA剤、からなる群から選択され、

前記第1のdsRNA、前記第2のdsRNA、又は前記第1のdsRNAと前記第2のdsRNAとの両方の前記センス鎖、前記アンチセンス鎖、又は前記センス鎖と前記アンチセンス鎖との両方が、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項92】

前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖が、AD-1446213.1、AD-1446217.1、AD-1446222.1、AD-1446234.1、AD-1446243.1、AD-1446246.1、AD-1446252.1、AD-1446259.1、AD-1446265.1、AD-1446268.1、AD-1446271.1、AD-1446279.1、AD-1446289.1、及びAD-1446294.1からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項91に記載の組成物。

20

【請求項93】

前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖が、AD-1446213.1、AD-1446246.1、及びAD-1446268.1からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項91又は92に記載の組成物。

30

【請求項94】

前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖が、AD-1446073.1、AD-1446075.1、AD-1285246.2、AD-1446084.1、AD-1446087.1、AD-1446090.1、及びAD-1446095.1からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項91～93に記載の組成物。

【請求項95】

前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖が、AD-1285238.1及びAD-1285234.1からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項91～94のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項96】

前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖が、AD-1285231.1、AD-1285232.1、AD-1285233.1、AD-1285235.1、AD-1285237.1、AD-1285239.1、AD-1285240.1、AD-1285242.1、AD-1285244.1、AD-1285243.1、AD-1285241.1、AD-1285236.1、AD-1446111.1、AD-1446117.1、AD-1446147.1、AD-1446157.1、AD-1446168.1

50

、A D－1 4 4 6 1 8 0．1、A D－1 4 4 6 1 8 9．1、A D－1 4 4 6 1 9 6．1、A D－1 4 4 6 2 0 2．1、A D－1 4 4 6 2 0 5．1からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項91～95のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項97】

前記第1のdsRNA剤の前記アンチセンス鎖が、A D－1 4 4 6 2 1 3．1、A D－1 4 4 6 2 4 6．1、及びA D－1 4 4 6 2 6 8．1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、前記第2のdsRNA剤の前記アンチセンス鎖が、A D－1 2 8 5 2 3 8．1及びA D－1 2 8 5 2 3 4．1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項91に記載の組成物。

【請求項98】

a) 前記第1のdsRNA剤が、A D－1 4 4 6 2 1 3のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、A D－1 2 8 5 2 3 8のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

b) 前記第1のdsRNA剤が、A D－1 4 4 6 2 1 3のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、A D－1 2 8 5 2 3 4のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

c) 前記第1のdsRNA剤が、A D－1 4 4 6 2 4 6のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、A D－1 2 8 5 2 3 8のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

d) 前記第1のdsRNA剤が、A D－1 4 4 6 2 4 6のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、A D－1 2 8 5 2 3 4のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

e) 前記第1のdsRNA剤が、A D－1 4 4 6 2 6 8のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、A D－1 2 8 5 2 3 8のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

f) 前記第1のdsRNA剤が、A D－1 4 4 6 2 6 8のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、A D－1 2 8 5 2 3 4のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む、請求項91に記載の組成物。

【請求項99】

a) 前記第1のdsRNA剤が、A D－1 4 4 6 2 1 3のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、A D－1 2 8 5 2 3 8のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、

b) 前記第1のdsRNA剤が、A D－1 4 4 6 2 1 3のアンチセンス鎖及び／又はセ

ンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、AD-1285234のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、

c) 前記第1のdsRNA剤が、AD-1446246のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、AD-1285238のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、

d) 前記第1のdsRNA剤が、AD-1446246のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、AD-1285234のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、

e) 前記第1のdsRNA剤が、AD-1446268のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、AD-1285238のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、あるいは

f) 前記第1のdsRNA剤が、AD-1446268のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、前記第2のdsRNA剤が、AD-1285234のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含む、請求項98に記載の組成物。

【請求項100】

前記第1のdsRNA、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる、請求項91～99のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項101】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域内の1つ以上の内部位置にコンジュゲートされる、請求項91～100のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項102】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方に、リンカー又は担体を介してコンジュゲートされる、請求項91～101のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項103】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方にコンジュゲートした前記親油性部分の親油性が、log Kowによって測定して、0を超える、請求項91～102のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項104】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の疎水性が、前記dsRNA剤の血漿タンパク質結合アッセイにおいて非結合分画によって測定して、0.2を超える、請求項91～103のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項105】

前記血漿タンパク質結合アッセイが、ヒト血清アルブミンタンパク質を使用する電気泳動移動度シフトアッセイである、請求項104に記載の組成物。

【請求項106】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の前記センス鎖ヌクレオチドのうちの5個以下及び前記アンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの5個以下が、非修飾ヌクレオチドである、請求項91に記載の組成物。

【請求項107】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の前記センス鎖のヌクレオチドの全て及び前記アンチセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドである、請求項91に記載の組成物。

【請求項108】

前記修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも1個が、デオキシヌクレオチド、3'末端

10

20

30

40

50

デオキシチミン（dT）ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシルヌクレオチド、2'-ホスフェートヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、アンロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束されたエチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、逆方向脱塩基残基、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-O-アリル修飾ヌクレオチド、2'-C-アルキル修飾ヌクレオチド、2'-ヒドロキシ修飾ヌクレオチド、2'-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、2', 3'-セコ修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、非天然塩基を含むヌクレオチド、テトラヒドロピラン修飾ヌクレオチド、1, 5-アンヒドロヘキシトール修飾ヌクレオチド、シクロヘキセニル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、5'-メチルホスホネート基を含むヌクレオチド、5'ホスフェート又は5'ホスフェート模倣体を含むヌクレオチド、ビニルホスホネートを含むヌクレオチド、アデノシン-グリコール核酸（GNA）を含むヌクレオチド、チミジン-グリコール核酸（GNA）S異性体を含むヌクレオチド、2'-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-5-ホスフェートを含むヌクレオチド、2'-デオキシチミジン-3'ホスフェートを含むヌクレオチド、2'-デオキシグアノシン-3'-ホスフェートを含むヌクレオチド、並びにコレステリル誘導体及びドデカン酸ビスデシルアミド基に連結した末端ヌクレオチド、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項91、106、及び107のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

【請求項109】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、3'末端デオキシチミンヌクレオチド（dT）、ロックドヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシルヌクレオチド、2'-ホスフェートヌクレオチド、グリコールヌクレオチド、ビニル-ホスホネートヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、及び非天然塩基を含むヌクレオチドからなる群から選択される、請求項108に記載の組成物。

【請求項110】

前記修飾ヌクレオチドが、3'末端デオキシチミンヌクレオチド（dT）の短い配列を含む、請求項108に記載の組成物。

30

【請求項111】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、GNA修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシル修飾ヌクレオチド、2'-リン酸修飾ヌクレオチド、ビニル-ホスホネート修飾ヌクレオチド、及び2'フルオロ修飾ヌクレオチドである、請求項108に記載の組成物。

【請求項112】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、少なくとも1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、請求項91～111のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項113】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、6～8個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、請求項112に記載の組成物。

40

【請求項114】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の各鎖が、30ヌクレオチド以下の長さである、請求項91～113のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項115】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の少なくとも1つの鎖が、少なくとも1個のヌクレオチド

50

の 3' オーバーハングを含む、請求項 91～114 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 116】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の少なくとも 1 つの鎖が、少なくとも 2 個のヌクレオチドの 3' オーバーハングを含む、請求項 91～115 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 117】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の前記二本鎖領域が、15～30 ヌクレオチド対の長さである、請求項 91～116 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 118】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の前記二本鎖領域が、17～23 ヌクレオチド対の長さである、請求項 117 に記載の組成物。

【請求項 119】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の前記二本鎖領域が、17～25 ヌクレオチド対の長さである、請求項 117 に記載の組成物。

【請求項 120】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の前記二本鎖領域が、23～27 ヌクレオチド対の長さである、請求項 117 に記載の組成物。

【請求項 121】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の前記二本鎖領域が、19～21 ヌクレオチド対の長さである、請求項 117 に記載の組成物。

【請求項 122】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の前記二本鎖領域が、21～23 ヌクレオチド対の長さである、請求項 117 に記載の組成物。

【請求項 123】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の各鎖が、19～30 ヌクレオチドの長さである、請求項 91～122 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 124】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の各鎖が、19～25 ヌクレオチドの長さである、請求項 91～122 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 125】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の各鎖が、19～23 ヌクレオチドの長さである、請求項 91～122 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 126】

前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の各鎖が、21～23 ヌクレオチドの長さである、請求項 91～122 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 127】

前記 1 つ以上の親油性部分が、前記第 1 の dsRNA 剤、前記第 2 の dsRNA 剤、又は前記第 1 の dsRNA 剤と前記第 2 の dsRNA 剤との両方の少なくとも 1 つの鎖上の 1 つ以上の内部位置に、リンカー又は担体を介してコンジュゲートされる、請求項 101 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 8】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置が、前記少なくとも 1 つの鎖の各端から末端 2 つの位置を除く全ての位置を含む、請求項 1 2 7 に記載の組成物。

【請求項 1 2 9】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置が、前記少なくとも 1 つの鎖の各端から末端 3 つの位置を除く全ての位置を含む、請求項 1 2 7 に記載の組成物。

【請求項 1 3 0】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置が、前記センス鎖の切断部位領域を除く、請求項 1 2 7 に記載の組成物。

10

【請求項 1 3 1】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置が、前記センス鎖の 5 ' 末端から数えて 9 ~ 1 2 位を除く全ての位置を含む、請求項 1 3 0 に記載の組成物。

【請求項 1 3 2】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置が、前記センス鎖の 3 ' 末端から数えて 1 1 ~ 1 3 位を除く全ての位置を含む、請求項 1 3 0 に記載の組成物。

20

【請求項 1 3 3】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置が、前記アンチセンス鎖の切断部位領域を除く、請求項 1 2 7 に記載の組成物。

【請求項 1 3 4】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置が、前記アンチセンス鎖の 5 ' 末端から数えて 1 2 ~ 1 4 位を除く全ての位置を含む、請求項 1 3 3 に記載の組成物。

【請求項 1 3 5】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置が、3 ' 末端から数えて前記センス鎖上の 1 1 ~ 1 3 位及び 5 ' 末端から数えて前記アンチセンス鎖上の 1 2 ~ 1 4 位を除く全ての位置を含む、請求項 1 3 3 に記載の組成物。

30

【請求項 1 3 6】

前記 1 つ以上の親油性部分が、各鎖の 5 ' 末端から数えて、前記センス鎖上の 4 ~ 8 位及び 1 3 ~ 1 8 位並びに前記アンチセンス鎖上の 6 ~ 1 0 位及び 1 5 ~ 1 8 位からなる群から選択される、前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置のうちの 1 つ以上にコンジュゲートされる、請求項 1 0 1 ~ 1 3 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 3 7】

前記 1 つ以上の親油性部分が、各鎖の 5 ' 末端から数えて、前記センス鎖上の 5、6、7、1 5、1 7 位、並びに前記アンチセンス鎖上の 1 5 及び 1 7 位からなる群から選択される、前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記内部位置のうちの 1 つ以上にコンジュゲートされる、請求項 1 3 6 に記載の組成物。

40

【請求項 1 3 8】

前記第 1 の d s R N A 剤、前記第 2 の d s R N A 剤、又は前記第 1 の d s R N A 剤と前記第 2 の d s R N A 剤との両方の前記二本鎖領域内の前記内部位置が、前記センス鎖の切断部位領域を除く、請求項 1 0 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3 9】

50

前記センス鎖が、21ヌクレオチドの長さであり、前記アンチセンス鎖が、23ヌクレオチドの長さであり、前記親油性部分が、前記センス鎖の21位、20位、15位、1位、7位、6位、若しくは2位、又は前記アンチセンス鎖の16位にコンジュゲートされる、請求項101～138のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項140】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方に、前記センス鎖の21位、20位、15位、1位、又は7位でコンジュゲートされる、請求項139に記載の組成物。

【請求項141】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方に、前記センス鎖の21位、20位、又は15位でコンジュゲートされる、請求項139に記載の組成物。

10

【請求項142】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方に、前記センス鎖の20位又は15位でコンジュゲートされる、請求項139に記載の組成物。

【請求項143】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方に、前記アンチセンス鎖の16位でコンジュゲートされる、請求項139に記載の組成物。

20

【請求項144】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方にコンジュゲートした前記親油性部分が、脂肪族、脂環式、又は多環脂環式化合物である、請求項101～143のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項145】

前記親油性部分が、脂質、コレステロール、レチノイン酸、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サノール、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、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、又はフェノキサジンからなる群から選択される、請求項144に記載の組成物。

30

【請求項146】

前記親油性部分が、飽和又は不飽和C4～C30炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホネート、ホスフェート、チオール、アジド、及びアルキンからなる群から選択される任意選択の官能基と、を含む、請求項144に記載の組成物。

【請求項147】

前記親油性部分が、飽和又は不飽和C6～C18炭化水素鎖を含む、請求項144に記載の組成物。

【請求項148】

前記親油性部分が、飽和又は不飽和C16炭化水素鎖を含む、請求項144に記載の組成物。

40

【請求項149】

前記飽和又は不飽和C16炭化水素鎖が、前記鎖の5'末端から数えて6位にコンジュゲートされる、請求項148に記載の組成物。

【請求項150】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方に、前記内部位置又は前記二本鎖領域内の1つ以上のヌクレオチドを代置する担体を介してコンジュゲートされる、請求項101～149のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項151】

50

前記担体が、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〕ジオキサニル、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、テトラヒドロフラニル、及びデカリニルからなる群から選択される環式基であるか、又はセリノール骨格若しくはジエタノールアミン骨格系の非環式部分である、請求項150に記載の組成物。

【請求項152】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の前記二本鎖iRNA剤に、エーテル、チオエーテル、尿素、炭酸塩、アミン、アミド、マレイミド、チオエーテル、ジスルフィド、ホスホジエステル、スルホンアミド連結、クリック反応の生成物、又はカルバメートを含むリンカーを介してコンジュゲートされる、請求項101～149のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項153】

前記親油性部分が、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の核酸塩基、糖部分、又はヌクレオシド間連結にコンジュゲートされる、請求項101～152のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項154】

前記親油性部分又は標的化リガンドが、前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方に、DNA、RNA、ジスルフィド、アミド、官能化された単糖又はオリゴ糖であって、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖又はオリゴ糖、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される生化学的に切断可能なリンカーを介してコンジュゲートされる、請求項101～153のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項155】

前記センス鎖の3'末端 前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、アミンを有する環式基である末端キャップを介して保護され、前記環式基が、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〕ジオキサニル、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、テトラヒドロフラニル、及びデカリニルからなる群から選択される、請求項101～154のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項156】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、神経細胞、神経組織中の細胞、又は中枢神経系組織中の細胞、又は肝臓組織を標的とする標的化リガンドを更に含む、請求項91～99のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項157】

前記標的化リガンドが、GalNAcコンジュゲートである、請求項156に記載の組成物。

40

【請求項158】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、
連結リン原子がSp配置である、前記アンチセンス鎖の3'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子がRp配置である、前記アンチセンス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに
連結リン原子がRp配置又はSp配置のいずれかである、前記センス鎖の5'末端にお

50

る第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの1つ以上を更に含む、請求項91～157のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項159】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、
連結リン原子がSp配置である、前記アンチセンス鎖の3'末端における前記第1及び第2のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子がRp配置である、前記アンチセンス鎖の5'末端における前記第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに
連結リン原子がRp配置又はSp配置のいずれかである、前記センス鎖の5'末端における前記第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの1つ以上を更に含む、請求項91～157のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項160】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、
連結リン原子がSp配置である、前記アンチセンス鎖の3'末端における前記第1、第2、及び第3のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
前記アンチセンス鎖の5'末端における第一のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾であって、連結リン原子がRp配置である、末端のキラル修飾と、
連結リン原子がRp配置又はSp配置のいずれかである、前記センス鎖の5'末端における前記第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの1つ以上を更に含む、請求項91～157のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項161】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、
連結リン原子がSp配置である、前記アンチセンス鎖の3'末端における前記第1及び第2のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子がRp配置である、前記アンチセンス鎖の3'末端における前記第3のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子がRp配置である、前記アンチセンス鎖の5'末端における前記第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに
連結リン原子がRp配置又はSp配置のいずれかである、前記センス鎖の5'末端における前記第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの1つ以上を更に含む、請求項91～157のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項162】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、
連結リン原子がSp配置である、前記アンチセンス鎖の3'末端における前記第1及び第2のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、
連結リン原子がRp配置である、前記アンチセンス鎖の5'末端における前記第1及び第2のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに
連結リン原子がRp配置又はSp配置のいずれかである、前記センス鎖の5'末端における前記第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、のうちの1つ以上を更に含む、請求項91～157のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項163】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方が、前記アンチセンス鎖の5'末端にホスフェート又はホスフェート模倣体を更に含む、請求項91～162のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項164】

前記ホスフェート模倣体が、5'-ビニルホスホネート(VP)である、請求項163

50

に記載の組成物。

【請求項 165】

前記第1のdsRNA剤、前記第2のdsRNA剤、又は前記第1のdsRNA剤と前記第2のdsRNA剤との両方の前記二本鎖の前記アンチセンス鎖の5'末端の1つの位置にある塩基対が、AU塩基対である、請求項91～164のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 166】

前記センス鎖が、21ヌクレオチドの長さであり、前記アンチセンス鎖が、23ヌクレオチドの長さである、請求項1～82のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 167】

請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物を含む、細胞。

【請求項 168】

C9orf72の発現を阻害するための医薬組成物である、請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 169】

脂質製剤を含む医薬組成物である、請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 170】

細胞における1つ以上のC9orf72 RNA転写産物のレベルを低減させる方法であって、前記細胞を、請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤、又は請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項84～90、168、及び169のいずれか一項に記載の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上と接触させ、それにより前記細胞におけるC9orf72の発現を阻害することを含む、方法。

【請求項 171】

前記細胞が、対象内にある、請求項170に記載の方法。

【請求項 172】

前記対象が、ヒトである、請求項171に記載の方法。

【請求項 173】

前記対象が、C9orf72関連障害を有する、請求項171又は172に記載の方法。

【請求項 174】

前記C9orf72関連障害が、C9orf72筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、C9orf72拡張に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリーブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、及びアルツハイマー病からなる群から選択される、請求項173に記載の方法。

【請求項 175】

前記細胞を前記dsRNA剤と接触させることで、センス及び／又はアンチセンスヘキサヌクレオチドリピート含有C9orf72 RNA転写産物のレベルが、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は95%低減する、請求項170～174のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 176】

前記センス及び／又はアンチセンスヘキサヌクレオチドリピート含有C9orf72 RNA転写産物のレベルを低減することで、ポリ（グリシン－アラニン）、ポリ（グリシン－アルギニン）、ポリ（グリシン－プロリン）、ポリ（プロリン－アラニン）、及びポリ（プロリン－アルギニン）からなる群から選択される1つ以上のジペプチドリピート（DPR）タンパク質のレベルが、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は95%低減する、請求項170～175のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 177】

前記細胞を前記dsRNA剤と接触させることで、前記C9orf72 mRNAの発現が、50%、40%、30%、20%、10%、又は5%以下阻害される、請求項17

10

20

30

40

50

0～176のいずれか一項に記載の方法。

【請求項178】

C9orf72の発現を阻害することで、前記対象の血清中のC9orf72タンパク質レベルが、50%、40%、30%、20%、10%、又は5%以下減少する、請求項170～177のいずれか一項に記載の方法。

【請求項179】

細胞におけるC9orf72 RNA巢のリピート長依存性形成を低減させる方法であって、前記細胞を、請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤、又は請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項84～90、168、及び169のいずれか一項に記載の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上と接触させ、それにより前記細胞におけるC9orf72 RNA巢のリピート長依存性形成を低減させることを含む、方法。

10

【請求項180】

細胞におけるポリ（グリシン－アラニン）ペプチド、ポリ（グリシン－プロリン）ペプチド、ポリ（グリシン－アルギニン）ペプチド、ポリ（アラニン－プロリン）ペプチド、又はポリ（プロリン－アルギニン）ペプチドの蓄積又は凝集を低減させる方法であって、前記細胞を、請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤、又は請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項84～90、168、及び169のいずれか一項に記載の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上と接触させ、それにより、前記細胞におけるポリ（グリシン－アラニン）ペプチド、ポリ（グリシン－プロリン）ペプチド、ポリ（グリシン－アルギニン）ペプチド、ポリ（アラニン－プロリン）ペプチド、又はポリ（プロリン－アルギニン）ペプチドの蓄積又は凝集を低減させることを含む、方法。

20

【請求項181】

C9orf72発現の低減から利益を受け得る障害を有する対象を治療する方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤、又は請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項84～90、168、及び169のいずれか一項に記載の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上を投与し、それにより、C9orf72発現の低減から利益を受け得る障害を有する前記対象を治療することを含む、方法。

【請求項182】

C9orf72発現の低減から利益を受け得る障害を有する対象において少なくとも1つの症状を予防する方法であって、前記対象に、予防有効量の、請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤、又は請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項84～90、168、及び169のいずれか一項に記載の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上を投与し、それにより、C9orf72発現の低減から利益を受け得る障害を有する前記対象において少なくとも1つの症状を予防することを含む、方法。

30

【請求項183】

前記障害が、C9orf72関連障害である、請求項181又は182に記載の方法。

【請求項184】

前記C9orf723関連障害が、C9orf72筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、C9orf72拡張に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、及びアルツハイマー病からなる群から選択される、請求項183に記載の方法。

40

【請求項185】

前記対象が、ヒトである、請求項181又は182に記載の方法。

【請求項186】

前記対象への前記薬剤の前記投与により、RNA巢のリピート長依存性形成、特定のRNA結合タンパク質の分画、又は蓄積若しくは凝集、又はポリ（グリシン－アラニン）ペプチド、ポリ（グリシン－プロリン）ペプチド、ポリ（グリシン－アルギニン）ペプチド、ポリ（アラニン－プロリン）ペプチド、若しくはポリ（プロリン－アルギニン）ペプチ

50

ドの減少が生じる、請求項 181～185 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 187】

前記 RNA 巢のリビート長依存性形成、前記特定の RNA 結合タンパク質の分画、又は蓄積若しくは凝集、又は前記ポリ（グリシン－アラニン）ペプチド、ポリ（グリシン－プロリン）ペプチド、ポリ（グリシン－アルギニン）ペプチド、ポリ（アラニン－プロリン）ペプチド、若しくはポリ（プロリン－アルギニン）ペプチドが、50%を超えて減少し、前記 C9orf72 成熟 RNA の発現が、50%未満阻害される、請求項 186 に記載の方法。

【請求項 188】

前記対象への前記薬剤の投与により、ポリ（グリシン－アラニン）、ポリ（グリシン－アルギニン）、ポリ（グリシン－プロリン）、ポリ（プロリン－アラニン）、及びポリ（プロリン－アルギニン）からなる群から選択される 1 つ以上のジペプチドリビート（DPR）タンパク質のレベルの減少が生じる、請求項 181～187 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 189】

1 つ以上の異常なジペプチドリビート（DPR）タンパク質のレベルが、50%、60%、70%、80%、90%、又は 95%を超えて減少する、請求項 188 に記載の方法。

【請求項 190】

ポリ（グリシン－アラニン）及び／又はポリ（グリシン－プロリン）のレベルが、50%、60%、70%、80%、90%、又は 95%を超えて減少する、請求項 189 に記載の方法。

【請求項 191】

前記 dsRNA 剤が、前記対象に、約 0.01 mg/kg～約 50 mg/kg の用量で投与される、請求項 181～190 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 192】

前記 dsRNA 剤が、前記対象に皮下投与される、請求項 181～191 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 193】

前記 dsRNA 剤が、前記対象に髄腔内投与される、請求項 181～191 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 194】

前記 dsRNA 剤が、前記対象に脳室内投与される、請求項 181～191 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 195】

前記対象からの試料中の C9orf72 のレベルを判定することを更に含む、請求項 181～194 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 196】

前記対象試料中の前記 C9orf72 のレベルが、血液、血清、又は脳脊髄液試料中の C9orf72 タンパク質レベルである、請求項 195 に記載の方法。

【請求項 197】

前記対象に追加の治療薬を投与することを更に含む、請求項 181～196 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 198】

請求項 1～82 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤、又は請求項 91～165 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 84～90、168、及び 169 のいずれか一項に記載の医薬組成物のうちのいずれか 1 つ以上を含む、キット。

【請求項 199】

請求項 1～82 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤、又は請求項 91～165 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 84～90、168、及び 169 のいずれか一項に

10

20

30

40

50

記載の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上を含む、バイアル。

【請求項200】

請求項1～82のいずれか一項に記載のdsRNA剤、又は請求項91～165のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項84～90、168、及び169のいずれか一項に記載の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上を含む、シリンジ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2021年6月4日に出願された米国特許仮出願第63／196,791号に対する優先権の利益を主張するものであり、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

ヒト9番染色体オープンリーディングフレーム72 (C9orf72) は、c9orf72遺伝子によりコードされるタンパク質である。C9orf72は、大脳皮質などの脳の多くの領域、星状細胞及びニューロンの細胞質、並びにシナプス前末端に見られる。

【0003】

転写の代替的な開始部位と終結部位とを差別的に使用することで、C9orf72 DNAから3つのセンスRNA転写産物が生成される。これらは、バリエーション (NM_018325.4) 及び3 (NM_001256054.2) に由来するおよそ54 kDaの長いアイソフォーム (アイソフォームA)、並びにバリエーション1 (NM_145005.6) に由来するおよそ24 kDaの短いアイソフォーム (アイソフォームB) からなる2つのタンパク質アイソフォームをコードする (例えば、Barker, et al. (2017) Frontiers Cell Neurosci 11:1-15の図1を参照されたい)。C9orf72 DNAからのセンスRNA転写産物に加えて、リピート含有アンチセンスRNA転写産物があり、これは、C9orf72拡張陽性患者の脳内で上昇することが示されている。転写開始部位の位置に応じて、リピート不含センス及びアンチセンスRNA転写産物も存在する。

【0004】

C9orf72遺伝子の2つの代替的に使用される第1のエクソンは、エクソン1a及び1bである (例えば、上記のBarker, et al. の図1を参照されたい)。エクソン1aと1bの間のC9orf72遺伝子の第1のイントロン中の大きなGGGGC (G4C2) ヘキサヌクレオチドリピート伸長 (約2～22コピーから700～1600コピー) は、1) リピート不含C9orf72 mRNAの転写を妨害することで、C9orf72のmRNA及びタンパク質レベルを減少させること、2) RANにより開始される翻訳をとおして毒性ジペプチドリピータンパク質を生成すること、並びに3) 核及び細胞質RNA巢を生成すること (これらの両方は、病原性である可能性があり、臨床的特徴が別個であるが、病理学的特徴及び遺伝的原因が共通であるいくつかの神経変性疾患をもたらす) が示されている (Ling, et al. (2013) Neuron 79:416-438)。更に、リピート含有アンチセンスRNA転写産物は、核及び細胞質RNA巢に蓄積し、RANにより開始される翻訳をとおしてアンチセンス毒性ジペプチドリピータンパク質の発現に寄与することが示されている。特に、C9orf72遺伝子におけるヘキサヌクレオチドリピート伸長の存在は、脳及び脊髄における運動ニューロンの重篤な変性疾患である家族性及び特発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の最も一般的な遺伝的原因である。実際に、C9orf72変異ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、家族性ALS対象のおよそ40%及び特発性ALS対象の8～10%に存在する。C9orf72遺伝子中のヘキサヌクレオチドリピート伸長は、アルツハイマー病後の初老期認知症の二番目に一般的な形態である前頭側頭型認知症 (FTD) の最も一般的な家族性原因でもあり、行動障害及び言語障害を特徴とし、脳の前頭葉及び前側頭葉における神経

10

20

30

40

50

萎縮によって病的に現れる。ジストニア、舞蹈病、ミオクローヌス、振戦及び硬直、認知障害及び記憶障害、早期精神障害、並びに行動問題を含む運動障害を特徴とする、C9orf72拡張に起因するハンチントン様症候群も、C9orf72遺伝子中のヘキサヌクレオチドリピート拡張と関連付けられる。

【0005】

C9orf72タンパク質の機能はまだ研究中であるが、C9orf72は、細胞骨格、オートファジー、及びエンドサイトーシス輸送の調節に関与するRabタンパク質と相互作用し、それらを活性化することが示されている。加えて、多数の細胞経路が、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長と関連付けられる神経変性疾患において調節されていないことが明らかとなっている。例えば、改変されたRNAプロセッシングは、C9orf72疾患に対する研究の最先端において一貫して現れている。これには、リピート配列の双方向転写、特定のRNA結合タンパク質(RBP)を隔離する核巢へのリピートRNAの蓄積、及びリピート関連非AUG(RAN)により開始される翻訳によるジペプチドリピータンパク質(DPR)へのRNAリピートの翻訳が含まれる。加えて、RNAポリメラーゼIIからのC9orf72 RNAの放出、細胞質内での翻訳、及び分解の破壊は、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長により破壊されることが示されている。更に、C9orf72 RNA自体のプロセッシングにおいて、その転写、スプライシング、及び局在化に関して、いくつかの改変が特定されている(例えば、上記のBarker, et al. を参照されたい)。

【0006】

機序に関係なく、いくつかのグループにより、センス及びアンチセンスC9orf72含有巢の存在、並びにセンス又はアンチセンスいずれかのリピート含有C9orf72 RNAの全てのリーディングフレームから、C9orf72関連疾患を有する対象の神経系中のいくつかの細胞型におけるリピート関連非AUG依存性(RAN)翻訳をとおして産生される、異常なジペプチドリピータンパク質(ポリ(GA)、ポリ(GR)、ポリ(GP)、ポリ(PA)、及びポリ(PR))の存在が特定されている(Lagier-Tourenne, et al. (2013) Proc Natl Acad Sci USA doi/10.1073/pnas.1318835110、Jiang, et al. (2016) Neuron 90:535-550)。更に、C9orf72の1つの対立遺伝子が不活性化されたマウスでは、疾患は観察されなかったが、C9orf72の両方の対立遺伝子が不活性化されたマウスでは、脾腫、リンパ節腫脹、及び軽度の社会的交流障害が観察され、運動機能障害は観察されなかった。加えて、最大450個のGGGGCCリピートでヒトC9orf72 RNAを発現するマウスにおいて、ヘキサヌクレオチド伸長により、海馬ニューロンの喪失、不安の増加、及び認知機能障害を伴う、AUG非依存性翻訳により合成されたセンス及びアンチセンスRNA含有巢並びにジペプチドリピータンパク質の、加齢、リピート長、並びに発現レベル依存性の蓄積が生じたことが示された(Jiang, et al. (2016) Neuron 90:535-550)。

【0007】

現在のところ、C9orf72関連疾患、例えば、C9orf72筋萎縮性側索硬化症、C9orf72前頭側頭型認知症、又はハンチントン病、例えば、C9orf72拡張に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、又はアルツハイマー病を有する対象のための治療法はなく、処置は、症状の軽減、及び疾患が進行するにつれた患者の生活の質の改善のみを目的としている。

【0008】

したがって、当技術分野において、例えばC9orf72関連障害を有する対象の治療のための、C9orf72遺伝子、例えば、ヘキサヌクレオチドリピート含有C9orf72 RNAの発現を選択的かつ効率的に阻害することができる薬剤が必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

本開示は、RNAにより誘導されるサイレンシング複合体（RISC）が媒介する、伸長したGGGGCC（G₄C₂）リピートを有するC9orf72遺伝子などのC9orf72遺伝子のRNA転写産物の切断をもたらすiRNA組成物を提供する。C9orf72 RNA転写産物は、細胞、例えば、ヒトなどの対象内の細胞の中にあってもよい。これらiRNAを使用することで、哺乳動物における対応する遺伝子（C9orf72遺伝子）の1つ以上のRNAの標的化された分解が可能になる。

【0010】

本発明のiRNAは、C9orf72遺伝子転写産物、例えば、遺伝子のイントロン中に伸長GGGGCCヘキサヌクレオチドリピートを有するC9orf72遺伝子転写産物を標的とするように設計されている。本剤は、成熟C9orf72 mRNA（イントロンがスプライシングアウトされたmRNA）、又はヘキサヌクレオチドリピートを含むセンス若しくはアンチセンスC9orf72 RNA（例えば、C9orf72イントロン1Aを含むRNA）を標的とし得る。記載されるiRNAは、iRNAの活性、送達、及び／又は安定性を増加させる1つ以上のヌクレオチド修飾又はヌクレオチド修飾の組み合わせを有し得る。

【0011】

本剤は、成熟C9orf72 mRNA（イントロンがスプライシングアウトされたmRNA）のセンス鎖、又はヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72 RNA（C9orf72イントロン1Aを含むRNA）のセンス若しくはアンチセンス鎖を標的とし得る。本発明のある特定の態様では、本開示のRNA i剤は、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72センス及び／又はアンチセンスRNA転写産物（C9orf72イントロン1Aを含むRNA）を標的とし得る。ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72センス鎖及び／又はアンチセンス鎖RNAを標的とすることで、C9orf72関連疾患を有する対象の神経系の細胞において、センスリピート含有C9orf72 RNA又はアンチセンスリピート含有C9orf72 RNAのいずれかの全てのリーディングフレームから、リピート関連非AUG依存性（RAN）翻訳をとおして産生される、異常なジペプチドリピート（DPR）タンパク質（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及びポリ（PR））の発現を阻害することができるか、又はそれらの存在を低減させることができる。いくつかの実施形態では、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72センス鎖RNAを標的とするRNA剤と、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72アンチセンス鎖RNAを標的とするRNA剤との組み合わせが一緒に提供される。

【0012】

本発明のiRNAは、C9orf72成熟mRNAのレベルを、それらがヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72 RNAのレベルを減少させる場合よりも小さく、減少させ得る。例えば、本発明のiRNAは、C9orf72成熟mRNAのレベルを、約50%以下減少させてもよく、約50%を超えて、センス及びアンチセンス含有C9orf72 RNA巢のレベルを低減させ、1つ以上の異常なジペプチドリピート（DPR）タンパク質（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及びポリ（PR））のレベルを低減させ、かつ／あるいはヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72センス及び／又はアンチセンスRNAのレベルを減少させてもよい。理論に拘束されることを意図するものではないが、前述の特徴と、これらiRNAにおける特定の標的部位又は特定の修飾との組み合わせ又は下位の組み合わせが、本発明のiRNAの有効性、安定性、効力、耐久性、及び安全性を向上させると考えられる。

【0013】

一態様では、本発明は、細胞内のC9orf72標的RNAをノックダウンするための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤を提供する。

【0014】

一実施形態では、dsRNA剤は、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの領域、例えば、GGGGCC又はCCCCGGヘキサヌクレオチドリピート

の複数の連続コピーを標的とする。いくつかの実施形態では、C9orf72 標的 RNA は、ヘキサヌクレオチドリピートを含むセンス C9orf72 RNA、ヘキサヌクレオチドリピートを含むアンチセンス C9orf72 標的 RNA、又はヘキサヌクレオチドリピートを含むセンス C9orf72 RNA とヘキサヌクレオチドリピートを含むアンチセンス C9orf72 標的 RNA との組み合わせであり得る。

【0015】

一態様では、本発明は、C9orf72 の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を提供し、本 dsRNA 剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 13 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 14 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、又はアンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む。

10

【0016】

一態様では、本発明は、C9orf72 の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を提供し、本 dsRNA 剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 17 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 18 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、又はアンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む。

20

【0017】

一態様では、本発明は、C9orf72 の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を提供し、本 dsRNA 剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 19 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 20 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、又はアンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む。

30

【0018】

一実施形態では、本開示の RNAi 剤は、アンチセンス RNA 転写開始部位とエクソン 1B の 5' 末端との間の領域において C9orf72 アンチセンス RNA 転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示の RNAi 剤は、アンチセンス RNA 転写開始部位とヘキサヌクレオチドリピートとの間の領域において C9orf72 アンチセンス RNA 転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示の RNAi 剤は、アンチセンス RNA 転写開始部位とエクソン 1A の 3' 末端との間の領域において C9orf72 アンチセンス RNA 転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示の RNAi 剤は、アンチセンス RNA 転写開始部位とエクソン 1A の 5' 末端との間の領域において C9orf72 アンチセンス RNA 転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示の RNAi 剤は、アンチセンス RNA 転写開始部位とエクソン 1A の 5' 末端の上流 500 塩基との間の領域において C9orf72 アンチセンス RNA 転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示の RNAi 剤は、アンチセンス RNA 転写開始部位とエクソン 1A の 5' 末端の上流 1000 塩基との間の領域において C9orf72 アンチセンス RNA 転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示の RNAi 剤は、アンチセンス RNA 転写開始部位とエ

40

50

クソン1 Aの5'末端の上流1500塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、アンチセンスRNA転写開始部位とエクソン1 Aの5'末端の上流2000塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。

【0019】

別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、エクソン1 Bの5'末端とヘキサヌクレオチドリピートとの間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、エクソン1 Bの5'末端とエクソン1 Aの3'末端との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、エクソン1 Bの5'末端とエクソン1 Aの5'末端との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、エクソン1 Bの5'末端とエクソン1 Aの5'末端の上流500塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、エクソン1 Bの5'末端とエクソン1 Aの5'末端の上流1000塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、エクソン1 Bの5'末端とエクソン1 Aの5'末端の上流1500塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、エクソン1 Bの5'末端とエクソン1 Aの5'末端の上流2000塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。

10

20

【0020】

別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、ヘキサヌクレオチドリピートとエクソン1 Aの3'末端との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、ヘキサヌクレオチドリピートとエクソン1 Aの5'末端との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、ヘキサヌクレオチドリピートとエクソン1 Aの5'末端の上流500塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、ヘキサヌクレオチドリピートとエクソン1 Aの5'末端の上流1000塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、ヘキサヌクレオチドリピートとエクソン1 Aの5'末端の上流1500塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。別の実施形態では、本開示のRNAi剤は、ヘキサヌクレオチドリピートとエクソン1 Aの5'末端の上流2000塩基との間の領域においてC9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする。

30

【0021】

一態様では、本発明は、C9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、表4A~4G及び7A~7Eのうちのいずれか1つのmRNA標的配列とはヌクレオチドが3個以下異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は、表4A~4G及び7A~7Eのうちのいずれか1つの対応するmRNA標的配列の相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む。

40

【0022】

ある特定の実施形態では、センス鎖、又はアンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

【0023】

一態様では、本発明は、

50

a) C9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つのmRNA標的配列とはヌクレオチドが3個以下異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つの対応するmRNA標的配列の相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤と、

b) C9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖が、表7A～7Eのうちのいずれか1つのmRNA標的配列とはヌクレオチドが3個以下異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖が、表7A～7Eのうちのいずれか1つの対応するmRNA標的配列の相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤と、の組み合わせを提供する。

10

【0024】

ある特定の実施形態では、センス鎖、又はアンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

20

【0025】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号21の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表7A～7Eのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

30

【0026】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号22の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表7A～7Eのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

40

【0027】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号23の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも1

50

5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

b) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 7A~7E のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤と、の組み合わせを提供する。

【0028】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72 アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 24 の相補体とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

b) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 7A~7E のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤と、の組み合わせを提供する。

【0029】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72 アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 25 の相補体とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

b) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 7A~7E のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤と、の組み合わせを提供する。

【0030】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72 アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 26 の相補体とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

b) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 7A~7E のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤と、の組み合わせを提供する。

【0031】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 51 の相補体とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

b) C9orf72 アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であ

って、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 4 A～4 G のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤と、の組み合わせを提供する。

【0032】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 52 の相補体とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

10

b) C9orf72 アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 4 A～4 G のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤と、の組み合わせを提供する。

【0033】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 53 の相補体とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

20

b) C9orf72 アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 4 A～4 G のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤と、の組み合わせを提供する。

【0034】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 54 の相補体とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

30

b) C9orf72 アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 4 A～4 G のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが 3 個以下、例えば、3、2、1、又は 0 個異なる、少なくとも 15 個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は 23 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤と、の組み合わせを提供する。

40

【0035】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72 センス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 55 の相補体とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA 剤と、

b) C9orf72 アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するための dsRNA 剤であって、本 dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表 4 a～4 g のうちのいずれか 1 つの mRNA 標的配列のうちのいずれ

50

かの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

【0036】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号56の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

【0037】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号57の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

【0038】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号58の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

【0039】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号59の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の

連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

【0040】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号60の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

10

【0041】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号61の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

20

【0042】

一態様では、本発明は、

a) C9orf72センス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、配列番号62の相補体とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む、dsRNA剤と、

b) C9orf72アンチセンス鎖転写産物の発現を阻害するためのdsRNA剤であって、本dsRNA剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、表4A～4Gのうちのいずれか1つのmRNA標的配列のうちのいずれかの相補体とはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA剤と、の組み合わせを提供する。

30

【0043】

一態様では、本発明は、C9orf72アンチセンスRNA転写産物を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72センス鎖転写産物を標的とする第2のdsRNA剤との組み合わせを提供し、

40

a) 第1のdsRNA剤は、AD-1446213のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285238のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

b) 第1のdsRNA剤は、AD-1446213のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285234のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含

50

むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

c) 第1のdsRNA剤は、AD-1446246のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285238のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

d) 第1のdsRNA剤は、AD-1446246のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285234のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

e) 第1のdsRNA剤は、AD-1446268のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285238のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

f) 第1のdsRNA剤は、AD-1446268のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285234のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。

【0044】

別の態様では、本発明は、C9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖又はアンチセンス鎖は、表2、3、10A、10C、11、及び12のうちのいずれか1つにあるセンス鎖及びアンチセンス鎖のうちのいずれかからなる群から選択される、センス鎖又はアンチセンス鎖であり、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0045】

別の態様では、本発明は、C9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号13のヌクレオチド27573296~27573318、27573314~27573336、27573319~27573341、27573562~27573584、27573585~27573607、27573592~27573614、27573599~27573621、27573608~27573630、27573616~27573638、27573619~27573641、27573622~27573644、27573633~27573655、27573690~27573712、又は27573717~27573739とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0046】

一実施形態では、センス鎖又はアンチセンス鎖は、AD-1446213.1、AD-1446217.1、AD-1446222.1、AD-1446234.1、AD-1446243.1、AD-1446246.1、AD-1446252.1、AD-1446259.1、AD-1446265.1、AD-1446268.1、AD-1446271.1、AD-1446279.1、AD-1446289.1、及びAD-1446294.1からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖から選択されるセンス鎖又はアンチセンス鎖である。

【0047】

10

20

30

40

50

一実施形態では、センス鎖又はアンチセンス鎖は、AD-1446213.1、AD-1446246.1、及びAD-1446268.1からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖から選択されるセンス鎖又はアンチセンス鎖である。

【0048】

一態様では、本発明は、C9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、表5、6、10B、及び10Dのうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

10

【0049】

別の態様では、本発明は、c9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド1～23、15～37、33～55、37～59、59～81、62～84又は69～91のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、又は21個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

20

【0050】

一実施形態では、アンチセンス鎖は、AD-1446073.1、AD-1446075.1、AD-1285246.2、AD-1446084.1、AD-1446087.1、AD-1446090.1、及びAD-1446095.1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む。

30

【0051】

一態様では、本発明は、c9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号15のヌクレオチド5197～5219、5213～5235、5223～5245、5226～5248、5227～5249、5228～5250、5229～5251、5230～5252、5231～5253、5233～5255、5235～5256、5241～5263、5245～5267、5233～5255、5248～5270、5539～5561、5547～5569、5917～5939、5936～5958、5954～5976、6008～6030、6021～6043、6036～6058、6043～6065、又は6048～6070のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、又は21個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

40

【0052】

一実施形態では、アンチセンス鎖は、AD-1285231.1、AD-1285232.1、AD-1285233.1、AD-1285235.1、AD-1285237.1、AD-1285239.1、AD-1285240.1、AD-1285242.

50

1、AD-1285244. 1、AD-1285238. 1、AD-1285243. 1、AD-1285234. 1、AD-1285241. 1、AD-1285236. 1、AD-1446111. 1、AD-1446117. 1、AD-1446147. 1、AD-1446157. 1、AD-1446168. 1、AD-1446180. 1、AD-1446189. 1、AD-1446196. 1、AD-1446202. 1、AD-1446205. 1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む。

【0053】

10

一実施形態では、アンチセンス鎖は、AD-1285231. 1、AD-1285232. 1、AD-1285233. 1、AD-1285234. 1、AD-1285235. 1、AD-1285236. 1、AD-1285237. 1、AD-1285239. 1、AD-1285240. 1、AD-1285241. 1、AD-1285242. 1、AD-1285243. 1、AD-1446087. 1、及びAD-1446090. 1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む。

【0054】

20

一実施形態では、アンチセンス鎖は、AD-1285238. 1及びAD-1285234. 1からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含む。

【0055】

一態様では、本発明は、c9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号15のヌクレオチド5015~5052、5017~5040、5032~5059、5032~5055、5033~5055、5035~5059、5036~5059、5058~5087、5059~5087、5059~5084、5064~5087、5197~5222、5213~5267、5223~5252、5229~5252、5233~5263、5516~5570、5539~5565、5539~5562、5545~5570、5545~5569、5593~5616、5883~5950、5917~5950、5919~5950、5923~5950、5934~5977、5934~5957、5938~5977、5938~5965、5938~5961、5947~5977、5947~5973、5972~6001、5973~5997、6006~6029、6011~6070、6011~6039、6011~6038、6015~6038、6019~6045、6019~6042、6033~6070、6035~6065、6035~6059、又は6040~6063のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、又は21個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0056】

一態様では、本発明は、c9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセン

50

ス鎖を含み、センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は64～87のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、又は21個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0057】

一態様では、本発明は、c9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号13のヌクレオチド27573296～27573584、27573296～27573575、27573301～27573338、27573318～27573342、27573555～27573583、27573581～27573607、27573584～27573607、27573588～27573671、27573588～27573666、27573588～27573624、27573592～27573624、27573592～27573617、27573598～27573624、27573599～27573623、27573606～27573655、27573606～27573652、27573606～27573647、27573654～27573712、又は27573707～27573740のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下、例えば、3、2、1、又は0個異なる、少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、又は21個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号14の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、又は23個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0058】

一態様では、本発明は、C9orf72の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供し、本dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖又はアンチセンス鎖は、表8及び9のうちのいずれか1つにあるセンス鎖及びアンチセンス鎖のうちのいずれかからなる群から選択される、センス鎖又はアンチセンス鎖であり、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0059】

一実施形態では、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

【0060】

一実施形態では、親油性部分は、dsRNA剤の二本鎖領域内の1つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。

【0061】

一実施形態では、親油性部分は、リンカー又は担体を介してコンジュゲートされる。

【0062】

一実施形態では、親油性部分の親油性は、logK_{ow}で測定して、0を超える。

【0063】

一実施形態では、二本鎖RNAi剤の血漿タンパク質結合アッセイにおいて非結合画分によって測定した二本鎖RNAi剤の疎水性は、0.2を超える。

【0064】

一実施形態では、血漿タンパク質結合アッセイは、ヒト血清アルブミンタンパク質を使

10

20

30

40

50

用する電気泳動移動度シフトアッセイである。

【0065】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0066】

一実施形態では、センス鎖ヌクレオチドのうちの5個以下及びアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの5個以下は、非修飾ヌクレオチドである。

【0067】

一実施形態では、センス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドである。一実施形態では、アンチセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドである。一実施形態では、センス鎖のヌクレオチドの全て及びアンチセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドである。

【0068】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも1個は、デオキシヌクレオチド、3'末端デオキシチミン(dT)ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシルヌクレオチド、2'-ホスフェートヌクレオチド、2'-5'連結リボヌクレオチド(3'-RNA)、ロックドヌクレオチド、アンロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束されたエチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、逆方向脱塩基残基、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-O-アリル修飾ヌクレオチド、2'-C-アルキル修飾ヌクレオチド、2'-ヒドロキシ修飾ヌクレオチド、2'-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、2', 3'-セコ修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、非天然塩基を含むヌクレオチド、テトラヒドロピラン修飾ヌクレオチド、1, 5-アンヒドロヘキシトール修飾ヌクレオチド、シクロヘキセニル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、5'-メチルホスホネート基を含むヌクレオチド、5'ホスフェート又は5'ホスフェート模倣体を含むヌクレオチド、ビニルホスホネートを含むヌクレオチド、グリコール修飾核酸(GNA)、グリコール核酸(GNA)を含むヌクレオチド、グリコール核酸S異性体(S-GNA)を含むヌクレオチド、2'-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-5-ホスフェートを含むヌクレオチド、2'-デオキシチミジン-3'-ホスフェートを含むヌクレオチド、2'-デオキシグアノシン-3'-ホスフェートを含むヌクレオチド、並びにコレステリル誘導体及びドデカン酸ビスデシルアミド基に連結した末端ヌクレオチド、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0069】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、3'末端デオキシチミンヌクレオチド(dT)、2'-O-ヘキサデシル修飾ヌクレオチド、2'-ホスフェート修飾ヌクレオチド、グリコール修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、及び非天然塩基を含むヌクレオチドからなる群から選択される。

【0070】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、3'末端デオキシチミンヌクレオチド(dT)の短い配列を含む。

【0071】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、独立して、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、GNA修飾ヌクレオチド、及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-ホスフェート修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシル修飾ヌクレオチド、及び2'-ホスフェート修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0072】

一実施形態では、センス鎖の修飾ヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修

10

20

30

40

50

飾ヌクレオチド及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、センス鎖の修飾ヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0073】

一実施形態では、アンチセンス鎖の修飾ヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-ホスフェート修飾ヌクレオチド、グリコール核酸修飾ヌクレオチド、及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の修飾ヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-ホスフェート修飾ヌクレオチド、グリコール核酸修飾ヌクレオチド、及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。

10

【0074】

一実施形態では、センス鎖の修飾ヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシル修飾ヌクレオチド、及びグリコール核酸(GNA)修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、センス鎖の修飾ヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシル修飾ヌクレオチド、及びグリコール核酸(GNA)修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0075】

一実施形態では、アンチセンス鎖の修飾ヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-ホスフェート修飾ヌクレオチド、及びグリコール核酸(GNA)修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の修飾ヌクレオチドの全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-ホスフェート修飾ヌクレオチド、及びグリコール核酸(GNA)修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。

20

【0076】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、少なくとも1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

【0077】

一実施形態では、dsRNA剤は、6~8個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

30

【0078】

一実施形態では、センス鎖は、少なくとも1個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖は、少なくとも1個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結を含む。

【0079】

一実施形態では、センス鎖は、少なくとも2個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結を含む。

【0080】

一実施形態では、アンチセンス鎖は、少なくとも2個、少なくとも3個、又は少なくとも4個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結を含む。

40

【0081】

一実施形態では、少なくとも1個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、一方の鎖の5'末端、一方の鎖の3'末端、又は一方の鎖の5'末端と3'末端との両方にある。

【0082】

一実施形態では、少なくとも1個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結は、センス鎖の5'末端にある。いくつかの実施形態では、センス鎖は、2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を5'末端に含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は、5'末端に1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結、3'末端に1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖

50

は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結、3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

【0083】

一実施形態では、少なくとも1個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖の5'末端と3'末端との両方にある。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結、3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結、3'末端に1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、5'末端に3個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結、3'末端に1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、5'末端に3個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結、3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

【0084】

一実施形態では、センス鎖の修飾ヌクレオチドの全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシル修飾ヌクレオチド、及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチドからなる群から選択され、アンチセンス鎖の修飾ヌクレオチドの全てが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-ホスフェート修飾ヌクレオチド、グリコール核酸修飾ヌクレオチド、及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチドからなる群から選択され、センス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結、3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結又はビニル-ホスホネートを含む。

【0085】

一実施形態では、センス鎖は、30ヌクレオチド以下の長さである。別の実施形態では、アンチセンス鎖は、30ヌクレオチド以下の長さである。一実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、各々独立的に、30ヌクレオチド以下の長さである。

【0086】

一実施形態では、少なくとも1つの鎖は、少なくとも1ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。別の実施形態では、少なくとも1つの鎖が、少なくとも2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。一実施形態では、アンチセンス鎖は、3'オーバーハングを含む。

【0087】

二本鎖領域は、15~30ヌクレオチド対の長さ、17~23ヌクレオチド対の長さ、17~25ヌクレオチド対の長さ、23~27ヌクレオチド対の長さ、19~21ヌクレオチド対の長さ、21~23ヌクレオチド対の長さ、又は17、18、19、20、21、22、若しくは23ヌクレオチド対の長さであってもよい。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、20ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、21ヌクレオチドの長さである。二本鎖領域は、0、1、2、又は3個のミスマッチを有してもよい。

【0088】

センス鎖及びアンチセンス鎖は、各々独立して、17~30ヌクレオチド、17~25、19~30ヌクレオチド、19~25ヌクレオチド、19~23ヌクレオチド、若しくは21~23ヌクレオチドの長さ、又は19、20、21、22、若しくは23ヌクレオチドの長さであってもよい。いくつかの実施形態では、センス鎖は、20ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、22ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、センス鎖は、23ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、21ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、センス鎖は、23ヌクレオチドの長さであり、アンチセンス鎖は、21ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、センス鎖は、23ヌクレオチドの長さであり、逆方向脱塩基残基を3'及び5'末端ヌクレオチド位置に含む。

40

50

【0089】

一実施形態では、相補性の領域は、少なくとも17ヌクレオチドの長さである。他の実施形態では、相補性の領域は、19～30ヌクレオチドの長さ、19～25ヌクレオチドの長さ、又は21～23ヌクレオチドの長さである。

【0090】

一実施形態では、相補性の領域は、C9orf72遺伝子のエクソン1Aの開始とエクソン2の開始との間の配列に対して少なくとも85%相補的である。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの開始とエクソン2の開始との間の配列に存在する15～25個の連続するヌクレオチドの配列に対して少なくとも85%の相補性を有する15～25個の連続するヌクレオチドの配列を含む。他の実施形態では、相補性の領域は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの開始とエクソン2の開始との間の配列に対して少なくとも90%相補的である。一実施形態では、相補性の領域は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの開始とエクソン2の開始との間の配列に対して少なくとも95%相補的である。いくつかの実施形態では、相補性の領域は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの開始とエクソン2の開始との間の配列に対して100%相補的である。いくつかの実施形態では、相補性の領域は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの末端とヘキサヌクレオチドリピート領域の開始との間の配列に対して100%相補的である。

10

【0091】

一実施形態では、相補性の領域は、C9orf72遺伝子のエクソン1Aの末端とイントロン1A中のヘキサヌクレオチドリピートの開始との間の配列に対して少なくとも85%相補的である。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの終止とイントロン1A中のヘキサヌクレオチドリピートの開始との間の配列に存在する15～25個の連続するヌクレオチドの配列に対して少なくとも85%の相補性を有する15～25個の連続するヌクレオチドの配列を含む。他の実施形態では、相補性の領域は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの終止とイントロン1A中のヘキサヌクレオチドリピートの開始との間の配列に対して少なくとも90%相補的である。一実施形態では、相補性の領域は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの終止とイントロン1A中のヘキサヌクレオチドリピートの開始との間の配列に対して少なくとも95%相補的である。いくつかの実施形態では、相補性の領域は、C9orf72標的RNAのエクソン1Aの終止とイントロン1A中のヘキサヌクレオチドリピートの開始との間の配列に対して100%相補的である。

20

30

【0092】

本発明の組成物及び方法のいくつかの実施形態では、RNAi剤は、1つ以上の親油性部分を更に含む。親油性部分をコンジュゲートしたRNAi剤は、本明細書に記載するように、核酸のインピボでの送達に有利であると同時に、インピボでの治療的使用に好適な組成物である。一実施形態では、1つ以上の親油性部分は、少なくとも1つの鎖上の1つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。親油性部分は、内部位置にリンカー又は担体を介してコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、親油性部分は、神経細胞又は神経組織内の細胞へのRNAi剤の送達を促進又は改善する。

40

【0093】

一実施形態では、内部位置は、少なくとも1つの鎖の各端から末端2つの位置を除く全ての位置を含み得る。

【0094】

別の実施形態では、内部位置は、少なくとも1つの鎖の各端から末端3つの位置を除く全ての位置を含み得る。

【0095】

一実施形態では、内部位置は、センス鎖の切断部位領域を除く。

【0096】

一実施形態では、内部位置は、センス鎖の5'末端から数えて9～12位を除く全ての

50

位置を含み得る。

【0097】

別の実施形態では、内部位置は、センス鎖の3'末端から数えて11～13位を除く全ての位置を含み得る。

【0098】

一実施形態では、内部位置は、アンチセンス鎖の切断部位領域を除く。

【0099】

一実施形態では、内部位置は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて12～14位を除く全ての位置を含み得る。

【0100】

一実施形態では、内部位置は、3'末端から数えてセンス鎖上の11～13位及び5'末端から数えてアンチセンス鎖上の12～14位を除く全ての位置であり得る。

【0101】

一実施形態では、1つ以上の親油性部分は、各鎖の5'末端から数えて、センス鎖上の4～8位及び13～18位並びにアンチセンス鎖上の6～10位及び15～18位からなる群から選択される内部位置のうちの1つ以上にコンジュゲートされる。

【0102】

別の実施形態では、1つ以上の親油性部分は、各鎖の5'末端から数えて、センス鎖上の5、6、7、15、及び17位、並びにアンチセンス鎖上の15及び17位からなる群から選択される内部位置のうちの1つ以上にコンジュゲートされる。

【0103】

一実施形態では、二本鎖領域中の内部位置は、センス鎖の切断部位領域を除く。

【0104】

一実施形態では、センス鎖は、21ヌクレオチドの長さであり、アンチセンス鎖は、23ヌクレオチドの長さであり、親油性部分は、5'末端から数えて、センス鎖の21位、20位、15位、1位、7位、6位、若しくは2位、又はアンチセンス鎖の16位にコンジュゲートされる。

【0105】

一実施形態では、親油性部分は、センス鎖の21位、20位、15位、1位、又は7位にコンジュゲートされる。

【0106】

別の実施形態では、親油性部分は、5'末端から数えて、センス鎖の21位、20位、又は15位にコンジュゲートされる。

【0107】

更に別の実施形態では、親油性部分は、5'末端から数えて、センス鎖の20位又は15位にコンジュゲートされる。

【0108】

一実施形態では、親油性部分は、5'末端から数えて、アンチセンス鎖の16位にコンジュゲートされる。

【0109】

一実施形態では、親油性部分は、脂肪族化合物、脂環式化合物、又は多環脂環式化合物である。

【0110】

一実施形態では、親油性部分は、脂質、コレステロール、レチノイン酸、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-0(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキサノール、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、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、03-(オレオイル)リトコール酸、03-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチル、又はフェノキサジンからなる群から選択される。

【0111】

10

20

30

40

50

一実施形態では、親油性部分は、飽和又は不飽和 C 4 ~ C 30 炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホネート、ホスフェート、チオール、アジド、アルケニル、及びアルキニルからなる群から選択される任意選択の官能基と、を含む。一実施形態では、親油性部分は、C 6 ~ C 30 アルキル、C 6 ~ C 30 アルケニル、又は C 6 ~ C 30 アルキニルを含む。

【0112】

一実施形態では、親油性部分は、飽和又は不飽和 C 6 ~ C 18 炭化水素鎖を含む。一実施形態では、親油性部分は、飽和又は不飽和 C 6、C 7、C 8、C 9、C 10、C 11、C 12、C 13、C 15、C 15、C 16、C 17、又は C 18 炭化水素鎖を含む。不飽和 C 6 ~ C 18 は、一価不飽和 C 6 ~ C 18 であることも、多価不飽和 C 6 ~ C 18 であることもできる。

10

【0113】

一実施形態では、親油性部分は、飽和又は不飽和 C 16 炭化水素鎖を含む。一実施形態では、親油性部分は、C 16 アルキル、C 16 アルケニル、又は C 16 アルキニルを含む。不飽和 C 16 は、一価不飽和 C 16 であることも、多価不飽和 C 16 であることもできる。

【0114】

一実施形態では、飽和又は不飽和 C 16 炭化水素鎖は、鎖の 5' 末端から数えて 6 位にコンジュゲートされる。

【0115】

一実施形態では、親油性部分は、内部位置又は二本鎖領域内の 1 つ以上のヌクレオチドを代置する担体を介してコンジュゲートされる。

20

【0116】

一実施形態では、担体は、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] ジオキサニル、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、テトラヒドロフラニル、及びデカリニルからなる群から選択される環式基であるか、又はセリノール骨格若しくはジエタノールアミン骨格系の非環式部分である。

【0117】

一実施形態では、親油性部分は、二本鎖 iRNA 剤に、エーテル、チオエーテル、尿素、炭酸塩、アミン、アミド、マレイミド-チオエーテル、ジスルフィド、ホスホジエステル、スルホンアミド連結、クリック反応の生成物、又はカルバメートを含むリンカーを介してコンジュゲートされる。

30

【0118】

一実施形態では、親油性部分は、核酸塩基、糖部分、又はヌクレオシド間連結にコンジュゲートされる。

【0119】

一実施形態では、親油性部分又は標的化リガンドは、DNA、RNA、ジスルフィド、アミド、官能化された単糖又はオリゴ糖であって、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖又はオリゴ糖、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される生化学的に切断可能なリンカーを介してコンジュゲートされる。

40

【0120】

一実施形態では、センス鎖の 3' 末端は、アミンを有する環式基である末端キャップを介して保護され、該環式基は、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] ジオキサニル、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、テトラヒドロフラニル、及びデカリニルからなる群から選択される。

50

【0121】

一実施形態では、dsRNA剤は、神経細胞、神経組織中の細胞、又は中枢神経系組織中の細胞を標的とする標的化リガンドを更に含む。

【0122】

一実施形態では、dsRNA剤は、肝臓組織を標的とする標的化リガンドを更に含む。

【0123】

一実施形態では、標的化リガンドは、GalNAcコンジュゲートである。

【0124】

一実施形態では、dsRNA剤は、連結リン原子がSp配置である、アンチセンス鎖の3'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp配置である、アンチセンス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp配置又はSp配置のいずれかである、センス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、を更に含む。

10

【0125】

別の実施形態では、dsRNA剤は、連結リン原子がSp配置である、アンチセンス鎖の3'末端における第1及び第2のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp配置である、アンチセンス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp又はSp配置のいずれかである、センス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、を更に含む。

20

【0126】

更に別の実施形態では、dsRNA剤は、連結リン原子がSp配置である、アンチセンス鎖の3'末端における第1、第2、及び第3のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp配置である、アンチセンス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp又はSp配置のいずれかである、センス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、を更に含む。

【0127】

別の実施形態では、dsRNA剤は、連結リン原子がSp配置である、アンチセンス鎖の3'末端における第1及び第2のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp配置である、アンチセンス鎖の3'末端における第3のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp配置である、アンチセンス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp又はSp配置のいずれかである、センス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、を更に含む。

30

【0128】

別の実施形態では、dsRNA剤は、連結リン原子がSp配置である、アンチセンス鎖の3'末端における第1及び第2のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp配置である、アンチセンス鎖の5'末端における第1及び第2のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、連結リン原子がRp又はSp配置のいずれかである、センス鎖の5'末端における第1のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾と、を更に含む。

40

【0129】

一実施形態では、dsRNA剤は、アンチセンス鎖の5'末端にホスフェート又はホスフェート模倣体を更に含む。

【0130】

一実施形態では、ホスフェート模倣体は、5'-ビニルホスホネート(VP)である。

【0131】

一実施形態では、二本鎖のアンチセンス鎖の5'末端の1つの位置にある塩基対は、A

50

U塩基対である。

【0132】

一実施形態では、センス鎖は、合計21個のヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖は、合計23個のヌクレオチドを有する。

【0133】

一実施形態では、dsRNA剤は、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの発現を、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAを発現する細胞への投与後24～48時間以内に、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、又は少なくとも60%阻害する。

10

【0134】

一実施形態では、dsRNA剤は、成熟C9orf72メッセンジャーRNAの発現と比べて、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの発現を選択的に阻害する。

【0135】

一実施形態では、dsRNA剤は、成熟C9orf72メッセンジャーRNAの発現を、成熟C9orf72メッセンジャーRNAを発現する細胞への投与後24～48時間以内に、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、又は10%未満阻害する。

【0136】

一実施形態では、dsRNA剤は、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAを発現する細胞への投与後24～48時間以内に、(ポリ(GA)、ポリ(GR)、ポリ(GP)、ポリ(PA)、及びポリ(PR)ジペプチドリピータンパク質合成を低減させる。いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、ジペプチドリピータンパク質合成を、細胞への投与後24～48時間以内に、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、又は少なくとも80%低減させる。

20

【0137】

本発明はまた、本発明のdsRNA剤などを含む、C9orf72をコードする遺伝子の発現を阻害するための細胞及び医薬組成物を提供する。

【0138】

一実施形態では、dsRNA剤は、生理食塩水又は水などの非緩衝溶液中にある。

30

【0139】

別の実施形態では、dsRNA剤は、酢酸塩、クエン酸塩、プロラミン、炭酸塩、若しくはリン酸塩、又はそれらの任意の組み合わせなどの緩衝液、あるいはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中にある。

【0140】

本発明は、C9orf72の発現を阻害するための、2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤を含む組成物を更に提供する。

【0141】

一実施形態では、組成物は、C9orf72のセンス鎖(C9orf72のエクソン又はイントロン)を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72のアンチセンス鎖(C9orf72のエクソン又はイントロン)を標的とする第2のdsRNA剤とを含む。

40

【0142】

いくつかの実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の組成物で使用するためのC9orf72のセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

a) 配列番号1のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

50

b) 配列番号 15 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 16 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

c) 表 5、6、10B、及び 10D のうちのいずれか 1 つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方が、1 個以上の親油性部分にコンジュゲートされる、アンチセンス鎖、

d) 配列番号 1 のヌクレオチド 1～23、15～37、33～55、37～59、59～81、62～84、又は 69～91 のヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 5 の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

e) 配列番号 15 のヌクレオチド 5197～5219、5213～5235、5223～5245、5226～5248、5227～5249、5228～5250、5229～5251、5230～5252、5231～5253、5233～5255、5235～5256、5241～5263、5245～5267、5233～5255、5248～5270、5539～5561、5547～5569、5917～5939、5936～5958、5954～5976、6008～6030、6021～6043、6036～6058、6043～6065、又は 6048～6070 のヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 16 の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

f) 配列番号 15 のヌクレオチド 5015～5052、5017～5040、5032～5059、5032～5055、5033～5055、5035～5059、5036～5059、5058～5087、5059～5087、5059～5084、5064～5087、5197～5222、5213～5267、5223～5252、5229～5252、5233～5263、5516～5570、5539～5565、5539～5562、5545～5570、5545～5569、5593～5616、5883～5950、5917～5950、5919～5950、5923～5950、5934～5977、5934～5957、5938～5977、5938～5965、5938～5961、5947～5977、5947～5973、5972～6001、5973～5997、6006～6029、6011～6070、6011～6039、6011～6038、6015～6038、6019～6045、6019～6042、6033～6070、6035～6065、6035～6059、又は 6040～6063 のヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 16 の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

g) 配列番号 1 のヌクレオチド 15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は 64～87 のヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 5 の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、並びに

h) 表 8 及び 9 のうちのいずれか 1 つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、からなる群から選択され、

センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0143】

ある特定の実施形態では、全内容が参照により本明細書に組み込まれる PCT 公開第 W

10

20

30

40

50

〇 2 0 2 1 / 1 1 9 2 2 6 号に開示される d s R N A 剤などの 2 つ以上の d s R N A 剤を含む本発明の組成物で使用するための C 9 o r f 7 2、例えば、C 9 o r f 7 2 エクソン又はイントロンセンス配列のセンス鎖を標的とする好適な薬剤。

【 0 1 4 4 】

ある特定の実施形態では、2 つ以上の d s R N A 剤を含む本発明の組成物で使用するための C 9 o r f 7 2 のアンチセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

a) 配列番号 1 3 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 1 4 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

b) 配列番号 1 7 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 1 8 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

c) 配列番号 1 9 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 2 0 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

d) 表 2、3、1 0 A、1 0 C、1 1、及び 1 2 のうちのいずれか 1 つにあるアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれかからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアンチセンス、

e) 配列番号 1 3 のヌクレオチド 2 7 5 7 3 2 9 6 ~ 2 7 5 7 3 3 1 8、2 7 5 7 3 3 1 4 ~ 2 7 5 7 3 3 3 6、2 7 5 7 3 3 1 9 ~ 2 7 5 7 3 3 4 1、2 7 5 7 3 5 6 2 ~ 2 7 5 7 3 5 8 4、2 7 5 7 3 5 8 5 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 1 4、2 7 5 7 3 5 9 9 ~ 2 7 5 7 3 6 2 1、2 7 5 7 3 6 0 8 ~ 2 7 5 7 3 6 3 0、2 7 5 7 3 6 1 6 ~ 2 7 5 7 3 6 3 8、2 7 5 7 3 6 1 9 ~ 2 7 5 7 3 6 4 1、2 7 5 7 3 6 2 2 ~ 2 7 5 7 3 6 4 4、2 7 5 7 3 6 3 3 ~ 2 7 5 7 3 6 5 5、2 7 5 7 3 6 9 0 ~ 2 7 5 7 3 7 1 2、又は 2 7 5 7 3 7 1 7 ~ 2 7 5 7 3 7 3 9 とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、並びに

f) 配列番号 1 3 のヌクレオチド 2 7 5 7 3 2 9 6 ~ 2 7 5 7 3 5 8 4、2 7 5 7 3 2 9 6 ~ 2 7 5 7 3 5 7 5、2 7 5 7 3 3 0 1 ~ 2 7 5 7 3 3 3 8、2 7 5 7 3 3 1 8 ~ 2 7 5 7 3 3 4 2、2 7 5 7 3 5 5 5 ~ 2 7 5 7 3 5 8 3、2 7 5 7 3 5 8 1 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 8 4 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 7 1、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 6 6、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 9 ~ 2 7 5 7 3 6 2 3、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 5 5、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 5 2、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 4 7、2 7 5 7 3 6 5 4 ~ 2 7 5 7 3 7 1 2、又は 2 7 5 7 3 7 0 7 ~ 2 7 5 7 3 7 4 0 のヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 1 4 の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、からなる群から選択され、

センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む。

【 0 1 4 5 】

一態様では、本発明は、C 9 o r f 7 2 の発現を阻害するための 2 つ以上の二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤を含む組成物を提供し、

各 d s R N A 剤は、独立して、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、

10

20

30

40

50

C 9 o r f 7 2 のアンチセンス鎖を標的とする第 1 の d s R N A 剤は、

a) 配列番号 1 3 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号 1 4 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖と、を含む、d s R N A 剤、

b) 配列番号 1 7 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 1 8 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

c) 配列番号 1 9 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 2 0 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

d) 表 2、3、1 0 A、1 0 C、1 1、及び 1 2 のうちのいずれか 1 つにあるアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれかからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む d s R N A 剤、

e) 配列番号 1 3 のヌクレオチド 2 7 5 7 3 2 9 6 ~ 2 7 5 7 3 3 1 8、2 7 5 7 3 3 1 4 ~ 2 7 5 7 3 3 3 6、2 7 5 7 3 3 1 9 ~ 2 7 5 7 3 3 4 1、2 7 5 7 3 5 6 2 ~ 2 7 5 7 3 5 8 4、2 7 5 7 3 5 8 5 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 1 4、2 7 5 7 3 5 9 9 ~ 2 7 5 7 3 6 2 1、2 7 5 7 3 6 0 8 ~ 2 7 5 7 3 6 3 0、2 7 5 7 3 6 1 6 ~ 2 7 5 7 3 6 3 8、2 7 5 7 3 6 1 9 ~ 2 7 5 7 3 6 4 1、2 7 5 7 3 6 2 2 ~ 2 7 5 7 3 6 4 4、2 7 5 7 3 6 3 3 ~ 2 7 5 7 3 6 5 5、2 7 5 7 3 6 9 0 ~ 2 7 5 7 3 7 1 2、又は 2 7 5 7 3 7 1 7 ~ 2 7 5 7 3 7 3 9 とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含む、センス鎖を含む d s R N A 剤、並びに

f) 配列番号 1 3 のヌクレオチド 2 7 5 7 3 2 9 6 ~ 2 7 5 7 3 5 8 4、2 7 5 7 3 2 9 6 ~ 2 7 5 7 3 5 7 5、2 7 5 7 3 3 0 1 ~ 2 7 5 7 3 3 3 8、2 7 5 7 3 3 1 8 ~ 2 7 5 7 3 3 4 2、2 7 5 7 3 5 5 5 ~ 2 7 5 7 3 5 8 3、2 7 5 7 3 5 8 1 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 8 4 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 7 1、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 6 6、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 9 ~ 2 7 5 7 3 6 2 3、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 5 5、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 5 2、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 4 7、2 7 5 7 3 6 5 4 ~ 2 7 5 7 3 7 1 2、又は 2 7 5 7 3 7 0 7 ~ 2 7 5 7 3 7 4 0 のヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号 1 4 の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、d s R N A 剤、からなる群から選択され、

C 9 o r f 7 2 のセンス鎖を標的とする第 2 の d s R N A 剤は、

a) 配列番号 1 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 5 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

b) 配列番号 1 5 のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号 1 6 のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

c) 表 5、6、1 0 B、及び 1 0 D のうちのいずれか 1 つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つとはヌクレオチドが 3 個以下異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖を含む、d s R N A 剤、

d) 配列番号1のヌクレオチド1～23、15～37、33～55、37～59、59～81、62～84、69～91のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

e) 配列番号15のヌクレオチド5197～5219、5213～5235、5223～5245、5226～5248、5227～5249、5228～5250、5229～5251、5230～5252、5231～5253、5233～5255、5235～5256、5241～5263、5245～5267、5233～5255、5248～5270、5539～5561、5547～5569、5917～5939、5936～5958、5954～5976、6008～6030、6021～6043、6036～6058、6043～6065、又は6048～6070のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

f) 配列番号15のヌクレオチド5015～5052、5017～5040、5032～5059、5032～5055、5033～5055、5035～5059、5036～5059、5058～5087、5059～5087、5059～5084、5064～5087、5197～5222、5213～5267、5223～5252、5229～5252、5233～5263、5516～5570、5539～5565、5539～5562、5545～5570、5545～5569、5593～5616、5883～5950、5917～5950、5919～5950、5923～5950、5934～5977、5934～5957、5938～5977、5938～5965、5938～5961、5947～5977、5947～5973、5972～6001、5973～5997、6006～6029、6011～6070、6011～6039、6011～6038、6015～6038、6019～6045、6019～6042、6033～6070、6035～6065、6035～6059、又は6040～6063のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、

g) 配列番号1のヌクレオチド15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は64～87のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖と、配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、を含む、dsRNA剤、並びに

h) 表8及び9のうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖を含む、dsRNA剤、からなる群から選択され、

第1のdsRNAのセンス鎖、第1のdsRNAのアンチセンス鎖、第1のdsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との両方、第2のdsRNAのセンス鎖、第2のdsRNAのアンチセンス鎖、及び／又は第2のdsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。

【0146】

一実施形態では、センス鎖又はアンチセンス鎖は、AD-1446213.1、AD-1446217.1、AD-1446222.1、AD-1446234.1、AD-1446243.1、AD-1446246.1、AD-1446252.1、AD-1446259.1、AD-1446265.1、AD-1446268.1、AD-1446271.1、AD-1446279.1、AD-1446289.1、及びAD-14

10

20

30

40

50

4 6 2 9 4 . 1 からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖から選択されるセンス鎖又はアンチセンス鎖である。

【0147】

一実施形態では、センス鎖又はアンチセンス鎖は、AD-1446213 . 1、AD-1446246 . 1、及びAD-1446268 . 1 からなる群から選択される二本鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖から選択されるセンス鎖又はアンチセンス鎖である。

【0148】

一実施形態では、アンチセンス鎖は、AD-1446073 . 1、AD-1446075 . 1、AD-1285246 . 2、AD-1446084 . 1、AD-1446087 . 1、AD-1446090 . 1、及びAD-1446095 . 1 からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列及び／又はセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個、2個、又は1個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む。

10

【0149】

一実施形態では、アンチセンス鎖は、AD-1285231 . 1、AD-1285232 . 1、AD-1285233 . 1、AD-1285235 . 1、AD-1285237 . 1、AD-1285239 . 1、AD-1285240 . 1、AD-1285242 . 1、AD-1285244 . 1、AD-1285238 . 1、AD-1285234 . 1、AD-1285243 . 1、AD-1285241 . 1、AD-1285236 . 1、AD-1446111 . 1、AD-1446117 . 1、AD-1446147 . 1、AD-1446157 . 1、AD-1446168 . 1、AD-1446180 . 1、AD-1446189 . 1、AD-1446196 . 1、AD-1446202 . 1、AD-1446205 . 1 からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列及び／又はセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個、2個、又は1個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む。

20

【0150】

一実施形態では、アンチセンス鎖は、AD-1285238 . 1 及び AD-1285234 . 1 からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列及び／又はセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個、2個、又は1個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む。

30

【0151】

一実施形態では、第1のdsRNA剤のアンチセンス鎖は、AD-1446213 . 1、AD-1446246 . 1、及びAD-1446268 . 1 からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列及び又はセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個、2個、又は1個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、第2のdsRNA剤のアンチセンス鎖は、AD-1285238 . 1 及び AD-1285234 . 1 からなる群から選択される二本鎖のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列及び／又はセンス鎖ヌクレオチド配列うちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個、2個、又は1個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む。

40

【0152】

一実施形態では、

a) 第1のdsRNA剤は、AD-1446213のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285238のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

b) 第1のdsRNA剤は、AD-1446213のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285234のアンチセン

50

ス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

c) 第1のdsRNA剤は、AD-1446246のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285238のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

d) 第1のdsRNA剤は、AD-1446246のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285234のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

10

e) 第1のdsRNA剤は、AD-1446268のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285238のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、

f) 第1のdsRNA剤は、AD-1446268のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤は、AD-1285234のアンチセンス配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。

20

【0153】

別の実施形態では、

a) 第1のdsRNA剤が、AD-1446213のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤が、AD-1285238のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、

b) 第1のdsRNA剤が、AD-1446213のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤が、AD-1285234のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、

30

c) 第1のdsRNA剤が、AD-1446246のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤が、AD-1285238のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、

d) 第1のdsRNA剤が、AD-1446246のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤が、AD-1285234のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、

e) 第1のdsRNA剤が、AD-1446268のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤が、AD-1285238のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含むか、あるいは

f) 第1のdsRNA剤が、AD-1446268のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含み、第2のdsRNA剤が、AD-1285234のアンチセンス鎖及び／又はセンス鎖を含む。

40

【0154】

一実施形態では、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

【0155】

一実施形態では、親油性部分は、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域内の1つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。

【0156】

50

一実施形態では、親油性部分は、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方に、リンカー又は担体を介してコンジュゲートされる。

【0157】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方にコンジュゲートした親油性部分の親油性は、 $\log K_{ow}$ によって測定して、0を超える。

【0158】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の疎水性は、dsRNA剤の血漿タンパク質結合アッセイにおいて非結合分画によって測定して、0.2を超える。

【0159】

一実施形態では、血漿タンパク質結合アッセイは、ヒト血清アルブミンタンパク質を使用する電気泳動移動度シフトアッセイである。

【0160】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤及び第2のdsRNA剤の両方は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。

【0161】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方のセンス鎖ヌクレオチドのうちの5個以下及びアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの5個以下が、非修飾ヌクレオチドである。

【0162】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方のセンス鎖のヌクレオチドの全て及びアンチセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドである。

【0163】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも1個は、デオキシヌクレオチド、3'末端デオキシチミン(dT)ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシルヌクレオチド、2'-ホスフェートヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、アンロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束されたエチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、逆方向脱塩基残基、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-O-アリル修飾ヌクレオチド、2'-C-アルキル修飾ヌクレオチド、2'-ヒドロキシ修飾ヌクレオチド、2'-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、2', 3'-セコ修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、非天然塩基を含むヌクレオチド、テトラヒドロピラン修飾ヌクレオチド、1, 5-アンヒドロヘキシトール修飾ヌクレオチド、シクロヘキセニル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、5'-メチルホスホネート基を含むヌクレオチド、5'-ホスフェート又は5'-ホスフェート模倣体を含むヌクレオチド、ビニルホスホネートを含むヌクレオチド、グリコール修飾核酸(GNA)、アデノシン-グリコール核酸(GNA)を含むヌクレオチド、チミジン-グリコール核酸(GNA)S異性体を含むヌクレオチド、2'-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-5'-ホスフェートを含むヌクレオチド、2'-デオキシチミジン-3'-ホスフェートを含むヌクレオチド、2'-デオキシグアノシン-3'-ホスフェートを含むヌクレオチド、並びにコレステリル誘導体及びドデカン酸ビスデシルアミド基に連結した末端ヌクレオチド、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0164】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、3'末端デオキシチミンヌクレオチド(dT)、ロックドヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシルヌクレオチド、2'-ホスフェートヌクレ

10

20

30

40

50

オチド、グリコールヌクレオチド、ビニル-ホスホネートヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、及び非天然塩基を含むヌクレオチドからなる群から選択される。

【0165】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、3'末端デオキシチミンヌクレオチド(dT)の短い配列を含む。

【0166】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、独立して、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、GNA修飾ヌクレオチド、2'-O-ヘキサデシル修飾ヌクレオチド、2'-リン酸修飾ヌクレオチド、ビニル-ホスホネート修飾ヌクレオチド、及び2'-フルオロ修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0167】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方は、少なくとも1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

【0168】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方は、6~8個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

【0169】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の各鎖は、30ヌクレオチド以下の長さである。

【0170】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の少なくとも1つの鎖は、少なくとも1個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。

【0171】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の少なくとも1つの鎖は、少なくとも2個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。

【0172】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域は、15~30ヌクレオチド対の長さである。

【0173】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域は、17~23ヌクレオチド対の長さである。

【0174】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域は、17~25ヌクレオチド対の長さである。

【0175】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域は、23~27ヌクレオチド対の長さである。

【0176】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域は、19~21ヌクレオチド対の長さである。

。

【0177】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域は、21～23ヌクレオチド対の長さである。

。

【0178】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の各鎖は、19～30ヌクレオチドの長さである。

【0179】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の各鎖は、19～23ヌクレオチドの長さである。

10

【0180】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の各鎖は、21～23ヌクレオチドの長さである。

【0181】

一実施形態では、1つ以上の親油性部分は、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の少なくとも1つの鎖上の1つ以上の内部位置に、リンカー又は担体を介してコンジュゲートされる。

【0182】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置は、少なくとも1つの鎖の各端から末端2つの位置を除くあらゆる位置を含む。

20

【0183】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置は、少なくとも1つの鎖の各端から末端3つの位置を除くあらゆる位置を含む。

【0184】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置は、センス鎖の切断部位領域を除く。

【0185】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置は、センス鎖の5'末端から数えて9～12位を除くあらゆる位置を含む。

30

【0186】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置は、センス鎖の3'末端から数えて11～13位を除くあらゆる位置を含む。

【0187】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置は、アンチセンス鎖の切断部位領域を除く。

40

【0188】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて12～14位を除くあらゆる位置を含む。

【0189】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置は、3'末端から数えてセンス鎖上の11～13位及び5'末端から数えてアンチセンス鎖上の12～14位を除くあらゆる位置を含む。

【0190】

一実施形態では、1つ以上の親油性部分は、各鎖の5'末端から数えて、センス鎖上の

50

4～8位及び13～18位並びにアンチセンス鎖上の6～10位及び15～18位からなる群から選択される、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置のうちの1つ以上にコンジュゲートされる。

【0191】

一実施形態では、1つ以上の親油性部分は、各鎖の5'末端から数えて、センス鎖上の5、6、7、15、17位、並びにアンチセンス鎖上の15及び17位からなる群から選択される、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の内部位置のうちの1つ以上にコンジュゲートされる。

【0192】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖領域内の内部位置は、センス鎖の切断部位領域を除く。

10

【0193】

一実施形態では、センス鎖は、21ヌクレオチドの長さであり、アンチセンス鎖は、23ヌクレオチドの長さであり、親油性部分は、5'末端から数えて、センス鎖の21位、20位、15位、1位、7位、6位、若しくは2位、又はアンチセンス鎖の16位にコンジュゲートされる。

【0194】

一実施形態では、親油性部分は、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方に、5'末端から数えて、センス鎖の21位、20位、15位、1位、又は7位でコンジュゲートされる。

20

【0195】

一実施形態では、親油性部分は、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方に、5'末端から数えて、センス鎖の21位、20位、又は15位でコンジュゲートされる。

【0196】

一実施形態では、親油性部分は、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方に、5'末端から数えて、センス鎖の20位又は15位でコンジュゲートされる。

【0197】

一実施形態では、親油性部分は、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方に、5'末端から数えて、アンチセンス鎖の16位でコンジュゲートされる。

30

【0198】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方にコンジュゲートした親油性部分は、脂肪族、脂環式、又は多環脂環式化合物である。

【0199】

一実施形態では、親油性部分は、脂質、コレステロール、レチノイン酸、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サノール、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、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、又はフェノキサジンからなる群から選択される。

40

【0200】

一実施形態では、親油性部分は、飽和又は不飽和C4～C30炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホネート、ホスフェート、チオール、アジド、及びアルキンからなる群から選択される任意選択の官能基と、を含む。

【0201】

一実施形態では、親油性部分は、飽和又は不飽和C6～C18炭化水素鎖を含む。

50

【0202】

一実施形態では、親油性部分は、飽和又は不飽和 C 1 6 炭化水素鎖を含む。

【0203】

一実施形態では、飽和又は不飽和 C 1 6 炭化水素鎖は、鎖の 5' 末端から数えて 6 位にコンジュゲートされる。

【0204】

一実施形態では、親油性部分は、第 1 の d s R N A 剤、第 2 の d s R N A 剤、又は第 1 の d s R N A 剤と第 2 の d s R N A 剤との両方に、内部位置又は二本鎖領域内の 1 つ以上のヌクレオチドを代置する担体を介してコンジュゲートされる。

【0205】

一実施形態では、担体は、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] ジオキサソラニル、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、テトラヒドロフラニル、及びデカリニルからなる群から選択される環式基であるか、又はセリノール骨格若しくはジエタノールアミン骨格系の非環式部分である。

【0206】

一実施形態では、親油性部分は、第 1 の d s R N A 剤、第 2 の d s R N A 剤、又は第 1 の d s R N A 剤と第 2 の d s R N A 剤との両方の二本鎖 i R N A 剤に、エーテル、チオエーテル、尿素、炭酸塩、アミン、アミド、マレイミド、チオエーテル、ジスルフィド、ホスホジエステル、スルホンアミド連結、クリック反応の生成物、又はカルバメートを含むリンカーを介してコンジュゲートされる。

【0207】

一実施形態では、親油性部分は、第 1 の d s R N A 剤、第 2 の d s R N A 剤、又は第 1 の d s R N A 剤と第 2 の d s R N A 剤との両方の核酸塩基、糖部分、又はヌクレオシド間連結にコンジュゲートされる。

【0208】

一実施形態では、親油性部分又は標的化リガンドは、第 1 の d s R N A 剤、第 2 の d s R N A 剤、又は第 1 の d s R N A 剤と第 2 の d s R N A 剤との両方に、DNA、RNA、ジスルフィド、アミド、官能化された単糖又はオリゴ糖であって、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖又はオリゴ糖、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される生化学的に切断可能なリンカーを介してコンジュゲートされる。

【0209】

一実施形態では、センス鎖の 3' 末端 第 1 の d s R N A 剤、第 2 の d s R N A 剤、又は第 1 の d s R N A 剤と第 2 の d s R N A 剤との両方は、アミンを有する環式基である末端キャップを介して保護され、環式基は、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] ジオキサソラニル、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、テトラヒドロフラニル、及びデカリニルからなる群から選択される。

【0210】

一実施形態では、第 1 の d s R N A 剤、第 2 の d s R N A 剤、又は第 1 の d s R N A 剤と第 2 の d s R N A 剤との両方は、神経細胞、神経組織中の細胞、又は中枢神経系組織中の細胞、又は肝臓組織を標的とする標的化リガンドを更に含む。

【0211】

一実施形態では、標的化リガンドは、G a l N A c コンジュゲートである。

【0212】

一実施形態では、第 1 の d s R N A 剤、第 2 の d s R N A 剤、又は第 1 の d s R N A 剤と第 2 の d s R N A 剤との両方は、

10

20

30

40

50

連結リン原子が S p 配置である、アンチセンス鎖の 3' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、

連結リン原子が R p 配置である、アンチセンス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、及び

連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、センス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、を更に含む。

【0213】

一実施形態では、第 1 の d s RNA 剤、第 2 の d s RNA 剤、又は第 1 の d s RNA 剤と第 2 の d s RNA 剤との両方は、

連結リン原子が S p 配置である、アンチセンス鎖の 3' 末端における第 1 及び第 2 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、

連結リン原子が R p 配置である、アンチセンス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに

連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、センス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、を更に含む。

【0214】

一実施形態では、第 1 の d s RNA 剤、第 2 の d s RNA 剤、又は第 1 の d s RNA 剤と第 2 の d s RNA 剤との両方は、

連結リン原子が S p 配置である、アンチセンス鎖の 3' 末端における第 1、第 2、及び第 3 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、

連結リン原子が R p 配置である、アンチセンス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに

連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、センス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、を更に含む。

【0215】

一実施形態では、第 1 の d s RNA 剤、第 2 の d s RNA 剤、又は第 1 の d s RNA 剤と第 2 の d s RNA 剤との両方は、

連結リン原子が S p 配置である、アンチセンス鎖の 3' 末端における第 1 及び第 2 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、

連結リン原子が R p 配置である、アンチセンス鎖の 3' 末端における第 3 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、

連結リン原子が R p 配置である、アンチセンス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに

連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、センス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、を更に含む。

【0216】

一実施形態では、第 1 の d s RNA 剤、第 2 の d s RNA 剤、又は第 1 の d s RNA 剤と第 2 の d s RNA 剤との両方は、

連結リン原子が S p 配置である、アンチセンス鎖の 3' 末端における第 1 及び第 2 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、

連結リン原子が R p 配置である、アンチセンス鎖の 5' 末端における第 1 及び第 2 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、並びに

連結リン原子が R p 配置又は S p 配置のいずれかである、センス鎖の 5' 末端における第 1 のヌクレオチド間連結において生じる末端のキラル修飾、を更に含む。

【0217】

一実施形態では、第 1 の d s RNA 剤、第 2 の d s RNA 剤、又は第 1 の d s RNA 剤と第 2 の d s RNA 剤との両方は、アンチセンス鎖の 5' 末端にホスフェート又はホスフェート模倣体を更に含む。

【0218】

一実施形態では、ホスフェート模倣体は、5'-ビニルホスホネート (VP) である。

【0219】

一実施形態では、第1のdsRNA剤、第2のdsRNA剤、又は第1のdsRNA剤と第2のdsRNA剤との両方の二本鎖のアンチセンス鎖の5'末端の1つの位置にある塩基対は、AU塩基対である。

【0220】

一実施形態では、センス鎖は、21ヌクレオチドの長さであり、アンチセンス鎖は、23ヌクレオチドの長さである。

【0221】

本発明はまた、本発明の組成物を含む細胞を提供する。

【0222】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、医薬組成物であり、いくつかの実施形態では、脂質製剤を含む。

【0223】

一態様では、本発明は、細胞、例えば、運動ニューロンなどのニューロン中のヘキサヌクレオチドリピートの複数の連続コピーを含むC9orf72遺伝子などのヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72 RNAなどの1つ以上のC9orf72 RNA転写産物のレベルを低減させる方法を提供し、本方法には、細胞を、本発明のdsRNA剤、2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの本発明のdsRNA剤、1つ以上のC9orf72 RNA転写産物の発現を阻害するための2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つのdsRNA剤、例えば、本明細書に記載される、C9orf72センス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72アンチセンス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第2のdsRNA剤とを含む組成物、又は本発明の医薬組成物と接触させ、それにより、細胞中のC9orf72遺伝子の発現を阻害することが含まれる。

【0224】

別の態様では、本発明は、細胞中のジペプチドリピータンパク質合成又はジペプチドリピータンパク質凝集体を低減させる方法を提供する。本方法には、本発明のdsRNA剤、2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの本発明のdsRNA剤、1つ以上のC9orf72 RNA転写産物の発現を阻害するための2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つのdsRNA剤、例えば、本明細書に記載される、C9orf72センス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72アンチセンス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第2のdsRNA剤とを含む組成物、又は本発明の医薬組成物を細胞に導入し、それにより、細胞中のジペプチドリピータンパク質合成又はジペプチドリピータンパク質凝集体を低減させることが含まれる。

【0225】

別の態様では、本発明は、細胞中のポリ（グリシン-アラニン）ペプチド、ポリ（グリシン-プロリン）ペプチド、ポリ（グリシン-アルギニン）ペプチド、ポリ（アラニン-プロリン）ペプチド、又はポリ（プロリン-アルギニン）ペプチドの蓄積又は凝集を低減させる方法を提供する。本方法には、本発明のdsRNA剤、2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの本発明のdsRNA剤、C9orf72の発現を阻害するための2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つのdsRNA剤、例えば、本明細書に記載される、C9orf72センス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72アンチセンス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第2のdsRNA剤とを含む組成物、又は本発明の医薬組成物を細胞に導入し、それにより、細胞中のポリ（グリシン-アラニン）ペプチド、ポリ（グリシン-プロリン）ペプチド、ポリ（グリシン-アルギニン）ペプチド、ポリ（アラニン-プロリン）ペプチド、又はポリ（プロリン-アルギニン）ペプチドの蓄積又は凝集を低減させることが含まれる。

【0226】

別の態様では、本発明は、細胞中のC9orf72 RNA巢のリピート長依存性の形成を低減させる方法を提供する。本方法には、本発明のdsRNA剤、2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの本発明のdsRNA剤、C9orf72の発現を阻害するための2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つのdsRNA剤、例えば、本明細書に記載される、C9orf72センス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72アンチセンス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第2のdsRNA剤とを含む組成物、又は本発明の医薬組成物を細胞に導入し、それにより、細胞中のC9orf72 RNA巢のリピート長依存性の形成を低減させることが含まれる。

【0227】

10

別の態様では、本発明は、細胞中の核及び／又は細胞質センス及び／又はアンチセンスC9orf72 RNA巢を低減させる方法を提供する。本方法には、本発明のdsRNA剤、2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの本発明のdsRNA剤、C9orf72の発現を阻害するための2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つのdsRNA剤、例えば、本明細書に記載される、C9orf72センス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72アンチセンス転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第2のdsRNA剤とを含む組成物、又は本発明の医薬組成物を細胞に導入し、それにより、細胞中の核及び／又は細胞質センス及び／又はアンチセンスC9orf72 RNA巢を低減させることが含まれる。

20

【0228】

一実施形態では、細胞は、対象内にある。

【0229】

一実施形態では、対象は、ヒトである。

【0230】

一実施形態では、対象は、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート拡張関連の疾患、状態、又は障害などのC9orf72関連障害を有するか、又はそれを発症するリスクがある。

【0231】

一実施形態では、C9orf72関連障害は、C9orf72筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート拡張に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、及びアルツハイマー病からなる群から選択される。

30

【0232】

一実施形態では、細胞をdsRNA剤と接触させることで、センス及び／又はアンチセンスヘキサヌクレオチドリピート含有C9orf72 RNA転写産物のレベルが、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は95%阻害される。

【0233】

一実施形態では、センス及び／又はアンチセンスヘキサヌクレオチドリピート含有C9orf72 RNA転写産物のレベルを阻害することで、ポリ（グリシン－アラニン）、ポリ（グリシン－アルギニン）、ポリ（グリシン－プロリン）、ポリ（プロリン－アラニン）、及びポリ（プロリン－アルギニン）からなる群から選択される1つ以上の異常なジペプチドリピート（DPR）タンパク質のレベルが、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又は95%減少する。

40

【0234】

一実施形態では、細胞をdsRNA剤と接触させることで、C9orf72 mRNAの発現が、50%、40%、30%、20%、10%、又は5%以下阻害される。

【0235】

一実施形態では、dsRNA剤は、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的mRNAの発現を、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAを

50

発現する細胞への投与後24～48時間以内に、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、又は少なくとも60%阻害する。

【0236】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、成熟C9orf72メッセンジャーRNAの発現と比べて、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの発現を選択的に阻害する。他の実施形態では、dsRNA剤は、成熟C9orf72メッセンジャーRNAの発現を、成熟C9orf72メッセンジャーRNAを発現する細胞への投与後24～48時間以内に、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、又は10%未満阻害する。

10

【0237】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、細胞中のジペプチドリピート（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及び／又はポリ（PR））タンパク質合成又はジペプチドリピート（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及び／又はポリ（PR））タンパク質凝集体を低減させる。

【0238】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、細胞中の核及び／又は細胞質センス及び／又はアンチセンスC9orf72 RNA巢を低減させる。

【0239】

一実施形態では、C9orf72の発現を阻害することで、対象の血清中のC9orf72タンパク質レベルが、50%、40%、30%、20%、10%、又は5%以下減少する。

20

【0240】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、細胞への投与後24～48時間以内に、ジペプチドリピート（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及び／又はポリ（PR））タンパク質合成又はジペプチドリピート（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及び／又はポリ（PR））タンパク質凝集体を、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、又は少なくとも80%低減させる。

【0241】

一態様では、本発明は、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート拡張関連の疾患、状態、又は障害などの標的C9orf72 RNAをノックダウンすることから利益を受け得る障害を有する対象を治療する方法を提供し、本方法には、対象に、治療有効量の本発明のdsRNA剤、2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの本発明のdsRNA剤、1つ以上のC9orf72 RNAの発現を阻害するための2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つ以上のdsRNA剤、例えば、本明細書に記載される、C9orf72センス鎖転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72アンチセンス鎖転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第2のdsRNA剤とを含む組成物、又は本発明の医薬組成物を投与し、それにより、C9orf72発現の低減から利益を受け得る障害を有する対象を治療することが含まれる。

30

40

【0242】

別の態様では、本発明は、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート拡張関連の疾患、状態、又は障害などのヘキサヌクレオチドリピート拡張を含むC9orf72 RNAの発現の低減から利益を受け得る障害を有する対象において少なくとも1つの症状を予防する方法を提供し、本方法には、対象に、予防有効量の本発明のdsRNA剤、2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの本発明のdsRNA剤、C9orf72の発現を阻害するための2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つ以上のdsRNA剤、例えば、本明細書に記載される、C9orf72センス鎖転写産物（C9orf72のエクソン又はイントロン）を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72アンチセンス鎖転写産物

50

(C9orf72のエクソン又はイントロン)を標的とする第2のdsRNA剤とを含む組成物、又は本発明の医薬組成物を投与し、それにより、C9orf72発現の低減から利益を受け得る障害を有する対象において少なくとも1つの症状を予防することが含まれる。

【0243】

一実施形態では、本方法には、C9orf72のセンス鎖(C9orf72のエクソン又はイントロン)を標的とする第1のdsRNA剤と、C9orf72のアンチセンス鎖(C9orf72のエクソン又はイントロン)を標的とする第2のdsRNA剤とを投与することが含まれる。

【0244】

いくつかの実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72のセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、これらの鎖は、

a) 配列番号1のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

b) 配列番号15のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号16のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

c) 表5、6、10B、及び10Dのうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

d) 配列番号1のヌクレオチド1~23、15~37、33~55、37~59、59~81、62~84、又は69~91のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

e) 配列番号15のヌクレオチド5197~5219、5213~5235、5223~5245、5226~5248、5227~5249、5228~5250、5229~5251、5230~5252、5231~5253、5235~5256、5241~5263、5245~5267、5233~5255、5248~5270、5539~5561、5547~5569、5917~5939、5936~5958、5954~5976、6008~6030、6021~6043、6036~6058、6043~6065、又は6048~6070のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

f) 配列番号15のヌクレオチド5015~5052、5017~5040、5032~5059、5032~5055、5033~5055、5035~5059、5036~5059、5058~5087、5059~5087、5059~5084、5064~5087、5197~5222、5213~5267、5223~5252、5229~5252、5233~5263、5516~5570、5539~5565、5539~5562、5545~5570、5545~5569、5593~5616、5883~5950、5917~5950、5919~5950、5923~5950、5934~5977、5934~5957、5938~5977、5938~5965、5938~5961、5947~5977、5947~5973、5972~6001、5973~5997、6006~6029、6011~6070、6011~6039、6011~6038、6015~6038、6019~6045、6019~6042、6033

10

20

30

40

50

～6070、6035～6065、6035～6059、又は6040～6063のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

g) 配列番号1のヌクレオチド15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は64～87のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、並びに

h) 表8及び9のうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、からなる群から選択され、

センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0245】

ある特定の実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72、例えば、C9orf72エクソン又はイントロンセンス配列のセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、全内容が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2021/119226号に開示されるdsRNA剤である。

【0246】

ある特定の実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72のアンチセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、これらの鎖は、

a) 配列番号13のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号14のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

b) 配列番号17のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号18のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

c) 配列番号19のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号20のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

d) 表2、3、10C、10B、11、及び12のうちのいずれか1つにあるアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれかからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアンチセンス、

e) 配列番号13のヌクレオチド27573296～27573318、27573314～27573336、27573319～27573341、27573562～27573584、27573585～27573607、27573592～27573614、27573599～27573621、27573608～27573630、27573616～27573638、27573619～27573641、27573622～27573644、27573633～27573655、27573690～27573712、又は27573717～27573739とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、並びに

f) 配列番号13のヌクレオチド27573296～27573584、27573296～27573575、27573301～27573338、27573318～27573342、27573555～27573583、27573581～27573607、27573584～27573607、27573588～27573671、

10

20

30

40

50

2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 6 6、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 1 7、2 7 5 7 3 5 9 8 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 9 ~ 2 7 5 7 3 6 2 3、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 5 5、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 5 2、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 4 7、2 7 5 7 3 6 5 4 ~ 2 7 5 7 3 7 1 2、又は2 7 5 7 3 7 0 7 ~ 2 7 5 7 3 7 4 0 のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号14の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、からなる群から選択され、

センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも10 個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0247】

一実施形態では、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

【0248】

一実施形態では、障害は、C9orf72関連障害である。

【0249】

一実施形態では、C9orf723関連障害は、C9orf72筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、C9orf72拡張に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、及びアルツハイマー病 20 からなる群から選択される。

【0250】

一実施形態では、対象は、ヒトである。

【0251】

一実施形態では、対象への薬剤の投与により、C9orf72タンパク質蓄積の減少が生じる。

【0252】

いくつかの実施形態では、本方法により、対象におけるジペプチドリピータンパク質合成が低減するか、又はジペプチドリピータンパク質凝集が低減する。いくつかの実施形態では、本方法により、対象における配列番号1の複数の連続コピーを含むヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの発現が減少する。 30

【0253】

一実施形態では、対象への薬剤の投与により、ポリ（グリシン-アラニン）、ポリ（グリシン-アルギニン）、ポリ（グリシン-プロリン）、ポリ（プロリン-アラニン）、及びポリ（プロリン-アルギニン）からなる群から選択される1つ以上のジペプチドリピート（DPR）タンパク質のレベルの減少が生じる。

【0254】

一実施形態では、1つ以上の異常なジペプチドリピート（DPR）タンパク質のレベルは、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%を超えて減少する。

【0255】

一実施形態では、ポリ（グリシン-アラニン）及び／又はポリ（グリシン-プロリン）のレベルは、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%を超えて減少する。 40

【0256】

一実施形態では、dsRNA剤は、対象に、約0.01mg/kg~約50mg/kgの用量で投与される。

【0257】

一実施形態では、dsRNA剤は、対象に皮下投与される。

【0258】

別の実施形態では、dsRNA剤は、対象に髄腔内投与される。

【0259】

更に別の実施形態では、dsRNA剤は、対象に脳室内投与される。

【0260】

一実施形態では、本発明の方法は、対象からの試料中のC9orf72のレベルを判定することを更に含む。

【0261】

一実施形態では、対象試料中のC9orf72のレベルは、血液、血清、又は脳脊髄液試料中のC9orf72タンパク質レベルである。

【0262】

一実施形態では、本発明の方法は、対象に追加の治療薬を投与することを更に含む。

【0263】

一態様では、本発明は、本発明のdsRNA剤、本発明の組成物、又は本発明の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上を含むキットを提供する。

【0264】

別の態様では、本発明は、本発明のdsRNA剤、本発明の組成物、又は本発明の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上を含むバイアルを提供する。

【0265】

更に別の態様では、本発明は、本発明のdsRNA剤、本発明の組成物、又は本発明の医薬組成物のうちのいずれか1つ以上を含むシリンジを提供する。

【0266】

一実施形態では、RNAi剤は、その薬学的に許容される塩である。本明細書のRNAi剤の各々の「薬学的に許容される塩」には、限定されないが、ナトリウム塩、カルシウム塩、リチウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩、それらの混合物が含まれる。当業者であれば、RNAi剤は、ポリカチオン性塩として提供される場合、任意選択で修飾されるホソホジエステル(phosphodiester)主鎖及び／又は任意の他の酸性修飾(例えば、5'末端のホスホネート基)の遊離酸基当たり1つのカチオンを有することを理解する。例えば、長さが「n」ヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドは、n-1の任意選択で修飾されるホソホジエステル(phosphodiester)を含み、その結果、長さ21ntのオリゴヌクレオチドは、最大20のカチオン(例えば、20のナトリウムカチオン)を有する塩として提供され得る。同様に、長さ21ntのセンス鎖と長さ23ntのアンチセンス鎖とを有するRNAi剤は、最大42のカチオン(例えば、42のナトリウムカチオン)を有する塩として提供され得る。前述の実施例では、RNAi剤が、5'末端のホスフェート又は5'末端のビニルホスホネート基も含む場合、RNAi剤は、最大44のカチオン(例えば、44のナトリウムカチオン)を有する塩として提供され得る。

【図面の簡単な説明】

【0267】

【図1】10nM、1nM、又は0.1nMの最終濃度での示される薬剤のCos-7細胞における単回投与スクリーニングの結果を示すグラフである。

【図2】10nM、1nM、又は0.1nMの最終濃度でのCos-7細胞における単回投与スクリーニングに基づく更なる分析のために選択された図1からの薬剤のサブセットの結果を示すグラフである。

【図3】10nM、1nM、又は0.1nMの最終濃度での示される薬剤のCos-7細胞における単回投与スクリーニングの結果を示すグラフである。

【図4】10nM、1nM、又は0.1nMの最終濃度でのCos-7細胞における単回投与スクリーニングに基づく更なる分析のために選択された図3からの薬剤のサブセットの結果を示すグラフである。

【図5A-5B】目的の二本鎖がC9orf72 RNAの蓄積に与える効果を示すグラフである。およそ300×のG4C2リピート伸長を保有する胚性幹細胞を、センスRNAを標的とする2つの異なるdsRNA剤(塗りつぶした暗色のバー)、又はエクソン1Aとリピート伸長との間のC9orf72遺伝子の領域から転写されたアンチセンスRNA

10

20

30

40

50

Aを標的とする2つの異なるdsRNA剤（白色のバー）、又はsiRNA-1を標的とするセンスRNA（AD1285238.1）とsiRNAを標的とする各アンチセンスのうちの1つとの組み合わせ（斜線付きのバー）を1μM用いてエレクトロポレーションした。エクソン1Aとリピート伸長との間のC9orf72遺伝子の領域に由来する配列を含む転写産物のノックダウン（図5A）を、この領域からの配列を検出するアッセイを用いたRT-qPCRによりアッセイした。このアッセイは、アンチセンスRNAレベルがセンスRNAの8分の1であるため、主にセンスRNAを検出することに留意されたい。C9orf72スプライシングmRNA（図5B）を、エクソン2とエクソン3との接合部にわたる配列を含むRNAを認識するアッセイを用いたRT-qPCRによりアッセイした。データは、ビヒクル、人工脳脊髄液（aCSF）で処置した2つの対照試料（黒色のバー）の平均に対して正規化した。

10

【図6A-6C】ウェスタンブロットプロット（図6A）、及びプロットの定量化のグラフ（図6B及び6C）であり、目的の二本鎖がジペプチドリピータンパク質のレベルに与える効果を示している。およそ300×のG4C2のリピート伸長を保有する胚性幹細胞を、センスRNA（塗りつぶした暗色のバー、図6B～6C）、アンチセンスRNA（白色のバー、図6B～6C）を標的とする2つの異なるdsRNA剤、又は図5のような組み合わせ（斜線付きのバー、図6B～6C）を1μM用いてエレクトロポレーションした。ノックダウン後のジペプチドリピータンパク質のレベルを、ポリ（GlyAla）（右パネル図6A）及びポリ（GlyPro）（左パネル図6A）に対する抗体を用いてアッセイした。siRNA処理後のポリ（GlyPro）（図6B）及びポリ（GlyAla）（図6C）の相対タンパク質レベルを定量し、aCSFで処理した試料に対して正規化した。

20

【図7】示される二本鎖又はPBSの3mg/kg単回投与の髄腔内投与後に残存するC9orf72 mRNAの割合を示すグラフである。

【図8】C9orf72アンチセンスRNAにおける転写開始部位のマッピングのためのナノストリングプローブの使用を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0268】

本開示は、RNAにより誘導されるサイレンシング複合体（RISC）が媒介する、伸長したGGGGCC（G4C2）リピートを有するC9orf72遺伝子などのC9orf72遺伝子のRNA転写産物の切断をもたらすRNAi組成物を提供する。C9orf72遺伝子は、細胞、例えば、ヒトなどの対象内の細胞の中にあってもよい。これらiRNAを使用することで、哺乳動物における対応する遺伝子（C9orf72遺伝子）のRNAの標的化された分解が可能になる。

30

【0269】

本発明のiRNAは、C9orf72標的RNA、例えば、遺伝子のイントロン中に伸長GGGGCCヘキサヌクレオチドリピートを有するC9orf72標的RNAを標的とするように設計されている。本薬剤は、成熟C9orf72 mRNA（イントロンがスプライシングアウトされたmRNA）又はC9orf72 mRNA前駆体（イントロンを含むmRNA）を標的としてもよい。本発明のある特定の態様では、本開示のRNAi剤は、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72センス及び／又はアンチセンスRNA転写産物（C9orf72イントロン1Aを含むRNA）を標的とし得る。ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72センス鎖及び／又はアンチセンス鎖RNAを標的とすることで、C9orf72関連疾患を有する対象の神経系の細胞において、センスリピート含有C9orf72 RNA又はアンチセンスリピート含有C9orf72 RNAのいずれかの全てのリーディングフレームから、リピート関連非AUG依存性（RAN）翻訳をとおして産生される、異常なジペプチドリピータンパク質（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及びポリ（PR））の発現を阻害することができるか、又はそれらの存在を低減させることができる。いくつかの実施形態では、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72センス鎖RNAを標的とする

40

50

RNA 剤と、ヘキサヌクレオチドリピートを含む C9orf72 アンチセンス鎖 RNA を標的とする RNA 剤との組み合わせが一緒に提供される。

【0270】

記載される iRNA は、iRNA の活性、送達、及び／又は安定性を増加させる 1 つ以上のヌクレオチド修飾又はヌクレオチド修飾の組み合わせを有し得る。

【0271】

いくつかの実施形態では、本発明の iRNA は、C9orf72 遺伝子（例えば、成熟 mRNA）の発現を、約 50% 以下阻害し、約 50% を超えて、センス及びアンチセンス含有 C9orf72 RNA 巢のレベルを低減させ、1 つ以上の異常なジペプチドリピート（DPR）タンパク質（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及びポリ（PR））のレベルを低減させ、かつ／あるいはヘキサヌクレオチドリピートを含む C9orf72 センス及び／又はアンチセンス RNA の発現を減少させる。理論に拘束されることを意図するものではないが、前述の特徴と、これら iRNA における特定の標的部位又は特定の修飾との組み合わせ又は下位の組み合わせが、本発明の iRNA の有効性、安定性、効力、耐久性、及び安全性を向上させると考えられる。

【0272】

したがって、本開示はまた、1 つ以上の C9orf72 RNA の発現をノックダウン若しくは阻害するための、又は 1 つ以上の C9orf72 RNA の発現のノックダウン若しくは阻害から利益を受け得る障害、例えば、C9orf72 関連疾患、例えば、C9orf72 筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、若しくはハンチントン病、例えば、C9orf72 伸長に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、若しくはアルツハイマー病などの C9orf72 遺伝子のイントロンにおける伸長した GGGGCC ヘキサヌクレオチドリピートと関連付けられる疾患を有する対象を治療するための、1 つ以上、例えば、2、3、又は 4 つの本発明の dsRNA 剤を含む組成物を含む、本開示の RNA i 組成物を使用する方法も提供する。

【0273】

本開示の RNA i 剤は、約 30 ヌクレオチド長以下、例えば、15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は 21～22 ヌクレオチド長である領域を有する RNA 鎖（アンチセンス鎖）を含み、この領域は、C9orf72 遺伝子、例えば、C9orf72 イントロンの標的 RNA 転写産物の少なくとも一部に対して実質的に相補的である。ある特定の実施形態では、本開示の RNA i 剤は、約 21～23 ヌクレオチドの長さである領域を有する RNA 鎖（アンチセンス鎖）を含み、この領域は、C9orf72 遺伝子、例えば、C9orf72 イントロンの標的 RNA 転写産物の少なくとも一部に対して実質的に相補的である。

【0274】

センス及びアンチセンス C9orf72 含有巢の存在、並びにリピート関連非 AUG 依存性（RAN）翻訳をとおしたセンス又はアンチセンスいずれかのリピートを含む C9orf72 RNA の全てのリーディングフレームから産生された異常なジペプチドリピート（DPR）タンパク質（ポリ（GA）、ポリ（GR）、ポリ（GP）、ポリ（PA）、及びポリ（PR））は、C9orf72 関連疾患を有する対象の神経系におけるいくつかの細胞型において特定されているため（Lagier-Tourenne, et al. (2013) Proc Natl Acad Sci USA doi/10.1073/pnas.1318835110、Jiang, et al. (2016)、本発明の

10

20

30

40

50

ある特定の態様では、本開示のRNAi剤は、約30ヌクレオチド長以下、例えば、15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は21～22ヌクレオチド長である領域を有するRNA鎖（アンチセンス鎖）を含み、この領域は、C9orf72遺伝子、例えば、C9orf72イントロンの標的RNA転写産物の少なくとも一部に対して実質的に相補的である。ある特定の実施形態では、本開示のRNAi剤は、約21～23ヌクレオチド長である領域を有するRNA鎖（アンチセンス鎖）を含み、この領域は、C9orf72遺伝子、例えば、C9orf72イントロンの標的RNA転写産物の少なくとも一部に対して実質的に相補的である。

10

【0275】

ある特定の実施形態では、本開示のRNAi剤は、長さがより長い、例えば、最大66ヌクレオチド、例えば、36～66、26～36、25～36、31～60、22～43、27～53ヌクレオチド長であり得るRNA鎖（アンチセンス鎖）を含み、少なくとも19個の連続するヌクレオチドの領域が、C9orf72遺伝子のmRNA転写産物の少なくとも一部に対して実質的に相補的である。アンチセンス鎖の長さがより長いRNAi剤は、好ましくは、20～60ヌクレオチド長の第2のRNA鎖（センス鎖）を含み、ここで、センス鎖及びアンチセンス鎖は、18～30個の連続するヌクレオチドの二本鎖を形成する。

20

【0276】

これらRNAi剤を使用することで、哺乳動物におけるC9orf72遺伝子の標的RNAの標的化された分解が可能になる。このため、これらのRNAi剤を含む方法及び組成物は、標的C9orf72 RNAのノックダウン、正常なC9orf72タンパク質の低減、及び／又は又は病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長から生成される病原性ジペプチドリピータンパク質の低減により利益を受ける対象、例えば、C9orf72筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、例えば、C9orf72伸長に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、又はアルツハイマー病などのC9orf72関連疾患を有する対象を治療するのに有用である。

30

【0277】

以下の詳細な説明は、C9orf72遺伝子の発現を阻害するRNAi剤を含む組成物を作製及び使用する方法、並びに遺伝子の発現の阻害又は低減から利益を受け得る疾患及び障害を有する対象を治療するための組成物及び方法を開示する。

【0278】

I. 定義

本開示の理解が更に容易となり得るように、まずある特定の用語を定義する。加えて、パラメータの値又は値の範囲が列記される場合はいつでも、列記された値の中間の値及び範囲も本開示の一部であると意図されることが意図される。

40

【0279】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書において、冠詞の文法上の対象の1つ又は2つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を意味するために使用する。例えば、「ある要素（an element）」は、1つの要素又は2つ以上の要素、例えば、複数の要素を意味する。

【0280】

「～を含むこと（including）」という用語は、「～を含むが、これらに限定

50

されない (including but not limited to)」という語句を意味するために本明細書において使用し、また当該語句と区別なく使用する。「又は」という用語は、文脈において別途明示しない限り、「及び／又は」という用語を意味するために本明細書において使用し、また当該用語と区別なく使用する。

【0281】

「約」という用語は、当技術分野において、典型的な許容誤差の範囲内であることを意味するために本明細書で使用する。例えば、「約」は、平均から約2の標準偏差として理解され得る。ある特定の実施形態では、約は、±10%を意味する。ある特定の実施形態では、約は、±5%を意味する。一連の数字又は範囲の前に約がある場合、「約」は、その連続する数字又は範囲のそれぞれを修飾し得ることが理解される。

10

【0282】

数又は一連の数に先行する「少なくとも」という用語は、文脈から明白な場合、「少なくとも」という用語に隣接する数、及び論理的に含まれ得るその後の全ての数又は整数を含むと理解される。例えば、ある核酸分子内のヌクレオチドの数は、整数でなければならない。例えば、「21個のヌクレオチド核酸分子の少なくとも18個のヌクレオチド」は、18、19、20、又は21個のヌクレオチドが、示された特性を有することを意味する。一連の数字又は範囲の前に少なくともがある場合、「少なくとも」は、その連続する数字又は範囲の各々を修飾し得ることが理解される。

【0283】

本明細書において使用する場合、「～以下」又は「未満」は、その語句に隣接する値と、文脈から論理的である場合はゼロまでのその値より論理的により小さい値又は整数として理解される。例えば、「2個以下のヌクレオチド」のオーバーハングを有する二本鎖は、2、1、又は0個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。一連の数字又は範囲の前に以下がある場合、「以下」は、その連続する数字又は範囲の各々を修飾し得ることが理解される。

20

【0284】

本明細書において使用する場合、検出の方法は、存在する分析物の量がその方法の検出レベルを下回ることの判定を含み得る。

【0285】

示した標的部位と、センス鎖又はアンチセンス鎖に関するヌクレオチド配列とが矛盾する場合には、示した配列を優先する。

30

【0286】

化学構造と化学名称とが矛盾する場合には、化学構造を優先する。

【0287】

1つ以上の列記された要素を「含む (comprising)」又は「含む (including)」組成物又は方法は、具体的に列記されていない他の要素を含んでもよい。例えば、タンパク質を「含む (comprise)」又は「含む (include)」組成物は、タンパク質を単独で含んでも、他の成分と組み合わせ含んでもよい。「～から本質的になる」という移行語句は、特許請求の範囲が、特許請求の範囲に列記される特定の要素、並びに特許請求される本発明の基本的な及び新規の特徴に大いに影響を与えない要素を包含するように解釈されるべきであることを意味する。このため、本発明の特許請求の範囲で使用する場合、「～から本質的になる」という用語は、「含む」と同等であるように解釈されることを意図するものではない。

40

【0288】

「任意選択の」又は「任意選択で」は、後述する事象又は状況が発生する場合もしない場合もあること、及び説明が、事象又は状況が発生する事例と、事象又は状況が発生しない事例とを含むことを意味する。

【0289】

「C9orf72」遺伝子という用語は、「C9orf72-SMCR8複合体サブユニット」、「グアニンヌクレオチド交換C9orf72」、「9番染色体オープンリーデ

50

「FTDALS1」、「ALSFTD」、及び「FTDALS」として知られ、エンドソーム輸送の調節に関与する周知のタンパク質をコードする遺伝子、C9orf72を指す。C9orf72タンパク質は、オートファジー及びエンドサイトーシス輸送に関与するRabタンパク質と相互作用することが示されている。この遺伝子からの転写産物中の代替5'エクソン間のイントロン配列における約2～約22コピーから約700～約1600コピーのGGGGCCリピートの伸長は、C9orf72筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、例えば、C9orf72伸長に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、又はアルツハイマー病と関連付けられる。オルタナティブスプライシングにより、異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが得られる。

10

【0290】

C9orf72の例示的なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えば、GenBank受託番号NM_001256054.2 (Homo sapiens C9orf72、配列番号1、逆相補体配列番号5)；GenBank受託番号XM_005581570.2 (Macaca fascicularis C9orf72、配列番号2、逆相補体配列番号6)；GenBank受託番号NM_001081343.2 (Mus musculus C9orf72、配列番号3、逆相補体配列番号7)、及びGenBank受託番号NM_001007702.1 (Rattus norvegicus C9orf72、配列番号4、逆相補体配列番号8)に見出すことができる。

20

【0291】

ヒトC9orf72の追加のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えば、GenBank受託番号NM_145005.6、転写バリエーション1 (配列番号9、逆相補体配列番号10)、及びNM_018325.5、転写バリエーション2 (配列番号11、逆相補体配列番号12)に見出すことができる。

【0292】

C9orf72遺伝子を保有するヒト9番染色体のゲノム領域のヌクレオチド配列は、例えば、GenBankで利用可能なGenome Reference Consortium Human Build 38 (Human Genome build 38又はGRCh38とも称される)に見出され得る。C9orf72遺伝子を保有するヒト9番染色体のゲノム領域のヌクレオチド配列はまた、例えば、GenBank受託番号NC_000009.12 (配列番号13は9番染色体のアセンブリのヌクレオチド27546546...27573866を提供、逆相補体配列番号14)に見出され得る。ヒトC9orf72遺伝子のヌクレオチド配列は、例えば、GenBank受託番号NG_031977.1 (配列番号15、逆相補体、配列番号16)に見出され得る。

30

【0293】

配列番号13は、9番染色体のアセンブリのヌクレオチド27546546...27573866 (NC_000009.12)を提供する。配列番号13内の標的配列の範囲が提供される場合、ヌクレオチド位置範囲は、9番染色体のアセンブリのヌクレオチド位置に対応し、例えば、配列番号13のヌクレオチド27573086～27573106は、配列番号13が位置27546546...27573866にヌクレオチドを提供するヒト9番染色体のアセンブリ内のヌクレオチド位置を指すことが理解されよう。

40

【0294】

C9orf72配列の更なる例は、公に利用可能なデータベース、例えば、GenBank、OMIM、及びUniProtに見出すことができる。

【0295】

C9orf72に関する追加情報は、例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/203228に見出すことができる。本明細書で使用する場合、C9orf72という用語は、例えばwww.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=NM_001256054.2で臨床バリエーションデータベースに提供

50

されるバリエーションを含む C 9 o r f 7 2 遺伝子のバリエーションも指す。

【0296】

先述の GenBank 受託番号及び遺伝子データベース番号の各々の内容全体は、本願出願日の時点で参照により本明細書に組み込まれる。

【0297】

本明細書において使用する場合、「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、センス又はアンチセンス C 9 o r f 7 2 RNA 分子などの C 9 o r f 7 2 遺伝子の転写中に形成される RNA 分子のヌクレオチド配列の連続する部分を指す。一実施形態では、配列の標的部分は、少なくとも、C 9 o r f 7 2 遺伝子の転写中に形成される mRNA 分子のヌクレオチド配列の一部分での又はその近傍での RNA A i 指向性切断のための基質として機能するのに十分な長さであることとなる。一実施形態では、標的配列は、C 9 o r f 7 2 遺伝子のタンパク質コード領域内にある。別の実施形態では、標的配列は、C 9 o r f 7 2 遺伝子のイントロン、例えばエクソン 1 A と 1 B との間のイントロン内にある。一実施形態では、標的配列は、センス C 9 o r f 7 2 RNA 分子である。別の実施形態では、標的配列は、アンチセンス C 9 o r f 7 2 RNA 分子である。一実施形態では、標的配列は、転写開始部位、例えば、アンチセンス C 9 o r f 7 2 RNA 分子の転写開始部位、例えば、DNA をコードするエクソン 1 B の 3 ' 末端の約 1 7 1 b p 下流、又は G G G G C C ヘキサヌクレオチドリピート伸長のおよそ 2 7 0 b p 下流、例えば、N G _ 0 3 1 9 7 7 (配列番号 1 5) のヌクレオチド 5 6 0 7 を含む。いくつかの実施形態では、標的配列は、転写開始部位とエクソン 1 A との間の領域、例えば、N G _ 0 3 1 9 7 7 (配列番号 1 5) のヌクレオチド 5 0 0 1 ~ 5 6 0 7 、 5 0 2 6 ~ 5 6 0 7 、 5 1 2 7 ~ 5 6 0 7 、又は 5 1 3 0 ~ 5 6 0 7 を含む。エクソン 1 A 及び 1 B は、N G _ 0 3 1 9 7 7 の 5 0 0 1 ~ 5 1 5 8 位及び 5 3 8 6 ~ 5 4 3 6 位に対応する。いくつかの実施形態では、標的配列は、転写開始部位から開始し、ヘキサヌクレオチドリピート伸長領域を通して延在し、C 9 o r f 7 2 遺伝子の 5 ' 隣接配列内に少なくとも約 2 0 0 b p 、約 5 0 0 b p 、約 9 0 0 b p 、約 1 2 0 0 b p 、又は約 1 5 0 0 b p 、又は約 2 0 0 0 b p 出た領域を含む。標的配列のヌクレオチド配列が、例えば、c D N A 配列若しくはゲノム配列、又は c D N A 配列若しくはゲノム配列の逆相補体、例えば、配列番号 1 ~ 2 0 として提供される場合、「T s」は、対応する mRNA 配列中の「U s」であることが理解される。

【0298】

C 9 o r f 7 2 mRNA (標的 C 9 o r f 7 2 RNA) は、センス鎖又はアンチセンス鎖いずれかの転写メッセージである、C 9 o r f 7 2 遺伝子から転写された RNA である。C 9 o r f 7 2 RNA は、C 9 o r f 7 2 成熟 mRNA 、C 9 o r f 7 2 前駆体 RNA 、又はその任意の部分 (例えば、スプライシングアウトされたイントロン領域又はオルタナティブスプライシングされた RNA) を含む。C 9 o r f 7 2 成熟 mRNA は、イントロンが除去され (スプライシングアウトされ)、C 9 o r f 7 2 タンパク質が翻訳される元である C 9 o r f 7 2 mRNA である。C 9 o r f 7 2 前駆体 RNA は、少なくとも 1 つのイントロン、特に第 1 のイントロン (イントロン 1) が除去されていない C 9 o r f 7 2 RNA である。

【0299】

C 9 o r f 7 2 タンパク質には、C 9 o r f 7 2 RNA から発現される任意のタンパク質が含まれる。C 9 o r f 7 2 タンパク質には、C 9 o r f 7 2 成熟 RNA から発現されるタンパク質、並びにヘキサヌクレオチドリピートを含む C 9 o r f 7 2 RNA から のリピート関連非 A U G (A U G) 翻訳から生じるジペプチドリピートタンパク質 (例えば、ポリ (グリシン-アラニン)、ポリ (グリシン-プロリン)、ポリ (グリシン-アルギニン)、ポリ (アラニン-プロリン)、及びポリ (プロリン-アルギニン)) が含まれる。

【0300】

C 9 o r f 7 2 標的 RNA には、ヘキサヌクレオチドリピート伸長を有する C 9 o r f

72 RNAが含まれてもよい。ヘキサヌクレオチドリピート伸長には、配列番号1の複数の連続コピー、又は配列番号1の複数の連続コピーと少なくとも90%の同一性を有する配列が含まれるが、これらに限定されない。C9orf72標的RNAには、ヘキサヌクレオチドリピート伸長を有するC9orf72センス及びアンチセンスRNA転写産物が含まれるが、これらに限定されない。C9orf72標的RNAは、例えば、病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長を伴う（例えば、ヘキサヌクレオチドリピートの少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、又は少なくとも約500コピーを有する）ものであり得る。

10

【0301】

標的配列は、約15～30ヌクレオチドの長さであり得る。例えば、標的配列は、約15～30ヌクレオチド、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は21～22ヌクレオチドの長さであり得る。ある特定の実施形態では、標的配列は、19～23ヌクレオチドの長さであり、任意選択で21～23ヌクレオチドの長さである。上に列記した範囲及び長さの間に存在する範囲及び長さも、本開示の一部であると企図される。

20

【0302】

本明細書において使用する場合、「配列を含む鎖」という用語は、標準的なヌクレオチドの用語体系を使用して言及される配列によって説明するヌクレオチドの鎖を含むオリゴヌクレオチドを指す。

【0303】

「G」、「C」、「A」、「T」、及び「U」は各々、概して、修飾ヌクレオチド又は未修飾ヌクレオチドの文脈において、それぞれ、塩基としてのグアニン、シトシン、アデニン、チミジン、及びウラシルを含むヌクレオチドを表す。しかしながら、「リボヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」という用語は、以下においてより詳述されるような修飾ヌクレオチド、又は代替置換部分（例えば、表1を参照）も指し得ることが理解されよう。当業者であれば、グアニン、シトシン、アデニン、チミジン、及びウラシルが、そのような置換部分を担持するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対合特性を実質的に改変することなく、他の部分で代置できることを十分に認識する。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、シトシン、又はウラシルを含むヌクレオチドと塩基対合し得る。よって、ウラシル、グアニン、又はアデニンを含むヌクレオチドは、本開示において取り上げるdsRNAのヌクレオチド配列において、例えばイノシンを含むヌクレオチドで代置することができる。別の実施例では、オリゴヌクレオチド内のいずれの場所にあるアデニン及びシトシンも、標的mRNAと塩基対合するG-U Wobbleを形成するために、それぞれグアニン及びウラシルで代置することができる。そのような置換部分を含む配列は、本開示において取り上げる組成物及び方法にとって好適である。

30

40

【0304】

本明細書において互換的に使用する、「iRNA」、「RNAi剤」、「iRNA剤」、「RNA干渉剤」という用語は、本明細書において用語が定義されるRNAを含み、かつRNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)経路を介してRNA転写産物の標的化された切断を媒介する、薬剤を指す。RNA干渉(RNAi)は、mRNAの配列特異的

50

分解を司るプロセスである。RNAiは、細胞、例えば、哺乳動物対象などの対象内の細胞において、C9orf72、C9orf72関連転写産物、又はC9orf72関連ペプチド（例えば、ジペプチドリピート）の発現をノックダウン（すなわち、その量を低減させる）又は調節（すなわち、阻害）する。

【0305】

一実施形態では、本開示のRNAi剤は、標的RNAの切断を司るために、標的RNA配列、例えば、C9orf72標的mRNA配列（センス又はアンチセンスいずれかのRNA転写産物配列）と相互作用する一本鎖RNAiを含む。理論に拘束されることを望むものではないが、細胞内に導入される長い二本鎖RNAは、Dicerとして知られるIII型エンドヌクレアーゼによって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖低分子干渉RNA（siRNA）へと分解されると考えられる（Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485）。DicerであるリボヌクレアーゼIII様酵素は、これらdsRNAを、特徴的な2つの塩基の3'オーバーハングを有する19～23塩基対の低分子干渉RNAへとプロセッシングする（Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363）。その後これらsiRNAは、RNA誘導型サイレンシング複合体（RISC）に組み込まれ、そこで1つ以上のヘリカーゼがsiRNA二本鎖を解き、それによって相補的アンチセンス鎖に対して標的認識を誘導することが可能になる（Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309）。適切な標的mRNAに結合すると、RISC内の1つ以上のエンドヌクレアーゼは、標的を切断してサイレンシングを誘導する（Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188）。このため、一態様では、本開示は、細胞内において生成されて、RISC複合体の形成を促進して標的遺伝子、すなわち、C9orf72遺伝子のサイレンシングを行うものである、一本鎖RNA（ssRNA）（siRNA二本鎖のアンチセンス鎖）に関する。したがって、「siRNA」という用語は、上で説明したRNAiも意味するために本明細書において使用される。

【0306】

別の実施形態では、RNAi剤は、標的mRNAを阻害するために細胞又は有機体に導入された一本鎖RNAであってもよい。一本鎖RNAi剤は、RISCエンドヌクレアーゼであるアルゴノート2に結合し、それは次いで、標的mRNAを切断する。一本鎖siRNAは、概して、15～30ヌクレオチドであり、化学的に修飾されている。一本鎖RNAの設計及び試験は、米国特許第8,101,348号及びLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載されており、それら各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書において記載するアンチセンスヌクレオチド配列はいずれも、本明細書において記載する一本鎖siRNAとして、又はLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載される方法によって化学的に修飾されるような一本鎖siRNAとして使用されてもよい。

【0307】

別の実施形態では、本開示の組成物及び方法で使用するための「RNAi剤」は、二本鎖RNAであり、また本明細書において「二本鎖RNAi剤」、「二本鎖RNA（dsRNA）分子」、「dsRNA剤」、又は「dsRNA」と称される。「dsRNA」という用語は、標的RNA、すなわち、C9orf72遺伝子のセンス鎖又はC9orf72遺伝子のアンチセンス鎖のいずれかに関して「センス」又は「アンチセンス」配向を有するとして言及する、二本の逆平行の実質的に相補的な核酸鎖を含む二本鎖構造を有するリボ核酸分子の複合体を指す。本開示のいくつかの実施形態では、二本鎖RNA（dsRNA）が、本明細書においてRNA干渉又はRNAiと称する転写後遺伝子サイレンシング機序を経て、標的RNAの、例えば、mRNAの分解を誘発する。

【0308】

本明細書に記載されるdsRNA剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）又はギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）とは異なってもよい（すなわち、それらを含まない）。

【0309】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される開示されたアンチセンスオリゴヌクレオチド配列のうちのいずれも、ASO、リボザイムとして単独で 사용할 ことができる。ASOは、記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチド配列のうちのいずれかからの16～20個の連続するヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、ASOは、記載されるdsRNAのうちのいずれかと同じ標的RNA領域を標的とする。ASOは、標的RNAのRNase Hエンドヌクレアーゼ切断を誘導することによって、リボソーム活性の立体障害によって、5'キャップ形成を阻害することによって、又はスプライシングを改変することによって、標的を下方調節することができる。ASOは、ギャップマー又はモルホリノであり得る。「ギャップマー」は、1つ以上のヌクレオシドを有する外部領域の間に位置付けられたRNase H切断を支援する複数のヌクレオシドを有する内部領域を含むオリゴヌクレオチドであり、内部領域を含むヌクレオシドは、外部領域を含むヌクレオシド（単数又は複数）と化学的に異なる。内部領域は「ギャップ」と称されてもよく、外部領域は「ウィング」と称されてもよい。ギャップマーは、各々が2～6個のヌクレオチドを有する5'及び3'ウィングと、7～12個のヌクレオチドを有するギャップとを有し得る。ギャップマーは、3-10-3構成又は5-10-5構成を有し得る。ギャップマーのヌクレオチドの全ては、ホスホロチオエート連結を有し、任意選択で、1つ以上のキラルメシル-ホスホルアミダート又はメチルホスホネート連結ヌクレオチドを伴い得る。ウィングヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル（2'-MOE）修飾ヌクレオチド、LNA修飾ヌクレオチド、cET修飾ヌクレオチド、又はそれらの組み合わせであり得るが、これらに限定されない。ギャップヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドであり得る。ASO中のいずれのシトシンヌクレオチドも、メチル-シトシンであることができる。

10

20

【0310】

概して、dsRNA分子は、リボヌクレオチドを含むことができるが、本明細書において詳細に説明されるように、各々の鎖又は両方の鎖は、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、修飾ヌクレオチドも含むことができる。加えて、本明細書において使用する場合、「RNAi剤」は、化学修飾を有するリボヌクレオチドを含んでもよく、RNAi剤は、複数のヌクレオチドにおける実質的な修飾を含んでもよい。本明細書において使用する場合、「修飾ヌクレオチド」という用語は、修飾糖部分、修飾ヌクレオチド間連結、又は修飾核酸塩基を独立して有するヌクレオチドを指す。このため、修飾ヌクレオチドという用語は、ヌクレオシド間連結、糖部分、又は核酸塩基に対する、例えば、官能基又は原子などの置換、付加、又は除去を包含する。本開示の薬剤における使用に好適な修飾は、本明細書において開示する修飾又は当技術分野で既知の修飾の全ての型を含む。siRNA型分子において使用するいずれのそのような修飾も、本明細書及び特許請求の範囲の目的では「RNAi剤」により包含される。

30

【0311】

本開示のある特定の実施形態では、デオキシ-ヌクレオチドを包含することが、RNAi剤内に存在するならば、修飾ヌクレオチドを構成するとみなすことができる。

【0312】

二本鎖領域は、RISC経路を介して所望の標的RNAの特異的分解を可能にするいずれの長さであってもよく、約15～36塩基対の長さ、例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、又は36塩基対の長さ、例えば、約15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25

40

50

、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は21～22塩基対の長さの範囲であってもよい。ある特定の実施形態では、二本鎖領域は、19～21塩基対の長さ、例えば、21塩基対の長さである。上に列記した範囲及び長さの間に存在する範囲及び長さもまた、本開示の一部であることを意図している。

【0313】

二本鎖構造を形成する二本の鎖は、1つのより大きいRNA分子の異なる部分であってもよく、又はそれらは、別個のRNA分子であってもよい。二本の鎖が、1つのより大きい分子のうちの部分であり、したがって二本鎖構造を形成する一方の鎖の3'末端とそれに対応するもう一方の鎖の5'末端との間にある中断されないヌクレオチドの鎖で接続されている場合、その接続しているRNA鎖は、「ヘアピンループ」と称される。ヘアピンループは、少なくとも1つの不對のヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、ヘアピンループは、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも23個、又はそれ以上の、不對のヌクレオチド又はdsRNAの標的部位に向けられていないヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、ヘアピンループは、10個以下のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、ヘアピンループは、8個以下の不對のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、ヘアピンループは、4～10個の不對のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、ヘアピンループは、4～8個のヌクレオチドであり得る。

【0314】

dsRNAの実質的に相補的な二本の鎖が別個のRNA分子で構成される場合、それらの分子は、必ずしもそうではないが、共有結合で接続することができる。二本の鎖が、二本鎖構造を形成する一方の鎖の3'末端とそれに対応するもう一方の鎖の5'末端との間にある中断されないヌクレオチドの鎖以外の手段によって共有結合されるある特定の実施形態では、その接続している構造は「リンカー」と称される（ただし、本明細書において別の箇所で規定するような他のある特定の構造もまた「リンカー」と称され得ることに留意されたい）。RNA鎖は、同じ数のヌクレオチドを有しても、異なる数のヌクレオチドを有してもよい。塩基対の最大数は、dsRNAの最も短い鎖にあるヌクレオチドの数から二本鎖内に存在するあらゆるオーバーハングを引いた数である。二本鎖構造に加えて、RNAiは、1つ以上のヌクレオチドオーバーハングを含んでもよい。RNAi剤の一実施形態では、少なくとも一方の鎖が、少なくとも1個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。別の実施形態では、少なくとも一方の鎖が、少なくとも2個のヌクレオチドの、例えば、2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、又は15個のヌクレオチドの、3'オーバーハングを含む。他の実施形態では、RNAi剤の少なくとも一方の鎖が、少なくとも1個のヌクレオチドの5'オーバーハングを含む。ある特定の実施形態では、少なくとも一方の鎖が、少なくとも2個のヌクレオチドの、例えば、2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、又は15個のヌクレオチドの、5'オーバーハングを含む。更に他の実施形態では、RNAi剤の一方の鎖の3'末端及び5'末端の両方が、少なくとも1個のヌクレオチドのオーバーハングを含む。

【0315】

一実施形態では、本開示のRNAi剤はdsRNAであり、その各鎖は、独立して、標的RNA配列、例えば、C9orf72標的mRNA配列と相互作用して標的RNAの切断を司る19～23個のヌクレオチドを含む。

【0316】

いくつかの実施形態では、本発明のiRNAは、標的RNA配列、例えば、C9orf72標的mRNA配列と相互作用して標的RNAの切断を司る24～30個のヌクレオチドのdsRNAである。

【0317】

本明細書において使用する場合、「ヌクレオチドオーバーハング」という用語は、RN

10

20

30

40

50

A i 剤、例えば、dsRNAの二本鎖構造から突出する少なくとも1つの不對ヌクレオチドを指す。例えば、dsRNAの一方の鎖の3'末端が、もう一方の鎖の5'末端を越えて延在する場合、又はその逆の場合も同様に、ヌクレオチドオーバーハングが存在する。dsRNAは、少なくとも1個のヌクレオチドのオーバーハングを含むことができ、あるいはオーバーハングは、少なくとも2個のヌクレオチド、少なくとも3個のヌクレオチド、少なくとも4個のヌクレオチド、少なくとも5個のヌクレオチド、又はそれ以上を含むことができる。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシヌクレオチド／ヌクレオシドなどであるヌクレオチド／ヌクレオシド類似体を含むことも、それらからなることもできる。オーバーハングは、センス鎖上にあることも、アンチセンス鎖上にあることも、それらのいずれかの組み合わせの上にあることもできる。更に、あるオーバーハングのヌクレオチドは、dsRNAのアンチセンス鎖又はセンス鎖のいずれかの5'末端、3'末端、又は両末端上に存在することができる。

10

【0318】

一実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖が、3'末端又は5'末端において1～10ヌクレオチドの、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチドの、オーバーハングを有する。一実施形態では、dsRNAのセンス鎖が、3'末端又は5'末端において1～10ヌクレオチドの、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチドの、オーバーハングを有する。別の実施形態では、オーバーハング内のヌクレオチドのうちの1つ以上が、ヌクレオシドチオホスフェートで代置される。

20

【0319】

ある特定の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖が、3'末端又は5'末端において1～10ヌクレオチドの、例えば、0～3、1～3、2～4、2～5、4～10、5～10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチドの、オーバーハングを有する。一実施形態では、dsRNAのセンス鎖が、3'末端又は5'末端において1～10ヌクレオチドの、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチドの、オーバーハングを有する。別の実施形態では、オーバーハング内のヌクレオチドの1つ以上が、ヌクレオシドチオホスフェートで代置される。

【0320】

ある特定の実施形態では、センス鎖又はアンチセンス鎖上のオーバーハングは、10ヌクレオチドより長い伸長した長さを含み得、例えば長さが1～30ヌクレオチド、2～30ヌクレオチド、10～30ヌクレオチド、又は10～15ヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二本鎖のセンス鎖上にある。ある特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二本鎖のセンス鎖の3'末端上に存在する。ある特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二本鎖のセンス鎖の5'末端上に存在する。ある特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二本鎖のアンチセンス鎖上にある。ある特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二本鎖のアンチセンス鎖の3'末端上に存在する。ある特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二本鎖のアンチセンス鎖の5'末端上に存在する。ある特定の実施形態では、オーバーハングにおけるヌクレオチドのうちの1つ以上は、ヌクレオシドチオホスフェートで代置される。ある特定の実施形態では、オーバーハングは、オーバーハングが生理学的条件下において安定なヘアピン構造を形成することができるような自己相補性部分を含む。

30

40

【0321】

ある特定の実施形態では、少なくとも一本の鎖の少なくとも一方の末端は二本鎖標的化領域を超えて伸長するものであり、これには両鎖のうちの一方が熱力学的に安定なテトラループ構造を含む構造が挙げられる（例えば、その各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,513,207号及び第8,927,705号並びに国際公開第2010/033225号を参照）。そのような構造は、一本鎖伸長（当該分子の片側又は両側における）及び二本鎖伸長を含んでもよい。

【0322】

50

ある特定の実施形態では、センス鎖の 3' 末端及びアンチセンス鎖の 5' 末端は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又はその両方を含むポリヌクレオチド配列によって接合され、任意選択で、ポリヌクレオチド配列は、テトラループ配列を含む。ある特定の実施形態では、センス鎖は、25～35ヌクレオチドの長さである。

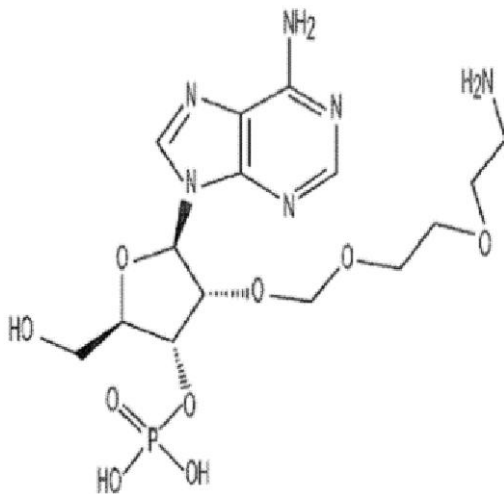
【0323】

テトラループは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、及びそれらの組み合わせを含んでもよい。典型的には、テトラループは、4～5ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、ループは、G A A Aと記載する配列を含む。いくつかの実施形態では、ループのヌクレオチド (G A A A) のうちの少なくとも1つは、ヌクレオチド修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2' 修飾を含む。いくつかの実施形態では、2' 修飾は、2' -アミノエチル、2' -フルオロ、2' -オーメチル、2' -オーメトキシエチル、2' -アミノジエトキシメタノール、2' -アデム (adem)、及び2' -デオキシ-2' -フィオロ (f h i o r o) -d-アラビノ核酸 (arabinonucleic acid) からなる群から選択される修飾である。いくつかの実施形態では、ループの全てのヌクレオチドが修飾される。いくつかの実施形態では、G A A A配列内のGは、2' -OHを含む。いくつかの実施形態では、G A A A配列内のそれぞれのヌクレオチドは、2' -オーメチル修飾を含む。いくつかの実施形態では、G A A A配列内のそれぞれのAは、2' -OHを含み、G A A A配列内のGは、2' -オーメチル修飾を含む。好ましい実施形態では、いくつかの実施形態では、G A A A配列内のAの各々は、2' -オーメトキシエチル (M O E) 修飾を含み、G A A A配列内のGは、2' -オーメチル修飾を含むか、又はG A A A配列内のAの各々は、2' -アデム修飾を含み、G A A A配列内のGは、2' -オーメチル修飾を含む。例えば、内容全体が参照により本明細書に組み込まれるP C T国際公開第2020/206350号を参照されたい。

【0324】

例示的な2' アデム修飾ヌクレオチドを以下に示す。

【化1】



【0325】

「平滑」又は「平滑末端」という用語は、dsRNAに関して本明細書において使用する場合、dsRNAの所定の末端において不對ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体が存在しない、すなわち、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。dsRNAの一方の末端又は両末端が、平滑であり得る。dsRNAの両末端が平滑である場合、dsRNAは、平滑末端であると言う。明瞭化のため、「平滑末端」のdsRNAは、両末端が平滑であるdsRNA、すなわち、分子のどちらの末端にもヌクレオチドオーバーハングが存在しないdsRNAである。ほとんどの場合、こうした分子は、その全長にわたって二本鎖となることとなる。

【0326】

RNAi剤の「アンチセンス鎖」又は「ガイド鎖」という用語は、標的配列、例えば、C9orf72 mRNAに対して実質的に相補的な領域を含む、例えば、dsRNAであるRNAi剤の鎖を指す。

【0327】

本明細書において使用する場合、「相補性の領域」という用語は、本明細書において定義されるように、配列、例えば標的配列、例えば、C9orf72ヌクレオチド配列に対して実質的に相補的であるアンチセンス鎖上の領域を指す。相補性領域が、標的配列に対して完全に相補的でない場合、そのミスマッチは、分子の内側領域内又は末端領域内にあり得る。概して、最も許容できるミスマッチは、末端領域内、例えば、RNAi剤の5'末端又は3'末端の5、4、3、又は2ヌクレオチドの範囲内にある。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖RNA剤は、アンチセンス鎖内のヌクレオチドミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖RNA剤のアンチセンス鎖は、標的mRNAとの4以下のミスマッチを含み、例えばアンチセンス鎖が、標的mRNAとの4、3、2、1、又は0のミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、本発明のアンチセンス鎖の二本鎖RNA剤は、センス鎖との4以下のミスマッチを含み、例えば、アンチセンス鎖が、センス鎖との4、3、2、1、又は0のミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖RNA剤は、センス鎖内にヌクレオチドミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖RNA剤のセンス鎖は、アンチセンス鎖との4以下のミスマッチを含み、例えば、センス鎖が、アンチセンス鎖との4、3、2、1、又は0のミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドミスマッチは、例えば、iRNAの3'末端から5、4、3ヌクレオチドの範囲内にある。別の実施形態では、ヌクレオチドミスマッチは、例えば、iRNA剤の3'末端ヌクレオチド内にある。いくつかの実施形態では、ミスマッチは、シード領域にはない。

【0328】

したがって、本明細書において記載するRNAi剤は、標的配列に対する1つ以上のミスマッチを含み得る。一実施形態では、本明細書において記載するRNAi剤は、3つ以下のミスマッチ（すなわち、3つ、2つ、1つ、又は0個のミスマッチ）を含む。一実施形態では、本明細書において記載するRNAi剤は、2つ以下のミスマッチを含む。一実施形態では、本明細書において記載するRNAi剤は、1つ以下のミスマッチを含む。一実施形態では、本明細書において記載するRNAi剤は、0個のミスマッチを含む。ある特定の実施形態では、RNAi剤のアンチセンス鎖が、標的配列に対してミスマッチを含む場合、このミスマッチは、任意選択で、相補性領域の5'末端又は3'末端のいずれかから最後の5ヌクレオチドの範囲内にあるように制限することができる。例えば、そのような実施形態では、23ヌクレオチドのRNAi剤の場合、C9orf72遺伝子の領域に対して相補的な鎖は、概して、中央の13ヌクレオチドの範囲内にいかなるミスマッチも含まない。本明細書において記載する方法又は当技術分野で公知の方法を使用することにより、標的配列に対するミスマッチを含むRNAi剤を、C9orf72遺伝子の発現を阻害するのに有効であるか否か判定することができる。とりわけ、C9orf72遺伝子における特定の相補性領域が、集団内での多形配列バリエーションを有することがわかっている場合には、C9orf72遺伝子の発現を阻害するミスマッチを有するRNAi剤の有効性を考慮することが重要である。いくつかの実施形態では、RNAi剤は、標的配列と1ヌクレオチドのミスマッチを含み、ミスマッチは、RNAi剤の3'末端又は5'末端で生じる。ミスマッチは、アンチセンス鎖、センス鎖、又はセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方にあり得る。センス鎖及びアンチセンス鎖の両方に標的RNAと3'又は5'末端ミスマッチを有するRNAi剤について、センス鎖及びアンチセンス鎖の末端ヌクレオチドは、塩基対のためであり得る。このため、本明細書において開示する記載のアンチセンス配列又はセンス配列のうちのいずれについても、5'又は3'ヌクレオチドは、標的RNAとミスマッチを形成するヌクレオチドの置換とされ得る。

【0329】

本明細書において使用する場合、「ヌクレオチドの実質的に全てが修飾されている」は、広く修飾されているが全体が修飾されているものではなく、また5、4、3、2、若しくは1つ以下の未修飾のヌクレオチドを含み得る。

【0330】

RNAi剤の「センス鎖」又は「パッセンジャー鎖」という用語は、本明細書において用語が定義されるようなアンチセンス鎖の領域に対して実質的に相補的である領域を含むRNAi剤の鎖を意味する。

【0331】

本明細書において使用する場合、「切断領域」という用語は、切断部位に直接隣接して位置する領域を指す。切断部位は、切断が生じる箇所である標的上の部位である。いくつかの実施形態では、切断領域は、切断部位のどちらかの末端における直接隣接している3つの塩基を含む。いくつかの実施形態では、切断領域は、切断部位のどちらかの末端における直接隣接している2つの塩基を含む。いくつかの実施形態では、切断部位は、アンチセンス鎖のヌクレオチド10及び11によって結合される部位において特異的に生じ、またこの切断領域は、ヌクレオチド11、12、及び13を含む。

【0332】

本明細書において使用する場合、別段に示さない限り、「相補的」という用語は、第2のヌクレオチド配列との関連において第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には、当業者によって理解されることとなるおり、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと特定の条件下においてハイブリダイズして二本鎖構造を形成する第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの能力を指す。かかる条件は、例えば、厳しい条件であり得、該厳しい条件は、400mMのNaCl、40mMのPIPES pH 6.4、1mMのEDTA、50℃又は70℃で12～16時間の後の洗浄、を含み得る（例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press」を参照）。生物体内で遭遇し得るような生理学的に関連のある条件などの他の条件を適用することができる。当業者は、ハイブリダイズされたヌクレオチドの最終的な用途に応じて、2つの配列の相補性の試験に最も適切な条件の組を決定することができる。

【0333】

RNAi剤内の、例えば本明細書において説明されるdsRNA内の相補配列は、一方又は両方のヌクレオチド配列の長さ全体にわたって、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドに対する第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの塩基対合を含む。かかる配列は、本明細書において、互いに対して「完全に相補的」とであると称され得る。しかしながら、本明細書において、第1の配列が第2の配列に対して「実質的に相補的」とであるという場合、この2つの配列は、完全に相補的であり得るか、又はそれらはその最終的な用途に、例えばRISC経路を経た遺伝子発現の阻害に最も関連した条件下でハイブリダイズする能力を維持しつつ、最大30塩基対の二本鎖についてのハイブリダイゼーションの際に、1つ以上であるが、概して5、4、3、又は2つ以下である、ミスマッチ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の際に1つ以上の一本鎖のオーバーハングを形成するように設計される場合には、かかるオーバーハングは、相補性の判定に関してミスマッチとはみなさないものとする。例えば、長さが21ヌクレオチドである一方のオリゴヌクレオチドと長さが23ヌクレオチドであるもう一方のオリゴヌクレオチドとを含むdsRNAであって、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対して完全に相補的である21ヌクレオチドの配列を含むようなdsRNAは、依然として、本明細書において記載する目的に関しては「完全に相補的」と称し得る。

【0334】

「相補的」配列は、本明細書において使用する場合、ハイブリダイズするそれらの能力に関する上記の要件を満足する限り、非ワトソン・クリック塩基対、又は非天然の修飾ヌ

クレオチドから形成された塩基対も含み得るか、又は全体的にそれらから形成され得る。そのような非ワトソン・クリック塩基対としては、これらに限定されるわけではないが、G：Uのウォッブル又はフーグスティーン型の塩基対合が挙げられる。

【0335】

本明細書における「相補的」、「完全に相補的」、及び「実質的に相補的」という用語は、それらの使用の文脈から理解されることとなるとおり、dsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との間、又はRNAi剤のアンチセンス鎖と標的配列との間における塩基マッチングに関連して使用され得る。

【0336】

本明細書において使用する場合、RNA転写産物「の少なくとも一部に対して実質的に相補的」であるポリヌクレオチドは、目的のRNA転写産物（例えば、C9orf72 RNA、センス鎖又はアンチセンス鎖いずれか）の連続する部分に対して実質的に相補的であるポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、配列が、RNAの中断されない部分に対して実質的に相補的である場合、C9orf72 RNAの少なくとも一部に対して相補的である。

【0337】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列に対して完全に相補的である。他の実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列に対して実質的に相補的であり、また配列番号1～4、9、11、13、15、17、及び19のいずれか1つのヌクレオチド配列の等価領域に対して、その全長にわたって少なくとも80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。

【0338】

上述のように、エクソン1aと1bとの間のC9orf72遺伝子の第1のイントロン中にあり、病原性となる、大きなGGGGCC（G₄C₂）ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、双方向転写され得る。したがって、いくつかの実施形態では、C9orf72遺伝子のいずれの鎖に対しても相補的であるアンチセンス鎖ポリヌクレオチドが本明細書において開示される。他の実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列に対して実質的に相補的であり、配列番号5～8、10、12、14、16、18、又は20のいずれか1つのヌクレオチド配列の等価領域に対して、その全長にわたって少なくとも80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。

【0339】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列の断片に対して実質的に相補的であり、配列番号13のヌクレオチド27573296～27573318、27573314～27573336、27573319～27573341、27573562～27573584、27573585～27573607、27573592～27573614、27573599～27573621、27573608～27573630、27573616～27573638、27573619～27573641、27573622～27573644、27573633～27573655、27573690～27573712、及び27573717～27573739の群から選択される配列番号13の断片に対して、その全長にわたって少なくとも80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。

【0340】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは

、標的C9orf72配列の断片に対して実質的に相補的であり、配列番号1のヌクレオチド1～23、15～37、33～55、37～59、62～84、又は69～91などの配列番号1の断片に対して、その全長にわたって少なくとも80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。上に列記した範囲の中間にある範囲も、本開示の一部であることが企図される。

【0341】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列の断片に対して実質的に相補的であり、配列番号15のヌクレオチド5197～5219、5223～5245、5226～5248、5227～5249、5233～5255、5248～5270、5539～5561、5547～5569、5917～5939、5936～5958、5954～5976、6008～6030、6021～6043、6036～6058、6043～6065、及び6048～6070などの配列番号15の断片に対して、その全長にわたって少なくとも80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。上に列記した範囲の中間にある範囲も、本開示の一部であることが企図される。

10

【0342】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列の断片に対して実質的に相補的であり、配列番号15のヌクレオチド5015～5052、5017～5040、5032～5059、5032～5055、5033～5055、5035～5059、5036～5059、5058～5087、5059～5087、5059～5084、5064～5087、5197～5222、5213～5267、5223～5252、5229～5252、5233～5263、5516～5570、5539～5565、5539～5562、5545～5570、5545～5569、5593～5616、5883～5950、5917～5950、5919～5950、5923～5950、5934～5977、5934～5957、5938～5977、5938～5965、5938～5961、5947～5977、5947～5973、5972～6001、5973～5997、6006～6029、6011～6070、6011～6039、6011～6038、6015～6038、6019～6045、6019～6042、6033～6070、6035～6065、6035～6059、又は6040～6063などの配列番号15の断片に対して、その全長にわたって少なくとも80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。上に列記した範囲の中間にある範囲も、本開示の一部であることが企図される。

20

30

【0343】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列の断片に対して実質的に相補的であり、配列番号1のヌクレオチド15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は64～87などの配列番号1の断片に対して、その全長にわたって少なくとも80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。上に列記した範囲の中間にある範囲も、本開示の一部であることが企図される。

40

【0344】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列の断片に対して実質的に相補的であり、配列番号13のヌクレオチド27573296～27573584、27573296～27573575、27573301～27573338、27573318～27573342、27573

50

5 5 5 ~ 2 7 5 7 3 5 8 3、2 7 5 7 3 5 8 1 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 8 4 ~ 2 7 5 7 3 6 0 7、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 7 1、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 6 6、2 7 5 7 3 5 8 8 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 2 ~ 2 7 5 7 3 6 1 7、2 7 5 7 3 5 9 8 ~ 2 7 5 7 3 6 2 4、2 7 5 7 3 5 9 9 ~ 2 7 5 7 3 6 2 3、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 5 5、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 5 2、2 7 5 7 3 6 0 6 ~ 2 7 5 7 3 6 4 7、2 7 5 7 3 6 5 4 ~ 2 7 5 7 3 7 1 2、又は2 7 5 7 3 7 0 7 ~ 2 7 5 7 3 7 4 0などの配列番号13の断片に対して、その全長にわたって少なくとも80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。上に列記した範囲の中間にある範囲も、本開示の一部であることが企図される。

10

【0345】

他の実施形態では、本明細書において開示するセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列に対して実質的に相補的であり、表2、3、10A、10C、11、若しくは12のうちのいずれか1つのいずれか1つにあるセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つに対して、又は表2、3、10A、10C、11、若しくは12のうちのいずれか1つにあるセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つの断片に対して、その全長にわたって少なくとも約80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は100%相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。

20

【0346】

他の実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的C9orf72配列に対して実質的に相補的であり、表5、6、10B、若しくは10Dのうちのいずれか1つのいずれか1つにあるセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つに対して、又は表5、6、10B、若しくは10Dのうちのいずれか1つにあるセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか1つの断片に対して、その全長にわたって少なくとも約80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は100%相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。

【0347】

ある特定の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、二本鎖AD-1446213.1、AD-1446217.1、AD-1446222.1、AD-1446234.1、AD-1446243.1、AD-1446246.1、AD-1446252.1、AD-1446259.1、AD-1446265.1、AD-1446268.1、AD-1446271.1、AD-1446279.1、AD-1446289.1、及びAD-1446294.1のうちのいずれか1つから選択される。

30

【0348】

ある特定の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、二本鎖AD-1446213.1、AD-1446246.1、及びAD-1446268.1のうちのいずれか1つから選択される。

40

【0349】

ある特定の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、二本鎖AD-1446073.1、AD-1446075.1、AD-1285246.2、AD-1446084.1、AD-1446087.1、AD-1446090.1、及びAD-1446095.1のうちのいずれか1つから選択される。

【0350】

ある特定の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、二本鎖AD-1446087.1及びAD-1446090.1のうちのいずれか1つから選択される。

【0351】

ある特定の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、二本鎖AD-128523

50

8. 1 及び A D - 1 2 8 5 2 3 4 . 1 のうちのいずれか 1 つから選択される。

【0352】

ある特定の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、二本鎖 A D - 1 2 8 5 2 3 1 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 2 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 3 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 5 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 7 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 9 . 1、A D - 1 2 8 5 2 4 0 . 1、A D - 1 2 8 5 2 4 2 . 1、A D - 1 2 8 5 2 4 4 . 1、A D - 1 2 8 5 2 4 3 . 1、A D - 1 2 8 5 2 4 1 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 6 . 1、A D - 1 4 4 6 1 1 1 . 1、A D - 1 4 4 6 1 1 7 . 1、A D - 1 4 4 6 1 4 7 . 1、A D - 1 4 4 6 1 5 7 . 1、A D - 1 4 4 6 1 6 8 . 1、A D - 1 4 4 6 1 8 0 . 1、A D - 1 4 4 6 1 8 9 . 1、A D - 1 4 4 6 1 9 6 . 1、A D - 1 4 4 6 2 0 2 . 1、A D - 1 4 4 6 2 0 5 . 1 のうちのいずれか 1 つから選択される。

10

【0353】

ある特定の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、二本鎖 A D - 1 2 8 5 2 3 1 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 2 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 3 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 4 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 5 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 6 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 7 . 1、A D - 1 2 8 5 2 3 9 . 1、A D - 1 2 8 5 2 4 0 . 1、A D - 1 2 8 5 2 4 1 . 1、A D - 1 2 8 5 2 4 2 . 1、及び A D - 1 2 8 5 2 4 3 . 1 のうちのいずれか 1 つから選択される。

【0354】

他の実施形態では、本明細書において開示するアンチセンスポリヌクレオチドは、標的 C 9 o r f 7 2 配列に対して実質的に相補的であり、表 8 若しくは 9 のうちのいずれか 1 つのいずれか 1 つにあるセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つ、又は表 8 若しくは 9 のうちのいずれか 1 つにあるセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つの断片に対して、その全長にわたって少なくとも約 8 0 % 相補的、例えば、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 %、又は 1 0 0 % 相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。

20

【0355】

本明細書において使用する場合、「C 9 o r f 7 2 の発現を阻害する」という語句は、成熟 C 9 o r f 7 2 m R N A の発現を阻害すること、イントロン中にヘキサヌクレオチドリピートを含む C 9 o r f 7 2 R N A の発現をノックダウン若しくは阻害する又はそのレベルを低減させること、ヘキサヌクレオチドリピートを含む C 9 o r f 7 2 R N A のアンチセンス鎖の発現をノックダウン若しくは阻害する又はそのレベルを低減させること、を含む。ヘキサヌクレオチドリピートを含む C 9 o r f 7 2 R N A の発現をノックダウン若しくは阻害する又はそのレベルを低減させることは、センス及びアンチセンス C 9 o r f 7 2 含有巢の産生を阻害すること、並びに／又は異常なジペプチドリピート (D P R) タンパク質 (例えば、ポリ (グリシン-アラニン) 若しくはポリ (G A) ペプチド、ポリ (グリシン-プロリン) 若しくはポリ (G P) ペプチド、ポリ (グリシン-アルギニン) 若しくはポリ (G R) ペプチド、ポリ (アラニン-プロリン) 若しくはポリ (P A) ペプチド、又はポリ (プロリン-アルギニン) 若しくはポリ (P R) ペプチド) の産生を阻害することを含む。いくつかの実施形態では、R N A 巢のリピート長依存性の形成、特定の R N A 結合タンパク質の分画、又はポリ (グリシン-アラニン) ペプチド、ポリ (グリシン-プロリン) ペプチド、ポリ (グリシン-アルギニン) ペプチド、ポリ (アラニン-プロリン) ペプチド、若しくはポリ (プロリン-アルギニン) ペプチドの蓄積若しくは凝集は、5 0 % を超えて、例えば、5 5 % を超えて、6 0 % を超えて、6 5 % を超えて、7 0 % を超えて、7 5 % を超えて、8 0 % を超えて、8 5 % を超えて、9 0 % を超えて、又は 9 5 % を超えて、阻害されるか又は減少し、C 9 o r f 7 2 成熟 R N A の発現は、5 0 % を下回って、例えば、4 5 % を下回って、4 0 % を下回って、3 5 % を下回って、3 0 % を下回って、2 5 % を下回って、2 0 % を下回って、1 5 % を下回って、1 0 % を下回って、又は 5 % を下回って、阻害されるか又は減少する。

30

40

【0356】

50

一実施形態では、C9orf72遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制は、C9orf72 RNA、例えば、センスRNA転写産物、アンチセンスRNA転写産物、総C9orf72 RNA転写産物、センスC9orf72リピート含有RNA転写産物、及び／又はアンチセンスC9orf72リピート含有RNA転写産物、の量の低減で評価されるものであって、C9orf72遺伝子が転写されており、またC9orf72遺伝子の発現が阻害されるように処理されている第1の細胞又は細胞の群から単離することができるか、又はそれらにおいて検出することができる、該C9orf72 RNA、例えば、センスRNA転写産物、アンチセンスRNA転写産物、総C9orf72 RNA転写産物、センスC9orf72リピート含有RNA転写産物、及び／又はアンチセンスC9orf72リピート含有RNA転写産物、の量が、第1の細胞又は細胞の群と実質的に同一だが第1の細胞又は細胞の群のように処理されていない第2の細胞又は細胞の群（対照細胞）と比較して、減少していることによって評価される。阻害の程度は、以下によって表すことができる：

10

【数1】

$$\frac{(\text{対照細胞中の RNA}) - (\text{処理した細胞中の RNA})}{\text{対照細胞中の RNA}} \times 100\%$$

【0357】

20

dsRNAなどの「細胞をRNAi剤と接触させること」という語句は、本明細書において使用する場合、任意の可能な手段によって細胞を接触させることを含む。細胞をRNAi剤と接触させることは、細胞をインビトロでRNAi剤と接触させること又は細胞をインビボでRNAi剤と接触させることを含む。接触させることは、直接的に行われても、間接的に行われてもよい。このため、例えば、RNAi剤は、方法を個別に実施することによって、細胞と物理的に接触させ得るか、あるいはRNAi剤は、その後に細胞と接触することを可能にし得る又は引き起こし得るような状況に置かれてもよい。

【0358】

細胞をインビトロで接触させることは、例えば、細胞をRNAi剤とともにインキュベートすることによって行われてもよい。細胞をインビボで接触させることは、例えば、RNAi剤を細胞が位置している組織中若しくはその近傍に注入することによって、又は別の領域に、例えば中枢神経系（CNS）に、任意選択で髄腔内注入、硝子体内注入、若しくは他の注入によって、RNAi剤を注入することによって、又は薬剤がその後に接触対象の細胞が位置している組織に到達することとなるように、血流若しくは皮下腔にRNAi剤を注入することによって、行われてもよい。例えば、RNAi剤は、目的の部位に、例えばCNSにおいてRNAi剤を向かわせるか又はそうでなければ安定化するリガンド、例えば、下記において説明され、例えば参照により本明細書に組み込まれるPCT/US2019/031170号において更に詳述されるような親油性部分、を含んでも、それにカップリングされてもよい。インビトロ及びインビボでの接触方法の組み合わせもまた可能である。例えば、細胞をインビトロにおいてRNAi剤と接触させて、その後に対象に移してもよい。

30

40

【0359】

一実施形態では、細胞をRNAi剤と接触させることは、細胞内への取り込み又は吸収を促進又は実施することによって「導入すること」又は「RNAi剤を細胞内に送達すること」を含む。RNAi剤の吸収又は取り込みは、自発的拡散性の若しくは活性な細胞プロセスによって、又は助剤若しくはデバイスによって生じ得る。RNAi剤を細胞内に導入することは、インビトロであっても、インビボであってもよい。例えば、インビボでの導入の場合、RNAi剤は、組織部位に注入することも、全身的に投与することもできる。インビトロでの細胞内への導入としては、当技術分野で公知の方法、例えばエレクトロポレーション法及びリポフェクション法などが挙げられる。更なるアプローチは、本明細

50

書の下記において説明されるか、又は当技術分野で公知である。

【0360】

「脂溶性」又は「親油性部分」という用語は、脂質に対して親和性を有する任意の化合物又は化学部分を広く意味する。親油性部分の親油性を特徴付ける方法の1つは、オクタノール-水分配係数 $\log K_{ow}$ によるものであり、この場合 K_{ow} は、平衡状態にある二相系のうちの水相の化学物質の濃度に対するオクタノール相の化学物質の濃度の比である。オクタノール-水分配係数は、物質の実験室測定される特性である。しかしながら、それは、第一原理又は経験的方法を使用して算出される化学物質の構成成分に起因する係数を使用することによっても予想され得る（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Tetko et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci. 41: 1407-21 (2001) を参照）。これは、水よりもむしろ非水性又は油性環境を好む物質の傾向の熱力学的尺度（すなわち、その親水性／親油性バランス）をもたらす。原則として、化学物質は、その $\log K_{ow}$ が0を超える場合、性質が親油性である。典型的には、親油性部分は、 $\log K_{ow}$ が、1を超える、1.5を超える、2を超える、3を超える、4を超える、5を超える、又は10を超える。例えば、6-アミノヘキサノールの $\log K_{ow}$ は、例えば、およそ0.7であると予測される。同じ方法を使用することにより、N-（ヘキサン-6-オール）カルバミン酸コレステリルの $\log K_{ow}$ は、10.7であると予測される。

10

【0361】

分子の親油性は、分子が有する官能基に応じて変化し得る。例えば、親油性部分の末端にヒドロキシル基又はアミン基を付加することにより、親油性部分の分配係数（例えば、 $\log K_{ow}$ ）の値が増加又は減少し得る。

20

【0362】

あるいは、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされた二本鎖RNAi剤の疎水性は、そのタンパク質結合特性によって測定することができる。例えば、ある特定の実施形態では、二本鎖RNAi剤の血漿タンパク質結合アッセイの非結合画分が、二本鎖RNAi剤の相対的疎水性に対して正に相関することを判定することとなれば、それは次いで二本鎖RNAi剤のサイレンシング活性に対して正に相関することとなる。

【0363】

一実施形態では、判定される血漿タンパク質結合アッセイは、ヒト血清アルブミンタンパク質を使用する電気泳動移動度シフトアッセイ（EMSA）である。この結合アッセイの例示的プロトコルは、例えば、PCT/US2019/031170号において詳細に説明される。結合アッセイにおけるsiRNAの非結合画分によって測定される二本鎖RNAi剤の疎水性は、増強されたsiRNAのインビボでの送達の場合では、0.15を超える、0.2を超える、0.25を超える、0.3を超える、0.35を超える、0.4を超える、0.45を超える、又は0.5を超える。

30

【0364】

したがって、親油性部分を二本鎖RNAi剤の内部位置にコンジュゲートすることにより、siRNAにおける増強されたインビボでの送達のために最適の疎水性がもたらされる。いくつかの実施形態では、親油性部分は、神経細胞、又は神経組織中の細胞、又は中枢神経系組織中の細胞へのRNAi剤の送達を促進又は改善する。

40

【0365】

「脂質ナノ粒子」又は「LNP」という用語は、薬学的に活性な分子を、例えば核酸分子、例えば、RNAi剤又はRNAi剤の転写元のプラスミドなどを、封入する脂質層を含むベシクルである。LNPは、例えば米国特許第6,858,225号、第6,815,432号、第8,158,601号、及び第8,058,069号に記載されており、それらの内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0366】

本明細書において使用する場合、「対象」は、例えば哺乳動物などである動物であり、霊長類（ヒト、非ヒト霊長類、例えば、サル及びチンパンジーなど）又は非霊長類（ラッ

50

ト又はマウスなど)が含まれる。好ましい実施形態では、対象は、ヒト、例えば、本明細書に記載されるように、標的C9orf72 RNAのレベルの低減から利益を受け得る疾患、障害、若しくは状態について治療若しくは評価されているヒト；標的C9orf72 RNAのレベルの低減から利益を受け得る疾患、障害、若しくは状態のリスクを有するヒト；C9orf72発現の低減から利益を受け得る疾患、障害、若しくは状態を有するヒト；又はC9orf72発現の低減から利益を受け得る疾患、障害、若しくは状態について治療されているヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、女性であるヒトである。他の実施形態では、対象は、男性であるヒトである。一実施形態では、対象は、成人である対象である。一実施形態では、対象は、小児である対象である。別の実施形態では、対象は、年少者である対象、すなわち、20歳未満の対象である。

10

【0367】

本明細書において使用する場合、「治療すること」又は「治療」という用語は、有益な又は所望の転帰、例えば、限定されるものではないが、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長転写産物又はそのジペプチドリピート産物と関連付けられる1つ以上の兆候又は症状、例えば、C9orf72関連疾患などのC9orf72関連疾患の緩和又は改善を指す。「治療」はまた、治療が行われない場合に予測される生存時間と比較して、生存時間を延ばすことも意味し得る。

【0368】

対象におけるC9orf72のレベル又は疾患マーカー又は症状の文脈での用語「低下させる(lower)」は、そのようなレベルの統計的に有意な減少を意味する。減少は、例えば、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又はそれ以上であり得る。ある特定の実施形態では、減少は、少なくとも20%である。ある特定の実施形態では、減少は、疾患マーカー、例えば、センス若しくはアンチセンス含有巢のレベル及び／又は異常なジペプチドリピートタンパク質のレベルにおける、少なくとも50%、例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又はそれ以上の減少である。いくつかの実施形態では、減少は、C9orf72タンパク質及び／又はC9orf72 mRNAレベルについては、50%以下、例えば、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、又は5%以下である。対象におけるC9orf72のレベルの文脈で「低下させる」は、好ましくは、こうした障害のない個体に関して正常な範囲内として受け入れられるレベルまで下げることである。ある特定の実施形態では、「低下させる」は、疾患を患っている対象におけるマーカー又は症状のレベルと、個体が正常な範囲内で受け入れられるレベルとの間の差の減少、例えば、肥満である個体と正常な範囲内に受容される体重の個体との間での体重の減少のレベルである。

20

30

【0369】

本明細書において使用する場合、「予防」又は「予防すること」は、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長又はそのジペプチド産物の発現の低減から利益を受け得る疾患、障害、又はその状態に関して使用する場合、対象が、そのような疾患、障害、又は状態と関連付けられる症状、例えば、C9orf72関連疾患の症状を発症することとなる可能性が低減することを指す。疾患、障害、若しくは状態を発症しないこと、又はそのような疾患、障害、若しくは状態と関連付けられる症状の発症の低減(例えば、その疾患又は障害に対して臨床的に受け入れられる規模の少なくとも約10%の低減)、又は遅延された症状の提示の遅延(例えば、数日、数週間、数か月、又は数年の遅延)が、有効な予防とみなされる。

40

【0370】

本明細書において使用する場合、「C9orf72関連疾患」又は「C9orf72関連障害」という用語は、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長転写産物の発現及び／又は活性の低減から利益を受け得るあらゆる疾患又は障害を含む。例示的なC9orf72関連疾患としては、対象がC9orf72遺伝子のエクソン1aと1bとの間の

50

イントロン中にヘキサヌクレオチドリピート（G G G C C）伸長を保有する疾患、例えば、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、例えば、C 9 o r f 7 2 拡張に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、又はアルツハイマー病が挙げられる。

【0371】

正常なG 4 C 2リピートは、約25単位以下であり、高い浸透性の疾患対立遺伝子は、典型的には、約60リピート単位よりも大きく、最大4,000単位超の範囲であり、まれに、47～60のリピートは、家族内の疾患で分離する。リピートプライミングされたPCRアッセイは、典型的には、より小さな伸長（80未満）を検出するために使用されるが、より大きなリピートを正確にサイズ設定するには、長さの推定を提供する他の技法（例えば、サザンブロットハイブリダイゼーション）が必要である。

10

【0372】

C 9 o r f 7 2 遺伝子のイントロン中にG G G G C C（又はG 4 C 2）ヘキサヌクレオチド伸長を有する対象は、同じ家族であっても筋萎縮性側索硬化症（A L S）又は前頭側頭型認知症（F T D）として顕出し得るため、この伸長と関連付けられる神経変性は、本明細書では「C 9 o r f 7 2 筋萎縮性側索硬化症／前頭側頭型認知症」又は「C 9 o r f 7 2 A L S／F T D」と称する。これは、常染色体優性疾患であり、A L Sファミリーの3分の1及び臨床A L Sにおける散发性症例の5～10%を占める家族性A L Sの最も一般的な形態である。これはまた、F T Dの一般的な原因であり、家族性F T Dの約4分の1を説明する。症状発症年齢は30～70歳の範囲であり、平均的な発症は50代後半である。C 9 o r f 7 2 媒介性A L Sは、多くの場合、典型的なA L Sに類似しており、延髄又は四肢での発症であり得、急速に進行し得（必ずしもそうではないが）、後の認知症状と関連付けられ得る。このため、C 9 o r f 7 2 媒介性A L Sは、あらゆるA L S患者と同様に評価され、治療される。C 9 o r f 7 2 媒介性F T Dのパターンは、最も一般的には行動バリエーションF T Dであり、脱抑制、無気力、及び実行機能障害を含む、全範囲の行動症状及び認知症状を伴う。あまり一般的ではないが、C 9 o r f 7 2 媒介性F T Dは、セマンティックバリエーション原発性進行性失語症（P P A）又は非流沫性バリエーションP P Aを呈し、非常にまれに、皮質基底核症候群、進行性核上性麻痺、又はH D様症候群に類似し得る。パーキンソン病の特徴がC 9 o r f 7 2 媒介性A L S又はF T Dに見られるときもある。

20

30

【0373】

対象は、行動、実行機能不全、及び／又は言語障害の進行性的変化を特徴とする前頭側頭葉変性（F T L D）を呈し得る。3つのF T L D臨床症候群のうち、行動バリエーションF T D（b v F T D）が最も頻繁に存在するが、独占的なものではない。これは、進行性行動障害、及び脳MRI上の優勢な前頭葉萎縮を伴う実行機能の低下を特徴とする。完全なA L S表現型の基準を満たす場合も満たさない場合もある、上位運動ニューロン機能不全又は下位運動ニューロン機能不全（又はその両方）を含む運動ニューロン疾患も存在し得る。C 9 o r f 7 2 関連b v F T Dを有する多くの個体に存在するある程度のパーキンソニズムは、典型的には、振戦を伴わない運動硬直型であり、レボドパに応答しない。

【0374】

40

ハンチントン病様症候群（H D様症候群、又はH D L症候群）は、典型的には、舞踏病、認知機能低下又は認知症、及び行動障害又は精神障害の組み合わせを生むという点で、ハンチントン病（H D）に非常に似ている遺伝性神経変性疾患のファミリーである。

【0375】

C 9 o r f 7 2 伸長に起因するハンチントン病様症候群を有する対象は、ジストニア、舞踏病、ミオクロヌス、振戦、及び硬直を含む運動障害を有することを特徴とする。関連する特徴はまた、認知及び記憶障害、早期精神障害、並びに行動障害である。発症時の平均年齢は約43歳（8～60の範囲）である。早期の精神及び行動障害（鬱病、無気力、強迫行動、及び精神病を含む）が一般的である。認知症状は、実行機能障害として顕出する。運動障害は顕著である。パーキンソン病の特徴及び錐体の特徴も顕出し得る。「治

50

療有効量」は、本明細書において使用する場合、C9orf72関連疾患を有する対象に投与されたときに、（例えば、既存の疾患又は疾患の1つ以上の症状を減少、改善、又は維持することによって）疾患の治療を行うのに十分なRNAi剤の量を含むことが意図される。「治療有効量」は、RNAi剤、該剤の投与方法、疾患及びその重症度及び病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、ある場合には先行する又は併用する治療の種類、並びに治療しようとする対象の他の個人的特徴、に応じて変動し得る。

【0376】

「予防有効量」は、本明細書において使用する場合、C9orf72関連障害を有する対象に投与されたときに、疾患又は疾患の1つ以上の症状を予防又は改善するのに十分である、RNAi剤の量を含むことが意図される。疾患の改善は、疾患の経過を鈍化させること、又はこれから発症する疾患の重症度を低減させることを含む。「予防的有効量」は、RNAi剤、当該剤の投与方法、疾患のリスクの程度、及び病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、ある場合には先行する又は併用する治療の種類、並びに治療しようとする患者の他の個人的特徴、に応じて変動し得る。

10

【0377】

「治療有効量」又は「予防有効量」は、任意の処置に適用可能な合理的なベネフィット／リスク比においていくつかの所望の局所的又は全身的效果を生じるRNAi剤の量も包含する。本開示の方法において用いられるRNAi剤は、そのような処置に適用可能な合理的なベネフィット／リスク比を生じるのに十分な量で投与され得る。

【0378】

「薬学的に許容される」という用語は、本明細書において、過度の毒性、刺激、アレ르기ー反応、又は他の問題若しくは合併症なしに、合理的なベネフィット／リスク比に見合う、健全な医学的判断の範囲内でのヒト対象及び動物対象の組織との接触での使用に好適であるそれら化合物、材料（塩類を含む）、組成物又は剤形を指すために用いる。

20

【0379】

「薬学的に許容される担体」という語句は、本明細書において使用する場合、1つの臓器又は身体の部分から、別の臓器又は身体の部分への主題化合物の運搬又は輸送に関与する、薬学的に許容される材料、組成物、又はビヒクルであって、例えば液体若しくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（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若しくはステアリン酸亜鉛、又はステアリン酸）、又は溶媒封入材料など、を意味する。各担体は、製剤の他の原材料に対して適合性であり、かつ治療される対象に対して有害であってはならないという意味において「許容可能」であるものでなければならない。薬学的に許容される担体として役立ち得る材料のいくつかの例には、以下が含まれる：（1）糖類、例えば乳糖、グルコース及びショ糖など、（2）デンプン、例えばトウモロコシデンプン及びジャガイモデンプンなど、（3）セルロース、及びその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロースなど、（4）トラガカント末、（5）モルト、（6）ゼラチン、（7）潤滑剤、例えばマグネシウムステート（magnesium stearate）、ラウリル硫酸ナトリウム及びタルクなど、（8）賦形剤、例えばココアバター及び座薬ワックスなど、（9）オイル、例えばピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブオイル、トウモロコシ油及び大豆油など、（10）グリコール、例えばプロピレングリコールなど、（11）ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコールなど、（12）エステル、例えばオレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなど、（13）寒天、（14）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなど、（15）アルギニン酸、（16）発熱因子なしの水、（17）等張生理食塩水、（18）リンゲル溶液、（19）エチルアルコール、（20）pH緩衝溶液、（21）ポリエステル、ポリカーボネート、又はポリ酸無水物、（22）充填剤、例えばポリペプチド、及びアミノ酸など、（23）血清成分、例えば血清アルブミン、HDL及びLDLなど、並びに（22）医薬品製剤に採用される他の非毒性の適合性物質。

30

40

【0380】

50

「試料」という用語は、本明細書において使用する場合、対象から単離された同様の体液、細胞、又は組織、及び対象内に存在する体液、細胞、又は組織の採取物を包含する。生体液の例としては、血液、血清、及び漿液、血漿、髄液、眼液、リンパ液、尿、唾液などが挙げられる。組織試料は、組織、臓器、又は局所領域からの試料を含んでもよい。例えば、試料は、特定の臓器、臓器の部分、又はそれら臓器内の体液若しくは細胞に由来するものであってもよい。ある特定の実施形態では、試料は、脳（例えば全脳若しくは脳の特定のセグメント、例えば線条体、又は脳内の特定の型の細胞、例えばニューロン及びグリア細胞（星状細胞、乏突起膠細胞、小グリア細胞））から得られてもよい。いくつかの実施形態では、「対象から得られた試料」は、対象から得られた血液又はそれらから得られた血漿若しくは血清を指す。更なる実施形態では、「対象から得られた試料」は、対象から得られた脳組織（又はその副成分）又は網膜組織（又はその副成分）を指す。

10

【0381】

II. 本開示のRNAi剤

本明細書の他の箇所に記載するように、C9orf72の変異は、家族性前頭側頭型認知症（FTD）及び筋萎縮性側索硬化症（ALS）と関連している。これらの変異は、C9orf72遺伝子のエクソン1Aとエクソン1Bとの間のイントロン内に位置するG4C2（配列番号1）ヘキサヌクレオチドリピートの伸長の結果である。ヘキサヌクレオチドリピートは、非AUGによる始動ではない機序をとおして翻訳されてもよい。リピート伸長含有RNA（標的RNA）の蓄積、又はリピート配列の翻訳は、FTD及び／若しくはALS、又はFTD及び／若しくはALSと関連付けられる疾患症状を引き起こすか、又はそれに寄与し得る。

20

【0382】

したがって、本発明は、ヘキサヌクレオチドリピート伸長と関連付けられるC9orf72関連発現産物、RNA及び／又は翻訳ポリペプチドの発現を選択的かつ効率的に減少させるdsRNA剤を提供する。いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、ヘキサヌクレオチドリピート含有RNA（標的RNA）を標的とし（例えば、選択的に標的とし）、ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAから発現される標的RNA及びポリペプチドをノックダウンする。dsRNA剤は、ニューロンにおけるリピート関連非AUG（AUG）翻訳から生じる、RNA巢のリピート長依存性の形成、特定のRNA結合タンパク質の分画、並びにジペプチドリピータンパク質（例えば、ポリ（グリシンーアラニン）、ポリ（グリシンープロリン）、ポリ（グリシンーアルギニン）、ポリ（アラニンープロリン）、及びポリ（プロリンーアルギニン））の蓄積及び凝集を含むがこれらに限定されない、FTD及び／又はALSと関連付けられる徴候又は症状の治療処置及び／又は予防のための方法において使用されてもよい。dsRNA剤は、運動ニューロン疾患の兆候及び症状、並びに認知症の兆候及び症状を含むがこれらに限定されない、FTD及び／又はALSと関連付けられる兆候又は症状の治療処置及び／又は予防のための方法に使用されてもよい。運動ニューロン疾患の徴候及び症状には、例えば、つまずき、物を落とすこと、腕及び／又は脚の異常な疲労、不明瞭な発話、筋肉の痙攣及び引きつり、笑うこと又は泣くことを制御できない期間、並びに呼吸困難が含まれ得る。認知症の徴候及び症状には、例えば、行動変化、性格変化、発話及び言語の障害、並びに運動関連障害が含まれ得る。このような方法には、対象（例えば、ヒト又は動物対象）に本明細書に記載の1つ以上のdsRNA剤を投与することが含まれる。

30

40

【0383】

本明細書に記載されるdsRNA剤は、リピート含有C9orf72 RNAの蓄積（例えば、RNA巢としてアッセイされる）を停止又は低減させ、それによってRNA翻訳によるジペプチドリピータンパク質の合成を防止し得る。

【0384】

いくつかの実施形態では、本発明のdsRNA剤は、成熟C9orf72 mRNA（すなわち、イントロンがスプライシングアウトされたmRNA）を標的とする。他の実施形態では、本発明のdsRNA剤は、イントロン1Aなどのイントロンを含むC9orf

50

72 RNA（すなわち、イントロンがスプライシングアウトされていないセンスRNA又はアンチセンスRNA、前駆体mRNAからスプライシングアウトされたRNA領域、又は代替的にスプライシングされたRNA）を標的とする。

【0385】

dsRNAは、二本のRNA鎖を含み、それらは、相補的であり、またdsRNAが使用されることとなる条件下においてハイブリダイズして二本鎖構造を形成する。いくつかの実施形態では、dsRNAの一方の鎖（アンチセンス鎖）は、標的配列に対して、実質的に相補的であり、概して完全に相補的である、相補性領域を含む。標的配列は、C9orf72遺伝子の発現の際に形成されたRNAの配列から得ることができる。もう一方の鎖（センス鎖）は、アンチセンス鎖に対して相補的である領域を含むため、これら二本の鎖は、好適な条件下で組み合わせられた場合に、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成する。いくつかの実施形態では、dsRNAの一方の鎖（センス鎖）は、C9orf72遺伝子の発現の際に形成されたRNAのアンチセンス配列から得られる標的配列に対して、実質的に相補的であり、概して完全に相補的である、相補性領域を含む。もう一方の鎖（アンチセンス鎖）は、センス鎖に対して相補的である領域を含むため、これら二本の鎖は、好適な条件下で組み合わせられた場合に、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成する。本明細書の他の箇所で説明し、また当技術分野で既知であるように、dsRNAの相補配列はまた、別個のオリゴヌクレオチド上において相対するように、単一の核酸分子の自己相補領域として含めることもできる。

【0386】

概して、二本鎖構造は、15～30個の塩基対の長さ、例えば、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は21～22個の塩基対の長さである。ある特定の好ましい実施形態では、二本鎖構造は、18～25個の塩基対の長さ、例えば、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～25、21～24、21～23、21～22、22～25、22～24、22～23、23～25、23～24、又は24～25個の塩基対の長さであり、例えば19～21個の塩基対の長さである。上に列記した範囲及び長さの間に存在する範囲及び長さもまた、本開示の一部であることを意図している。

【0387】

同様に、標的配列に対する相補性の領域は、15～30個のヌクレオチドの長さ、例えば、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は21～22個のヌクレオチドの長さであり、例えば、19～23個のヌクレオチドの長さ、又は21～23個のヌクレオチドの長さである。上に列記した範囲及び長さの間に存在する範囲及び長さもまた、本開示の一部であることを意図している。

【0388】

いくつかの実施形態では、二本鎖構造は、19～30個の塩基対の長さである。同様に、標的配列に対する相補性領域は、19～30個のヌクレオチドの長さである。

【0389】

いくつかの実施形態では、dsRNAは、15～23個のヌクレオチドの長さ、19～23個のヌクレオチドの長さ、又は25～30個のヌクレオチドの長さである。概して、dsRNAは、Dicer酵素のための基質として機能するのに十分に長い。例えば、約21～23個のヌクレオチドより長いdsRNAが、Dicerのための基質として機能し得ることは、当技術分野において周知である。当業者も認識することとなるように、切断のために標的とされるRNAの領域は、ほとんどの場合、より長いRNA分子の一部、多くの場合mRNA分子となることとなる。関連する場合、mRNA標的の「一部」は、RNAi依存性切断（すなわち、RISC経路を経る切断）のための基質となることを可能にさせるのに十分な長さのmRNA標的の連続する配列である。

10

【0390】

当業者であれば、二本鎖領域がdsRNAの一次機能部分、例えば、約15～36個の塩基対、例えば、15～36、15～35、15～34、15～33、15～32、15～31、15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は21～22個の塩基対、例えば19～21個の塩基対の二本鎖領域であることも認識することになる。すなわち、一実施形態では、切断のために所望のRNAを標的とする例えば、15～30個の塩基対の機能性二本鎖へとプロセッシングされる限り、30個超の塩基対の二本鎖領域を有するRNA分子又はRNA分子の複合体は、dsRNAである。したがって、当業者は、一実施形態では、miRNAがdsRNAであることを認識することになる。別の実施形態では、dsRNAは、天然に生じるmiRNAではない。別の実施形態では、C9orf72発現を標的とするのに有用なRNAi剤は、より大きなdsRNAの切断によって標的細胞内で生成されない。

20

30

【0391】

本明細書において説明されるdsRNAは、例えば、1、2、3、又は4個のヌクレオチドの、1つ以上の一本鎖ヌクレオチドオーバーハングを更に含むことができる。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシヌクレオチド／ヌクレオシドなどであるヌクレオチド／ヌクレオシド類似体を含むことも、それらからなることもできる。オーバーハングは、センス鎖上にあることも、アンチセンス鎖上にあることも、それらのいずれかの組み合わせの上にあることもできる。更に、あるオーバーハングのヌクレオチドは、dsRNAのアンチセンス鎖又はセンス鎖のいずれかの5'末端、3'末端、又は両末端上に存在することができ

40

【0392】

dsRNAは、当技術分野で既知の標準的な方法で合成することができる。本発明の二本鎖RNAi化合物は、二段階手法を使用して調製され得る。最初に、二本鎖RNA分子の個々の鎖が、別個に調製される。次いで、当該構成要素の鎖がアニーリングされる。siRNA化合物の個々の鎖は、溶液相又は固相の有機合成又はその両方を使用して調製することができる。有機合成は、非天然のヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド鎖を容易に調製することができるという利点を提供する。同様に、本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、溶液相又は固相の有機合成又はその両方を使用して調製することができる。

50

【0393】

合成方法に関係なく、s i R N A 調製物は、剤形に適切な溶液（例えば、水溶液又は有機溶液）中で調製することができる。例えば、s i R N A 調製物は、沈殿させ、純粋な再蒸留水中に再溶解させ、凍結乾燥させることができる。次いで、乾燥させた s i R N A を、意図される製剤化プロセスに適切な溶液中に再懸濁させることができる。

【0394】

ある特定の実施形態では、本発明の d s R N A 剤は、複数の連続コピーを含むヘキサヌクレオチドリピートを含む C 9 o r f 7 2 標的 R N A、例えば、病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長を伴う（例えば、ヘキサヌクレオチドリピートの少なくとも約 30、少なくとも約 35、少なくとも約 40、少なくとも約 50、少なくとも約 60、少なくとも約 70、少なくとも約 80、少なくとも約 100、少なくとも約 200、少なくとも約 300、少なくとも約 400、又は少なくとも約 500 コピーを有する）C 9 o r f 7 2 標的 R N A を標的とする。

【0395】

一態様では、本開示の d s R N A は、少なくとも 2 つのヌクレオチド配列、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む。C 9 o r f 7 2 のためのセンス鎖配列は、表 2、3、5、6、8、9、10 A、10 B、10 C、10 D、11、及び 12 のうちのいずれか 1 つに提供される配列の群から選択されてもよく、またこのセンス鎖のアンチセンス鎖の対応するヌクレオチド配列は、表 2、3、5、6、8、9、10 A、10 B、10 C、10 D、11、及び 12 のうちのいずれか 1 つの配列の群から選択されてもよい。この態様では、2 つの配列の一方は、2 つの配列の他方に対して相補的であり、配列の一方は、C 9 o r f 7 2 遺伝子座の発現の際に生じた R N A の配列に対して実質的に相補的である。このように、この態様では、d s R N A は、2 つのオリゴヌクレオチドを含むこととなるが、1 つのオリゴヌクレオチドは、表 2、3、5、6、8、9 10 A、10 B、10 C、10 D、11、及び 12 のうちのいずれか 1 つにあるセンス鎖（パッセンジャー鎖）として記載され、第 2 のオリゴヌクレオチドは、表 2、3、5、6、8、9、10 A、10 B、10 C、10 D、11、及び 12 のうちのいずれか 1 つにあるセンス鎖の対応するアンチセンス鎖（ガイド鎖）として記載される。

【0396】

一実施形態では、d s R N A の実質的に相補的な配列は、別個のオリゴヌクレオチド上に含まれる。別の実施形態では、d s R N A の実質的に相補的な配列は、単一のオリゴヌクレオチド上に含まれる。

【0397】

表 2 及び 5 にある配列は、修飾された配列又はコンジュゲートされた配列として記載されているが、本開示の R N A i 剤の R N A、例えば、本開示の d s R N A は、表 2、3、5、6、8、9、10 A、10 B、10 C、10 D、11、及び 12 のうちのいずれか 1 つに示される配列のうちのうちのいずれか 1 つを含んでもよく、それらは、修飾されていない、コンジュゲートされていない、又は本明細書に記載されるものとは異なるように修飾若しくはコンジュゲートされたものであることが理解される。

【0398】

当業者は、約 20～23 塩基対、例えば、21 塩基対の二本鎖構造を有する d s R N A が、R N A 干渉を導入する際に特に有効であるとして歓迎されてきたことを十分に意識している（E l b a s h i r e t a l . , (2 0 0 1) E M B O J . , 2 0 : 6 8 7 7 - 6 8 8 8）。しかしながら、他の者らは、それよりも短い又は長い R N A 二本鎖構造も有効であり得ることを発見した（C h u a n d R a n a (2 0 0 7) R N A 1 4 : 1 7 1 4 - 1 7 1 9、K i m e t a l . (2 0 0 5) N a t B i o t e c h 2 3 : 2 2 2 - 2 2 6）。上記に記載した実施形態では、本明細書において提供するオリゴヌクレオチド配列の性質により、本明細書に記載する d s R N A が、最小で 21 ヌクレオチドの長さである少なくとも 1 つの鎖を含むことができる。一方の末端又は両末端におけるいくつかのヌクレオチドだけを差し引いたより短い二本鎖は、上記に記載した d s R N

Aと比較して、同様に有効であり得ることは、合理的に予測することができる。したがって、本明細書において提供する配列のうちの1つから得られる少なくとも15、16、17、18、19、20、又はそれ以上の連続するヌクレオチドの配列を有し、例えばBe(2)c細胞及び10nM濃度のRNA剤によるインビトロアッセイ並びに本明細書の実施例において提供されるPCRアッセイを使用して、完全配列を含むdsRNAから10、15、20、25、又は30%以下の阻害によってC9orf72遺伝子の発現を阻害するそれらの能力が異なるものであるdsRNAは、本開示の範囲内であることを意図する。

【0399】

加えて、本明細書に記載するRNAは、RISC媒介切断を受けやすいC9orf72転写産物内の部位を特定する。そのため、本開示は、この部位の範囲内を標的とするRNAi剤を更に取り上げる。本明細書において使用する場合、RNAi剤が特定の部位内のいずれかにおける転写産物の切断を促進する場合、該RNAi剤は、RNA転写産物の特定の部位の範囲内を標的としていると言う。このようなRNAi剤は、概して、C9orf72遺伝子内の選択された配列に隣接する領域から取られた追加的なヌクレオチド配列に結合した本明細書において提供される配列のうちの1つから、少なくとも約15個の連続するヌクレオチド、好ましくは少なくとも19個のヌクレオチド、を含むこととなる。

【0400】

本明細書に開示されるdsRNA剤は、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの発現を阻害する。発現を阻害することには、いずれの阻害のレベル（例えば、発現の部分的阻害）も含まれる。例えば、dsRNA剤により、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの発現が、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%、又は少なくとも約90%（又はC9orf72標的RNAが検出不能であるところまで）阻害されてもよい。例えば、これらの阻害のレベルは、ヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAを発現する細胞への投与後24～48時間以内であり得る。減少は、例えば、dsRNA剤で処理する前の細胞と比べたもの、又はdsRNA剤で処理しなかった対照細胞と比べたものであり得る。

【0401】

本明細書に開示されるdsRNA剤は、成熟C9orf72メッセンジャーRNAの発現と比べて、選択的に、イントロンヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAのレベルを低減させる又はその発現を阻害する。この背景における成熟C9orf72メッセンジャーRNAは、スプライシング及びプロセシングされたC9orf72RNA転写産物である。成熟C9orf72メッセンジャーRNAは、エクソンのみからなり、全てのイントロンが除去されている。dsRNA剤は、C9orf72標的RNAの発現の相対的減少が、C9orf72標的RNAを発現する細胞へのdsRNA剤の投与後の成熟C9orf72メッセンジャーRNAの発現の相対的減少よりも大きい場合に、成熟C9orf72メッセンジャーRNAの発現と比べて、イントロンヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの発現を選択的に阻害し得る。例えば、dsRNA剤は、成熟C9orf72メッセンジャーRNAの発現を、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、又は約5%未満阻害してもよい（又は例えば、発現に対して統計的に有意若しくは機能的に有意な効果を一切有しない）。例えば、これらの阻害のレベルは、成熟C9orf72メッセンジャーRNAを発現する細胞への投与後24～48時間以内であり得る。

【0402】

本明細書に開示されるdsRNA剤はまた、例えば、細胞におけるジペプチドリピートタンパク質合成又はジペプチドリピートタンパク質レベルを（例えば、細胞への投与後24～48時間以内に）低減することができる。例えば、dsRNA剤により、ジペプチドリピートタンパク質合成又はジペプチドリピートタンパク質レベルが、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%、又は少なくとも約90%低減されてもよい。減少は、例えば、dsRNA剤で処理する前の細胞と比べたもの、又はdsRNA剤で処理しなかった対照細胞と比べたものであり得る。

【0403】

本発明の特定の態様によれば、iRNA剤は、標的RNAの任意の特定された部分（例えば、特定のエクソン）を含む、本明細書に記載の標的RNAのうちのいずれかのホットスポット領域を標的とするように設計されてもよい。本明細書で使用される場合、ホットスポット領域は、RNAi剤を使用した標的化が、同じ標的RNAの他の領域の標的化と比較して、有効なサイレンシングを明らかにより高い可能性で提供する、標的RNA配列の約19~200、19~150、19~100、19~75、19~50、21~200、21~150、21~100、21~75、21~50、50~200、50~150、50~100、50~75、75~200、75~150、75~100、100~200、又は100~150個のヌクレオチド領域を指してもよい。本発明のある特定の態様によれば、ホットスポット領域は、標的RNAの限定された領域、場合によっては、例えば、標的RNAの長さの半分未満、例えば、標的RNAの長さの約5%、10%、15%、20%、25%、又は30%などを含む、標的の実質的に限定された領域を含んでもよい。逆に、ホットスポットが比較される他の領域は、標的RNAの長さの少なくとも過半を累積的に含んでもよい。例えば、他の領域は、標的RNAの長さの少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約95%を累積的に含んでもよい。

【0404】

標的RNAの比較領域は、インビトロ又はインビボスクリーニングアッセイから得られた有効性データを使用してホットスポットの特定について経験的に評価されてもよい。例えば、標的RNAに及ぶ様々な領域を標的とするRNAi剤は、各領域に結合する有効なiRNA剤の頻度（例えば、mRNA発現又はタンパク質発現によって測定される、標的遺伝子発現が阻害される量）について比較されてもよい。概して、ホットスポットは、RNA標的の限定された領域に結合する複数の有効なRNAi剤のクラスタリングを観察することによって認識され得る。ホットスポットは、ホットスポットとして特定される標的領域の少なくとも約60%、例えば、領域の両端を含む領域の長さの約70%、約80%、約90%、又は約95%以上（すなわち、領域の各末端のヌクレオチドを含む領域内のヌクレオチドの少なくとも約60%、70%、80%、90%、又は95%以上がiRNA剤によって標的化された）に累積的に及ぶiRNA剤の有効性を観察することによって、十分に特徴付けられ得る。本発明のいくつかの態様によれば、領域にわたる少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%の阻害（例えば、約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、又は5%以下のmRNAの残存）を示すiRNA剤が、有効なものと特定されてもよい。

【0405】

RNA領域の標的化に対する適合性はまた、定義されたサイズ（例えば、25、30、40、50、60、70、80、90、又は100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、又は200 nt）の異なる領域にわたる阻害測定値の定量的比較を使用して評価されてもよい。例えば、阻害の平均レベルは、各領域について決定されてもよく、各領域の平均を比較してもよい。ホットスポット領域内の阻害の平均レベルは、評価された全ての領域の平均より実質的に高くてもよい。いくつかの態様によれば、ホットスポット領域における阻害の平均レベルは、少なくとも約10%、20%、30%、40%、又は50%高くてもよい。いくつかの態様によれば、ホットスポット領域における阻害の平均レベルは、平均の平均よりも、少なくとも約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、又は2.0標準偏差が高くてもよい。阻害の平均レベルは、統計的に有意な（例えば、 $p < 0.05$ ）

量だけ高くてもよい。いくつかの態様によれば、ホットスポット領域内の各阻害測定値は、閾値量（例えば、残留するmRNAの閾値量以下）を超えてもよい。いくつかの態様によれば、領域内の各阻害測定値は、全ての測定された領域にわたる全ての阻害測定値の平均より実質的に高くてもよい。例えば、ホットスポット領域における各阻害測定値は、全ての阻害測定値の平均より、少なくとも約10%、20%、30%、40%、又は50%高くてもよい。いくつかの態様によれば、各阻害測定値は、全ての阻害測定値の平均より、少なくとも約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、又は2.0標準偏差が高くてもよい。各阻害測定値は、全ての阻害測定値の平均よりも統計的に有意（例えば、 $p < 0.05$ ）な量だけ高くてもよい。ホットスポットを評価するための基準は、適合する上記の標準（例えば、少なくとも約第1の量の阻害の平均レベルであり、第1の量よりも小さい第2の量の閾値レベルを下回る阻害測定値を有しない）の様々な組み合わせを含んでもよい。

10

【0406】

したがって、標的RNAのホットスポット領域を標的とする、本明細書に記載の特定の例示的なiRNA剤を含む任意のiRNA剤は、好ましくは、そのようなホットスポット領域を標的とすることが、ホットスポット領域ではない領域を標的とすることと比較して、堅牢な阻害応答を示す可能性が高いため、標的mRNAのRNA干渉を誘発するために選択され得ることが明示的に企図される。実質的に重複する（例えば、標的配列長さの少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%）、又は好ましくは完全にホットスポット領域内に存在する標的配列を標的とするRNAi剤は、ホットスポット領域を標的とするとみなされ得る。本発明のRNA標的のホットスポット領域には、本明細書の他の箇所に記載される基準のいずれかを含む有効なRNAi剤による標的化のより高い頻度が本明細書に開示されるデータにより示される、いずれの領域が含まれてもよく、これは、そのようなホットスポット領域の範囲が明示的に指定されているか否かにかかわらない。

20

【0407】

様々な実施形態では、本発明のdsRNA剤は、ホットスポット領域を標的とする。一実施形態では、ホットスポット領域は、配列番号21~47及び51~93から選択される配列のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。別の実施形態では、ホットスポット領域は、配列番号13のヌクレオチド220~256、220~266、200~290を含む。

30

【0408】

III. 本開示の修飾RNAi剤

一実施形態では、本開示のRNAi剤のヌクレオチド、例えば、dsRNAは、未修飾であり、また例えば、当技術分野で既知であり本明細書に記載する化学修飾又はコンジュゲーションを含まない。好ましい実施形態では、本開示のRNAi剤のヌクレオチド、例えば、dsRNAは、安定性又は他の有益な特徴を増強するように化学修飾される。本開示のある特定の実施形態では、本開示のRNAi剤のヌクレオチドの実質的に全てが修飾される。本開示の他の実施形態では、本開示のRNAi剤のヌクレオチドの全てが修飾される。「ヌクレオチドの実質的に全てが修飾されている」本開示のRNAi剤は、広く修飾されているが全体が修飾されているものではなく、また5、4、3、2以下、若しくは未修飾のヌクレオチドを含み得る。本開示の更に他の実施形態では、本開示のRNAi剤は、5、4、3、2、若しくは1つ以下の修飾ヌクレオチドを含み得る。

40

【0409】

本開示で取り上げられる核酸は、当技術分野で十分に確立された方法、例えば、参照により本明細書に組み込まれる「Current protocols in nucleic acid chemistry,」Beaucage, S. L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されている方法によって合成又は修飾され得る。修飾としては、例えば、末端修飾、例えば、5'末端修飾（リン酸化、コンジュゲーション、逆方向結合）又は3'

50

末端修飾（コンジュゲーション、DNAヌクレオチド、逆方向結合など）、塩基修飾、例えば、安定化塩基、不安定化塩基、若しくは伸長したレポーターのパートナーと塩基対合する塩基での置換、塩基除去（脱塩基ヌクレオチド）若しくはコンジュゲートされた塩基、糖修飾（例えば、2'位又は4'位における）若しくは糖の置換、又はホスホジエステル結合の修飾若しくは置換をはじめとする主鎖修飾が挙げられる。本明細書において記載する実施形態において有用なRNAi剤の具体例として、限定されないが、修飾骨格を含む、又は天然ヌクレオシド間連結を含まないRNAが挙げられる。修飾骨格を有するRNAとして、なかでも、骨格内にリン原子を有しないものが挙げられる。本明細書の目的上、また時には当技術分野で言及されるように、それらのヌクレオシド間骨格内にリン原子を有しない修飾RNAもまた、オリゴヌクレオシドであるとみなされ得る。いくつかの実施形態では、修飾RNAi剤は、そのヌクレオシド間骨格中にリン原子を有することとなる。

10

【0410】

修飾RNA骨格として、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むメチル及び他のアルキルのホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホロアミダート及びアミノアルキルホスホロアミダートを含むホスホロアミダート、チオノホスホロアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、並びに通常の3'-5'連結を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'連結類似体、及びヌクレオシド単位の隣接する対が連結された3'-5'と5'-3'又は2'-5'と5'-2'であるものである反転した極性を有するものが挙げられる。種々の塩、混合塩、及び遊離酸の形態も含まれる。本発明のいくつかの実施形態では、本発明のdsRNA剤は、遊離酸形態である。本発明の他の実施形態では、本発明のdsRNA剤は、塩形態である。一実施形態では、本発明のdsRNA剤は、ナトリウム塩形態である。ある特定の実施形態では、本発明のdsRNA剤がナトリウム塩形態である場合には、ナトリウムイオンが、薬剤中に存在するホスホジエステル及び／又はホスホロチオエート基の実質的に全てに対する対イオンとして薬剤中に存在する。ホスホジエステル及び／又はホスホロチオエート連結の実質的に全てがナトリウム対イオンを有する薬剤は、5、4、3、2、又は1つ以下の、ナトリウム対イオンを有しないホスホジエステル及び／又はホスホロチオエート連結を含む。いくつかの実施形態では、本発明のdsRNA剤がナトリウム塩形態である場合には、ナトリウムイオンが、薬剤中に存在するホスホジエステル及び／又はホスホロチオエート基の全てに対する対イオンとして薬剤中に存在する。

20

30

【0411】

上記リン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許には、限定されるものではないが、米国特許第3,687,808号、第4,469,863号、第4,476,301号、第5,023,243号、第5,177,195号、第5,188,897号、第5,264,423号、第5,276,019号、第5,278,302号、第5,286,717号、第5,321,131号、第5,399,676号、第5,405,939号、第5,453,496号、第5,455,233号、第5,466,677号、第5,476,925号、第5,519,126号、第5,536,821号、第5,541,316号、第5,550,111号、第5,563,253号、第5,571,799号、第5,587,361号、第5,625,050号、第6,028,188号、第6,124,445号、第6,160,109号、第6,169,170号、第6,172,209号、第6,239,265号、第6,277,603号、第6,326,199号、第6,346,614号、第6,444,423号、第6,531,590号、第6,534,639号、第6,608,035号、第6,683,167号、第6,858,715号、第6,867,294号、第6,878,805号、第7,015,315号、第7,041,816号、第7,273,933号、第7,321,029号、及び米国特許第RE39464号が挙げられ、それら各々の内容全体が参照により本明細書に組

40

50

み込まれる。

【0412】

骨格内にリン原子を含まない修飾RNA骨格は、短鎖アルキル若しくはシクロアルキルのヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子及びアルキル若しくはシクロアルキルのヌクレオシド間連結又は1つ以上の短鎖ヘテロ原子若しくは複素環のヌクレオシド間連結によって形成される骨格を有する。これらとしては、モルホリノ連結を有するもの（ヌクレオシドの糖部分から一部形成される）、シロキサ骨格、スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファメート骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、スルホネート及びスルホンアミド骨格、アミド骨格、並びにN、O、S及びCH₂の混合した構成要素部分を有する他のものが挙げられる。

10

【0413】

上記のオリゴヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許としては、限定されるものではないが、米国特許第5,034,506号、第5,166,315号、第5,185,444号、第5,214,134号、第5,216,141号、第5,235,033号、第5,64,562号、第5,264,564号、第5,405,938号、第5,434,257号、第5,466,677号、第5,470,967号、第5,489,677号、第5,541,307号、第5,561,225号、第5,596,086号、第5,602,240号、第5,608,046号、第5,610,289号、第5,618,704号、第5,623,070号、第5,663,312号、第5,633,360号、第5,677,437号、及び第5,677,439号が挙げられ、それら各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0414】

他の実施形態では、ヌクレオチド単位の糖及びヌクレオシド間連結の両方、すなわち、骨格が新規基と置き換えられている、RNAi剤において使用するために好適なRNA模倣体が考察される。この塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。このようなオリゴマー化合物の1つ、優れたハイブリダイゼーション特性を有するとわかっているRNA模倣体を、ペプチド核酸（PNA）と称する。PNA化合物においては、RNAの糖骨格は、アミド含有骨格で、特にアミノエチルグリシン骨格で置換されている。核酸塩基が、保持されて、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的又は間接的に結合される。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許として、限定されるものではないが、米国特許第5,539,082号、第5,714,331号、及び第5,719,262号が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。本開示のRNAi剤において使用するのに好適な更なるPNA化合物は、例えば、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に記載されている。

30

【0415】

本開示で取り上げるいくつかの実施形態には、ホスホロチオエート骨格をもつRNA及びヘテロ原子骨格をもつオリゴヌクレオシドが挙げられ、特に上記で参照した米国特許第5,489,677号の、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ （メチレン（メチルイミノ）又はMMI骨格として知られる）、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、及び $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ （天然のホスホジエステル骨格を $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ として表す）、及び上記で参照した米国特許第5,602,240号のアミド骨格、が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書において取り上げるRNAは、上記で参照したUS5,034,506のモルホリノ骨格構造を有する。

40

【0416】

修飾RNAはまた、1つ以上の置換された糖部分を含み得る。本明細書において取り上げるRNAi剤、例えば、dsRNAは、2'位に以下のうちの1つを含み得る：OH、

50

F、O-、S-又はN-アルキル、O-、S-又はN-アルケニル、O-、S-又はN-アルキニル、又はO-アルキル-O-アルキル（式中、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換された又は非置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキル又は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルであり得る）。例示的な好適な修飾としては、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ が挙げられ、式中、 n 及び m は、1～約10である。他の実施形態では、dsRNAは、2'位に以下のうちの1つを含む： $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換された低級アルキル、アルカリル、アラキル、O-アルカリル又はO-アラキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、干渉物質、RNAi剤の薬物動態特性を改善するための基又はRNAi剤の薬力学的特性を改善するための基、及び同様の特性を有する他の置換基。いくつかの実施形態では、修飾には、2'-メトキシエトキシ（2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-（2-メトキシエチル）又は2'-MOEとしても知られる）（Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78: 486-504）、すなわち、アルコキシ-アルコキシ基、が含まれる。別の例示的な修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、本明細書において以下の実施例において記載されるような、2'-DMAOEとしても知られる、 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエチル（当技術分野で2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は2'-DMAEOEとしても知られる）、すなわち、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂、である。更なる例示的な修飾として、5'-Me-2'-Fヌクレオチド、5'-Me-2'-OMeヌクレオチド、5'-Me-2'-デオキシヌクレオチド、（これら3つのファミリー内のR及びS異性体の両方）、2'-アルコキシアルキル、及び2'-NMA（N-メチルアセトアミド）が挙げられる。

【0417】

他の修飾として、2'-メトキシ（2'-OCH₃）、2'-アミノプロポキシ（2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂）、2'-O-ヘキサデシル、及び2'-フルオロ（2'-F）が挙げられる。同様の修飾はまた、RNAi剤のRNA上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上又は2'-5'連結dsRNA中の糖の3'位及び5'末端ヌクレオチドの5'位でも行うことができる。RNAi剤はまた、糖模倣体を有することができ、例えば、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などを有することができる。このような修飾された糖構造の調製を教示する代表的な米国特許として、限定されるものではないが、米国特許出願第4,981,957号、5,118,800号、5,319,080号、5,359,044号、5,393,878号、5,446,137号、5,466,786号、5,514,785号、5,519,134号、5,567,811号、5,576,427号、5,591,722号、5,597,909号、5,610,300号、5,627,053号、5,639,873号、5,646,265号、5,658,873号、5,670,633号、及び5,700,920号が挙げられ、これらのうちのあるものは本出願と共同所有されている。前述のものの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0418】

本開示のRNAi剤はまた、核酸塩基（当技術分野では簡単に「塩基」と称されることも多い）の修飾又は置換を含み得る。本明細書において使用する場合、「未修飾の（修飾されていない）」又は「天然の」核酸塩基として、プリン塩基のアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基のチミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）が挙げられる。修飾核酸塩基としては、他の合成核酸塩基及び天然核酸塩基が挙げられ、例えば5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他の

アルキル誘導体、アデニン及びグアニンの２-プロピル及び他のアルキル誘導体、２-チオウラシル、２-チオチミン及び２-チオシトシン、５-ハロウラシル及びシトシン、５-プロピニルウラシル及びシトシン、６-アゾウラシル、シトシン及びチミン、５-ウラシル（シュードウラシル）、４-チオウラシル、８-ハロ、８-アミノ、８-チオール、８-チオアルキル、８-ヒドロキシル及び他の８-置換のアデニン及びグアニン、５-ハロ、特に５-プロモ、５-トリフルオロメチル及び他の５-置換のウラシル及びシトシン、７-メチルグアニン及び７-メチルアデニン、８-アザグアニン及び８-アザアデニン、７-デアザグアニン及び７-ダアザアデニン（7-daazaadenine）並びに３-デアザグアニン及び３-デアザアデニンなどである。更なる核酸塩基として、米国特許第３，６８７，８０８号に開示されるもの、Modified Nucleoside in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008に開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 858~859頁, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されるもの、Englisch et al., (1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613によって開示されるもの、及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, 289~302頁, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993によって開示されるもの、が挙げられる。これら核酸塩基のうちのあるものは、本開示において取り上げるオリゴマー化合物の結合親和性を増大するのに特に有用である。これらには、５-置換ピリミジン、６-アザピリミジン及びN-2、N-6及び0~6置換のプリンが含まれ、２-アミノプロピルアデニン、５-プロピニルウラシル及び５-プロピニルシトシンが挙げられる。５-メチルシトシン置換は、核酸の二本鎖安定性を0.6~1.2℃高めることがわかっており（Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Application, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）、そして更により具体的には2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合には、模範的な塩基置換である。

10

20

30

【0419】

上記の修飾核酸塩基並びに他の修飾核酸塩基のうちの特定のものの調製を教示する代表的な米国特許としては、限定されるものではないが、上記に記載の米国特許第３，６８７，８０８号、第４，８４５，２０５号、第５，１３０，３０号、第５，１３４，０６６号、第５，１７５，２７３号、第５，３６７，０６６号、第５，４３２，２７２号、第５，４５７，１８７号、第５，４５９，２５５号、第５，４８４，９０８号、第５，５０２，１７７号、第５，５２５，７１１号、第５，５５２，５４０号、第５，５８７，４６９号、第５，５９４，１２１号、第５，５９６，０９１号、第５，６１４，６１７号、第５，６８１，９４１号、第５，７５０，６９２号、第６，０１５，８８６号、第６，１４７，２００号、第６，１６６，１９７号、第６，２２２，０２５号、第６，２３５，８８７号、第６，３８０，３６８号、第６，５２８，６４０号、第６，６３９，０６２号、第６，６１７，４３８号、第７，０４５，６１０号、第７，４２７，６７２号、及び第７，４９５，０８８号が挙げられ、それら各々の内容全体が、参照により本明細書において組み込まれる。

40

【0420】

本開示のRNA i剤は、１つ以上のロックド核酸（LNA）を含むように修飾することもできる。ロックド核酸は、リボース部分が2'及び4'炭素を接続する追加の架橋を含むものである、修飾リボース部分を有するヌクレオチドである。この構造は、3'-エンド構造立体配座内にリボースを効率的に「ロックする」。siRNAへのロック核酸の付加により、血清中でのsiRNA安定性が増大し、オフターゲット効果が低減するとわかっ

50

ている (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33 (1): 439-447、Mook, OR. et al., (2007) Mol Canc Ther 6 (3): 833-843、Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31 (12): 3185-3193)。

【0421】

本開示のRNAi剤を、1つ以上の二環式糖部分を含むように修飾することもできる。

「二環式の糖」は、二原子を架橋することによって修飾されたフラノース環である。「二環式のヌクレオシド」(「BNA」)は、糖環の2つの炭素原子を接続し、それによって二環式環系を形成する架橋を含む糖部分を有するヌクレオシドである。ある特定の実施形態では、架橋が、糖環の4'-炭素と2'-炭素とを接続する。このため、いくつかの実施形態では、本開示の薬剤は、1つ以上のロックド核酸(LNA)を含んでもよい。ロックド核酸は、リボース部分が2'及び4'炭素を接続する追加の架橋を含むものである、修飾リボース部分を有するヌクレオチドである。言い換えれば、LNAは、4'-CH₂-O-2'架橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオチドである。この構造は、3'-エンド構造立体配座内にリボースを効率的に「ロックする」。siRNAへのロック核酸の付加により、血清中でのsiRNA安定性が増大し、オフターゲット効果が低減するとわかっている (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33 (1): 439-447、Mook, OR. et al., (2007) Mol Canc Ther 6 (3): 833-843、Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31 (12): 3185-3193)。本開示のポリヌクレオチドにおいて使用するための二環式ヌクレオシドの例として、限定するものではないが、4'リボシル環原子と2'リボシル環原子との間の架橋を含むヌクレオシドが挙げられる。ある特定の実施形態では、本開示のアンチセンスポリヌクレオチド剤として、4'から2'への架橋を含む1つ以上の二環式ヌクレオシドが挙げられる。このような4'から2'架橋二環式ヌクレオシドの例として、限定するものではないが、4'-(CH₂)-O-2'(LNA)；4'-(CH₂)-S-2'；4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA)；4'-CH(CH₃)-O-2'('拘束されたエチル'又は「cEt」とも呼ばれる)及び4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(及びその類似体、例えば、米国特許第7,399,845号を参照)、4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'(及びその類似体、例えば、米国特許第8,278,283号を参照)、4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(及びその類似体、例えば、米国特許第8,278,425号を参照)、4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(例えば、米国特許公開第2004/0171570号を参照)、4'-CH₂-N(R)-O-2'であり、式中、Rは、H、C₁-C₁₂アルキル、又は保護基である(例えば、米国特許第7,427,672号参照)、4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(例えば、Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134参照)、及び4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(及びその類似体、例えば、米国特許第8,278,426号を参照)、が挙げられる。前述のものの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0422】

ロックド核酸ヌクレオチドの調製を教示する更なる代表的な米国特許及び米国特許公開として、限定するものではないが、以下：米国特許第6,268,490号、第6,525,191号、第6,670,461号、第6,770,748号、第6,794,499号、第6,998,484号、第7,053,207号、第7,034,133号、第7,084,125号、第7,399,845号、第7,427,672号、第7,569,686号、第7,741,457号、第8,022,193号、第8,030,467号、第8,278,425号、第8,278,426号、第8,278,283号、US2008/0039618、及びUS2009/0012281が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0423】

例えば α -L-リボフラノース及び β -D-リボフラノースをはじめとする1つ以上の立体化学的な糖立体配座を有する前述の二環式ヌクレオシドのいずれもが、調製可能である(WO99/14226を参照)。

【0424】

本開示のRNAi剤は、1つ以上の拘束されたエチルヌクレオチドを含むように修飾することもできる。本明細書において使用する場合、「拘束されたエチルヌクレオチド」又は「cEt」は、4'-CH(CH₃)-O-2' 架橋を含む二環式糖部分を含むロックド核酸である。一実施形態では、拘束されたエチルヌクレオチドは、S立体配座であり、本明細書において「S-cEt」と称する。

10

【0425】

本開示のRNAi剤はまた、1つ以上の「立体配座制限ヌクレオチド」(「CRN」)を含んでもよい。CRNは、リボースのC2'及びC4'炭素を、又はリボースのC3及びC5'炭素を接続するリンカーを有するヌクレオチド類似体である。CRNは、リボース環を安定な立体配座にロックして、mRNAに対するハイブリダイゼーション親和性を増大する。リンカーは、酸素を安定性及び親和性にとって最適な位置に配置するのに十分な長さのものであり、その結果、リボース環のパッカリングを少なくさせる。

【0426】

上記のCRNのある特定のものの調製を教示する代表的な刊行物として、限定するものではないが、US2013/0190383及びWO2013/036868が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0427】

いくつかの実施形態では、本開示のRNAi剤は、UNA(アンロックド核酸)ヌクレオチドである1つ以上のモノマーを含む。UNAは、アンロックド非環式核酸であり、その糖の結合のいずれもが除去されていて、アンロック「糖」残基を形成しているものである。一実施例では、UNAはまた、C1'-C4'間の結合が除去されているモノマーも包含する(すなわち、C1'炭素とC4'炭素との間の共有結合による炭素-酸素-炭素間結合)。別の実施例においては、糖のC2'-C3'結合(すなわち、C2'炭素とC3'炭素との間の共有結合による炭素-炭素間結合)が除去されている(参照により本明細書に組み込まれるNuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134(2008)及びFluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039を参照されたい)。

30

【0428】

UNAの調製を教示する代表的な米国の刊行物として、限定するものではないが、US8,314,227、並びに米国特許出願公開第2013/0096289号、第2013/0011922号、及び第2011/0313020号が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0429】

RNA分子の末端に対する安定化修飾として可能性があるものとして、N-(アセチルアミノカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-NHAc)、N-(カプロイル-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6)、N-(アセチル-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-NHAc)、チミジン-2'-O-デオキシチミジン(エーテル)、N-(アミノカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-アミノ)、2-ドコサノイル-ウリジン-3'-ホスフェート、逆方向2'-デオキシー修飾リボヌクレオチド、例えば逆方向dT(idT)及び逆方向dA(idA)など、並びに逆方向脱塩基2'-デオキシリボヌクレオチド(iAb)及び他のものなどが挙げられ得る。この修飾の開示内容は、WO2011/005861に見ることができる。

40

【0430】

一実施例では、オリゴヌクレオチドの3'末端又は5'末端は、例えば逆方向dT(idT)、逆方向dA(idA)、又は逆方向脱塩基2'-デオキシリボヌクレオチド(iA

50

b) などである逆方向 2' - デオキシ修飾リボヌクレオチドに連結される。1つの特定の例では、逆方向 2' - デオキシ修飾リボヌクレオチドは、本明細書に記載するセンス鎖の 3' 末端など、オリゴヌクレオチドの 3' 末端に連結され、ここで、この連結は、3' - 3'、ホスホジエステル連結又は 3' - 3'、ホスホロチオエート連結を介している。

【0431】

別の例では、センス鎖の 3' 末端は、3' - 3'、ホスホロチオエート連結を介して、逆方向脱塩基リボヌクレオチド (i A b) に連結される。別の例では、センス鎖の 3' 末端は、3' - 3'、ホスホロチオエート連結を介して、逆方向 d A (i d A) に連結される。

【0432】

別の例では、センス鎖の 5' 末端は、3' - 3'、ホスホロチオエート連結を介して、逆方向脱塩基リボヌクレオチド (i A b) に連結される。別の例では、センス鎖の 5' 末端は、3' - 3'、ホスホロチオエート連結を介して、逆方向 d A (i d A) に連結される。

【0433】

別の例では、センス鎖の 3' 及び 5' 末端は、3' - 3'、ホスホロチオエート連結を介して、逆方向脱塩基リボヌクレオチド (i A b) に連結される。別の例では、センス鎖の 3' 及び 5' 末端は、3' - 3'、ホスホロチオエート連結を介して、逆方向 d A (i d A) に連結される。

【0434】

1つの特定の例では、逆方向 2' - デオキシ修飾リボヌクレオチドは、本明細書に記載するセンス鎖の 3' 末端など、オリゴヌクレオチドの 3' 末端に連結され、ここで、この連結は、3' - 3'、ホスホジエステル連結又は 3' - 3'、ホスホロチオエート連結を介している。

【0435】

別の例では、センス鎖の 3' 末端ヌクレオチドは、逆方向 d A (i d A) であり、また 3' - 3' 連結 (例えば、3' - 3'、ホスホロチオエート連結) を介して先行するヌクレオチドに連結されている。

【0436】

本開示の RNA i 剤の他の修飾として、5' ホスフェート又は 5' ホスフェートミミック、例えば、RNA i 剤のアンチセンス鎖上の 5' 末端ホスフェート又はホスフェート模倣体が挙げられる。好適なホスフェート模倣体は、例えば、内容全体が参照により本明細書に組み込まれる US 2012 / 0157511 に開示されている。

【0437】

A. 本開示のモチーフを含む修飾 RNA i 剤

本開示のある特定の態様では、本開示の二本鎖 RNA i 剤は、例えば、内容全体が参照により本明細書に組み込まれる WO 2013 / 075035 において開示されるような化学修飾を有する薬剤を含む。本明細書及び WO 2013 / 075035 に示されるように、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一修飾のうちの1つ以上のモチーフを、特に切断部位において又はその近傍において、RNA i 剤のセンス鎖又はアンチセンス鎖に導入することによって、優れた結果が得られ得る。いくつかの実施形態では、RNA i 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、別様には完全に修飾されてもよい。これらモチーフの導入は、存在する場合にはセンス鎖又はアンチセンス鎖の修飾パターンを中断する。RNA i 剤は、任意選択で、例えばセンス鎖上の、親油性リガンドと、例えば、C16 リガンドとコンジュゲートしてもよい。RNA i 剤は、任意選択で、例えばアンチセンス鎖の1つ以上の残基において、(S) - グリコール核酸 (GNA) 修飾で修飾されてもよい。得られた RNA i 剤は、優れた遺伝子サイレンシング活性を示す。

【0438】

したがって、本開示は、インビボで標的遺伝子 (すなわち、C9orf72 遺伝子) の発現を阻害可能な二本鎖 RNA i 剤を提供する。この RNA i 剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む。RNA i 剤の各鎖は、長さが 15 ~ 30 ヌクレオチドであってもよい。例えば、各鎖は、長さが 16 ~ 30 ヌクレオチド、長さが 17 ~ 30 ヌクレオチド、長さ

が 25～30ヌクレオチド、長さが 27～30ヌクレオチド、長さが 17～23ヌクレオチド、長さが 17～21ヌクレオチド、長さが 17～19ヌクレオチド、長さが 19～25ヌクレオチド、長さが 19～23ヌクレオチド、長さが 19～21ヌクレオチド、長さが 21～25ヌクレオチド、又は長さが 21～23ヌクレオチドであってもよい。ある特定の実施形態では、各鎖は、長さが 19～23ヌクレオチドである。

【0439】

センス鎖及びアンチセンス鎖は、典型的には、本明細書において「RNAi剤」とも称される二重の二本鎖RNA（「dsRNA」）を形成する。RNAi剤の二本鎖領域は、長さが 15～30ヌクレオチド対であってもよい。例えば、二本鎖領域は、長さが 16～30ヌクレオチド対、長さが 17～30ヌクレオチド対、長さが 27～30ヌクレオチド対、長さが 17～23ヌクレオチド対、長さが 17～21ヌクレオチド対、長さが 17～19ヌクレオチド対、長さが 19～25ヌクレオチド対、長さが 19～23ヌクレオチド対、長さが 19～21ヌクレオチド対、長さが 21～25ヌクレオチド対、又は長さが 21～23ヌクレオチド対であってもよい。別の例では、二本鎖領域は、長さが 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、及び 27ヌクレオチドから選択される。好ましい実施形態では、二本鎖領域は、長さが 19～21ヌクレオチド対である。

【0440】

一実施形態では、RNAi剤は、一方又は両方の鎖の 3'末端、5'末端、又は両末端に 1つ以上のオーバーハング領域又はキャッピング基を含んでもよい。オーバーハングは、1～6ヌクレオチドの長さであり得、例えば 2～6ヌクレオチドの長さ、1～5ヌクレオチドの長さ、2～5ヌクレオチドの長さ、1～4ヌクレオチドの長さ、2～4ヌクレオチドの長さ、1～3ヌクレオチドの長さ、2～3ヌクレオチドの長さ、又は 1～2ヌクレオチドの長さであり得る。好ましい実施形態では、ヌクレオチドオーバーハング領域は、長さが 2ヌクレオチドである。オーバーハングは、一方の鎖がもう一方よりも長い結果、又は同一の長さの二本の鎖がねじれている結果であり得る。このオーバーハングは、標的 mRNA とミスマッチを形成し得るか、又は標的とする遺伝子配列に対して相補的であり得るか、又は別の配列であり得る。第 1 及び第 2 の鎖を、例えば、ヘアピンを形成する追加の塩基によって、又は他の非塩基リンカーによって、連結することもできる。

【0441】

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、各々独立して、修飾又は未修飾のヌクレオチドであり得、これには、限定されるものではないが 2'-糖修飾されたもの、例えば、2'-F、2'-O-メチル、チミジン（T）、及びそれらのいずれかの組み合わせが含まれる。

【0442】

例えば、TT は、いずれかの鎖上のいずれかの末端のためのオーバーハング配列であり得る。このオーバーハングは、標的 mRNA とミスマッチを形成し得るか、又は標的とする遺伝子配列に対して相補的であり得るか、又は別の配列であり得る。

【0443】

RNAi剤のセンス鎖、アンチセンス鎖、又は両鎖の 5'-又は 3'-オーバーハングは、リン酸化されてもよい。いくつかの実施形態では、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチドの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、これら 2つのヌクレオチドは、同一であっても、異なってもよい。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、又は両鎖の 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、アンチセンス鎖内に存在する。一実施形態では、この 3'-オーバーハングは、センス鎖内に存在する。

【0444】

RNAi剤は、RNAiの干渉活性を、その安定性全体に影響を及ぼすことなく強化できる単一のオーバーハングのみを含んでもよい。例えば、一本鎖オーバーハングは、センス鎖の 3'末端に、あるいはアンチセンス鎖の 3'末端に位置し得る。RNAiはまた、ア

ンチセンス鎖の 5' 末端（又はセンス鎖の 3' 末端）に位置する平滑末端を有してもよく、逆もまた同様である。概して、RNAi のアンチセンス鎖は、3' 末端に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。理論に拘束されることを望むものではないが、アンチセンス鎖の 5' 末端にある平滑末端とアンチセンス鎖の 3' 末端オーバーハングとが非対称であることが、RISC プロセスへのガイド鎖挿入に好都合である。

【0445】

一実施形態では、RNAi 剤は、長さが 19 ヌクレオチドの両端ブラントマー（bluntmer）であり、このセンス鎖は、5' 末端から 7、8、9 位の 3 つの連続するヌクレオチド上に 3 つの 2' -F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5' 末端から 11、12、13 位において 3 つの連続するヌクレオチド上に 3 つの 2' -O-メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。 10

【0446】

別の実施形態では、RNAi 剤は、長さが 20 ヌクレオチドの両端ブラントマーであり、このセンス鎖は、5' 末端から 8、9、10 位の 3 つの連続するヌクレオチド上に 3 つの 2' -F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5' 末端から 11、12、13 位において 3 つの連続するヌクレオチド上に 3 つの 2' -O-メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。

【0447】

更に別の実施形態では、RNAi 剤は、長さが 21 ヌクレオチドの両端ブラントマーであり、このセンス鎖は、5' 末端から 9、10、11 位の 3 つの連続するヌクレオチド上に 3 つの 2' -F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5' 末端から 11、12、13 位において 3 つの連続するヌクレオチド上に 3 つの 2' -O-メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。 20

【0448】

一実施形態では、RNAi 剤は、21 ヌクレオチドのセンス鎖及び 23 ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、このセンス鎖は、5' 末端から 9、10、11 位の 3 つの連続するヌクレオチド上に 3 つの 2' -F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含み、アンチセンス鎖は、5' 末端から 11、12、13 位の 3 つの連続するヌクレオチド上に 3 つの 2' -O-メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有し、RNAi 剤の一方の末端は、平滑であり、もう一方の末端は、2 ヌクレオチドのオーバーハングを含む。好ましくは、2 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。2 ヌクレオチドのオーバーハングが、アンチセンス鎖の 3' 末端にある場合には、末端の 3 つのヌクレオチドの間に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結があり得るものであり、これら 3 つのヌクレオチドのうち 2 つが、オーバーハングヌクレオチドであり、3 番目のヌクレオチドが、オーバーハングヌクレオチドに隣接する対合したヌクレオチドである。一実施形態では、RNAi 剤は、更に、センス鎖の 5' 末端及びアンチセンス鎖の 5' 末端の両方において末端の 3 つのヌクレオチドの間に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有する。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 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖内のどのヌクレオチドも、修飾ヌクレオチドである。一実施形態では、各残基は、独立して、例えば交互モチーフ内において、2' -O-メチル又は 3' -フル 30
40
オロで修飾されている。任意選択で、RNAi 剤は、リガンド（例えば、親油性リガンド、任意選択で C16 リガンド）を更に含む。

【0449】

一実施形態では、RNAi 剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含むものであり、このセンス鎖が、長さが 25～30 ヌクレオチド残基であり、5' 末端ヌクレオチド（1 位）から開始して、第 1 の鎖の 1 位～23 位が、少なくとも 8 個のリボヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖が、長さが 36～66 ヌクレオチド残基であり、また 3' 末端ヌクレオチドから開始して、センス鎖の 1～23 位と対合した位置において少なくとも 8 個のリボヌクレオチドを含んで二本鎖を形成するものであり、アンチセンス鎖の少なくとも 3' 末端ヌクレオチドがセンス鎖と対合せず、また最大 6 個の連続する 3' 末端ヌクレオチドはセ 50

ンス鎖と対合せず、それによって1～6個のヌクレオチドの3'の単一鎖オーバーハングを形成し、アンチセンス鎖の5'末端が、センス鎖と対合しない10～30個の連続するヌクレオチドを含み、それによって10～30個のヌクレオチドの単一鎖の5'オーバーハングを形成し、少なくともセンス鎖5'末端及び3'末端ヌクレオチドが、センス鎖及びアンチセンス鎖が最大の相補性で整列する場合にアンチセンス鎖のヌクレオチドと塩基対合し、それによってセンス鎖及びアンチセンス鎖間の実質的に二本鎖の領域を形成し、またアンチセンス鎖が、アンチセンス鎖長の少なくとも19個のリボヌクレオチドに沿って標的RNAに対して十分に相補的であり、二本鎖核酸が哺乳動物細胞に導入されたときに標的遺伝子発現を低減させ、またセンス鎖が、3個の連続するヌクレオチド上に3個の2'-F修飾の少なくとも1個のモチーフを含むものであり、モチーフのうちの少なくとも1個が、切断部位において又は切断部位の近傍で生じる。アンチセンス鎖は、切断部位において又はその近傍で3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを含む。

10

【0450】

一実施形態では、RNAi剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、このRNAi剤は、少なくとも25ヌクレオチドであり最大でも29ヌクレオチドである長さを有する第1の鎖と、5'末端から11、12、13位において3個の連続するヌクレオチド上の3個の2'-O-メチル修飾の少なくとも1個のモチーフをもつ最大でも30ヌクレオチドである長さを有する第2の鎖を含むものであり、この第1の鎖の3'末端及び第2の鎖の5'末端が平滑末端を形成し、また第2の鎖が、その3'末端において第1の鎖よりも長い1～4ヌクレオチドであるものであり、二本鎖領域が長さが少なくとも25ヌクレオチドであり、また第2の鎖が、第2の鎖の長さのうちの少なくとも19ヌクレオチドに沿って標的mRNAに対して十分に相補的であり、RNAi剤が哺乳動物細胞に導入されたときに標的遺伝子発現を低減するものであり、またRNAi剤のdicer切断が、優先的に、第2の鎖の3'末端を含むsiRNAを結果として生じ、それによって哺乳動物細胞において標的遺伝子の発現が低減する。任意選択で、RNAi剤は、リガンドを更に含む。

20

【0451】

一実施形態では、RNAi剤のセンス鎖は、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含み、そのモチーフのうちの1つは、センス鎖内の切断部位に生じる。

30

【0452】

一実施形態では、RNAi剤のアンチセンス鎖もまた、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含むことができ、このモチーフのうちの1つは、アンチセンス鎖内の切断部位に又はその近傍に生じる。

【0453】

17～23ヌクレオチドの長さの二本鎖領域を有するRNAi剤について、アンチセンス鎖の切断部位は、典型的には、5'末端からおよそ10、11、及び12位である。このため、3つの同一の修飾のモチーフは、アンチセンス鎖の9、10、11位、10、11、12位、11、12、13位、12、13、14位、又は13、14、15位において生じてよく、この数字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開始するか、又はこの数字はアンチセンス鎖の5'末端から二本鎖領域の範囲内の最初の対合ヌクレオチドから開始する。アンチセンス鎖内の切断部位はまた、5'末端からのRNAiの二本鎖領域の長さに応じて変化し得る。

40

【0454】

RNAi剤のセンス鎖は、その鎖の切断部位において3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含んでもよく、またアンチセンス鎖は、鎖の切断部位において又はその近傍において3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを有し得る。センス鎖及びアンチセンス鎖がdsRNA二本鎖を形成する場合には、センス鎖及びアンチセンス鎖は、センス鎖上の3つのヌクレオチドの1つのモチーフ及びアンチセンス鎖上の3つのヌクレオチドの1つのモチーフ

50

が、少なくとも1つのヌクレオチドオーバーラップを有するように、すなわち、センス鎖内のモチーフの3つのヌクレオチドの少なくとも1つが、アンチセンス鎖内のモチーフの3つのヌクレオチドの少なくとも1つと塩基対合を形成するように、整列され得る。あるいは、少なくとも2つのヌクレオチドが重複してもよく、3つのヌクレオチドの全てが重複してもよい。

【0455】

一実施形態では、RNA i 剤のセンス鎖は、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の2つ以上のモチーフを含み得る。第1のモチーフは、鎖の切断部位において又はその近傍に生じてもよく、また他のモチーフが、ウィング修飾であってもよい。本明細書において「ウィング修飾」という用語は、同一の鎖の切断部位において又はその近傍においてのモチーフから分離されている鎖の別の部分において生じるモチーフを指す。ウィング修飾は、第1のモチーフに隣接しているか、又は少なくとも1つ以上のヌクレオチドで分離されている。モチーフが互いに直ぐ隣に隣接する場合には、モチーフの化学的性質は、互いに別個であり、またモチーフが1つ以上のヌクレオチドで分離されている場合には、化学的性質は、同一であることも、異なっていることもできる。2つ以上のウィング修飾が存在してもよい。例えば、2つのウィング修飾が存在する場合には、各ウィング修飾は、切断部位における若しくはその近傍における第1のモチーフに対して1つの末端において生じてもよく、又はリードモチーフのいずれかの側で生じてもよい。

【0456】

センス鎖と同様に、RNA i 剤のアンチセンス鎖は、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の2つ以上のモチーフを含んでもよく、そのモチーフの少なくとも1つはその鎖の切断部位において又はその近傍で生じる。このアンチセンス鎖はまた、センス鎖上に存在し得るウィング修飾と同様のアラインメント内に1つ以上のウィング修飾を含んでもよい。

【0457】

一実施形態では、RNA i 剤のセンス鎖又はアンチセンス鎖上のウィング修飾は、典型的には、鎖の3'末端、5'末端、又は両末端における最初の1つ又は2つの末端ヌクレオチドを含まない。

【0458】

別の実施形態では、RNA i 剤のセンス鎖又はアンチセンス鎖上のウィング修飾は、典型的には、鎖の3'末端、5'末端、又は両末端における二本鎖領域内の最初の1つ又は2つの対合ヌクレオチドを含まない。

【0459】

RNA i 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖が各々、少なくとも1つのウィング修飾を含む場合には、そのウィング修飾は、二本鎖領域の同一末端に入ってもよく、1、2、又は3つのヌクレオチドのオーバーラップを有する。

【0460】

RNA i 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖が各々、少なくとも2つのウィング修飾を含有する場合には、センス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれの一本鎖に由来する2つの修飾が、1、2、又は3ヌクレオチドのオーバーラップを有する二本鎖領域の一方の末端に入り、一本鎖からの2つの修飾がそれぞれ、1、2、又は3ヌクレオチドのオーバーラップを有する二本鎖領域のうちのもう一方の末端に入り、一本鎖からの2つの修飾が、二本鎖領域内の1、2、又は3ヌクレオチドのオーバーラップを有するリードモチーフの両側に入るように、整列され得る。

【0461】

一実施形態では、RNA i 剤は、標的との、二本鎖内のミスマッチ又はそ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内に生じても、二本鎖領域内に生じてもよい。塩基対は、解離又は融解を促進するそれらがもつ傾向に基づいて格付けされ得る（例えば、特定の対合の会合又は解離の自由エネルギーに基づくものであり、最も単純なアプローチとしては、個々の対ごとに對を調べることであるが、隣り合う又は類似した分析

10

20

30

40

50

も使用可能である)。解離の促進の点では、A : UはG : Cより好ましく、G : UはG : Cより好ましく、またI : CはG : Cより好ましい (I = イノシン)。ミスマッチ、例えば、非標準の対合又は標準以外の対合 (本明細書において別の箇所に記載される) が、標準 (A : T、A : U、G : C) の対合より好ましく、またユニバーサル塩基を含む対合が、標準の対合より好ましい。

【0462】

一実施形態では、RNA i 剤は、A : U、G : U、I : Cの群から独立して選択されるアンチセンス鎖の5'末端から二本鎖領域内の最初の1、2、3、4、又は5塩基対、及びミスマッチ対、例えば、非標準の対合又は標準以外の対合又はユニバーサル塩基を含む対合のうちの少なくとも1つを含み、二本鎖の5'末端においてアンチセンス鎖の解離を促進する。

10

【0463】

一実施形態では、アンチセンス鎖内の5'末端から二本鎖領域内の1位にあるヌクレオチドは、A、dA、dU、U、及び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'末端から二本鎖領域内の最初の1、2、又は3塩基対のうち少なくとも1つは、AU塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の5'末端から二本鎖領域内の最初の塩基対が、AU塩基対である。

【0464】

別の実施形態では、センス鎖の3'末端にあるヌクレオチドは、デオキシチミン (dT) である。別の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端にあるヌクレオチドは、デオキシチミン (dT) である。一実施形態では、デオキシチミンヌクレオチドの短い配列が存在し、例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖の3'末端上の2つのdTヌクレオチドが存在する。

20

【0465】

一実施形態では、センス鎖配列は、式 (I) によって表され、

$$5' \text{ } n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q \text{ } 3' \text{ (I)}$$

式中、

i 及び j は、各々独立して、0又は1であり、

p 及び q は、各々独立して、0～6であり、

30

各 N_a は、独立して、0～25個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ものであって、各配列は少なくとも2つの異なるように修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b は、独立して、0～10個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 及び n_q は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表すものであり、

式中、 N_b 及び Y は、同一の修飾を有せず、

XXX、YYY、及び ZZZ は、各々独立して、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表す。好ましくは、YYYは、全て2'-F修飾ヌクレオチドである。

40

【0466】

一実施形態では、 N_a 又は N_b は、交互パターンの修飾を含む。

【0467】

一実施形態では、YYYモチーフは、センス鎖の切断部位において又はその近傍に生じる。例えば、RNA i 剤が、17～23個のヌクレオチドの長さの二本鎖領域を有する場合、YYYモチーフは、センス鎖の切断部位において又はその近傍において生じ得 (例えば、6、7、8位、7、8、9位、8、9、10位、9、10、11位、10、11、12位、又は11、12、13位において生じ得る)、この数字は、5'末端から、最初のヌクレオチドから開始し、又は任意選択で、この数字は、5'末端から、二本鎖領域内の最初の対合ヌクレオチドにおいて開始する。

50

【0468】

一実施形態では、 i は1であり、 j は0であるか、又は i は0であり、 j は1であるか、又は i と j との両方が1である。したがって、センス鎖は、以下の式：

$5' \text{ } n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q \text{ } 3' \text{ (I b)}$ 、

$5' \text{ } n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q \text{ } 3' \text{ (I c)}$ 、又は

$5' \text{ } n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q \text{ } 3' \text{ (I d)}$

によって表される。

【0469】

センス鎖が式 (I b) で表される場合、 N_b は、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2、又は0個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。

10

【0470】

各 N_a は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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得る。

【0471】

センス鎖が式 (I c) で表される場合、 N_b は、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2、又は0個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。各 N_a は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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得る。

【0472】

センス鎖が式 (I d) 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、又は0個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。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5、又は6である。各 N_a は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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得る。

20

【0473】

X 、 Y 、及び Z の各々は、互いに同一であっても、異なってもよい。

【0474】

他の実施形態では、 i は0であり、 j は0であり、センス鎖は、式：

$5' \text{ } n_p - N_a - YYY - N_a - n_q \text{ } 3' \text{ (I a)}$

によって表され得る。

30

【0475】

センス鎖が、式 (I a) で表される場合、各 N_a は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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得る。

【0476】

一実施形態では、RNA i のアンチセンス鎖配列は、式 (II)：

$5' \text{ } n_q - N_a' - (Z' Z' Z_k') N_b' - Y' Y' Y_b' N' - (X' X' X_l') N_a' - n_p' \text{ } 3' \text{ (II)}$

によって表され得、

式中、

k 及び l は、各々独立して、0又は1であり、

40

p' 及び q' は、各々独立して、0～6であり、

各 N_a' は、独立して、0～25個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ものであって、各配列は少なくとも2個の異なるように修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b' は、独立して、0～10個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' 及び n_q' は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表すものであり、

N_b' 及び Y' は、同一の修飾を有せず、

$X' X' X'$ 、 $Y' Y' Y'$ 、及び $Z' Z' Z'$ は、各々独立して、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表す。

50

【0477】

一実施形態では、 N_a' 又は N_b' は、交互パターンの修飾を含む。

【0478】

$Y'Y'Y'$ モチーフは、アンチセンス鎖の切断部位において又はその近傍で生じる。例えば、RNAi 剤が、17～23ヌクレオチドの長さの二本鎖領域を有する場合、 $Y'Y'Y'$ モチーフは、アンチセンス鎖の9、10、11位、10、11、12位、11、12、13位、12、13、14位、又は13、14、15位において生じ得、この数字は、5'末端から、第1のヌクレオチドから開始し、又は任意選択で、この数字は、5'末端から、二本鎖領域内の第1の対合ヌクレオチドにおいて開始する。好ましくは、 $Y'Y'Y'$ モチーフは、11、12、13位で生じる。

10

【0479】

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

【0480】

一実施形態では、 k は1であり、 l は0であるか、又は k は0であり、 l は1であるか、又は k と l の両方が1である。

【0481】

したがって、アンチセンス鎖は、以下の式：

$5' r_q - N_a' - Z' Z' Z' b' - N - Y' Y' Y' a' - N r_p' 3' \text{ (I I b) 、}$

$5' r_q - N_a' - Y' Y' Y' b' - N - X' X' X' p' 3' \text{ (I I c) 、 又は}$

$5' r_q - N_a' - Z' Z' Z' b' - N - Y' Y' Y' b' - N - X' X' X' a' - N r_p' 3' \text{ (I I d)}$

20

I d)

によって表される。

【0482】

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、又は0個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。各 N_a' は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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。

【0483】

アンチセンス鎖が、式 (I I c) で表される場合、 N_b' は、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2、又は0個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。各 N_a' は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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。

30

【0484】

アンチセンス鎖が、式 (I I d) 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、又は0個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。各 N_a' は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5、又は6である。

【0485】

他の実施形態では、 k は0であり、 l は0であり、アンチセンス鎖は、式：

$5' r_p - N_a - Y' Y' Y' a - N n_q' 3' \text{ (I a)}$

40

によって表される。

【0486】

アンチセンス鎖が、式 (I I a) で表される場合、各 N_a' は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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。

【0487】

X' 、 Y' 、及び Z' の各々は、互いに同一であっても、異なってもよい。

【0488】

センス鎖及びアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、独立して、LNA、1,5-アンヒドロヘキシトール (HNA)、シクロヘキセニル (CeNA)、2'-メトキシエチル、

50

2'-O-メチル、2'-O-アシル、2'-C-アシル、2'-ヒドロキシル、又は2'-フルオロで修飾されてもよい。例えば、センス鎖及びアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、独立して、2'-O-メチル又は2'-フルオロで修飾される。各X、Y、Z、X'、Y'、及びZ'は、特に、2'-O-メチル修飾又は2'-フルオロ修飾を表してもよい。

【0489】

一実施形態では、RNAi剤のセンス鎖は、二本鎖領域が21ntである場合に、鎖の9、10、及び11位で生じるYYYモチーフを含んでもよく、この数字は、5'末端から最初のヌクレオチドから開始するか、又は任意選択で、この数字は、5'末端から二本鎖領域内の最初の対合ヌクレオチドで開始し、Yは、2'-F修飾を表す。センス鎖は、二本鎖領域の対向する側の末端においてウィング修飾としてXXXモチーフ又はZZZモチーフを追加で含んでもよく、XXX及びZZZは、各々独立して、2'-OMe修飾又は2'-F修飾を表す。

【0490】

一実施形態では、アンチセンス鎖は、鎖の11、12、13位で生じるY'Y'Y'モチーフを含んでもよく、この数字は、5'末端から第1のヌクレオチドから開始し、又は任意選択で、この数字は、5'末端から二本鎖領域内の第1の対合ヌクレオチドで開始し、Y'は、2'-O-メチル修飾を表す。アンチセンス鎖は、二本鎖領域の対向する側の末端においてウィング修飾としてX'X'X'モチーフ又はZ'Z'Z'モチーフを追加で含んでもよく、X'X'X'及びZ'Z'Z'は、各々独立して、2'-OMe修飾又は2'-F修飾を表す。

【0491】

上記の式(Ia)、(Ib)、(Ic)、及び(Id)のいずれか1つで表されるセンス鎖は、それぞれ、式(IIa)、(IIb)、(IIc)、及び(IId)のいずれか1つで表されるアンチセンス鎖と二本鎖を形成する。

【0492】

したがって、本開示の方法において使用するRNAi剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含んでもよく、その各鎖は、14～30個のヌクレオチドを有し、RNAi二本鎖は、式(III)によって表され、

【表1】

センス:	5' np -Na-(X X X) _i -Nb- Y Y Y -Nb -(Z Z Z) _j -Na-nq 3'	30
アンチセンス:	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、及びlは、各々独立して、0又は1であり、

p、p'、q、及びq'は、各々独立して、0～6であり、

各N_a及びN_a'は、独立して、0～25個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ものであって、各配列は少なくとも2個の異なるように修飾されたヌクレオチドを含み、

各N_b及びN_b'は、独立して、0～10個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、

式中、

各n_p'、n_p、n_q'、及びn_qは、それらの各々が、存在する場合もしない場合もあり、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'、及びZ'Z'Z'は、各々独立して、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表す。

【0493】

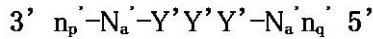
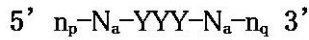
一実施形態では、iは0であり、jは0であるか、又はiは1であり、jは0であるか、又はiは0であり、jは1であるか、又はiとjとの両方が0であるか、又はiとjと

の両方が1である。別の実施形態では、 k は0であり、 l は0であるか、又は k は1であり、 l は0であり、 k は0であり、 l は1であるか、又は k と l の両方が0であるか、又は k と l の両方が1である。

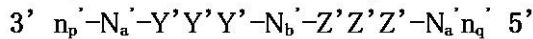
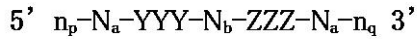
【0494】

RNA i 二本鎖を形成するセンス鎖及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。

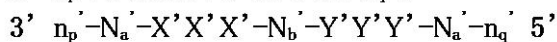
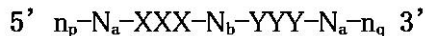
【表2】



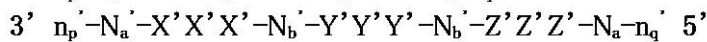
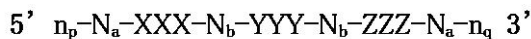
(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

10

20

【0495】

RNA i 剤が式(IIIa)で表される場合、各 N_a は、独立して、2～20、2～15、又は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。

【0496】

RNA i 剤が式(IIIb)で表される場合、各 N_b は、独立して、1～10、1～7、1～5、又は1～4個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。各 N_a は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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。

30

【0497】

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、又は0個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。各 N_a は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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。

【0498】

RNA i 剤が式(IIId)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、又は0個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。各 N_a 、 N_a' は、独立して、2～20、2～15、又は2～10個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。 N_a 、 N_a' 、 N_b 、及び N_b' の各々は、独立して、交互パターンの修飾を含む。

40

【0499】

一実施形態では、RNA i 剤が式(IIId)で表される場合、 N_a 修飾は、2'-O-メチル修飾又は2'-フルオロ修飾である。別の実施形態では、RNA i 剤が式(IIId)で表される場合、 N_a 修飾は、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート連結を介して隣接するヌクレオチドに連結する。更に別の実施形態では、RNA i 剤が式(IIId)で表される場合、 N_a 修飾は2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり、 $p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート連結を介して隣接するヌクレオチドに連結し、センス鎖は、二価又は三価の分枝リンカー（以下に記載する）を介して結合した1つ以

50

上の C 1 6（又はそれと関連する）部分にコンジュゲートする。別の実施形態では、RNA i 剤が式 (I I I d) で表される場合、N_a 修飾は 2'-O-メチル又は 2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも 1 つの n_p' は、ホスホロチオエート連結を介して隣接するヌクレオチドに連結し、センス鎖は、少なくとも 1 つのホスホロチオエート連結を含み、センス鎖は、任意選択で二価又は三価の分枝リンカーを介して結合した、1 つ以上の親油性部分、例えば、C 1 6（又はそれと関連する）部分にコンジュゲートする。

【0500】

一実施形態では、RNA i 剤が式 (I I I a) で表される場合、N_a 修飾は 2'-O-メチル又は 2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも 1 つの n_p' は、ホスホロチオエート連結を介して隣接するヌクレオチドに連結し、センス鎖は、少なくとも 1 つのホスホロチオエート連結を含み、センス鎖は、二価又は三価の分枝リンカーを介して結合した、1 つ以上の親油性部分、例えば、C 1 6（又はそれと関連する）部分にコンジュゲートする。

10

【0501】

一実施形態では、RNA i 剤は、式 (I I I)、(I I I a)、(I I I b)、(I I I c)、及び (I I I d) で表される少なくとも 2 つの二本鎖を含む多量体であり、これら二本鎖は、リンカーで接続されている。このリンカーは、切断可能である場合も、切断可能でない場合もある。任意選択で、多量体は、リガンドを更に含む。二本鎖の各々は、同一の遺伝子又は 2 つの異なる遺伝子を標的とすることができ、又は二本鎖の各々は、2 つの異なる標的部位において同一の遺伝子を標的とすることができる。

20

【0502】

一実施形態では、RNA i 剤は、式 (I I I)、(I I I a)、(I I I b)、(I I I c)、及び (I I I d) で表される 3 個、4 個、5 個、6 個、又はそれ以上の二本鎖を含む多量体であり、これら二本鎖は、リンカーで接続されている。このリンカーは、切断可能である場合も、切断可能でない場合もある。任意選択で、多量体は、リガンドを更に含む。二本鎖の各々は、同一の遺伝子又は 2 つの異なる遺伝子を標的にすることができ、又は二本鎖の各々は、2 つの異なる標的部位における同一の遺伝子を標的とすることができる。

【0503】

一実施形態では、式 (I I I)、(I I I a)、(I I I b)、(I I I c)、及び (I I I d) で表される 2 つの RNA i 剤は、5' 末端で互いに連結し、3' 末端の一方又は両方が、任意選択でリガンドにコンジュゲートする。これら薬剤は各々、同一の遺伝子又は 2 つの異なる遺伝子を標的にすることができ、又はこれら薬剤の各々は、2 つの異なる標的部位において同一の遺伝子を標的とすることもできる。

30

【0504】

種々の公開公報には、本開示の方法において使用され得る多量体 RNA i 剤が記載されている。そのような公開公報としては、WO 2007/091269、WO 2010/141511、WO 2007/117686、WO 2009/014887、及び WO 2011/031520、並びに US 7858769 が挙げられ、それらの各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

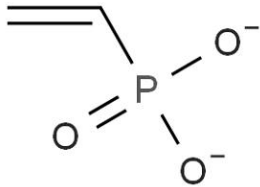
40

【0505】

ある特定の実施形態では、本開示の組成物及び方法は、本明細書において記載するような RNA i 剤のビニルホスホネート (VP) 修飾を含む。例示的实施形態では、本開示のビニルホスホネートは、以下の構造を有する。

50

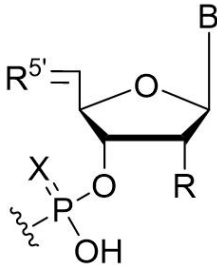
【化 2】



【0506】

例示的な実施形態では、本開示の5'-ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドは、以下の構造を有し、

【化 3】



式中、Xは、O又はSであり、

Rは、水素、ヒドロキシ、フルオロ、又はC₁~20アルコキシ（例えば、メトキシ又はn-ヘキサデシルオキシ）であり、

R^{5'}は、=C(H)-P(O)(OH)₂であり、C5'炭素とR^{5'}との間の二重結合は、E配座又はZ配座（例えば、E配座）にあり、

Bは、核酸塩基又は修飾核酸塩基であり、任意選択で、Bは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、又はウラシルである。

【0507】

一実施形態では、R^{5'}は、=C(H)-P(O)(OH)₂であり、C5'炭素とR^{5'}との間の二重結合は、E配座にある。別の実施形態では、Rは、メトキシであり、R^{5'}は、=C(H)-P(O)(OH)₂であり、C5'炭素とR^{5'}との間の二重結合は、E配座にある。別の実施形態では、Xは、Sであり、Rは、メトキシであり、R^{5'}は、=C(H)-P(O)(OH)₂であり、C5'炭素とR^{5'}との間の二重結合は、E配座にある。

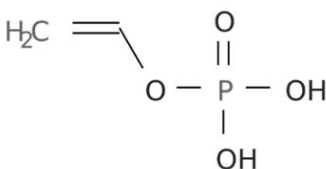
【0508】

本開示のビニルホスホネートは、本開示のdsRNAのアンチセンス又はセンス鎖のいずれに結合してもよい。ある特定の好ましい実施形態では、本開示のビニルホスホネートは、任意選択でdsRNAのアンチセンス鎖の5'末端で、dsRNAのアンチセンス鎖に結合する。

【0509】

ビニルホスフェート修飾も、本開示の組成物及び方法のために企図される。例示的ビニルホスフェート構造は以下のとおりである。

【化 4】



【0510】

別の例示的なビニルホスフェート構造は、前述した構造を含み、式中、R^{5'}は、=C

(H) - OP(O)(OH)₂であり、C 5'炭素とR 5'との間の二重結合は、E配座又はZ配座(例えば、E配座)にある。

【0511】

i. 熱不安定化修飾

ある特定の実施形態では、アンチセンス鎖のシード領域(すなわち、アンチセンス鎖の5'末端の2~9位において)中に熱不安定化修飾を組み込んで、オフターゲット遺伝子サイレンシングを低減させる又は阻害することによって、dsRNA分子をRNA干渉のために最適化できる。アンチセンス鎖の5'末端から数えて最初の9ヌクレオチドの位置内にある二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含むアンチセンス鎖を有するdsRNAが、オフターゲット遺伝子サイレンシング活性を低減させたことを発見した。したがって、いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'領域の最初の9ヌクレオチドの位置内に、二本鎖の少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれ以上)の熱的不安定化修飾を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の二本鎖の熱的不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から2~9位、又は好ましくは4~8位に位置する。いくつかの更なる実施形態では、二本鎖の熱的不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から6、7、又は8位に位置する。更にいくつかの実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から7位に位置する。「熱不安定化修飾」という用語は、そうした修飾を有していないdsRNAの融解温度(T_m)よりも、好ましくは1度、2度、3度、又は4度低い、より低い全体的な融解温度(T_m)を有するdsRNAをもたらすこととなる修飾を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から、2、3、4、5、又は9位に位置する。

10

20

【0512】

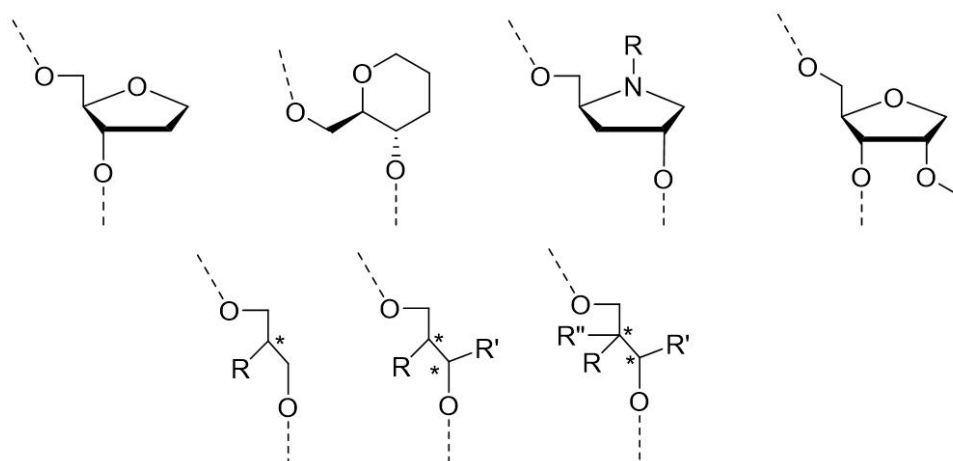
熱不安定化修飾としては、限定するものではないが、脱塩基修飾、対向する鎖における対向するヌクレオチドとのミスマッチ、及び例えば2'-デオキシ修飾などの糖修飾、例えばアンロック核酸(UNA)又はグリコール核酸(GNA)である非環式ヌクレオチド、及び2'-5'連結リボヌクレオチド(「3'-RNA」)を挙げることができる。

【0513】

例示の脱塩基修飾としては、限定するものではないが、以下が挙げられ、

【化5】

30

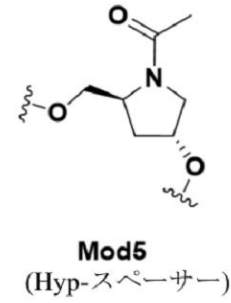
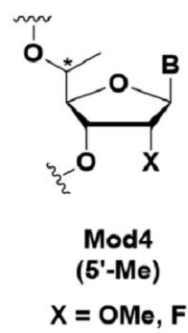
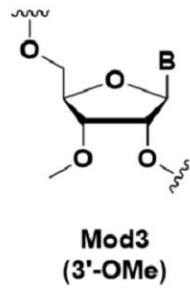
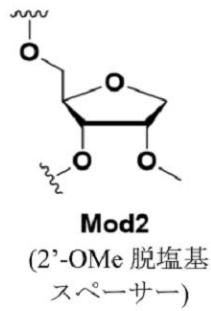


40

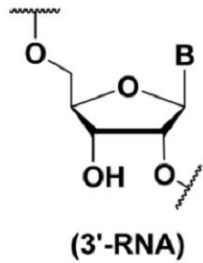
式中、R = H、Me、Et、又はOMeであり、R' = H、Me、Et、又はOMeであり、R'' = H、Me、Et、又はOMeであり、

50

【化 6】



10



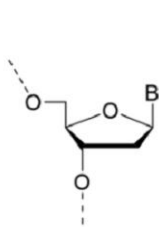
式中、B は、修飾又は未修飾の核酸塩基である。

20

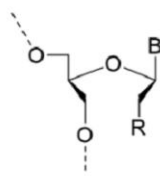
【 0 5 1 4】

例示の糖修飾としては、限定されるものではないが、以下が挙げられ、

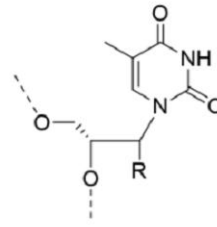
【化 7】



2'-デオキシ

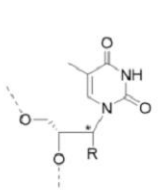


アンロックド核酸
R=H、OH、O-アルキル

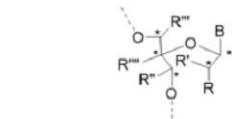


グリコール核酸
R=H、OH、O-アルキル

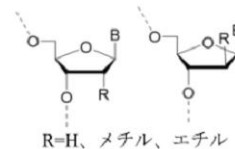
30



グリコール核酸
R=H、OH、O-アルキル



アンロックド核酸
R=H、OH、CH₃、CH₂CH₃、O-アルキル、NH₂、NHMe、NMe₂
R'=H、OH、CH₃、CH₂CH₃、O-アルキル、NH₂、NHMe、NMe₂
R''=H、OH、CH₃、CH₂CH₃、O-アルキル、NH₂、NHMe、NMe₂
R'''=H、OH、CH₃、CH₂CH₃、O-アルキル、NH₂、NHMe、NMe₂
R''''=H、OH、CH₃、CH₂CH₃、O-アルキル、NH₂、NHMe、NMe₂



R=H、メチル、エチル

40

式中、B は、修飾又は未修飾の核酸塩基である。

【 0 5 1 5】

いくつかの実施形態では、二本鎖の熱的不安定化修飾は、以下からなる群から選択され、

50

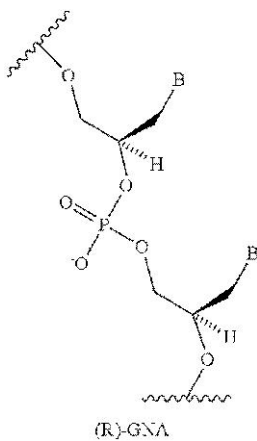
ゲン、 OR_3 、又はアルキルであり、 R_3 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、又は糖である。「UNA」という用語は、糖の結合のいずれかが除去されて、アンロックド「糖」残基を形成する、非環式アンロックド核酸を指す。一実施例では、UNAはまた、 $C1'-C4'$ 間の結合が除去されているモノマーを包含する（すなわち、 $C1'$ 炭素と $C4'$ 炭素との間の炭素-酸素-炭素の共有結合）。別の実施例では、糖の $C2'-C3'$ 結合（すなわち、 $C2'$ 炭素と $C3'$ 炭素との間の炭素-炭素の共有結合）が除去される（参照により全体が本明細書に組み込まれるMikhailov et al., Tetrahedron Letters, 26(17): 2059 (1985)、及びFluiter et al., Mol. Biosyst., 10: 1039 (2009)を参照されたい）。非環式誘導体は、ワトソン-クリック対合に影響を及ぼすことなく、より大きな骨格柔軟性を与える。非環式ヌクレオチドは、 $2'-5'$ 又は $3'-5'$ 連結を介して連結し得る。

10

【0518】

「GNA」という用語は、グリコール核酸を指し、これはDNA又はRNAと類似のポリマーであるが、ホスホジエステル結合によって連結した反復するグリセロール単位から構成される点で、その「骨格」の組成が異なる。

【化11】



20

【0519】

二本鎖の熱的不安定化修飾は、熱的不安定化ヌクレオチドと、dsRNA二本鎖内の対向する鎖内の対向するヌクレオチドとの間のミスマッチ（すなわち、非相補的な塩基対）であり得る。例示的なミスマッチ塩基対としては、 $G:G$ 、 $G:A$ 、 $G:U$ 、 $G:T$ 、 $A:A$ 、 $A:C$ 、 $C:C$ 、 $C:U$ 、 $C:T$ 、 $U:U$ 、 $T:T$ 、 $U:T$ 、又はそれらの組み合わせが挙げられる。当技術分野で既知の他のミスマッチ塩基対合も本発明に従う。ミスマッチは、天然に存在するヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドのいずれかであるヌクレオチドの間に生じ得、すなわち、ミスマッチ塩基対合は、ヌクレオチドのリボース糖上の修飾とは独立してそれぞれのヌクレオチドに由来する核酸塩基間で生じ得る。ある特定の実施形態では、dsRNA分子は、 $2'$ -デオキシ核酸塩基であるミスマッチ対合内の少なくとも1つの核酸塩基を含み、例えば、 $2'$ -デオキシ核酸塩基は、センス鎖内にある。

30

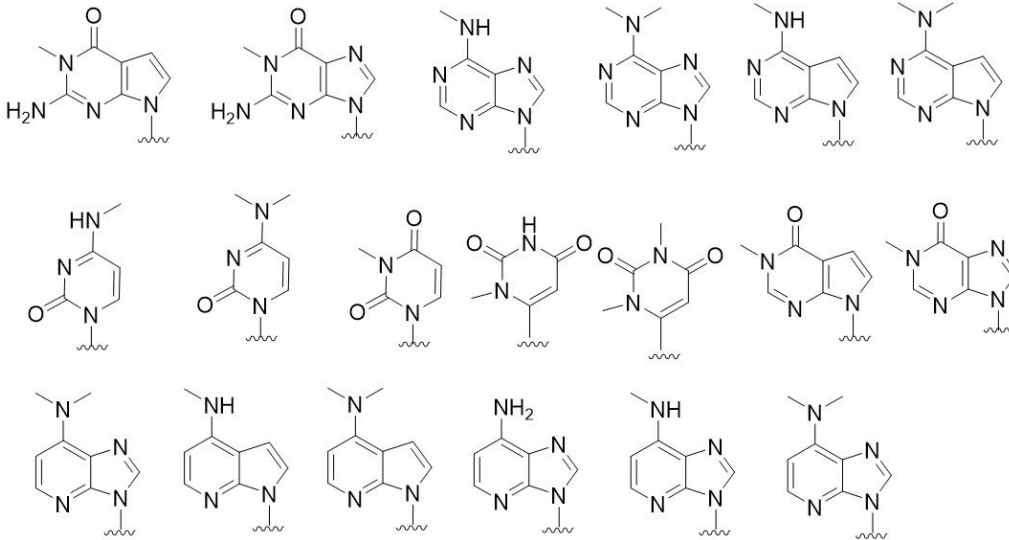
40

【0520】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖のシード領域内の二本鎖の熱不安定化修飾としては、以下などの、標的mRNA上の相補的塩基との $W-C-H$ 結合が損なわれたヌクレオチドを含む。

50

【化 1 2】



10

【0 5 2 1】

脱塩基ヌクレオチド、非環式ヌクレオチド修飾（UNA及びGNAを含む）、及び mismatches 修飾のより多くの例は、WO 2 0 1 1 / 1 3 3 8 7 6 に詳細に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0 5 2 2】

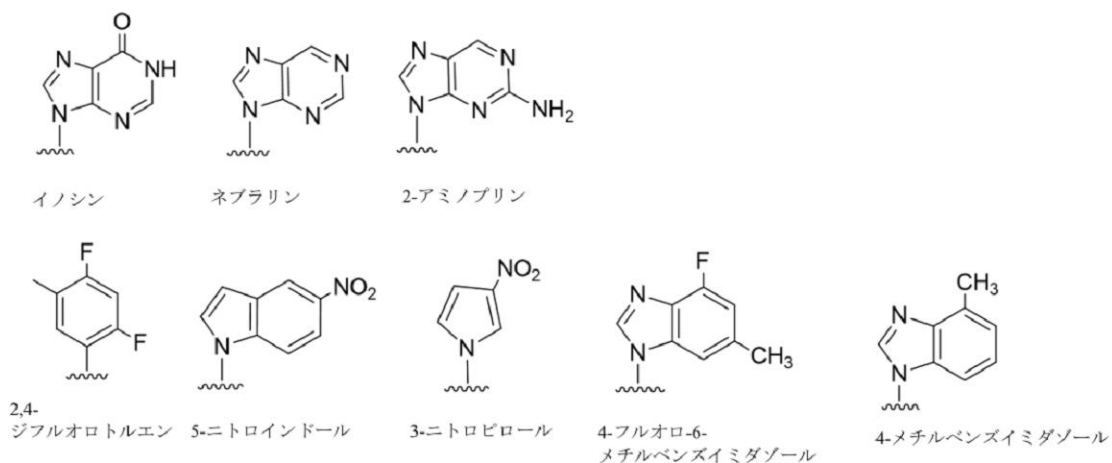
熱的不安定化修飾はまた、対向し合う塩基と水素結合を形成する能力が低減又は消失したユニバーサル塩基及びリン酸修飾を含んでもよい。

【0 5 2 3】

いくつかの実施形態では、二本鎖の熱的不安定化修飾には、非標準塩基を有するヌクレオチド、例えば、限定されるものではないが、対向する鎖内の塩基と水素結合を形成する能力が損なわれた、又は完全に消失した核酸塩基修飾が含まれる。これら核酸塩基修飾は、参照により全体が本明細書に組み込まれる WO 2 0 1 0 / 0 0 1 1 8 9 5 に記載されるように、dsRNA 二本鎖の中心領域の不安定化について評価されている。例示的な核酸塩基の修飾は、以下である。

30

【化 1 3】



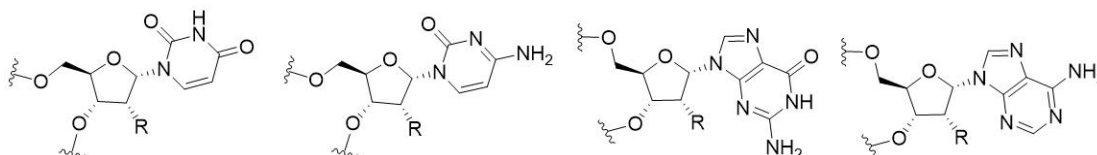
40

【0 5 2 4】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖のシード領域内の二本鎖の熱的不安定化修飾としては、以下などの、標的 mRNA 上の塩基と相補的である 1 つ以上の α -ヌクレオチドを含み、

50

【化 1 4】

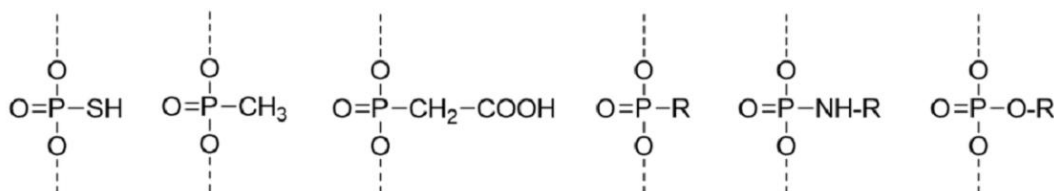


式中、Rは、H、OH、OCH₃、F、NH₂、NHMe、NMe₂、又はO-アルキルである。

【0525】

天然のホスホジエステル連結と比較して、dsRNA二本鎖の熱的安定性を減少させることがわかっている例示的なリン酸修飾としては以下のものがある。

【化 1 5】



R=アルキル

【0526】

R基のアルキルは、C₁～C₆アルキルであり得る。R基の具体的なアルキルとして、限定されるものではないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチル、及びヘキシルが挙げられる。

【0527】

当業者であれば認識するように、核酸塩基の機能的役割が本開示のRNA i剤の特異性を規定しているということを考慮して、核酸塩基修飾は本明細書に記載するような種々の手法で、例えばオフターゲット効果に対してオンターゲット効果を増強する目的のために、例えば本開示のRNA i剤に不安定化修飾を導入することを実施することが可能であるが、利用可能であって、概して本開示のRNA i剤上に存在する修飾の範囲は、例えばポリリボヌクレオチドの糖基又はホスフェート骨格に対する修飾である非核酸塩基修飾に対してずっと大きい傾向がある。こうした修飾は、本開示の他の項でより詳細に記載するものであり、また本明細書において上記又は他の場所で記載されるような天然の核酸塩基又は修飾核酸塩基のいずれかを有する本開示のRNA i剤のために明確に企図される。

【0528】

dsRNAはまた、熱的不安定化修飾を含むアンチセンス鎖に加えて、1つ以上の複数の安定化修飾を含み得る。例えば、dsRNAは、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上）の安定化修飾を含み得る。限定するものではないが、安定化修飾は全て、一方の鎖内に存在し得る。いくつかの実施形態では、センス及びアンチセンス鎖の両方が、少なくとも2つの安定化修飾を含む。安定化修飾は、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかのヌクレオチドで生じ得る。例えば、安定化修飾は、センス鎖若しくはアンチセンス鎖上のどのヌクレオチド上でも生じ得、各安定化修飾は、センス鎖若しくはアンチセンス鎖上で交互パターン内で生じ得、又はセンス鎖若しくはアンチセンス鎖は、交互パターン内で両方の安定化修飾を含む。センス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一である場合も異なっている場合もあり、またセンス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上の安定化修飾の交互パターンに対して相対的な移動がある場合がある。

【0529】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上）の安定化修飾を含む。限定されるものではないが、アンチセンス鎖内の安定化修飾は、任意の位置に存在し得る。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、アンチセンスは、5'末端から、2、6、8、9、14、及び16位に安定化修飾を含む。いくつかの他の実施形態では、アンチセンスは、5'末端から、2、6、14、及び16位に安定化修飾を含む。更にいくつかの他の実施形態では、アンチセンスは、5'末端から、2、14、及び16位に安定化修飾を含む。

【0530】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾に隣接する少なくとも1つの安定化修飾を含む。例えば、安定化修飾は、不安定化修飾の5'末端又は3'末端にある、すなわち、不安定化修飾の位置から-1位又は+1位にある、ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の5'末端及び3'末端の各々にある、すなわち、不安定化修飾の位置から-1位及び+1位にある、安定化修飾を含む。

10

【0531】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の3'末端にある、すなわち、不安定化修飾の位置から+1位及び+2位にある、少なくとも2つの安定化修飾を含む。

【0532】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上）の安定化修飾を含む。限定されるものではないが、センス鎖内の安定化修飾は、任意の位置に存在し得る。いくつかの実施形態では、センス鎖は、5'末端から7、10、及び11位に安定化修飾を含む。いくつかの他の実施形態では、センス鎖は、5'末端から、7、9、10、及び11位に安定化修飾を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて、アンチセンス鎖の11、12、及び15位に対して対向する位置又は相補的な位置に安定化修飾を含む。いくつかの他の実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて、アンチセンス鎖の11、12、13、及び15位に対して対向する位置又は相補的な位置に安定化修飾を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は、2つ、3つ、又は4つの安定化修飾のブロックを含む。

20

【0533】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖内の二本鎖の熱的不安定化修飾に対して対向する位置又は相補的な位置に安定化修飾を含まない。

30

【0534】

例示的な熱的不安定化修飾としては、限定するものではないが、2'-フルオロ修飾が挙げられる。他の熱的不安定化修飾としては、限定するものではないが、LNAが挙げられる。

【0535】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNAは、少なくとも4つ（例えば、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上）の2'-フルオロヌクレオチドを含む。限定するものではないが、2'-フルオロヌクレオチドは全て、一方の鎖内に存在し得る。いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との両方が、少なくとも2つの2'-フルオロヌクレオチドを含む。2'-フルオロ修飾は、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかのヌクレオチド上で生じ得る。例えば、2'-フルオロ修飾は、センス鎖若しくはアンチセンス鎖上のどのヌクレオチド上でも生じ得るか、各2'-フルオロ修飾は、センス鎖若しくはアンチセンス鎖上の交互パターンにおいて生じ得るか、又はセンス鎖若しくはアンチセンス鎖は、両方とも交互パターンにおいて2'-フルオロ修飾を含む。センス鎖上の2'-フルオロ修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一である場合も異なっている場合もあり、またセンス鎖上の2'-フルオロ修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上の2'-フルオロ修飾の交互パターンに対して相対的な移動があり得る。

40

【0536】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上）の2'-フルオロヌクレオチドを含む。限

50

定するものではないが、アンチセンス鎖内の 2' -フルオロ修飾は、任意の位置に存在し得る。いくつかの実施形態では、アンチセンスは、5' 末端から、2、6、8、9、14、及び 16 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの他の実施形態では、アンチセンスは、5' 末端から、2、6、14、及び 16 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。更にいくつかの他の実施形態では、アンチセンスは、5' 末端から、2、14、及び 16 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。

【0537】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾に隣接する少なくとも 1 つの 2' -フルオロヌクレオチドを含む。例えば、2' -フルオロヌクレオチドは、不安定化修飾の 5' 末端又は 3' 末端にある、すなわち、不安定化修飾の位置から -1 位又は +1 位の位置にある、ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の 5' 末端及び 3' 末端の各々に、すなわち、不安定化修飾の位置から -1 及び +1 位の位置に、2' -フルオロヌクレオチドを含む。

【0538】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の 3' 末端に、すなわち、不安定化修飾の位置から +1 及び +2 位に、少なくとも 2 つの 2' -フルオロヌクレオチドを含む。

【0539】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、少なくとも 2 つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個、又はそれ以上）の 2' -フルオロヌクレオチドを含む。限定するものではないが、センス鎖内の 2' -フルオロ修飾は、任意の位置に存在し得る。いくつかの実施形態では、アンチセンスは、5' 末端から、7、10、及び 11 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの他の実施形態では、センス鎖は、5' 末端から、7、9、10、及び 11 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の 5' 末端から数えて、アンチセンス鎖の 11、12、及び 15 位に対して対向する位置又は相補的な位置に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの他の実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の 5' 末端から数えて、アンチセンス鎖の 11、12、13、及び 15 位に対して対向する位置又は相補的な位置に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は、2 つ、3 つ、又は 4 つの 2' -フルオロヌクレオチドのブロックを含む。

【0540】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖内の二本鎖の熱的不安定化修飾に対向する位置又は相補的な位置に 2' -フルオロヌクレオチドを含まない。

【0541】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、21 ヌクレオチド (nt) のセンス鎖と 23 ヌクレオチド (nt) のアンチセンスとを含み、アンチセンス鎖は少なくとも 1 つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、少なくとも 1 つの熱不安定化ヌクレオチドはアンチセンス鎖のシード領域（アンチセンス鎖の 5' 末端の 2 ~ 9 位にある）内で生じるものであり、dsRNA の一方の末端が平滑である一方で他方の末端は 2 nt のオーバーハングを含み、dsRNA は、任意選択で、少なくとも 1 つ（例えば、1、2、3、4、5、6、又は 7 つ全て）の以下の特徴を更に含むものである：(i) アンチセンスは、2、3、4、5、又は 6 つの 2' -フルオロ修飾を含む、(ii) アンチセンスは、1、2、3、4、又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされる、(iv) センス鎖は、2、3、4、又は 5 つの 2' -フルオロ修飾を含む、(v) センス鎖は、1、2、3、4、又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、(vi) dsRNA は、少なくとも 4 つの 2' -フルオロ修飾を含む、及び (vii) dsRNA は、アンチセンス鎖の 5' 末端に平滑末端を含む。好ましくは、2 nt のオーバーハングは、アンチセンスの 3' 末端にある。

【0542】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を

含み、センス鎖は25～30ヌクレオチド残基の長さであり、5'末端ヌクレオチド(1位)から開始して、センス鎖の1～23位が少なくとも8のリボヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は36～66ヌクレオチド残基の長さであり、3'末端ヌクレオチドから開始して、これらの位置における少なくとも8個のリボヌクレオチドがセンス鎖の1～23位と対合して二本鎖を形成し、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合せず、最大6つの連続する3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、それによって1～6ヌクレオチドの3'の一本鎖オーバーハングを形成し、アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖と対合しない10～30個の連続するヌクレオチドから構成され、それによって10～30ヌクレオチドの一本鎖5'オーバーハングを形成し、少なくともセンス鎖5'末端及び3'末端ヌクレオチドは、センス及びアンチセンス鎖が相補性が最大となるようにアラインされる場合にアンチセンス鎖のヌクレオチドと塩基対合し、それによってセンス及びアンチセンス鎖の間に実質的に二本鎖の領域を形成し、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の長さの少なくとも19リボヌクレオチドに沿って標的RNAと十分に相補的であり、二本鎖の核酸が哺乳動物細胞に導入されたときに標的遺伝子発現を低減させ、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内(すなわち、アンチセンス鎖の5'末端の2～9位に)にある。例えば、熱的不安定化ヌクレオチドは、センス鎖の5'末端の14～17位に対向する位置又は相補的な位置の間で生じ、dsRNAは、任意選択で、以下の特徴のうちの少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、又は7つ全て)を更に有する：(i)アンチセンスは、2、3、4、5、又は6つの2'-フルオロ修飾を含む、(ii)アンチセンスは、1、2、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、(iii)センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされる、(iv)センス鎖は、2、3、4、又は5つの2'-フルオロ修飾を含む、(v)センス鎖は、1、2、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、及び(vi)dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含む、及び(vii)dsRNAは、12～30ヌクレオチド対の長さの二本鎖領域を含む。

【0543】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、該dsRNA分子は、少なくとも25ヌクレオチドであり最大で29ヌクレオチドである長さを有するセンス鎖と、最大30ヌクレオチドの長さであるアンチセンス鎖とを含み、センス鎖は、5'末端から11位にある酵素分解に感受性がある修飾ヌクレオチドを含むものであり、当該センス鎖の3'末端と当該アンチセンス鎖の5'末端とが平滑末端を形成し、当該アンチセンス鎖は、その3'末端においてセンス鎖よりも1～4ヌクレオチド長いものであり、二本鎖領域は少なくとも25ヌクレオチドの長さであり、該アンチセンス鎖は、該アンチセンス鎖の少なくとも19ntに沿って標的mRNAに対して十分に相補的であり、当該dsRNA分子が哺乳動物細胞に導入されたときに標的遺伝子発現を低減させ、該dsRNAのdicer切断が、優先的に、当該アンチセンス鎖の当該3'末端を含むsiRNAを結果としてもたらし、それによって哺乳動物細胞において標的遺伝子の発現が低減されるものであり、該アンチセンスは、少なくとも1つの熱的不安定化ヌクレオチドを含み、この少なくとも1つの熱的不安定化ヌクレオチドは、アンチセンスのシード領域内(すなわち、アンチセンス鎖の5'末端の2～9位に)にあり、dsRNAは、任意選択で、以下の特徴のうちの少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又は7つ全て)を更に有する：(i)アンチセンスは、2、3、4、5、又は6つの2'-フルオロ修飾を含む、(ii)アンチセンスは、1、2、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、(iii)センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされる、(iv)センス鎖は、2、3、4、又は5つの2'-フルオロ修飾を含む、(v)センス鎖は、1、2、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、及び(vi)dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含む、及び(vii)dsRNAは、12～29ヌクレオチド対の長さの二本鎖領域

域を有する。

【0544】

いくつかの実施形態では、dsRNA分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖内のどのヌクレオチドも修飾され得る。各ヌクレオチドは、同一の又は異なる修飾で修飾され得、これらの修飾としては、非連結ホスフェート酸素の一方若しくは両方の、又は連結ホスフェート酸素のうちの1つ以上のうちの1つ以上の改変、リボース糖の構成成分の改変、例えば、リボース糖上の2'ヒドロキシルの改変、ホスフェート部分の「脱リン酸化」リンカーでの大規模な置換、天然に存在する塩基の修飾又は置換、及びリボースホスフェート骨格の置換又は修飾が挙げられ得る。

【0545】

核酸はサブユニットのポリマーであるので、修飾の多くは、核酸内で反復される位置で生じ、例えば、塩基、又はホスフェート部分、又はホスフェート部分の非連結のOの修飾である。いくつかの場合、修飾は、核酸中の対象位置の全てにおいて生じることとなるが、多くの場合は、生じない。例として、修飾は、3'末端又は5'末端の位置においてのみ生じてもよく、末端領域においてのみ生じてもよく、例えば、鎖の末端ヌクレオチド上の位置、又は鎖の最後の2、3、4、5、若しくは10ヌクレオチドにおいて生じてもよい。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、又は両方において生じてもよい。修飾は、RNAの二本鎖領域内においてのみ生じてもよく、又はRNAの一本鎖領域内においてのみ生じてもよい。例えば、非連結のOの位置でのホスホロチオエート修飾は、一方又は両方の末端でのみ生じてもよく、末端領域においてのみ、例えば、鎖の末端ヌクレオチド上の位置又は最後の2、3、4、5、若しくは10ヌクレオチド内において生じてもよく、あるいは二本鎖及び一本鎖領域において、特に末端において、生じてもよい。5'末端（単数又は複数）はリン酸化することができる。

【0546】

それにより、例えば、安定性を増強すること、オーバーハング内に特定の塩基を含めること、あるいは一本鎖のオーバーハング内、例えば、5'オーバーハング若しくは3'オーバーハング内、又は両オーバーハング内に、修飾ヌクレオチド又はヌクレオチド代替物を含めることが可能であり得る。例えば、オーバーハング内にプリンヌクレオチドを含めることが望ましいことがある。いくつかの実施形態では、3'オーバーハング又は5'オーバーハング内の塩基の全て又は一部が、例えば、本明細書において記載する修飾で修飾されてもよい。修飾は、例えば、当技術分野で周知である修飾でのリボース糖の2'位における修飾の使用、例えば、核酸塩基のリボ糖の代わりに修飾された、デオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'-F）、又は2'-O-メチルの使用、及びホスフェート基における修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾、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。

【0547】

いくつかの実施形態では、センス鎖及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、又は2'-フルオロで修飾される。これら鎖は、2つ以上の修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、2'-O-メチル又は2'-フルオロで修飾される。これら修飾は、アンチセンス鎖内に存在する二本鎖の少なくとも1つの熱的不安定化修飾に付加されるということを理解されたい。

【0548】

少なくとも2つの異なる修飾が、典型的には、センス鎖及びアンチセンス鎖上に存在する。それらの2つの修飾は、2'-デオキシ、2'-O-メチル、又は2'-フルオロ修飾、非環式ヌクレオチドなどであってもよい。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、各々、2'-O-メチル又は2'-デオキシから選択される2つの異なるように修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド

、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)ヌクレオチド、2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル(2'-O-DMAE OE)ヌクレオチド、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)ヌクレオチド、又は2'-アラ- Fヌクレオチド(2'-ara- F nucleotide)で修飾される。ここでも、これら修飾は、アンチセンス鎖内に存在する二本鎖の少なくとも1つの熱的不安定化修飾に付加されるということを理解されたい。

【0549】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、特にB1、B2、B3、B1'、B2'、B3'、B4'領域における、交互パターン¹⁰の修飾を含む。「交互モチーフ」又は「交互パターン」という用語は、本明細書で使用する場合、1つ以上の修飾を有するモチーフを指し、各修飾は、一本の鎖の交互ヌクレオチド上で生じる。交互ヌクレオチドは、1つおきのヌクレオチド毎に1つ、又は3つのヌクレオチド毎に1つ、又は類似のパターンを指し得る。例えばA、B、及びCが、各々、ヌクレオチドに対する1タイプの修飾を表す場合、交互モチーフは、「ABABABABABAB...」、「AABBAABBAABBAAB...」、「AABBAABBAABBAAB...」、「AABBAABBAABBAAB...」、「AABBAABBAABBAAB...」、又は「ABCABCABCABC...」などであり得る。

【0550】

交互モチーフ内に含まれるこのタイプの修飾は、同一である場合も、異なっている場合もある。例えば、A、B、C、Dが、各々、ヌクレオチド上の1タイプの修飾を表す場合、交互パターンが、すなわち、1つおきのヌクレオチド上の修飾は、同一であり得るが、²⁰センス鎖又はアンチセンス鎖の各々は、例えば「ABABAB...」、「ACACAC...」、「BDBDBD...」、又は「CDCDCD...」などである交互モチーフの範囲内のいくつかの可能性のある修飾から選択され得る。

【0551】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、アンチセンス鎖上の交互モチーフの修飾パターンに対して相対的に移動されているセンス鎖上の交互モチーフの修飾パターンを含む。この移動は、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ように修飾された基に対応するようになされたものであってもよく、逆もまた同様である。例えば、センス鎖は、dsRNA二本鎖内のアンチセンス鎖と対合される場合には、センス鎖内の交互モチーフは、鎖の5'-3'から「ABABAB」で開始し³⁰てもよく、アンチセンス鎖内の交互モチーフは、二本鎖領域内の鎖の3'-5'から「BABAABA」で開始してもよい。別の例としては、センス鎖内の交互モチーフは、鎖の5'-3'から「AABBAABBA」で開始してもよく、アンチセンス鎖内の交互モチーフは、二本鎖領域内の鎖の3'-5'から「BBAABAABA」で開始してもよく、その結果、センス鎖及びアンチセンス鎖間の修飾パターンの完全な移動又は部分的な移動が存在するようになる。

【0552】

1つの特定の例では、センス鎖内の交互モチーフは、鎖の5'-3'から「ABABAB」であり、各Aは、非修飾リボヌクレオチドであり、各Bは、2'-Oメチル修飾ヌクレオチドである。⁴⁰

【0553】

1つの特定の例では、センス鎖内の交互モチーフは、鎖の5'-3'から「ABABAB」であり、各Aは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、各Bは、2'-Oメチル修飾ヌクレオチドである。

【0554】

別の特定の例では、アンチセンス鎖内の交互モチーフは、鎖の3'-5'から「BABAABA」であり、各Aは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、各Bは、2'-Oメチル修飾ヌクレオチドである。

【0555】

1つの特定の例では、センス鎖内の交互モチーフは、鎖の5'-3'から「ABABAB」⁵⁰

」であり、アンチセンス鎖内の交互モチーフは、鎖の 3' - 5 から「B A B A B A」であり、各 A は、未修飾リボヌクレオチドであり、各 B は、2' - O メチル修飾ヌクレオチドである。

【0556】

1つの特定の例では、センス鎖内の交互モチーフは、鎖の 5' - 3' から「A B A B A B」であり、アンチセンス鎖内の交互モチーフは、鎖の 3' - 5 から「B A B A B A」であり、各 A は、2' - デオキシ-2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり、各 B は、2' - O メチル修飾ヌクレオチドである。

【0557】

本開示の dsRNA 分子は、少なくとも 1つのホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結を更に含んでもよい。ホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾は、鎖の任意の位置にあるセンス鎖又はアンチセンス鎖又は両鎖のいずれかのヌクレオチド上で生じ得る。例えば、ヌクレオチド間連結修飾は、センス鎖若しくはアンチセンス鎖上のどのヌクレオチドで生じてもよく、各ヌクレオチド間連結修飾は、センス鎖若しくはアンチセンス鎖上で交互パターンで生じてもよく、又はセンス鎖若しくはアンチセンス鎖は、交互パターンで両方のヌクレオチド間連結修飾を含む。センス鎖上のヌクレオチド間連結修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一であっても異なってもよく、センス鎖上のヌクレオチド間連結修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド間連結修飾の交互パターンに対して相対的な移動があってもよい。

【0558】

いくつかの実施形態では、dsRNA 分子は、オーバーハング領域内にホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチドを含むものであって、これら2つのヌクレオチドの間にホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結を有する、2つのヌクレオチドを含む。ヌクレオチド間連結修飾はまた、オーバーハングヌクレオチドを二本鎖領域内の末端の対合されるヌクレオチドと連結させるようになされてもよい。例えば、少なくとも 2、3、4、又は全てのオーバーハングヌクレオチドは、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結によって連結されてもよく、任意選択で、オーバーハングヌクレオチドを、オーバーハングヌクレオチドと隣接する対合したヌクレオチドと連結する更なるホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結が存在してもよい。例えば、3つのヌクレオチドのうち2つがオーバーハングヌクレオチドであり、3番目が、オーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドであるような、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ヌクレオチド間連結が存在してもよい。好ましくは、これら末端の3つのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の 3' 末端にあり得る。

【0559】

いくつかの実施形態では、dsRNA 分子のセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又は16個のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される2~10個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1~10個のブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該センス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むアンチセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

【0560】

いくつかの実施形態では、dsRNA 分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、又は18個のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される2個のホスホロチオエート又はメチルホ

スホネートのヌクレオチド間連結の2個のブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

【0561】

いくつかの実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又は16のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される3個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の2個のブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

10

【0562】

いくつかの実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14個のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される4個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の2個のブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

20

【0563】

いくつかの実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12個のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される5個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の2個のブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

30

【0564】

いくつかの実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される6個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の2個のブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

40

【0565】

いくつかの実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、又は8個のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される7個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の2個のブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該アンチセンス鎖は、ホスホロチ

50

オエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

【0566】

いくつかの実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、又は6個のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される8個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の2個のブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

10

【0567】

いくつかの実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、又は4個のホスフェートヌクレオチド間連結によって分離される9個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の2つのブロックを含むものであり、このホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結の1個は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、当該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びホスフェートのヌクレオチド間連結のいずれかの組み合わせを含むセンス鎖と又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネート若しくはホスフェート連結のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

20

【0568】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス又はアンチセンス鎖の末端の1～10位の範囲内に1つ以上のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾を更に含む。例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のヌクレオチドが、センス又はアンチセンス鎖の一方の末端又は両末端においてホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結を介して連結され得る。

【0569】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス又はアンチセンス鎖の各々の二本鎖の内部領域の1～10の範囲内に1個以上のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾を更に含む。例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のヌクレオチドが、センス鎖の5'末端から数えて二本鎖領域の8～16位にあるホスホロチオエートメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾を介して連結されてもよく、dsRNA分子は、任意選択で、その末端の1～10位の範囲内に1個以上のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾を更に含んでもよい。

30

【0570】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1～5位の範囲内に1～5個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内に1～5個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における1～5個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内の1～5個とを更に含む。

40

【0571】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1～5位の範囲内に1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内に1個のホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内の2個のホスホロチオエート

50

又はメチルホスホネートのヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

【0572】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 末端から数えて）1～5 位の範囲内に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内に 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の（5' 末端から数えて）1 及び 2 位における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

【0573】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 末端から数えて）1～5 位の範囲内に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の（5' 末端から数えて）1 及び 2 位における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

10

【0574】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 末端から数えて）1～5 位の範囲内に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の（5' 末端から数えて）1 及び 2 位における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

20

【0575】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 末端から数えて）1～5 位の範囲内に 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内に 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の（5' 末端から数えて）1 及び 2 位における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

【0576】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 末端から数えて）1～5 位の範囲内に 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内に 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の（5' 末端から数えて）1 及び 2 位における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

30

【0577】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 末端から数えて）1～5 位の範囲内に 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の（5' 末端から数えて）1 及び 2 位における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

40

【0578】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 末端から数えて）1～5 位の範囲内に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の（5' 末端から数えて）1 及び 2 位における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と 18～23 位の範囲内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

【0579】

いくつかの実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 末端から数え

50

て) 1～5位の範囲内に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内に1個、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内の1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

【0580】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1～5位の範囲内に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内に1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内の2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

10

【0581】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1～5位の範囲内に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内に1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と18～23位の範囲内の2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

【0582】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と20及び21位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と21位における1個とを更に含む。

20

【0583】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と21位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と20及び21位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

30

【0584】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と21及び22位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と21位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

【0585】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と21位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と21及び22位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

40

【0586】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数えて)1及び2位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と22及び23位における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、並びにアンチセンス鎖の(5'末端から数えて)1位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と21位における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを更に含む。

【0587】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'末端から数え

50

【 0 5 8 8 】

50

は、キラルでない1個以下のヌクレオチド間連結を含む。いくつかの実施形態では、骨格キラル中心の通常のパターンは、S p 立体配置にある少なくとも10個のヌクレオチド間連結と、キラルでない8個以下のヌクレオチド間連結とを含む。いくつかの実施形態では、骨格キラル中心の通常のパターンは、S p 立体配置にある少なくとも11個のヌクレオチド間連結と、キラルでない7個以下のヌクレオチド間連結とを含む。いくつかの実施形態では、骨格キラル中心の通常のパターンは、S p 立体配置にある少なくとも12個のヌクレオチド間連結と、キラルでない6個以下のヌクレオチド間連結とを含む。いくつかの実施形態では、骨格キラル中心の通常のパターンは、S p 立体配置にある少なくとも13個のヌクレオチド間連結と、キラルでない6個以下のヌクレオチド間連結とを含む。いくつかの実施形態では、骨格キラル中心の通常のパターンは、S p 立体配置にある少なくとも14個のヌクレオチド間連結と、キラルでない5個以下のヌクレオチド間連結とを含む。いくつかの実施形態では、骨格キラル中心の通常のパターンは、S p 立体配置にある少なくとも15個のヌクレオチド間連結と、キラルでない4個以下のヌクレオチド間連結とを含む。いくつかの実施形態では、S p 立体配置にあるヌクレオチド間連結は、任意選択で、連続しているか、又は連続していない。いくつかの実施形態では、R p 立体配置にあるヌクレオチド間連結は、任意選択で、連続しているか、又は連続していない。いくつかの実施形態では、キラルでないヌクレオチド間連結は、任意選択で、連続しているか、又は連続していない。

10

【0589】

いくつかの実施形態では、本開示の化合物は、立体化学ブロックであるブロックを含む。いくつかの実施形態では、ブロックは、ブロックの各ヌクレオチド間連結がR p であるという点で、R p ブロックである。いくつかの実施形態では、5' - ブロックは、R p ブロックである。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、R p ブロックである。いくつかの実施形態では、ブロックは、ブロックの各ヌクレオチド間連結がS p であるという点で、S p ブロックである。いくつかの実施形態では、5' - ブロックは、S p ブロックである。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、S p ブロックである。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、R p ブロックとS p ブロックとの両方を含む。いくつかの実施形態では、提供されたオリゴヌクレオチドは、1つ以上のR p ブロックを含むが、S p ブロックを含まない。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のS p ブロックを含むが、R p ブロックを含まない。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のP O ブロックであって、各ヌクレオチド間連結が天然のホスフェート連結である、P O ブロックを含む。

20

30

【0590】

いくつかの実施形態では、本開示の化合物は、各糖部分が2' - F 修飾を含むS p ブロックである、5' - ブロックを含む。いくつかの実施形態では、5' - ブロックは、ヌクレオチド間連結の各々が修飾ヌクレオチド間連結であり、各糖部分が2' - F 修飾を含む、S p ブロックである。いくつかの実施形態では、5' - ブロックは、ヌクレオチド間連結の各々がホスホロチオエート連結であり、各糖部分が2' - F 修飾を含む、S p ブロックである。いくつかの実施形態では、5' - ブロックは、4以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの実施形態では、5' - ブロックは、5以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの実施形態では、5' - ブロックは、6以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの実施形態では、5' - ブロックは、7以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、各糖部分が2' - F 修飾を含む、S p ブロックである。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、ヌクレオチド間連結の各々が修飾ヌクレオチド間連結であり、各糖部分が2' - F 修飾を含む、S p ブロックである。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、ヌクレオチド間連結の各々がホスホロチオエート連結であり、各糖部分が2' - F 修飾を含む、S p ブロックである。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、4以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、5以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、6以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの実施形態では、3' - ブロックは、7以上の

40

50

ヌクレオシド単位を含む。

【0591】

いくつかの実施形態では、本開示の化合物は、ある領域内にあるタイプのヌクレオシドを含むか、又はオリゴヌクレオチドに、特定のタイプのヌクレオチド間連結が続くものであり、これは例えば、天然のホスフェート連結、修飾ヌクレオチド間連結、R pキラルヌクレオチド間連結、S pキラルヌクレオチド間連結などである。いくつかの実施形態では、Aに、S pが続く。いくつかの実施形態では、Aに、R pが続く。いくつかの実施形態では、Aに、天然のホスフェート連結（P O）が続く。いくつかの実施形態では、Uに、S pが続く。いくつかの実施形態では、Uに、R pが続く。いくつかの実施形態では、Uに、天然のホスフェート連結（P O）が続く。いくつかの実施形態では、Cに、S pが続く。いくつかの実施形態では、Cに、R pが続く。いくつかの実施形態では、Cに、天然のホスフェート連結（P O）が続く。いくつかの実施形態では、Gに、S pが続く。いくつかの実施形態では、Gに、R pが続く。いくつかの実施形態では、Gに、天然のホスフェート連結（P O）が続く。いくつかの実施形態では、C及びUに、S pが続く。いくつかの実施形態では、C及びUに、R pが続く。いくつかの実施形態では、C及びUに、天然のホスフェート連結（P O）が続く。いくつかの実施形態では、A及びGに、S pが続く。いくつかの実施形態では、A及びGに、R pが続く。

10

【0592】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの21位と22位との間、及びヌクレオチドの22位と23位との間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むものであり、このアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわち、アンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、dsRNAは、任意選択で、以下の特徴のうちの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、又は8つ全て）を更に有する：（i）アンチセンスは、2、3、4、5、又は6つの2'-フルオロ修飾を含む、（ii）アンチセンスは、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされる、（iv）センス鎖は、2、3、4、又は5つの2'-フルオロ修飾を含む、（v）センス鎖は、1、2、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、（vi）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含む、（vii）dsRNAは、12～40ヌクレオチド対の長さの二本鎖領域を含む、及び（viii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端において平滑末端を有する。

20

30

【0593】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの1位と2位との間、ヌクレオチドの2位と3位との間、ヌクレオチドの21位と22位との間、及びヌクレオチドの22位と23位との間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むものであり、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわち、アンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、dsRNAは、任意選択で、以下の特徴のうちの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、又は8つ全て）を更に有する：（i）アンチセンスは、2、3、4、5、又は6つの2'-フルオロ修飾を含む、（ii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされる、（iii）センス鎖は、2、3、4、又は5つの2'-フルオロ修飾を含む、（iv）センス鎖は、1、2、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、（v）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含む、（vi）dsRNAは、12～40ヌクレオチド対の長さの二本鎖領域を含む、（vii）dsRNAは、12～40ヌクレオチド対の長さの二本鎖領域を含む、及び（viii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端において平滑末端を有する。

40

【0594】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、ヌクレオチドの1位と2位との間、ヌクレオチドの2位と3位との間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むものであり、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわち、アンチセンス鎖の5'末端

50

の2～9位に)位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、dsRNAは、任意選択で、以下の特徴のうちの少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、又は8つ全て)を更に有する:(i)アンチセンスは、2、3、4、5、又は6つの2'-フルオロ修飾を含む、(ii)アンチセンス鎖は、1、2、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、(iii)センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされる、(iv)センス鎖は、2、3、4、又は5つの2'-フルオロ修飾を含む、(v)センス鎖は、3、4、又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、(vi)dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含む、(vii)dsRNAは、12～40ヌクレオチド対の長さの二本鎖領域を含む、及び(viii)dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端において平滑末端を有する。

10

【0595】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、ヌクレオチドの1位と2位との間、及びヌクレオチドの2位と3位との間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの1位と2位との間、ヌクレオチドの2位と3位との間、ヌクレオチドの21位と22位との間、及びヌクレオチドの22位と23位との間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むものであり、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に(すなわち、アンチセンス鎖の5'末端の2～9位に)位置する二本鎖の少なくとも1つの熱的不安定化修飾を含み、dsRNAは、任意選択で、以下の特徴のうちの少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、又は7つ全て)を更に有する:(i)アンチセンスは、2、3、4、5、又は6つの2'-フルオロ修飾を含む、(ii)セ

20

【0596】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、標的との、二本鎖内のミスマッチ、又はそ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又は二本鎖領域内に生じ得る。塩基対は、解離又は融解を促進するそれらがもつ傾向に基づいて格付けされ得る(例えば、特定の対合の会合又は解離の自由エネルギーに基づくものであり、最も単純なアプローチとしては、個々の対ごとに対を調べることであるが、隣り合う又は類似した分析も使用可能である)。解離の促進の点では、A:UはG:Cより好ましく、G:UはG:Cより好ましく、I:CはG:Cより好ましい(I=イノシン)。ミスマッチ、例えば、非標準の対合又は標準以外の対合(本明細書において別の箇所に記載される)が、標準(A:T、A:U、G:C)の対合より好ましく、ユニバーサル塩基を含む対合が、標準の対合より好ましい。

30

【0597】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、A:U、G:U、I:Cの群から独立して選択され得るアンチセンス鎖の5'末端から二本鎖領域内の最初の1、2、3、4、又は5塩基対、及びミスマッチ対、例えば、非標準の対合又は標準以外の対合又はユニバーサル塩基を含む対合のうちの少なくとも1つを含み、二本鎖の5'末端においてアンチセンス鎖の解離を促進する。

40

【0598】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖内の5'末端から二本鎖領域内の1位におけるヌクレオチドは、A、dA、dU、U、及び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'末端から二本鎖領域内の最初の1、2、又は3塩基対のうち少なくとも1つは、AU塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の5'末端から二本鎖領域内の最初の塩基対が、AU塩基対である。

【0599】

50

一本鎖又は二本鎖のオリゴヌクレオチドの任意の位置において、ジヌクレオチドのホスホジエステル（PO）、ホスホロチオエート（PS）又はホスホロジチオエート（PS₂）連結の3'末端に、4'修飾又は5'修飾のヌクレオチドを導入することで、ヌクレオチド間連結に対する立体効果を発揮させることができ、そのため、ヌクレアーゼに対してそれを保護又は安定化させるということが見出された。

【0600】

いくつかの実施形態では、5'修飾ヌクレオシドが、一本鎖又は二本鎖のsiRNAの任意の位置において、ジヌクレオチドの3'末端に導入される。例えば、5'-アルキル化ヌクレオシドを、一本鎖又は二本鎖のsiRNAの任意の位置において、ジヌクレオチドの3'末端に導入できる。リボース糖の5'位にあるアルキル基は、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体であり得る。例示的な5'-アルキル化ヌクレオシドは、5'-メチルヌクレオシドである。5'-メチルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。

【0601】

いくつかの実施形態では、4'修飾ヌクレオシドが、一本鎖又は二本鎖のsiRNAの任意の位置において、ジヌクレオチドの3'末端に導入される。例えば、4'-アルキル化ヌクレオシドを、一本鎖又は二本鎖のsiRNAの任意の位置において、ジヌクレオチドの3'末端に導入できる。リボース糖の4'位にあるアルキル基は、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体であり得る。例示的な4'-アルキル化ヌクレオシドとしては、4'-メチルヌクレオシドがある。4'-メチルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。あるいは、4'-O-アルキル化ヌクレオシドを、一本鎖又は二本鎖のsiRNAの任意の位置において、ジヌクレオチドの3'末端に導入できる。リボース糖の4'-O-アルキルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体であり得る。例示的な4'-O-アルキル化ヌクレオシドは、4'-O-メチルヌクレオシドである。4'-O-メチルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。

【0602】

いくつかの実施形態では、5'-アルキル化ヌクレオシドが、dsRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖の任意の位置において導入され、このような修飾は、dsRNAの効力を維持又は向上させる。5'-アルキルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。例示的な5'-アルキル化ヌクレオシドは、5'-メチルヌクレオシドである。5'-メチルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。

【0603】

いくつかの実施形態では、4'-アルキル化ヌクレオシドが、dsRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖の任意の位置において導入され、このような修飾は、dsRNAの効力を維持又は向上させる。4'-アルキルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。例示的な4'-アルキル化ヌクレオシドは、4'-メチルヌクレオシドである。4'-メチルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。

【0604】

いくつかの実施形態では、4'-O-アルキル化ヌクレオシドは、dsRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖の任意の位置において導入され、このような修飾は、dsRNAの効力を維持又は向上させる。5'-アルキルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。例示的な4'-O-アルキル化ヌクレオシドは、4'-O-メチルヌクレオシドである。4'-O-メチルは、ラセミ体又はキラル的に純粋なR異性体若しくはS異性体のいずれかであり得る。

【0605】

いくつかの実施形態では、本開示のdsRNA分子は、2'-5'連結（2'-H、2'-OH及び2'-OMeを有し、P=O又はP=Sを有する）を含み得る。例えば、2'-5'

’ 連結修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するために、若しくはセンス鎖のアンチセンス鎖への結合を阻害するために使用することができ、又は RISC によるセンス鎖の活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端において使用することができる。

【0606】

別の実施形態では、本開示の dsRNA 分子は、L 糖（例えば、2'-H、2'-OH、及び 2'-OMe を有する リボース、L-アラビノース）を含み得る。例えば、これらの L 糖修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するために、若しくはセンス鎖のアンチセンス鎖への結合を阻害するために使用することができ、又は RISC によるセンス鎖の活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端において使用することができる。

【0607】

種々の刊行物に多量体 siRNA が記載されており、これらは全て、本開示の dsRNA とともに使用することができる。当該公開公報としては、WO2007/091269、US7858769、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887、及び WO2011/031520 が挙げられ、それら各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0608】

以下により詳細に記載するように、RNAi 剤への 1 つ以上の炭水化物部分のコンジュゲーションを含む RNAi 剤は、RNAi 剤の 1 つ以上の特性を最適化することができる。多くの場合、炭水化物部分は、RNAi 剤の修飾サブユニットに結合させることとなる。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、別の部分で、例えば、炭水化物リガンドが結合する非炭水化物（好ましくは、環式の）の担体で置換することができる。リボヌクレオチドのサブユニットであって、該サブユニットリボース糖がそのように置換されているリボヌクレオチドサブユニットを、本明細書においては、リボース置換修飾サブユニット（RRMS）と称する。環式担体は、環状炭素系であってもよく、すなわち、全ての環原子が炭素原子であるか、又は複素環系であり、すなわち、1 つ以上の環原子が、ヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、硫黄であってもよい。環式担体は、単環式環系であってもよく、又は 2 つ以上の環、例えば、縮合環を含んでもよい。環式担体は、完全に飽和の環系であってもよく、又は 1 つ以上の二重結合を含んでもよい。

【0609】

リガンドは、担体を介してポリヌクレオチドに結合してもよい。担体は、(i) 少なくとも 1 つの「骨格結合点」、好ましくは 2 つの「骨格結合点」と、(ii) 少なくとも 1 つの「係留結合点」とを含む。「骨格結合点」とは、本明細書で使用する場合、例えば、ヒドロキシル基である官能基を指し、又は概して結合であって、リボ核酸の骨格、例えば、ホスフェート、若しくは例えば、硫黄含有である修飾ホスフェートの骨格である骨格内に担体を組み込むために利用可能であり好適である結合を指す。いくつかの実施形態における「係留結合点」（TAP）とは、選択された部分を接続する環式担体の構成環原子、例えば、炭素原子又はヘテロ原子（骨格結合点を提供する原子とは別の）を指す。この部分は、例えば、炭水化物、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、及び多糖であり得る。任意選択で、選択部分は、介在する係留によって環式担体に接続される。このため、環式担体は、多くの場合、官能基、例えば、アミノ基を含む、又は概して、結合であって、構成する環への、例えば、リガンドである別の化学的実体の組み込み若しくは係留に好適な結合を提供することとなる。

【0610】

RNAi 剤は、担体を介してリガンドにコンジュゲートされてもよく、担体は、環式基であることも非環式基であることもでき、好ましくは、環式基は、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] ジオキサラン、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、及びデカリンであり、好ましくは、非環式基は、セリノール骨格又はジエタノ

10

20

30

40

50

ールアミン骨格から選択される。

【0611】

ある特定の実施形態では、本開示の方法で使用するRNAi剤は、表2、3、5、6、8、9、10A、10B、10C、10D、11、及び12のうちのいずれか1つに列記された薬剤の群から選択される剤である。これらの薬剤は、リガンドを更に含み得る。

【0612】

IV. リガンドにコンジュゲートされたiRNA

本発明のiRNAのRNAの別の修飾は、iRNAの活性、細胞分布、又は例えば細胞内への細胞取り込みを増強する1つ以上のリガンド、部分、又はコンジュゲートと、iRNAを化学的に連結することを含む。こうした部分としては、限定するものではないが、脂質部分、例えばコレステロール部分 (Lettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556)、コール酸 (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1053-1060)、チオエーテル、例えば、ベリル-S-トリチルチオール (beryl-S-tritylthiol) (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660: 306-309、Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3: 2765-2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20: 533-538)、脂肪鎖、例えば、ドデカンジオール残基若しくはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10: 1111-1118、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259: 327-330、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75: 49-54)、リン脂質、例えば、ジヘキサデシル-rac-グリセロール若しくはトリエチルアンモニウム 1, 2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-ホスホネート (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651-3654、Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18: 3777-3783)、ポリアミン若しくはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14: 969-973)、又はアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264: 229-237)、又はオクタデシルアミン若しくはヘキサシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277: 923-937) が挙げられる。

【0613】

ある特定の実施形態では、リガンドは、それが組み込まれるiRNA剤の分布、標的化、又は寿命を変化させる。いくつかの実施形態では、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た場合に、選択された標的に対する、例えば、分子、細胞又は細胞型、例えば、細胞又は臓器のコンパートメントなどのコンパートメント、組織、身体の器官又は領域に対する、親和性の増強をもたらす。典型的なリガンドは、二本鎖核酸において二本鎖対合に関与しない。

【0614】

リガンドとしては、タンパク質などの天然に存在する物質 (例えば、ヒト血清アルブミン (HSA)、低密度リポタンパク質 (LDL)、又はグロブリン)、炭水化物 (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、又はヒアルロン酸)、又は脂質を挙げることができる。リガンドはまた、合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸など、組換え又は合成分子であってもよい。ポリアミノ酸の例としては、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-

無水マレイン酸共重合体、ポリ（ L -ラクチド-コ-グリコリド（ L -lactide-co-glycolide））共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体、 N -（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド共重合体（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（poly（2-ethylacrylic acid）））、 N -イソプロピルアクリルアミドポリマー又はポリホスファジンであるポリアミノ酸が挙げられる。ポリアミンの例としては、ポリエチレンジアミン、ポリリジン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド-ポリアミン、ペプチドミメティックポリアミン、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、カチオン性ポリフィリン、ポリアミンの第四級塩、又は α ヘリックスペプチドが挙げられる。

10

【0615】

リガンドには、標的化基、例えば、細胞又は組織標的化剤、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質又はタンパク質、例えば、腎細胞などの特定の細胞種に結合する抗体も含まれ得る。標的化基は、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤プロテインA、ムチン炭水化物、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、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、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビオチン、又はRGDペプチド若しくはRGDペプチド模倣体であり得る。ある特定の実施形態では、リガンドは、多価ガラクトース、例えば、 N -アセチル-ガラクトサミンである。

20

【0616】

リガンドの他の例としては、色素、挿入剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ソラーレン、マイトマイシンC）、ポリフィリン（TPPC4、テキサフィリン（texaphyrin）、サフィリン（Sapphyrin））、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（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-ピレンブタン酸、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、 O 3-（オレオイル）リトコール酸、 O 3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、又はフェノキサジン）及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、ホスフェート、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／吸収促進物質（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、テトラアザマクロサイクルのEu³⁺錯体）、ジニトロフェニル、HRP、又はAPが挙げられる。

30

40

【0617】

リガンドは、タンパク質、例えば、糖タンパク質又はペプチド、例えば、共リガンドに対して特異的親和性を有する分子、又は抗体、例えば、がん細胞、内皮細胞又は骨細胞などの特定の細胞種に結合する抗体であり得る。リガンドにはまた、ホルモン及びホルモン受容体が含まれてもよい。これらにはまた、非ペプチド種、例えば脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、コファクタ、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、又は多価フコースが含まれ得る。リガンドは、例えば、リポ多糖、p38 MAPキナーゼのアクチベーター、又はNF- κ Bのアクチベーターであり得る。

【0618】

50

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格系を破壊することによって、例えば、細胞の微小管、微小線維、又は中間径線維を破壊することによって、細胞内へのiRNA剤の取り込みを増大し得る物質、例えば、薬物であり得る。薬物は、例えば、タキソン(taxon)、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、ジャスプラキノリド、ラトルンクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA(swinholide A)、インダノシン(indanocine)、又はミオセルビン(myoservin)であり得る。

【0619】

いくつかの実施形態では、本明細書において記載するiRNAに結合するリガンドは、薬物動態モジュレーター(PKモジュレーター)として作用する。PKモジュレーターとしては、親油性物質、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、ジアルキルグリセリド、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、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチンなどが挙げられる。いくつかのホスホロチオエート連結を含むオリゴヌクレオチドはまた、血清タンパク質に結合することがわかっており、したがって骨格中に複数のホスホロチオエート連結を含む短いオリゴヌクレオチド、例えば、約5塩基、10塩基、15塩基、又は20塩基のオリゴヌクレオチドもまた、リガンドとして(例えば、PK調節リガンドとして)本発明に適している。更に、血清成分(例えば、血清タンパク質)を結合するアプタマーもまた、本明細書において記載する実施形態においてPK調節リガンドとして使用するのに適している。

【0620】

本発明のリガンドがコンジュゲートしたiRNAは、反応性官能性ペンダント側鎖を有するオリゴヌクレオチドの使用によって合成でき、例えば、このペンダント側鎖はこのオリゴヌクレオチド(以下に記載される)上への連結分子の結合に由来するものなどである。この反応性オリゴヌクレオチドを、市販のリガンド、種々の保護基のいずれかを有する合成されたリガンド、又はそれに結合する連結部分を有するリガンドと、直接反応させてもよい。

【0621】

本発明のコンジュゲートにおいて使用するオリゴヌクレオチドは、固相合成の周知の技術によって好都合に、ごく普通に作製できる。こうした合成のための機器は、例えばApplied Biosystems(登録商標)(Foster City, Calif.)を含むいくつかの業者によって販売されている。当技術分野で既知の当該合成のための任意の他の手段を、追加的に又は代替的に採用してもよい。ホスホロチオエート及びアルキル化誘導体などの他のオリゴヌクレオチドを調製する同様の技法を使用することも知られている。

【0622】

本発明のリガンドがコンジュゲートしたオリゴヌクレオチド及びリガンド分子を保有する配列特異的な連結ヌクレオシドにおいて、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオシドは、標準ヌクレオチド又はヌクレオシドの前駆体を利用する好適なDNAシンセサイザー、又は連結部分を既に保有するヌクレオチド若しくはヌクレオシドのコンジュゲート前駆体、リガンド分子を既に保有するリガンドヌクレオチド若しくはリガンドヌクレオシドのコンジュゲート前駆体、又は非ヌクレオシドリガンド保有構成単位上において組み立てられ得る。

【0623】

連結部分を既に保有するヌクレオチド-コンジュゲート前駆体を使用する場合には、典型的に、配列特異的に連結されるヌクレオシドの合成が完了してから、次いで、リガンド分子が連結部分と反応して、リガンドがコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを形成する。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド又は連結ヌクレオシドは、市販の、オリゴヌクレオチド合成でごく普通に使用する標準ホスホルアミダイト及び非標準

ホスホルアミダイトに加えて、リガンドーヌクレオシドコンジュゲートから誘導したホスホルアミダイトを使用して、自動化シンセサイザーによって合成される。

【0624】

A. 脂質コンジュゲート

ある特定の実施形態では、リガンド又はコンジュゲートは、脂質又は脂質系分子である。このような脂質又は脂質系分子は、典型的には、血清タンパク質を、例えばヒト血清アルブミン（HSA）を結合できる。HSA結合性リガンドは、身体の標的組織への、例えば、腎臓でない標的組織への、コンジュゲートの分布を可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含めた肝臓であり得る。HSAを結合可能である他の分子もまた、リガンドとして使用できる。例えば、ナプロキセン又はアスピリンを使用することができる。脂質又は脂質系リガンドは、（a）コンジュゲートの分解に対する耐性を増大させること、（b）標的細胞若しくは細胞膜内への標的化若しくは輸送を増大させること、又は（c）血清タンパク質、例えば、HSAへの結合を調整するために使用すること、ができる。

10

【0625】

脂質系リガンドを使用して、コンジュゲートの標的組織への結合を調節、例えば、制御（例えば、阻害）することができる。例えば、より強力にHSAに結合する脂質又は脂質系リガンドは、腎臓を標的とする可能性が低く、したがって身体から排除される可能性が低くなる。コンジュゲートが腎臓を標的とするように、あまり強力にHSAに結合しない脂質又は脂質系リガンドを使用することができる。

20

【0626】

ある特定の実施形態では、脂質系リガンドは、HSAを結合する。例えば、リガンドは、十分な親和性でHSAに結合でき、その結果、非腎臓組織へのコンジュゲートの分布が増強される。しかしながら、この親和性は、典型的には、HSA-リガンド間結合を元に戻すことができないほど強力ではない。

【0627】

ある特定の実施形態では、脂質系リガンドは、HSAに弱く結合するか、又は全く結合せず、その結果、腎臓へのコンジュゲートの分布が増強される。脂質系リガンドの代わりに、又は脂質系リガンドに加えて、腎臓細胞を標的とする他の部分も使用することができる。

【0628】

別の態様では、リガンドは、標的細胞、例えば、増殖性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、悪性又は非悪性種の、例えば、がん細胞の望まれない細胞増殖を特徴とする障害の治療に特に有用である。例示的なビタミンとしては、ビタミンA、E、及びKが挙げられる。他の例示的なビタミンは、ビタミンB、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ピオチン、ピリドキサル、又はがん細胞に取り込まれる他のビタミン若しくは栄養素である。HSA及び低比重リポタンパク（LDL）も含まれる。

30

【0629】

B. 細胞透過剤

別の態様では、リガンドは、ヘリックス細胞透過剤などの細胞透過剤である。ある特定の実施形態では、細胞透過剤は、両親媒性である。例示的な細胞透過剤は、tat又はアンテナペディアなどのペプチドである。薬剤がペプチドである場合、これは、ペプチジル模倣体、逆転異性体、非ペプチド又はシュードペプチドの連結及びD-アミノ酸の使用を含めて、修飾可能である。ヘリックス剤は、典型的には、 α -ヘリックス剤であり、親油性及び疎油性相を有し得る。

40

【0630】

リガンドは、ペプチド又はペプチド模倣体であり得る。ペプチド模倣体（本明細書においてオリゴペプチド模倣体とも称する）は、天然ペプチドと類似する規定された三次元構造にフォールディング可能な分子である。ペプチド及びペプチド模倣体のiRNA剤への結合は、細胞認識及び吸収を増強することなどによって、iRNAの薬物動態分布に影響

50

を及ぼすことができる。ペプチド又はペプチド模倣体部分は、約5～50アミノ酸長、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は50アミノ酸長であり得る。

【0631】

ペプチド又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、両親媒性ペプチド又は疎水性ペプチド（例えば、主にTyr、Trp、又はPheからなる）であり得る。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、拘束されたペプチド又は架橋されたペプチドであり得る。別の選択肢としては、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_____）を有するRFGFである。疎水性MTSを含むRFGF類似体（例えば、アミノ酸配列AALLPVLLAAP（配列番号_____））も、標的化部分であり得る。ペプチド部分は、細胞膜を横断してペプチド、オリゴヌクレオチド、及びタンパク質を含む大きな極性分子を運搬することができる、「送達」ペプチドであり得る。例えば、HIV Tatタンパク質（GRKKRRQRRRPPQ（配列番号_____））及びDrosophila Antennapediaタンパク質（RQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号_____））からの配列が、送達ペプチドとして機能できることがわかっている。ペプチド又はペプチド模倣体は、ファージディスプレイライブラリー又はワンビードワンコンパウンド（one-bead-one-compound）（OBOC）コンビナトリアルライブラリー（Lam et al., Nature, 354: 82-84, 1991）から特定されるペプチドなど、DNAのランダム配列によってコードされ得る。典型的には、組み込まれたモノマー単位を介してdsRNA剤に係留されるペプチド又はペプチド模倣体は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）-ペプチド又はRGD模倣体などの細胞標的化ペプチドである。ペプチド部分は、長さが、約5アミノ酸～約40アミノ酸の範囲であり得る。ペプチド部分は、例えば安定性を増大させる又は立体配座特性を司るなどの構造的な修飾を有し得る。以下に記載する構造的な修飾のいずれも利用可能である。

【0632】

本発明の組成物及び方法において使用するためのRGDペプチドは、直鎖状であっても環状であってもよく、特定の組織へのターゲティングを促進するように修飾、例えば、グリコシル化又はメチル化されてもよい。RGD含有ペプチド及びペプチジオ模倣体（peptidomimetic）は、D-アミノ酸及び合成RGD模倣体を含んでもよい。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ができる。このリガンドの好ましいコンジュゲートは、PECAM-1又はVEGFを標的とする。

【0633】

RGDペプチド部分を、特定の細胞種、例えば、内皮腫瘍細胞又は乳がん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ペプチドにより、dsRNA剤の肺、腎臓、脾臓、又は肝臓を含む様々な他の組織の腫瘍へ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）。典型的には、RGDペプチドは、iRNA剤の腎臓への標的化を促進することとなる。RGDペプチドは、直鎖状であることも環状であることもでき、特定の組織への標的化を促進するように修飾すること、例えば、グリコシル化又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）。

【0634】

「細胞透過ペプチド」は、細胞に、例えば、バクテリア細胞若しくは真菌細胞などの微生物細胞、又はヒト細胞などの哺乳動物細胞に、透過可能である。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば α -ヘリックス直鎖ペプチド（例えば、LL-37又はCeropin

10

20

30

40

50

P 1)、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えば、 α -デフェンシン、 β -デフェンシン、又はバクテネシン（*bactenecin*））又は1つ若しくは2つの支配的なアミノ酸のみを含むペプチド（例えば、PR-39又はインドリジン）であり得る。細胞透過性ペプチドはまた、核移行シグナル（NLS）を含み得る。例えば、細胞透過性ペプチドは、HI V-1 gp 41とSV 40 ラージ T 抗原の NLS との融合ペプチドドメインに由来する、例えばMPGなどである、二部分の両親媒性ペプチドであり得る（Simeoni et al., *Nucl. Acids Res.* 31: 2717-2724, 2003）。

【0635】

C. 炭水化物コンジュゲート

本発明の組成物及び方法のいくつかの実施形態では、iRNAは、炭水化物を更に含む。炭水化物をコンジュゲートしたiRNAは、本明細書に記載するように、核酸のインビボでの送達に有利であると同時にインビボでの治療的使用に好適な組成物である。本明細書において使用する場合、「炭水化物」は、各炭素原子に結合した酸素、窒素、若しくは硫黄原子とともに少なくとも6個の炭素原子を有する1個以上の単糖単位で構成されている炭水化物自体（直鎖状、分枝、又は環状であり得る）、又はその一部として、各炭素原子に結合した酸素、窒素、若しくは硫黄原子とともに各々が少なくとも6個の炭素原子を有する1個以上の単糖単位で構成されている炭水化物部分（直鎖状、分枝、又は環状であり得る）を有する化合物、のいずれかである化合物を指す。代表的な炭水化物としては、糖（単糖、二糖、三糖、及び約4、5、6、7、8、又は9の単糖単位を含むオリゴ糖）並びに多糖、例えばデンプン、グリコーゲン、セルロース、及び多糖類樹脂、が挙げられる。特定の単糖としては、C5、及び上記の（例えば、C5、C6、C7、又はC8）糖が挙げられ、二糖及び三糖としては、2又は3の単糖単位（例えば、C5、C6、C7、又はC8）を有する糖が挙げられる。

【0636】

ある特定の実施形態では、炭水化物コンジュゲートは、単糖を含む。

【0637】

ある特定の実施形態では、単糖は、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）である。1つ以上のN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）誘導体を含むGalNAcコンジュゲートは、例えばUS 8,106,022に記載されており、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、GalNAcコンジュゲートは、iRNAが特定の細胞を標的にするリガンドとして機能する。いくつかの実施形態では、GalNAcコンジュゲートは、例えば、肝臓の細胞（例えば、肝細胞）のアシアロ糖タンパク質受容体のリガンドとして機能することによって、iRNAが肝臓の細胞を標的にする。

【0638】

いくつかの実施形態では、炭水化物コンジュゲートは、1つ以上のGalNAc誘導体を含む。GalNAc誘導体は、リンカーを介して、例えば、二価又は三価の分枝リンカーを介して、結合させることができる。いくつかの実施形態では、GalNAcコンジュゲートは、センス鎖の3'末端にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、GalNAcコンジュゲートは、リンカーを介して、例えば、本明細書において記載するようなリンカーを介して、iRNA剤に（例えば、センス鎖の3'末端に）コンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、GalNAcコンジュゲートは、センス鎖の5'末端にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、GalNAcコンジュゲートは、リンカーを介して、例えば、本明細書において記載するようなリンカーを介して、iRNA剤に（例えば、センス鎖の5'末端に）コンジュゲートされる。

【0639】

本発明のある特定の実施形態では、GalNAc又はGalNAc誘導体は、一価リンカーを介して本発明のiRNA剤に結合する。いくつかの実施形態では、GalNAc又はGalNAc誘導体は、二価リンカーを介して本発明のiRNA剤に結合する。本発明

10

20

30

40

50

の更に他の実施形態では、G a l N A c又はG a l N A c誘導体は、三価リンカーを介して本発明のiRNA剤に結合する。本発明の他の実施形態では、G a l N A c又はG a l N A c誘導体は、四価リンカーを介して本発明のiRNA剤に結合する。

【0640】

ある特定の実施形態では、本発明の二本鎖RNA i剤は、iRNA剤に結合した1つのG a l N A c又はG a l N A c誘導体を含む。ある特定の実施形態では、本発明の二本鎖RNA i剤は、複数の（例えば、2、3、4、5、又は6つの）G a l N A c又はG a l N A c誘導体を含み、この各々は、独立して、複数の一価リンカーを介して二本鎖RNA i剤の複数のヌクレオチドに結合する。

【0641】

いくつかの実施形態では、例えば、本発明のiRNA剤の二本の鎖が、複数の対合しないヌクレオチドを含むヘアピンループを形成する、一方の鎖の3'末端と、対応するもう一方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの中断されない鎖によって接続した1つのより大きな分子の一部である場合には、このヘアピンループ内の対合しないヌクレオチドは各々、独立して、一価リンカーを介して結合したG a l N A c又はG a l N A c誘導体を含んでもよい。このヘアピンループはまた、二本鎖のうち一方の鎖内の伸長したオーバーハングによって形成されてもよい。

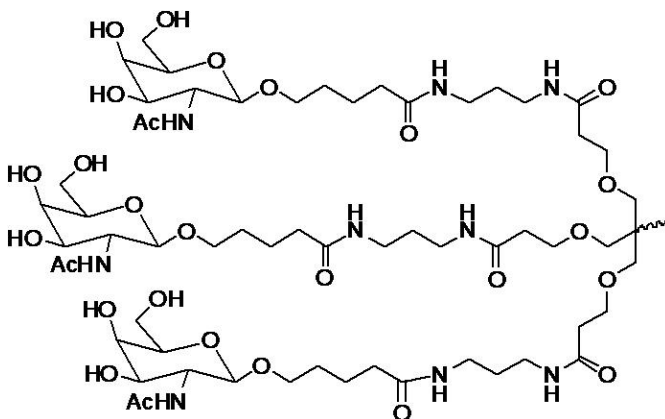
【0642】

いくつかの実施形態では、例えば、本発明のiRNA剤の二本の鎖が、複数の対合しないヌクレオチドを含むヘアピンループを形成する、一方の鎖の3'末端と、対応するもう一方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの中断されない鎖によって接続した1つのより大きな分子の一部である場合には、このヘアピンループ内の対合しないヌクレオチドは各々、独立して、一価リンカーを介して結合したG a l N A c又はG a l N A c誘導体を含んでもよい。このヘアピンループはまた、二本鎖のうち一方の鎖内の伸長したオーバーハングによって形成されてもよい。

【0643】

いくつかの実施形態では、G a l N A cコンジュゲートは、

【化16】



式II

である。

【0644】

いくつかの実施形態では、RNA i剤は、以下の概略図で示すようなリンカーを介して炭水化物コンジュゲートに結合し、式中、Xは、O又はSである。

10

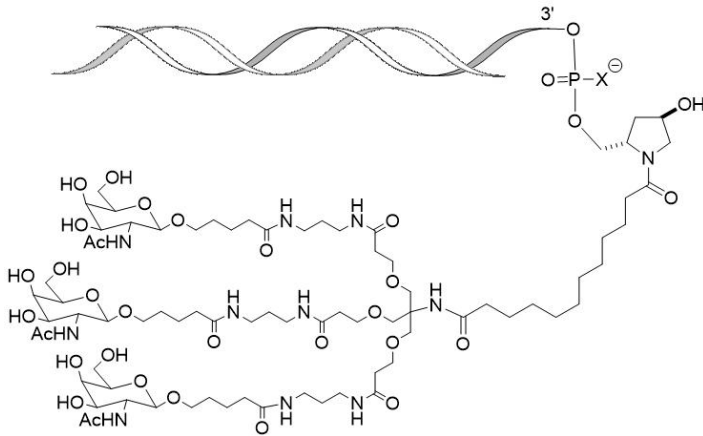
20

30

40

50

【化 1 7】

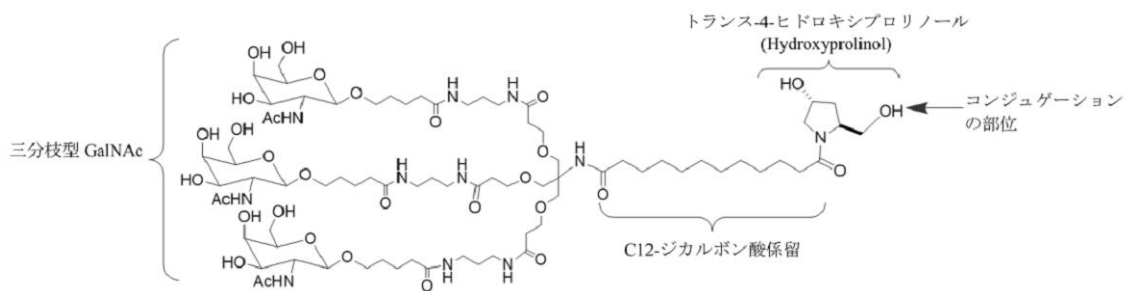


10

【 0 6 4 5】

いくつかの実施形態では、RNA i 剤は、表 1 において規定され、以下に示す、L 9 6 にコンジュゲートされる：

【化 1 8】

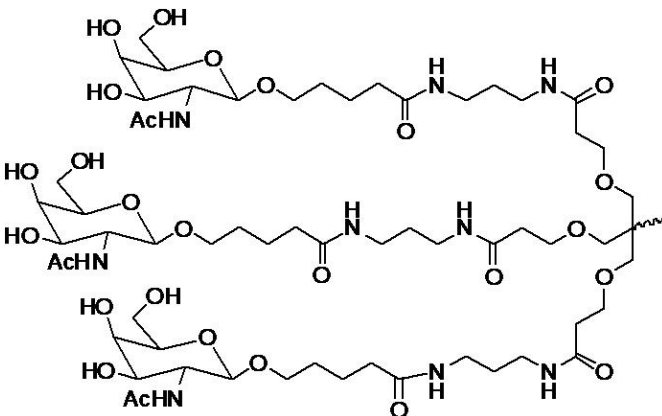


20

【 0 6 4 6】

ある特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法において使用するための炭水化物コンジュゲートは、以下からなる群から選択される：

【化 1 9】



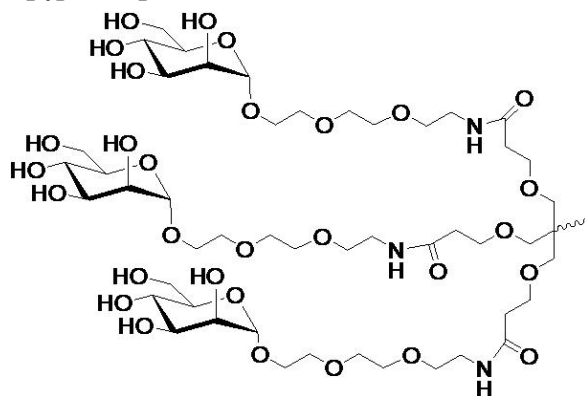
30

40

式 I I 、

50

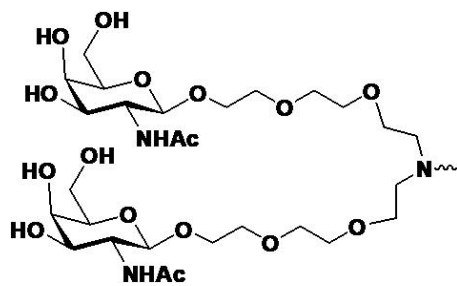
【化 2 0】



10

式 I I I、

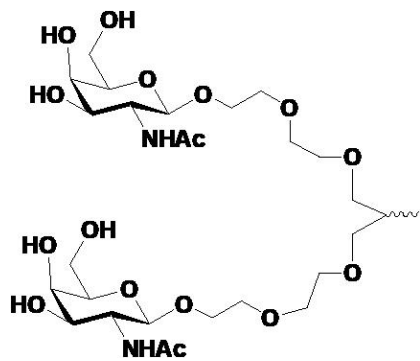
【化 2 1】



20

式 I V、

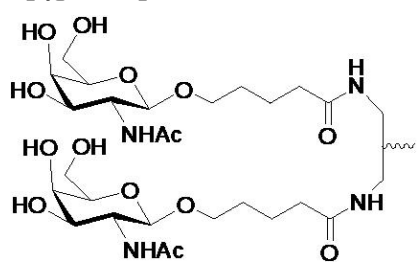
【化 2 2】



30

式 V、

【化 2 3】

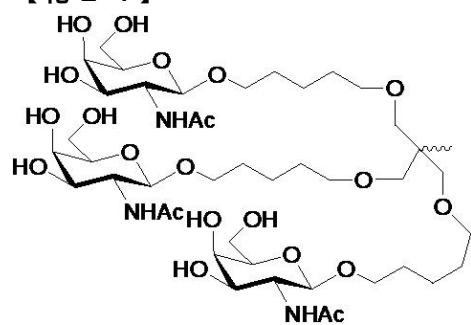


40

式 V I、

50

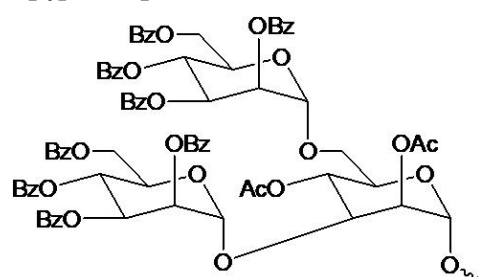
【化 2 4】



10

式 V I I、

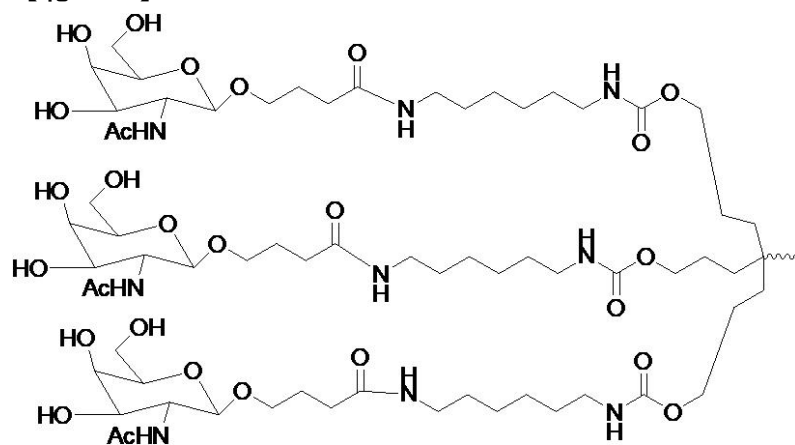
【化 2 5】



20

式 V I I I、

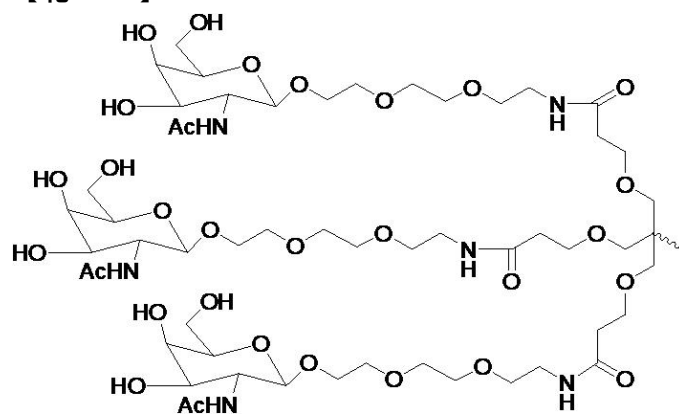
【化 2 6】



30

式 I X、

【化 2 7】

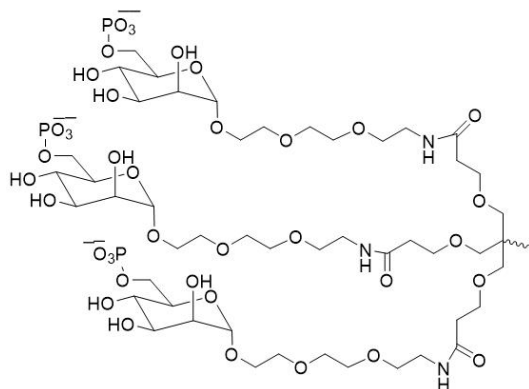


40

式 X、

50

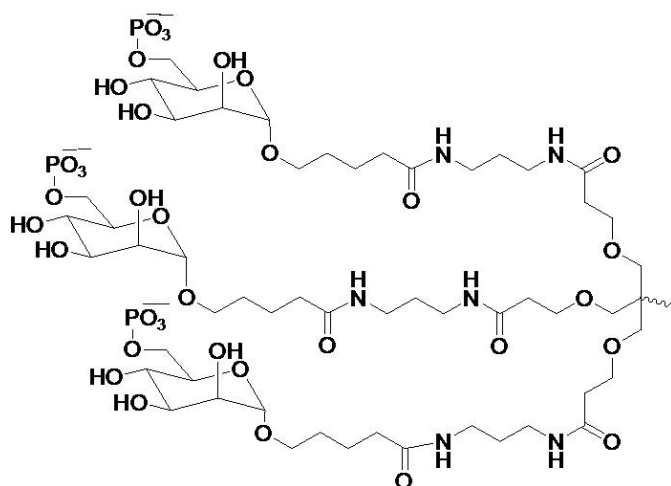
【化 2 8】



10

式 X I、

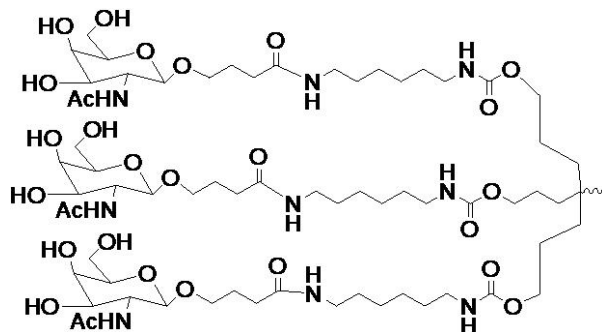
【化 2 9】



20

式 X I I、

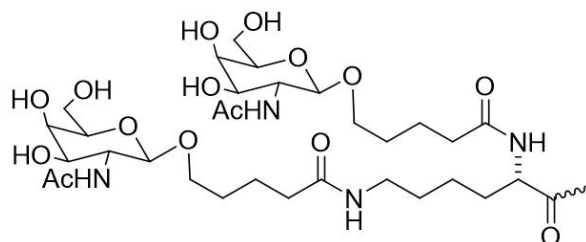
【化 3 0】



30

式 X I I I、

【化 3 1】

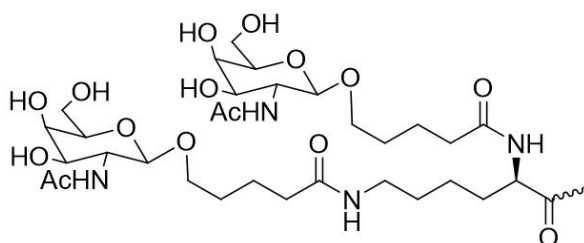


40

式 X I V、

50

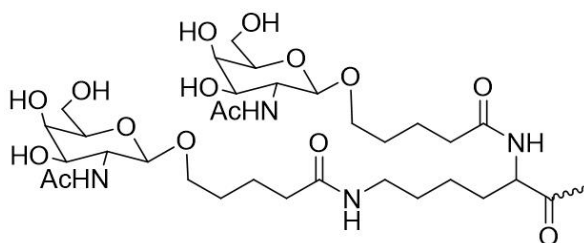
【化 3 2】



式 X V、

【化 3 3】

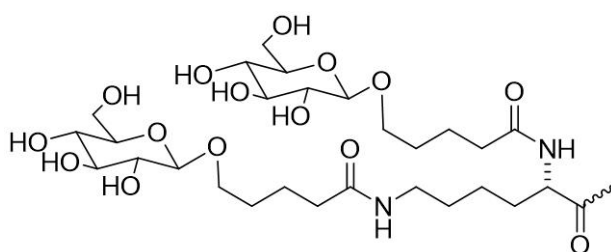
10



式 X V I、

【化 3 4】

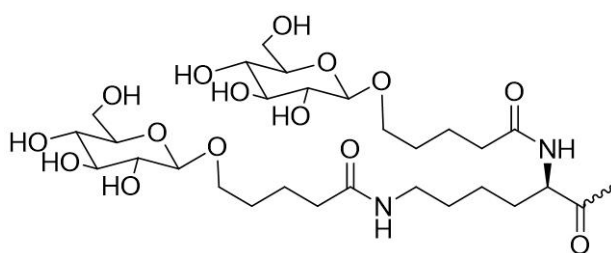
20



式 X V I I、

【化 3 5】

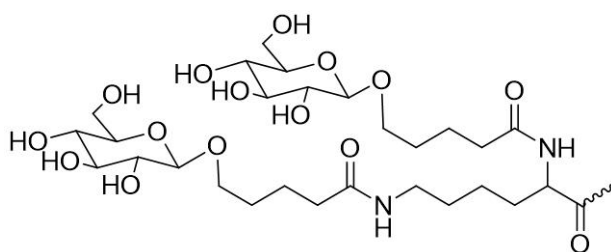
30



式 X V I I I、

【化 3 6】

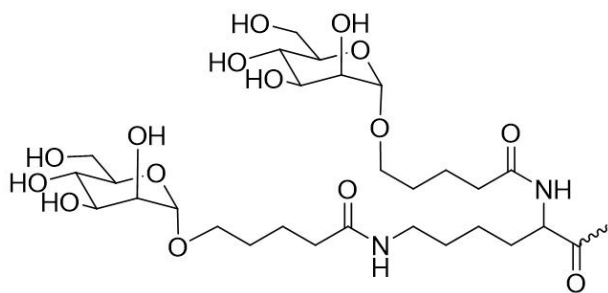
40



式 X I X、

50

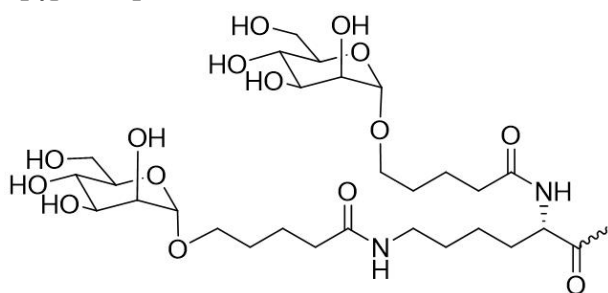
【化 3 7】



10

式 X X、

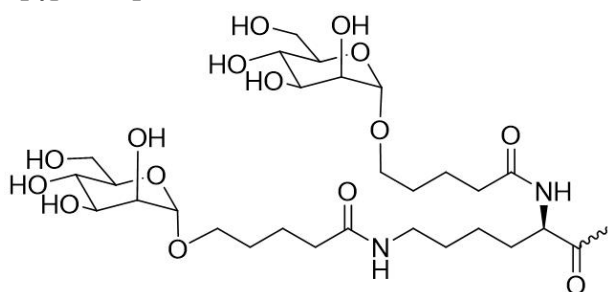
【化 3 8】



20

式 X X I、

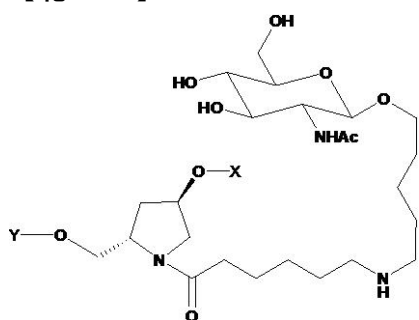
【化 3 9】



30

式 X X I I、

【化 4 0】

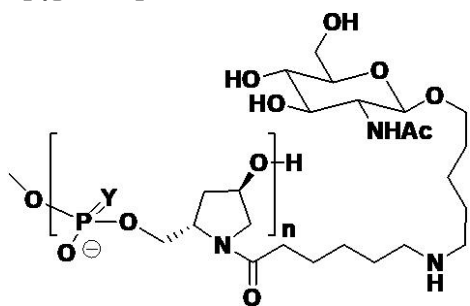


40

式 X X I I I、

50

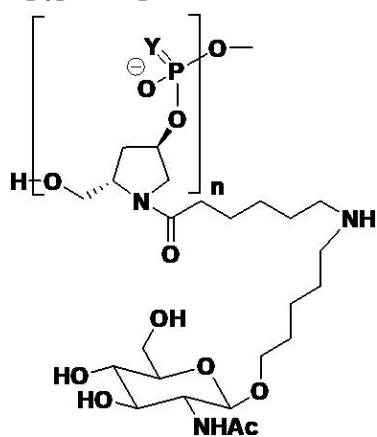
【化 4 1】



10

、式中、YはO又はSであり、nは3～6であり（式XXIV）、

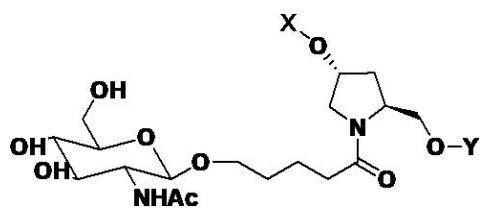
【化 4 2】



20

、式中、YはO又はSであり、nは3～6であり（式XXV）、

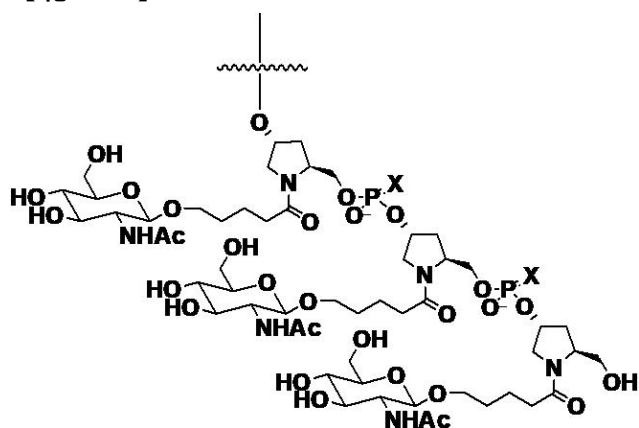
【化 4 3】



30

式XXVI、

【化 4 4】

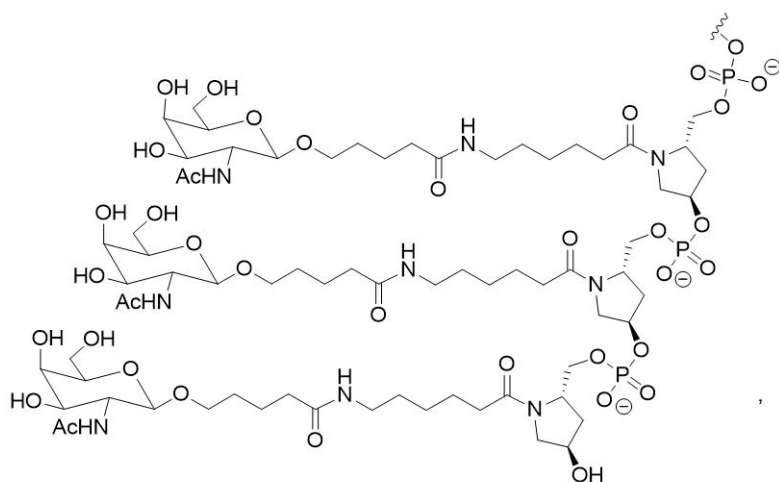


40

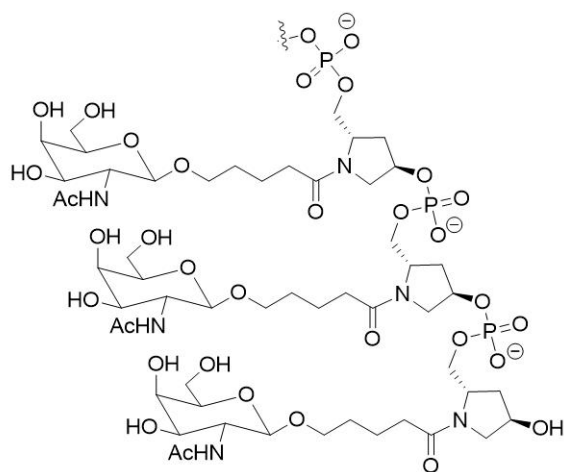
、式中、XはO又はSであり（式XXVII）、

50

【化 4 5】



10



20

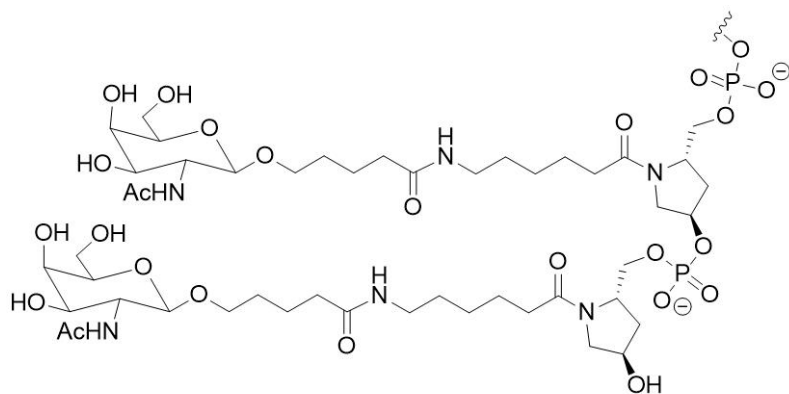
式 X X V I I 、 式 X X I X 、

30

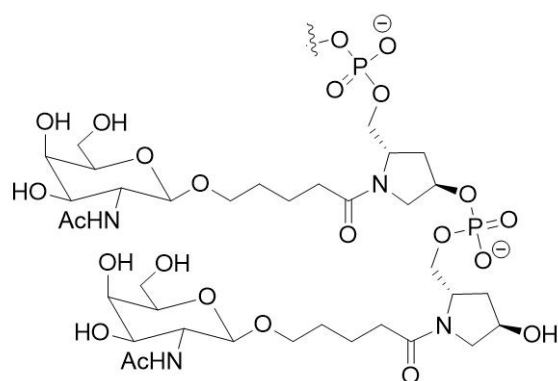
40

50

【化 4 6】

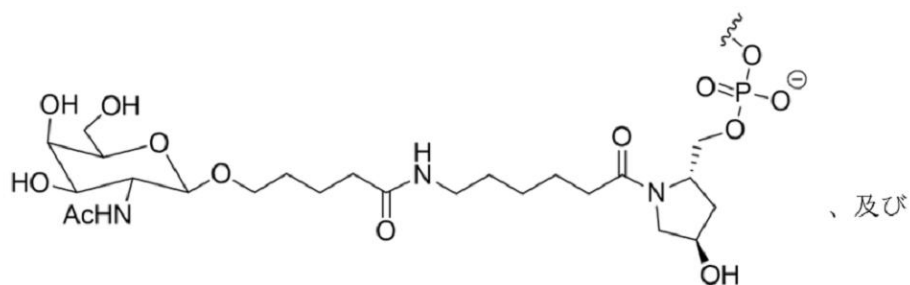


10



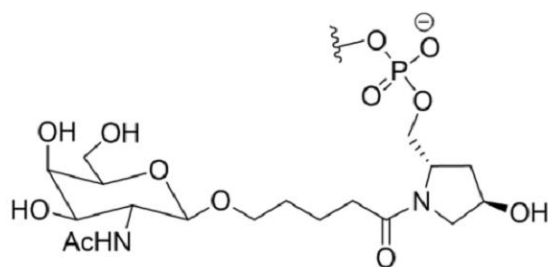
20

式 X X X 、
式 X X X I 、
【化 4 7】



30

、及び

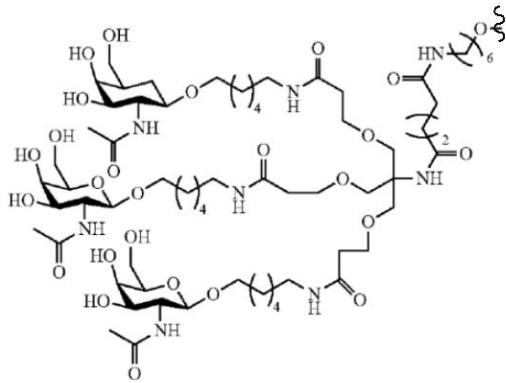


40

式 X X X I I 、
式 X X X I I I 、

50

【化 4 8】



10

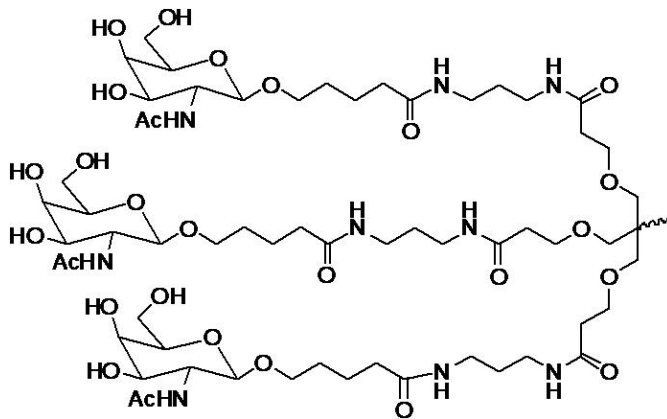
式 X X X I V。

【 0 6 4 7】

ある特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法において使用する炭水化物コンジュゲートは、単糖である。ある特定の実施形態では、単糖は、N-アセチルガラクトサミンであり、例えば、

20

【化 4 9】



30

式 I I

である。

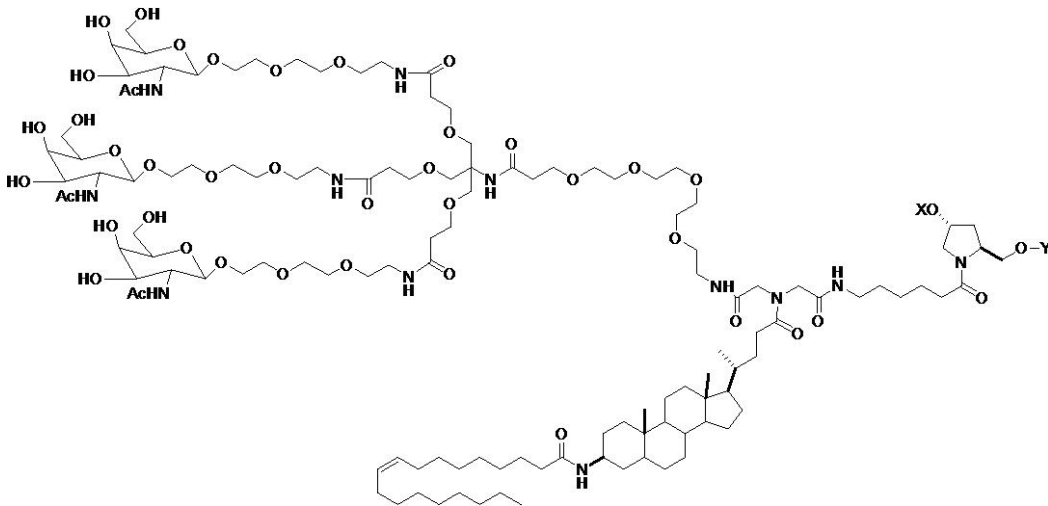
【 0 6 4 8】

本明細書において記載する実施形態において使用するための別の代表的な炭水化物コンジュゲートとしては、限定するものではないが、以下が挙げられ、

40

50

【化 5 0】



10

(式 X X X V I)

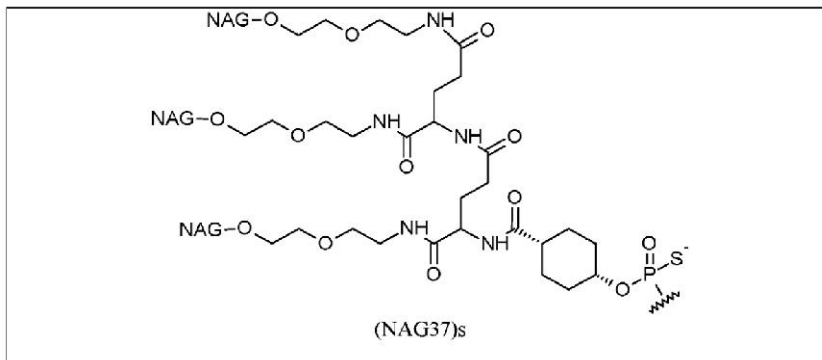
X 又は Y のうち一方がオリゴヌクレオチドである場合、もう一方は、水素である。

【 0 6 4 9 】

いくつかの実施形態では、好適なリガンドは、WO 2 0 1 9 / 0 5 5 6 3 3 において開示されるリガンドであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、リガンドは、以下の構造を含む。

20

【化 5 1】



30

【 0 6 5 0 】

ある特定の実施形態では、本開示の RNA i 剤は、GalNAc リガンドを、このような GalNAc リガンドが本開示の好ましい髄腔内 / CNS 送達経路にとっては価値が制限されることが現在予測される場合であっても、含み得る。

【 0 6 5 1 】

本発明のある特定の実施形態では、GalNAc 又は GalNAc 誘導体は、一価リンカーを介して本発明の iRNA 剤に結合する。いくつかの実施形態では、GalNAc 又は GalNAc 誘導体は、二価リンカーを介して本発明の iRNA 剤に結合する。本発明の更に他の実施形態では、GalNAc 又は GalNAc 誘導体は、三価リンカーを介して本発明の iRNA 剤に結合する。

40

【 0 6 5 2 】

一実施形態では、本発明の二本鎖 RNA i 剤は、iRNA 剤に結合した 1 つ以上の GalNAc 又は GalNAc 誘導体を含む。GalNAc は、センス鎖又はアンチセンス鎖上のリンカーを介して任意のヌクレオチドに結合してもよい。GalNAc は、センス鎖の 5' 末端、センス鎖の 3' 末端、アンチセンス鎖の 5' 末端、又はアンチセンス鎖の 3' 末端に結合してもよい。一実施形態では、GalNAc は、例えば、三価リンカーを介して、センス鎖の 3' 末端に結合する。

50

【0653】

他の実施形態では、本発明の二本鎖RNA i 剤は、複数の（例えば、2、3、4、5、又は6の）GalNAc又はGalNAc誘導体を含み、各々が独立して、複数のリンカー、例えば、一価リンカーを介して、二本鎖RNA i 剤の複数のヌクレオチドに結合する。

【0654】

いくつかの実施形態では、例えば、本発明のiRNA剤の二本の鎖が、複数の対合しないヌクレオチドを含むヘアピンループを形成する、一方の鎖の3'末端と、対応するもう一方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの中断されない鎖によって接続した1つのより大きな分子の一部である場合には、このヘアピンループ内の対合しないヌクレオチドは各々、独立して、一価リンカーを介して結合したGalNAc又はGalNAc誘導体を含んでもよい。

10

【0655】

いくつかの実施形態では、炭水化物コンジュゲートは、限定するものではないがPKモジュレーター又は細胞透過ペプチドなどである、上記のような1つ以上の更なるリガンドを更に含む。

【0656】

本発明において使用するのに好適な更なる炭水化物コンジュゲート及びリンカーとしては、WO2014/179620及びWO2014/179627に記載されるものが挙げられ、その各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0657】

D. リンカー

いくつかの実施形態では、本明細書において記載するコンジュゲート又はリガンドを、切断可能である場合も切断可能でない場合もある種々のリンカーを用いてiRNAオリゴヌクレオチドに結合させることができる。

【0658】

「リンカー」又は「連結基」という用語は、化合物の2つの部分を接続する、例えば、化合物の2つの部分を共有結合で結合させる、有機部分を意味する。典型的には、リンカーは、直接結合、又は酸素若しくは硫黄などの原子、NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NHなどのユニット、又は原子の鎖であって、例えば、限定するものではないが、置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換アルケニル、置換若しくは非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル (alkylhereroicyclicalkynyl)、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリール (alkynylhereroaryl) など、を含み、1つ以上のメチレンが、O、S、S(O)、SO₂、N(R₈)、C(O)、置換又は非置換アリール、

30

40

50

置換又は非置換ヘテロアリール、置換又は非置換複素環によって中断又は終結され得、式中、R 8 は、水素、アシル、脂肪族、又は置換された脂肪族である。ある特定の実施形態では、リンカーは、約 1 ～ 2 4 原子、2 ～ 2 4、3 ～ 2 4、4 ～ 2 4、5 ～ 2 4、6 ～ 2 4、6 ～ 1 8、7 ～ 1 8、8 ～ 1 8 原子、7 ～ 1 7、8 ～ 1 7、6 ～ 1 6、7 ～ 1 6、又は 8 ～ 1 6 原子である。

【0659】

切断可能な連結基とは、細胞の外部で十分に安定であるが、標的細胞内に入ると、切断されて、リンカーと一緒に保持している 2 つの部分放出する基である。好ましい実施形態では、切断可能な連結基は、対象の血液中又は第 2 の参照条件下（例えば、血液又は血清中で見られる条件を模倣する又は表すように選択され得る）よりも、標的細胞中又は第 1 の参照条件下（例えば、細胞内条件を模倣又は表すように選択され得る）において、少なくとも約 1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、6 0 倍、7 0 倍、8 0 倍、9 0 倍、又はそれ以上、又は少なくとも約 1 0 0 倍速い速度で切断される。

【0660】

切断可能な連結基は、切断剤、例えば、p H、酸化還元電位、又は分解性分子の存在、の影響を受け易い。概して切断剤は、血清又は血液中においてよりも、細胞の内部で、より広範に広がっているか又はより高いレベル若しくは活性で見られる。このような分解剤の例としては、特定の基質のために選択される、又は基質特異性を有しない酸化還元剤、例えば還元によって酸化還元切断可能な連結基を分解できる、細胞中に存在する、例えば、メルカプタンなどの酸化酵素若しくは還元酵素又は還元剤、エステラーゼ、エンドソーム又は酸性環境を作出できる試薬、例えば、5 以下の p H をもたらす試薬、一般酸、ペプチダーゼ（基質特異的であり得る）及びホスファターゼとして作用することによって酸切断可能な連結基を加水分解若しくは分解できる酵素が挙げられる。

【0661】

ジスルフィド結合などの切断可能な連結基は、p H の影響を受け易い場合がある。ヒト血清の p H は 7 . 4 であるが、平均細胞内 p H はわずかに低く、約 7 . 1 ～ 7 . 3 の範囲である。エンドソームは、5 . 5 ～ 6 . 0 の範囲のより酸性の p H であり、リソソームは、およそ 5 . 0 の更により酸性の p H である。いくつかのリンカーは、好ましい p H で切断され、それによって、リガンドからのカチオン性脂質を細胞の内側又は細胞の所望のコンパートメント内に放出する切断可能な連結基を有することとなる。

【0662】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能である切断可能な連結基を含み得る。リンカー中に組み込まれる切断可能な連結基の種類は、標的にする細胞に左右され得る。例えば、肝臓標的化リガンドは、エステル基を含むリンカーを介してカチオン性脂質に連結することができる。肝細胞は、エステラーゼが豊富であるため、リンカーは、肝細胞中では、エステラーゼが豊富でない細胞型においてよりも効率的に切断されることとなる。エステラーゼが豊富な他の細胞型としては、肺、腎皮質、及び精巣の細胞が挙げられる。

【0663】

肝細胞及び滑膜細胞などのペプチダーゼが豊富な細胞型を標的とする場合には、ペプチド結合を含むリンカーを使用することができる。

【0664】

概して、候補の切断可能な連結基の適合性は、分解剤が候補連結基を切断する能力（又は条件）を試験することによって評価することができる。また、血液中で、又は他の非標的組織と接触したときに、切断に抵抗する能力について候補の切断可能な連結基を試験することもまた望ましいであろう。したがって、第 1 及び第 2 の条件の間での切断に対する相対的な感受性を決定することができるものであり、ここで第 1 の条件は、標的細胞において切断を示すように選択され、第 2 の条件は、他の組織又は生物学的流体中で、例えば、血液若しくは血清中で、切断を示すように選択される。評価は、無細胞系において、細胞において、細胞培養液において、臓器若しくは組織の培養液において、又は動物全身において、行うことができる。無細胞条件又は培養条件において最初の評価を行うこと及び

動物全身における更なる評価によって確認することが、有用であり得る。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液又は血清（又は細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）と比較して、細胞において（又は細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）少なくとも約 2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は約 100 倍速い速度で切断される。

【0665】

i. 酸化還元切断可能な連結基

ある特定の実施形態では、切断可能な連結基は、還元又は酸化の際に切断される酸化還元切断可能な連結基である。還元的に切断可能な連結基の例としては、ジスルフィド連結基（ $-S-S-$ ）が挙げられる。候補の切断可能な連結基が、好適な「還元的に切断可能な連結基」であるか、又は例えば、特定の iRNA 部分及び特定のターゲティング剤とともに使用するのに好適であるか否かを決定するために、本明細書において記載する方法に目を向けることができる。例えば、細胞中であって、例えば、標的細胞中で観察されるであろう切断の速度を模倣する、当技術分野で公知の試薬を使用してジチオスレイトール（DTT）又は他の還元剤とともにインキュベートすることによって、候補を評価することができる。候補はまた、血液又は血清条件を模倣するように選択された条件下で評価することもできる。ある条件においては、候補化合物は、血液中で最大約 10% 切断される。他の実施形態では、有用な候補化合物は、血液中（又は細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、細胞中で（又は細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）少なくとも約 2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は約 100 倍速い速度で分解される。候補化合物の切断の速度は、細胞内媒体を模倣するように選択された条件下での標準酵素動態アッセイを用いて決定され、細胞外媒体を模倣するように選択された条件と比較され得る。

【0666】

ii. ホスフェート系の切断可能な連結基

ある特定の実施形態では、切断可能なリンカーは、ホスフェート系の切断可能な連結基を含む。ホスフェート系の切断可能な連結基は、ホスフェート基を分解又は加水分解する試薬により切断される。細胞内においてホスフェート基を切断する試薬の例は、細胞中のホスファターゼなどの酵素である。ホスフェート系連結基の例は、 $-O-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(SR_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-S-$ である。好ましい実施形態は、 $O-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(SH)-O-$ 、 $-S-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(OH)-S-$ 、 $-S-P(O)(OH)-S-$ 、 $-O-P(S)(OH)-S-$ 、 $-S-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(H)-O-$ 、 $-O-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-O-$ 、 $-S-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-S-$ 、 $-O-P(S)(H)-S-$ である。好ましい実施形態は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ である。これら候補は、上述のものと類似した方法を使用して評価することができる。

【0667】

iii. 酸切断可能な連結基

ある特定の実施形態では、切断可能なリンカーは、酸切断可能な連結基を含む。酸切断可能な連結基は、酸性条件下で切断される連結基である。好ましい実施形態では、酸切断可能な連結基は、pH が約 6.5 以下である酸性環境（例えば、約 6.0、5.75、5.5、5.25、5.0 以下）において、又は一般酸として作用できる酵素などの薬剤によって、切断される。細胞内においては、特定の低 pH オルガネラ、例えばエンドソーム及びリソソームが、酸切断可能な連結基のための切断環境をもたらすことができる。酸切

断可能な連結基の例としては、限定するものではないが、ヒドラゾン、エステル、及びアミノ酸のエステルが挙げられる。酸切断可能な基は、一般式 $-C=N-N-$ 、 $C(O)O$ 、又は $-OC(O)$ を有し得る。好ましい実施形態では、エステル（アルコキシ基）の酸素に結合する炭素は、アリール基、置換アルキル基、又は三級アルキル基、例えばジメチルペンチル若しくはセブチルである。これら候補は、上述のものと類似した方法を使用して評価することができる。

【0668】

i v . エステル系の切断可能な連結基

ある特定の実施形態では、切断可能なリンカーは、エステル系の切断可能な連結基を含む。エステル系の切断可能な連結基は、細胞内においてエステラーゼ及びアミダーゼなどの酵素によって切断される。エステル系の切断可能な連結基の例としては、限定するものではないが、アルキレン、アルケニレン、及びアルキニレン基のエステルが挙げられる。エステルの切断可能な連結基は、一般式 $-C(O)O-$ 又は $-OC(O)-$ を有する。これら候補は、上述のものと類似した方法を使用して評価することができる。

10

【0669】

v . ペプチド系の切断可能な連結基

更に別の実施形態では、切断可能なリンカーは、ペプチド系の切断可能な連結基を含む。ペプチド系の切断可能な連結基は、細胞内においてペプチダーゼ及びプロテアーゼなどの酵素によって切断される。ペプチド系の切断可能な連結基は、アミノ酸の間で形成されて、オリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチドなど）及びポリペプチドが得られるペプチド結合である。ペプチド系の切断可能な基は、アミド基 ($-C(O)NH-$) を含まない。アミド基は、任意のアルキレン、アルケニレン又はアルキネレンの間で形成され得る。ペプチド結合は、アミノ酸の間で形成されて、ペプチド及びタンパク質が得られるアミド結合の特殊な型である。ペプチド系の切断基は、概して、アミノ酸の間で形成されてペプチド及びタンパク質が得られるペプチド結合（すなわち、アミド結合）に限定され、全てのアミド官能基を含むものではない。ペプチド系の切断可能な連結基は、一般式 $-NHCH(R)A-C(O)NHCH(R)B-C(O)-$ （配列番号__）を有し、式中、 RA 及び RB は、2つの隣接するアミノ酸の R 基である。これら候補は、上述のものと類似した方法を使用して評価することができる。

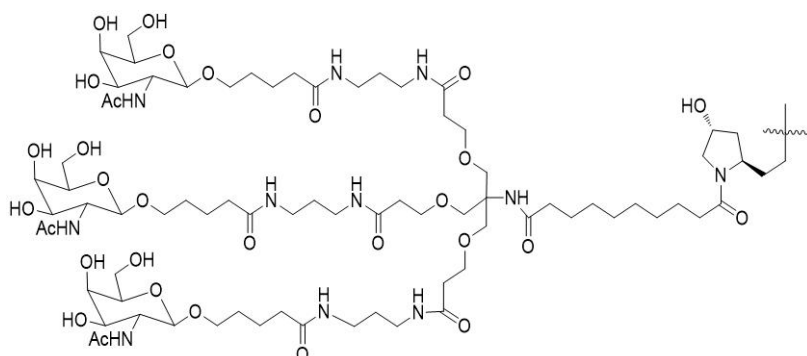
20

【0670】

いくつかの実施形態では、本発明の $iRNA$ は、リンカーを介して炭水化物にコンジュゲートされる。本発明の組成物及び方法のリンカーを有する $iRNA$ 炭水化物コンジュゲートの非限定的な例としては、限定するものではないが、

30

【化52】

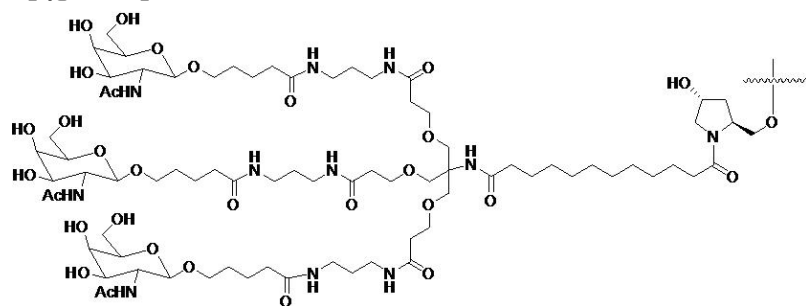


40

(式 XXXV II)、

50

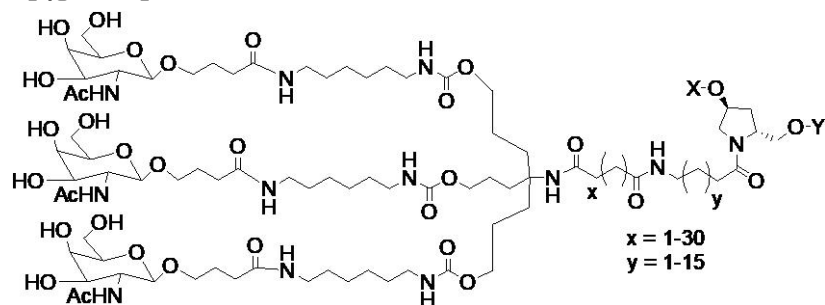
【化 5 3】



10

(式 XXXVII)、

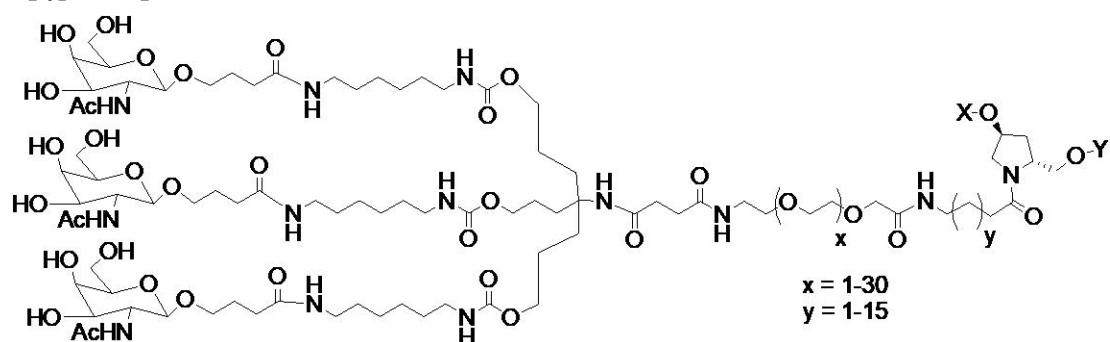
【化 5 4】



20

(式 XXXIX)、

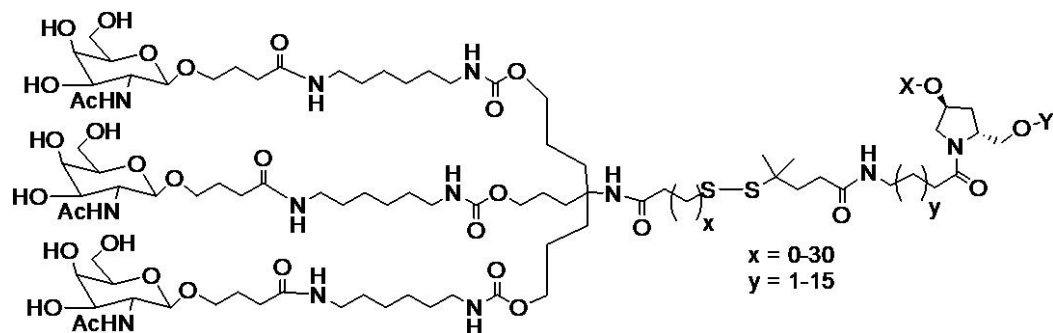
【化 5 5】



30

(式 XL)、

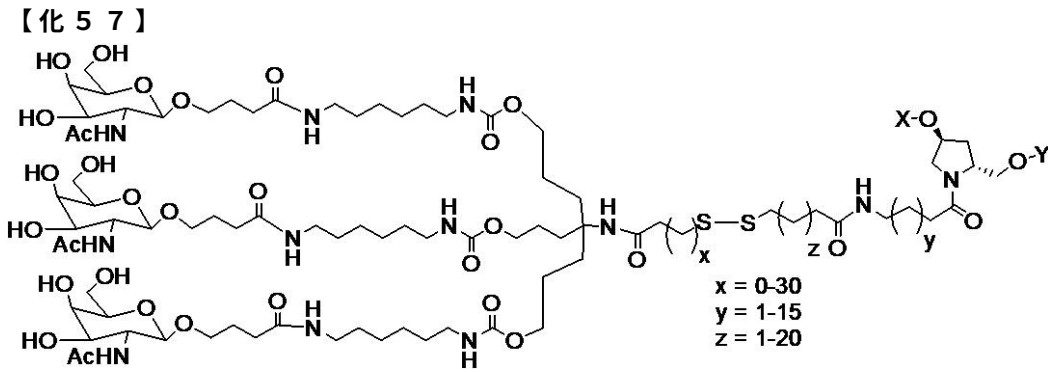
【化 5 6】



40

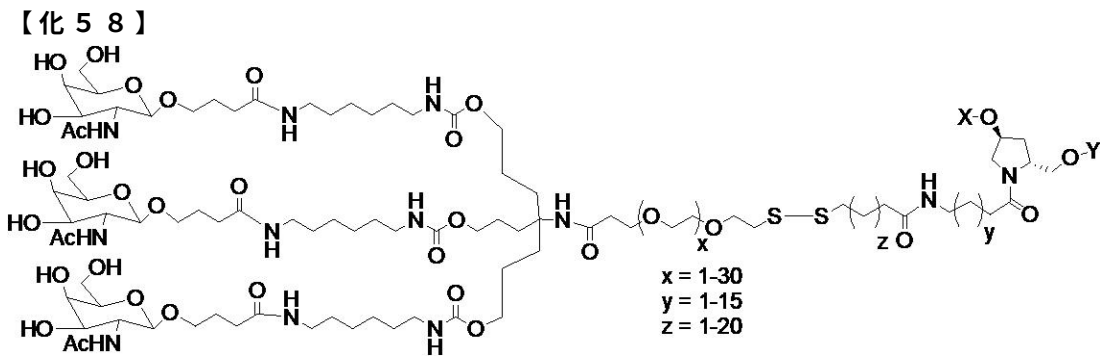
(式 LXI)、

50



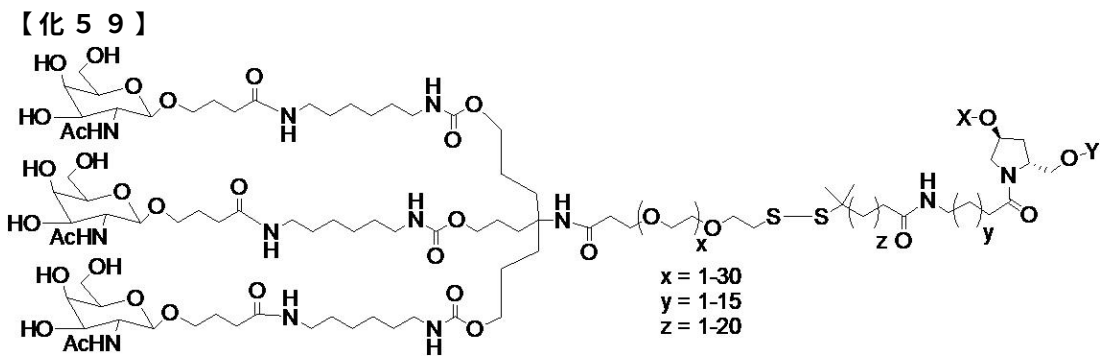
10

(式 X L I I)、



20

(式 X L I I I)、及び



30

(式 X L I V) が挙げられ、X 又は Y のうち的一方がオリゴヌクレオチドである場合、もう一方は、水素である。

【0 6 7 1】

本発明の組成物及び方法のある特定の実施形態では、リガンドは、二価又は三価の分枝リンカーを介して結合した1つ以上の「G a l N A c」(N-アセチルガラクトサミン)誘導体である。

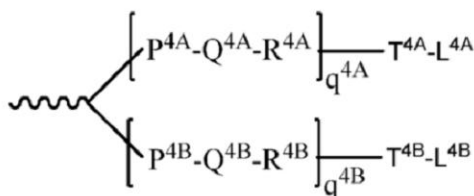
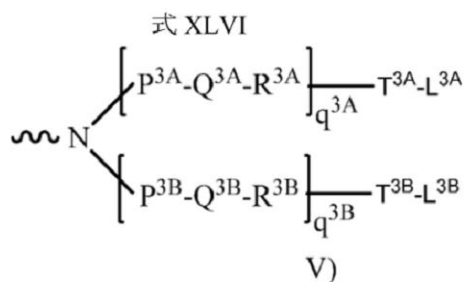
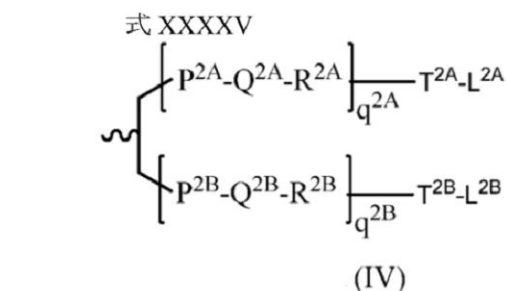
【0 6 7 2】

ある特定の実施形態では、本発明の d s R N A は、式 (X L V) ~ (X L V I) のいずれかで示される構造の群から選択される二価又は三価の分枝リンカーにコンジュゲートされ、

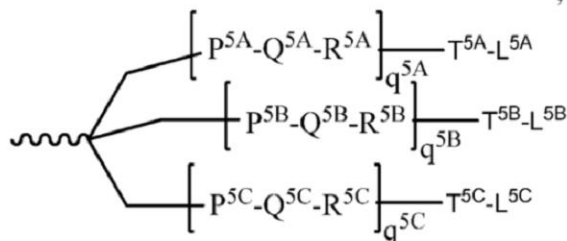
40

50

【化 6 0】



式 XLVII



式 XLVIII

式中、

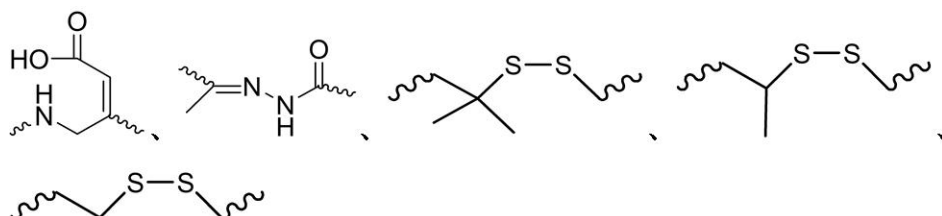
q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 、及び q^{5C} は、出現ごとに独立して、0～20を表し、繰り返し単位は、同一である場合も、異なる場合もあり、

P^{2A} 、 P^{2B} 、 P^{3A} 、 P^{3B} 、 P^{4A} 、 P^{4B} 、 P^{5A} 、 P^{5B} 、 P^{5C} 、 T^{2A} 、 T^{2B} 、 T^{3A} 、 T^{3B} 、 T^{4A} 、 T^{4B} 、 T^{5A} 、 T^{5B} 、 T^{5C} は、出現ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH、又はCH₂Oであり、

Q^{2A} 、 Q^{2B} 、 Q^{3A} 、 Q^{3B} 、 Q^{4A} 、 Q^{4B} 、 Q^{5A} 、 Q^{5B} 、 Q^{5C} は、出現ごとに独立して、存在しないか、アルキレン、置換アルキレンであり、式中、1つ以上のメチレンが、O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡C、又はC(O)のうち1つ以上によって中断又は終結され得、

R^{2A} 、 R^{2B} 、 R^{3A} 、 R^{3B} 、 R^{4A} 、 R^{4B} 、 R^{5A} 、 R^{5B} 、 R^{5C} は、出現ごとに各々独立して、存在しないか、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 1】



又はヘテロシクリルであり、

L^{2A} 、 L^{2B} 、 L^{3A} 、 L^{3B} 、 L^{4A} 、 L^{4B} 、 L^{5A} 、 L^{5B} 、及び L^{5C} は、リガンドを表し、すなわち、出現ごとに各々独立して、単糖 (GalNAc など)、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、又は多糖を表し、 R^a は、H又はアミノ酸側鎖である。三価のコンジュゲート GalNAc 誘導体は、標的遺伝子の発現を阻害するために RNAi 剤とともに使用するのに一部有用であり、例えば以下の式 (XLIIX) のものなどであり、

10

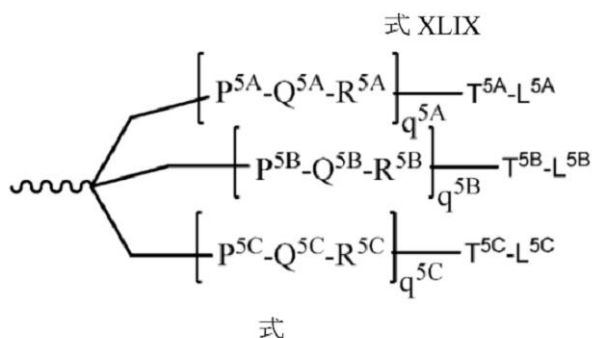
20

30

40

50

【化 6 2】



10

式中、 L^{5A} 、 L^{5B} 、及び L^{5C} は、GalNAc 誘導体などの単糖を表す。

【0673】

GalNAc 誘導体をコンジュゲートする好適な二価及び三価の分枝のリンカー基の例としては、限定するものではないが、式 II、VII、XI、X、及び XIII のような上記で列記した構造が挙げられる。

【0674】

RNA コンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許としては、限定するものではないが、米国特許第 4, 828, 979 号、第 4, 948, 882 号、第 5, 218, 105 号、第 5, 525, 465 号、第 5, 541, 313 号、第 5, 545, 730 号、第 5, 552, 538 号、第 5, 578, 717 号、第 5, 580, 731 号、第 5, 591, 584 号、第 5, 109, 124 号、第 5, 118, 802 号、第 5, 138, 045 号、第 5, 414, 077 号、第 5, 486, 603 号、第 5, 512, 439 号、第 5, 578, 718 号、第 5, 608, 046 号、第 4, 587, 044 号、第 4, 605, 735 号、第 4, 667, 025 号、第 4, 762, 779 号、第 4, 789, 737 号、第 4, 824, 941 号、第 4, 835, 263 号、第 4, 876, 335 号、第 4, 904, 582 号、第 4, 958, 013 号、第 5, 082, 830 号、第 5, 112, 963 号、第 5, 214, 136 号、第 5, 082, 830 号、第 5, 112, 963 号、第 5, 214, 136 号、第 5, 245, 022 号、第 5, 254, 469 号、第 5, 258, 506 号、第 5, 262, 536 号、第 5, 272, 250 号、第 5, 292, 873 号、第 5, 317, 098 号、第 5, 371, 241 号、第 5, 391, 723 号、第 5, 416, 203 号、第 5, 451, 463 号、第 5, 510, 475 号、第 5, 512, 667 号、第 5, 514, 785 号、第 5, 565, 552 号、第 5, 567, 810 号、第 5, 574, 142 号、第 5, 585, 481 号、第 5, 587, 371 号、第 5, 595, 726 号、第 5, 597, 696 号、第 5, 599, 923 号、第 5, 599, 928 号、第 5, 688, 941 号、第 6, 294, 664 号、第 6, 320, 017 号、第 6, 576, 752 号、第 6, 783, 931 号、第 6, 900, 297 号、第 7, 037, 646 号、及び第 8, 106, 022 号が挙げられ、この各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0675】

所与の化合物において全ての位置について均一に修飾される必要はなく、実際には、前述の修飾のうち 2 つ以上を単一の化合物内に、又は更に iRNA 内の単一のヌクレオシドにおいて組み込むことができる。本発明はまた、キメラ化合物である iRNA 化合物も含む。

40

【0676】

本発明の文脈で、「キメラの」iRNA 化合物又は「キメラ」は、iRNA 化合物、好ましくは dsRNA 剤であり、これは 2 つ以上の化学的に別個の領域を含み、その各々が少なくとも 1 つのモノマーユニットから、すなわち、dsRNA 化合物の場合ではヌクレオチドから、構成される。これら iRNA は、典型的には、少なくとも 1 つの領域であって、そこで RNA が、iRNA に対してヌクレアーゼ分解に対する耐性の増大、細胞取り

50

込みの増大又は標的核酸に対する結合親和性の増大を付与するように修飾されるものである、少なくとも1つの領域を含む。iRNAの追加の領域は、RNA:DNA又はRNA:RNAの複合型を切断可能である酵素のための基質として機能し得る。例として、リボヌクレアーゼHは、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。したがって、リボヌクレアーゼHの活性化が、RNA標的の切断をもたらし、それによって遺伝子発現のiRNA阻害の効率を大きく増強する。結果的に、これに匹敵する結果は、多くの場合、同一の標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシdsRNAと比較して、キメラdsRNAを使用する場合により短いiRNAで得ることができる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動によって、また必要に応じて、当技術分野で既知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技法によって、慣習的に検出することができる。

10

【0677】

ある特定の例では、iRNAのRNAは、非リガンドの基によって修飾することができる。iRNAの活性、細胞分布、又は細胞取り込みを増強するために、いくつかの非リガンドの分子がiRNAにコンジュゲートされてきたので、こうしたコンジュゲーションを実施するための手順は、科学文献において利用可能である。こうした非リガンドの部分としては、コレステロールなどの脂質部分 (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365 (1): 54-61、Letting et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553)、コール酸 (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4: 1053)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール (hexyl-S-tritylthiol) (Manoharan et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 660: 306、Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3: 2765)、チオコレステロール (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 533)、脂肪鎖、例えば、ドデカンジオール残基若しくはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10: 111、Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259: 327、Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75: 49)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール若しくはトリエチルアンモニウム1, 2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651、Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777)、ポリアミン若しくはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 969)、又はアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651)、パルミチル部分 (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229)、又はオクタデシルアミン若しくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分 (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277: 923)、が含まれている。こうしたRNAコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許は、上で列記している。典型的なコンジュゲーションプロトコールは、配列の1つ以上の位置にアミノリンカーを有するRNAの合成を伴う。次いで、アミノ基が、適切なカップリング又は活性化試薬を使用することによってコンジュゲートされている分子と反応する。コンジュゲーション反応は、RNAがまだ固体支持部に結合している状態で、又は溶液相でRNAが切断された後で実施することができる。典型的には、HPLCによるRNAコンジュゲートの精製によって、純粋なコンジュゲートが得られる。

20

30

40

【0678】

V. 本開示のRNA i剤の送達

50

本開示のRNAi剤を、細胞、例えば、ヒト対象（例えば、それを必要とする対象、例えば、C9orf72関連障害、例えば、C9orf72関連疾患を有する対象）など対象内の細胞に送達することは、ある数の異なる方法で達成することができる。例えば、送達は、細胞をインビトロ又はインビボのどちらかで本開示のRNAi剤と接触させることによって実施されてもよい。インビボでの送達は、RNAi剤、例えばdsRNAを含む組成物を対象に投与することによって直接的に実施されてもよい。あるいは、インビボでの送達は、RNAi剤をコードしてその発現を誘導する1つ以上のベクターを投与することによって間接的に実施されてもよい。これら選択肢は、以下で更に説明される。

【0679】

概して、核酸分子を送達する任意の方法（インビトロ又はインビボで）は、本開示のRNAi剤の使用に適合させることができる（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれるAkhtar S. and Julian R.L., (1992) Trends Cell Biol. 2 (5): 139-144及びWO94/02595を参照されたい）。インビボでの送達の場合、RNAi剤を送達するために考慮する因子としては、例えば、送達された薬剤の生物学的安定性、非特異的効果の防止、及び標的組織内での送達された薬剤の蓄積が挙げられる。RNAi剤の非特異的効果は、局所投与によって、例えば、組織への直接注入若しくは移植又は調製物の局所投与によって最小限に抑えることができる。処置部位への局所投与は、薬剤の局所濃度を最大化して、それとは別に薬剤によって害され得るか又は薬剤を分解することができる全身組織への薬剤の曝露を制限し、投与しようとするRNAi剤のより少ない投与総量を可能にする。いくつかの研究では、RNAi剤が局所的に投与された場合に、遺伝子産物のノックダウンの成功が示されている。例えば、カニクイザルにおける硝子体内への注入によるVEGF dsRNAの眼内送達（Tolentino, M.J. et al., (2004) Retina 24: 132-138）及びマウスにおける網膜下への注入（Reich, S.J. et al. (2003) Mol. Vis. 9: 210-216）がいずれも、加齢黄斑変性症の実験モデルにおいて、新生血管形成を予防することを示した。加えて、マウスにおけるdsRNAの直接の腫瘍内注入は、腫瘍体積を減少させ（Pille, J. et al. (2005) Mol. Ther. 11: 267-274）、腫瘍を有するマウスの生存を長引かせることができる（Kim, W.J. et al., (2006) Mol. Ther. 14: 343-350、Li, S. et al., (2007) Mol. Ther. 15: 515-523）。RNA干渉は、直接注入によるCNSへの局所送達によって成功することがわかっており（Dorn, G. et al., (2004) Nucleic Acids 32: e49、Tan, P.H. et al. (2005) Gene Ther. 12: 59-66、Makimura, H. et al. (2002) BMC Neurosci. 3: 18、Shishkina, G.T., et al. (2004) Neuroscience 129: 521-528、Thakker, E.R., et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 17270-17275、Akaneya, Y., et al. (2005) J. Neurophysiol. 93: 594-602）、肺に対しては鼻腔内投与によって成功することがわかっている（Howard, K.A. et al., (2006) Mol. Ther. 14: 476-484、Zhang, X. et al., (2004) J. Biol. Chem. 279: 10677-10684、Bitko, V. et al., (2005) Nat. Med. 11: 50-55）。疾患の処置のためにRNAi剤を全身投与する場合、RNAを修飾するか、又は代替として、薬物送達システムを使用して送達することができ、いずれの方法も、インビボでのエンドヌクレアーゼ及びエクソヌクレアーゼによってdsRNAの急速な分解を防ぐように機能する。RNA又は医薬担体を修飾することによっても、標的組織へのRNAi剤のターゲティングを可能にすることができ、望ましくないオフターゲット効果を回避することができる（例えば、理論に拘束されることを望むものではないが、本明細書に記載のGNAの使用は、dsRNAのシード領域を不安定化させることが特定されているが、これによりこうしたdsRNAのオフターゲット効果と比較してオン

10

20

30

40

50

ターゲット効果への優先性が向上することとなり、それによりオフターゲット効果が、こうしたシード領域の不安定化によって有意に低下することとなる）。RNAi剤は、細胞取り込みを増強し、分解を防ぐように、コレステロールなどの親油性基への化学的コンジュゲーションによって修飾することができる。例えば、親油性コレステロール部分にコンジュゲートさせたApoBへと誘導されるRNAi剤を、マウスに全身注入したところ、結果として、肝臓及び空腸の両方においてapoB mRNAのノックダウンを生じた（Soultsek, J. et al., (2004) Nature 432:173-178）。アプタマーへのRNAi剤のコンジュゲーションは、前立腺がんのマウスモデルにおいて腫瘍の成長を阻害し、腫瘍縮小を媒介することが分かっている（McNamara, J.O. et al., (2006) Nat. Biotechnol. 24:1005-1015）。代替的な実施形態では、RNAi剤は、ナノ粒子、デンドリマー、ポリマー、リポソーム、又はカチオン性送達システムなどの薬物送達システムを使用して送達させることができる。正に帯電したカチオン性送達システムにより、分子RNAi剤（負に帯電した）の結合が促進され、負に帯電した細胞膜での相互作用も向上し、それによって細胞によるRNAi剤の効率的な取り込みが可能になる。カチオン性脂質、デンドリマー、又はポリマーを、RNAi剤に結合させることができるか、又はRNAi剤を封入するベシクル若しくはミセルを形成するように誘導することができる（例えば、Kim S.H. et al., (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116を参照されたい）。ベシクル又はミセルの形成は、全身投与したときのRNAiの分解を更に防止する。カチオン性のRNAi剤複合体を作製及び投与する方法は、十分に当業者の能力の範囲内である（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれるSorensen, D.R., et al. (2003) J. Mol. Biol. 327:761-766、Verma, U.N. et al., (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300、Arnold, A.S. et al. (2007) J. Hypertens. 25:197-205を参照されたい）。RNAi剤の全身送達に有用な薬物送達システムのいくつかの非限定的な例としては、DOTAP（Sorensen, D.R., et al. (2003)、同上、Verma, U.N. et al., (2003)、同上）、オリゴフェクタミン、「固体核酸脂質粒子 (solid nucleic acid lipid particle)」(Zimmermann, T.S. et al., (2006) Nature 441:111-114)、カルジオリピン (Chien, P.Y. et al., (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328、Pal, A. et al., (2005) Int. J. Oncol. 26:1087-1091)、ポリエチレンイミン (Bonnet M.E. et al., (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub, オンライン先行公開、Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチド (Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487)、及びポリアミドアミン (Tomalia, D.A. et al., (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67、Yoo, H. et al., (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804) が挙げられる。いくつかの実施形態では、RNAi剤は、全身投与のためにシクロデキストリンと複合体を形成する。RNAi剤とシクロデキストリンの投与方法及びRNAi剤とシクロデキストリンとの医薬組成物は、米国特許第7,427,605号に見ることができ、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0680】

本開示の特定の態様は、細胞内においてC9orf72標的遺伝子の発現を減少させる方法であって、該細胞を本開示の二本鎖RNAi剤と接触させることを含む方法に関する。一実施形態では、細胞は、肝外細胞 (extrahepatic cell) であり、任意選択でCNS細胞である。

【0681】

10

20

30

40

50

本開示の別の態様は、対象においてC9orf72標的遺伝子の発現を減少させる方法であって、本開示の二本鎖RNAi剤を対象に投与することを含む方法に関する。

【0682】

本開示の別の態様は、CNS障害を有する対象を治療する方法であって、対象に本開示の二本鎖C9orf72標的化RNAi剤の治療有効量を投与し、それによって対象を治療することを含む方法に関する。本開示の方法によって治療することができる例示的なCNS障害としては、C9orf72関連疾患が挙げられる。

【0683】

一実施形態では、二本鎖RNAi剤は、髄腔内投与される。この方法は、二本鎖RNAi剤の髄腔内投与によって、脳（例えば、線条体）又は脊柱組織、例えば、皮質、小脳、頸椎、腰椎、及び胸椎におけるC9orf72標的遺伝子の発現を減少させることができる。

【0684】

説明を簡単にするため、この項における製剤、組成物、及び方法は、主として修飾siRNA化合物に関して述べる。しかしながら、これら製剤、組成物、及び方法は、他のsiRNA化合物、例えば未修飾siRNA化合物で実施することができ、こうした実施は、本開示の範囲内であることが理解され得る。RNAi剤を含む組成物は、様々な経路によって対象に送達することができる。例示的な経路としては、髄腔内、静脈内、局所、経直腸、経肛門、経膈、経鼻、肺内、及び眼内が挙げられる。

【0685】

本開示のRNAi剤は、投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる。こうした組成物は、典型的には、1つ以上の種のRNAi剤と薬学的に許容される担体とを含む。本明細書において使用する場合、「薬学的に許容される担体」という語句は、医薬投与に適合性の、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、並びに同様のものを含むことが意図される。薬学的に活性な物質のためのこうした媒体及び薬剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒体又は薬剤が活性成分と不適合性である場合を除き、組成物におけるそれらの使用が意図される。補足的な有効成分もまた組成物に組み込まれ得る。

【0686】

本開示の医薬組成物は、局所処置が所望されるのか全身処置が所望されるのか、及び処置される面積に応じて、ある数の方法で投与され得る。投与は、局所（例えば、眼内、経膈、経直腸、鼻腔内、経皮など）、経口、又は非経口投与であり得る。非経口投与は、点滴静注、皮下、腹腔内、若しくは筋肉注射、又は髄腔内又は脳室内の投与を含む。

【0687】

投与の経路及び部位は、標的化を増強するように選択され得る。例えば、筋肉細胞を標的とするためには、目的の筋肉内への筋肉注射が、論理的な選択となるであろう。肺細胞は、エアロゾル形態でのRNAi剤の投与によって標的とすることができる。血管内皮細胞は、バルーンカテーテルをRNAi剤でコーティングすること、及びRNAを機械的に導入することによって標的とすることができる。

【0688】

局所投与用製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴剤、座薬、噴霧剤、液体、及び粉末を含み得る。従来の医薬担体、水性、粉末、又は油状の基剤、増粘剤なども、必要である場合又は望ましい場合がある。コーティングしたコンドーム、手袋なども有用であり得る。

【0689】

経口投与用組成物としては、散剤若しくは顆粒剤、水中の懸濁剤若しくは溶液剤、シロップ剤、エリキシル剤若しくは非水性媒体、タブレット剤、カプセル剤、ドロップ剤、又はトローチ剤を含む。錠剤の場合、使用できる担体としては、ラクトース、クエン酸ナトリウム、及びリン酸の塩が挙げられる。錠剤中には、デンプンなどの種々の崩壊剤、並びにステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、及びタルクなどの潤滑剤が、一

10

20

30

40

50

般的に使用される。カプセル形態での経口投与の場合、有用な希釈剤は、ラクトース及び高分子量ポリエチレングリコールである。経口投与のために水性懸濁剤が必要な場合は、核酸組成物を、乳化剤及び懸濁剤と組み合わせることができる。所望の場合、ある特定の甘味剤又は風味剤を加えることができる。

【0690】

髄腔内又は脳室内に投与されるための組成物は、緩衝剤、希釈剤、及び他の好適な添加剤も含み得る無菌の水溶液を含んでもよい。

【0691】

非経口投与用の製剤は、緩衝剤、希釈剤、及び他の好適な添加剤も含み得る無菌の水溶液を含んでもよい。脳室内注射は、例えばリザーバに取り付けられた、脳室内カテーテルによって促進されてもよい。静脈内での使用の場合、溶質の総濃度は、調製物を等張にするように制御されてもよい。

【0692】

一実施形態では、*s i R N A*化合物、例えば、二本鎖*s i R N A*化合物、又は*s s i R N A*化合物、組成物の投与は、非経口であり、例えば、静脈内（例えば、ボラスとして、又は拡散性注入として）、皮内、腹腔内、筋肉内、髄腔内、心室内、脳室内、頭蓋内、皮下、経粘膜、頬側、舌下、内視鏡下、経直腸、経口、経膈、局所、肺内、鼻腔内、経尿道、又は眼内である。投与は、対象自身によって、又は他の者、例えば、医療提供者によって提供され得る。医薬品は、測定された用量で、又は計量された用量を送達するディスペンサーで、提供することができる。選択される送達様式は、以下においてより詳細に説明する。

【0693】

A．髄腔内投与

一実施形態では、二本鎖*R N A i*剤は、髄腔内注入（すなわち、脳及び脊髄組織を浸す脳脊髄液への注入）によって送達される。脳脊髄液への*R N A i*剤の髄腔内注入は、ボラス注入として、又は皮下に植え込み可能であり、それによって脳脊髄液への*s i R N A*の規則正しい一定の送達を提供することができるミニポンプによって、実施することができる。脳脊髄液が産生される脈絡叢からの脳脊髄液の循環は、脊髄及び後根神経節の周りを下り、その後上がって小脳を通過して、皮質を越えてクモ膜顆粒へと入り、そこで脳脊髄液は*C N S*を出ることができるものであり、注入された化合物のサイズ、安定性、及び溶解性に応じて、髄腔内より送達される分子は、*C N S*全体を通して標的を攻撃することとなる。

【0694】

いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、ポンプを介して行われる。ポンプは、外科手術によって植え込んだ浸透圧ポンプであってもよい。一実施形態では、浸透圧ポンプは、髄腔内投与を容易にするために、脊柱管のクモ膜下腔内に植え込まれる。

【0695】

いくつかの実施形態では、髄腔内投与は、ある量の医薬品を収容するリザーバと、リザーバに収容された医薬品の一部を送達するように構成されたポンプを含む、製薬品の髄腔内送達システムを介して行われる。この髄腔内送達系についての更なる詳細は、*W O 2 0 1 5 / 1 1 6 6 5 8*に見ることができ、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0696】

髄腔内注入された*R N A i*剤の量は、1つの標的遺伝子から別の標的遺伝子で変動してもよく、適用されるべき適切な量は、標的遺伝子ごとに個別に決定しなければならない場合がある。典型的には、この量は、 $10\mu\text{g} \sim 2\text{mg}$ 、好ましくは $50\mu\text{g} \sim 1500\mu\text{g}$ 、より好ましくは $100\mu\text{g} \sim 1000\mu\text{g}$ の範囲である。

【0697】

B．本開示のベクターコード*R N A i*剤

C 9 o r f 7 2 遺伝子を標的とする*R N A i*剤は、*D N A*又は*R N A*ベクターに挿入さ

10

20

30

40

50

れた転写産物ユニットから発現され得る（例えば、Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10、WO00/22113、WO00/22114、及びUS6,054,299を参照されたい）。発現は、使用される特定の構築物及び標的の組織又は細胞種に応じて持続することが好ましい（数か月又はそれ以上）。これら導入遺伝子は、直鎖状の構築物、環状プラスミド、又は統合ベクター若しくは非統合ベクターであり得るウイルスベクターとして導入することができる。導入遺伝子は、染色体外プラスミドとして継代されることを可能にするように構築することもできる（Gassmann, et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1292）。

【0698】

RNAi剤の個々の鎖（単数又は複数）は、発現ベクター上のプロモーターから転写させることができる。2つの別々の鎖が、例えば、dsRNAを生成するように発現される場合、2つの別々の発現ベクターを、標的細胞内に同時導入することができる（例えば、トランスフェクション又は感染によって）。あるいは、dsRNAの各個別の鎖を、プロモーターによって転写させることができ、プロモーターのいずれもが同じ発現プラスミド上に位置される。一実施形態では、dsRNAは、dsRNAがステム-アンド-ループ構造を有するようにリンカーポリヌクレオチド配列によって連結された逆方向リピートポリヌクレオチドとして発現される。

【0699】

RNAi剤発現ベクターは、概して、DNAプラスミド又はウイルスベクターである。真核細胞に適合性がある発現ベクター、好ましくは脊椎動物細胞に対して適合性がある発現ベクターを使用することにより、本明細書において記載するRNAi剤の発現のための組換え構築物を産生することができる。RNAi剤発現ベクターの送達は、例えば静脈内又は筋肉内投与によって、患者から取り出された標的細胞への投与とその後の患者への再導入によって、又は所望の標的細胞への導入を可能にする任意の他の手段によって、全身的になされ得る。

【0700】

本明細書において記載する方法及び組成物とともに用いることができるウイルスベクターシステムとしては、限定するものではないが、(a) アデノウイルスベクター、(b) レトロウイルスベクター、例えば限定するものではないが、レンチウイルスベクター、モロニーマウス白血病ウイルスなど、(c) アデノ随伴ウイルスベクター、(d) 単純ヘルペスウイルスベクター、(e) SV40ベクター、(f) ポリオーマウイルスベクター、(g) パピローマウイルスベクター、(h) ピコルナウイルスベクター、(i) ポックスウイルスベクター、例えばオルソポックスなどであり、例えば、ワクシニアウイルスベクターなど、又はトリポックスであり、例えば、カナリアポックス若しくは鶏痘など、並びに(j) ヘルパー依存性アデノウイルス又はガットレス(gutless)アデノウイルスが挙げられる。複製欠損ウイルスも有利であり得る。異なるベクターは、細胞のゲノムの中に組み込まれた状態になることもならないこともある。構築物に、所望の場合、トランスフェクションのためのウイルス配列を含めることができる。あるいは、構築物を、エピソード複製が可能なベクター内に、例えば、EPVベクター及びEBVベクター内に、組み込むことができる。RNAi剤の組換え発現のための構築物は、概して、標的細胞におけるRNAi剤の発現を確実にするために、調節要素、例えば、プロモーター、エンハンサーなどを必要とすることとなる。ベクター及び構築物を検討するための他の態様は、当技術分野で既知である。

【0701】

VI. 本発明の組成物

本開示はまた、本開示のRNAi剤を含む医薬組成物及び製剤を含む組成物を含む。

【0702】

例えば、一実施形態では、本発明は、2つ以上、例えば、2つ、3つ、又は4つのdsRNA剤を含む組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0703】

別の実施形態では、本明細書において説明されるRNAi剤と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が本明細書において提供される。RNAi剤を含む医薬組成物は、C9orf72の発現又は活性と関連付けられる疾患又は障害、例えば、C9orf72関連疾患の治療に有用である。

【0704】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、無菌である。別の実施形態では、本発明の医薬組成物は、パイロジェンフリーである。

【0705】

こうした医薬組成物は、送達の態様に基づいて製剤化される。一例は、非経口送達を介して、例えば、静脈内（IV）送達、筋肉内（IM）送達、又は皮下（subQ）送達によって、全身投与用に製剤化される組成物である。別の例は、例えば、髄腔内若しくは硝子体内の注入経路によって、又は心室内若しくは脳室内投与によって、又は注射の内部経路（intraroute）、任意選択で脳（例えば、線条体）内への注入、例えば連続ポンプ注入による、CNS内への直接送達用に製剤化された組成物である。

【0706】

本開示の医薬組成物は、C9orf72遺伝子の発現を阻害するのに十分な投薬量で投与され得る。概して、本開示のRNAi剤の好適な用量は、1日当たりレシピエントの体重1キログラム当たり約0.001～約200.0ミリグラムの範囲、概して1日当たり体重1キログラム当たり約1～50mgの範囲となる。

【0707】

反復投薬レジメンには、例えば1か月に1回から6か月に1回など、治療量のRNAi剤の定期的な投与が含まれ得る。ある特定の実施形態では、RNAi剤は、四半期に約1回（すなわち、3か月毎に約1回）から1年に約2回で投与される。

【0708】

初回治療レジメン（例えば、初回負荷量）の後、治療は、少ない頻度で施与することができる。

【0709】

他の実施形態では、医薬組成物の単回用量は、長期間持続することができ、その後の用量は、1、2、3、又は4か月、又はそれ以上の間隔を超えないように投与される。本開示のいくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物の単回用量は、月1回投与される。本開示の他の実施形態では、本開示の医薬組成物の単回用量は、四半期に1回から年に2回で投与される。

【0710】

当業者は、例えば限定するものではないが、疾患又は障害の重症度、過去の治療、対象の健康全般又は年齢、及び存在する他の疾患などの特定の要因が、対象を効果的に治療するために必要な投薬量及び投薬のタイミングに影響を及ぼし得ることを理解するであろう。更に、治療有効量の組成物での対象の治療には、単回治療又は一連の治療が含まれ得る。

【0711】

マウス遺伝学における進歩により、リピート含有C9orf72の発現の低減から利益を受け得る疾患ALS及びFTDなどの様々なヒト疾患の研究のために多くのマウスモデルが生み出された。こうしたモデルは、RNAi剤のインビボ試験のため、並びに治療有効用量を決定するために使用することができる。好適な齧歯類モデルは、当技術分野で既知であり、例えば、Cepeda, et al. (ASN Neuro (2010) 2 (2): e00033) 及びPouladi, et al. (Nat Reviews (2013) 14: 708) に記載されているものを例えば含む。

【0712】

本開示の医薬組成物は、局所処置が所望されるのか全身処置が所望されるのか、及び処置される面積に応じて、ある数の方法で投与され得る。投与は、局所（例えば、経皮貼布

10

20

30

40

50

による)であり、例えば、ネブライザーなどによる散剤又はエアロゾル剤の吸入又は吹送によって肺内であり、気管内、鼻腔内、表皮及び経皮、経口又は非経口であり得る。非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、又は筋肉内の注射又は注入、例えば、埋め込みデバイスによる皮下への投与、又は例えば、実質内、髄腔内、心室内、若しくは脳室内の投与によって頭蓋内への投与を含む。

【0713】

RNAi剤は、特定の組織、例えば、CNS（例えば、脳のニューロン、膠細胞、又は血管内皮組織）、又は細胞種（例えば、ニューロン）を標的とする方式で送達することができる。

【0714】

局所投与用の医薬組成物及び製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴、座薬、噴霧剤、液体、及び粉末を含み得る。従来の医薬担体、水性、粉末、又は油状の基剤、増粘剤なども、必要である場合又は望ましい場合がある。コーティングしたコンドーム、手袋なども有用であり得る。好適な局所製剤には、本開示で取り上げるRNAi剤が、局所送達剤、例えば脂質、リボソーム、脂質酸、脂質酸エステル、ステロイド、キレート剤、及び界面活性剤との混合物となっているものが含まれる。好適な脂質及びリボソームとしては、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリスティルホスファチジルコリンDMPC、ジステアロリホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリスティルホスファチジルグリセロールDMPG）及びカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAP及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA）が挙げられる。本開示において取り上げるRNAi剤は、リボソーム内においてカプセル化することができ、又はリボソームと、特にカチオン性リボソームと複合体を形成することができる。あるいは、RNAi剤は、脂質、特にカチオン性脂質と複合体化することができる。好適な脂肪酸及びエステルとしては、限定するものではないが、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、1-モノカプリン酸グリセリル、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、又はC₁₋₂₀アルキルエステル（例えば、イソプロピルミリステートIPM）、モノグリセリド、ジグリセリド、又はそれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。局所製剤は、US 6,747,014に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0715】

A. 膜性分子アセンブリを含むRNAi剤製剤

本開示の組成物及び方法で使用するためのRNAi剤は、膜性分子アセンブリでの、例えばリボソーム又はミセルでの送達用に製剤化することができる。本明細書において使用する場合、「リボソーム」という用語は、少なくとも1つの二分子層、例えば、1つの二分子層又は複数の二分子層内に整列した両親媒性脂質で構成されたベシクルを指す。リボソームは、親油性材料から形成された膜と水性の内部とを有する単層膜及び多重膜のベシクルを含む。水性部分は、RNAi剤組成物を含む。親油性材料は、典型的にはRNAi剤組成物を含まないがいくつかの例では含む場合もある水性の外側部分から、水性の内側部分を隔離する。リボソームは、作用部位への活性成分の移送及び送達に有用である。リボソーム膜は、生体膜と構造的に似ているため、リボソームが組織に適用されるとリボソーム二重層は細胞膜の二重層と融合する。リボソームと細胞の融合が進むにつれて、RNAi剤を含む内側水性部分の内容物は、細胞内へと送達されて、そこでRNAi剤が、標的RNAに特異的に結合することができ、そしてRNAiを媒介することができる。場合によっては、リボソームはまた、例えば、RNAi剤を特定の細胞種に誘導するために、特異的に標的とされる。

【0716】

RNAi剤を含むリボソームは、様々な方法によって調製することができる。一実施例

では、リポソームの脂質成分が界面活性剤に溶解され、それによって脂質成分でミセルが形成される。例えば、脂質成分は、両親媒性カチオン性脂質又は脂質コンジュゲートであり得る。界面活性剤は、高い臨界ミセル濃度を有し得、非イオン性であり得る。例示的な界面活性剤としては、コール酸、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸、及びラウロイルサルコシンが挙げられる。次いで、RNAi剤調製物は、脂質成分を含むミセルに加えられる。脂質上のカチオン性基が、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、界面活性剤は、RNAi剤のリポソーム調製物を得るために、例えば、透析などによって、除去される。

【0717】

必要であれば、凝集反応の際に、例えば、制御された添加によって、凝集を補助する担体化合物を加えることもできる。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマーであり得る（例えば、スペルミン又はスペルミジン）。pHも、縮重に都合よく調節することができる。

10

【0718】

送達ビヒクルの構造的な成分としてポリヌクレオチド／カチオン性脂質複合体を組み込んだ安定なポリヌクレオチド送達ビヒクルを産生する方法は、例えば、WO96/37194に更に記載されており、これはその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。リポソーム形成はまた、Felgner, P. L. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417、米国特許第4,897,355号、米国特許第5,171,678号、Bangham et al., (1965) M. Mol. Biol. 23:238、Olson et al., (1979) Biochim. Biophys. Acta 557:9、Szoka et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4194、Mayhew et al., (1984) Biochim. Biophys. Acta 775:169、Kim et al., (1983) Biochim. Biophys. Acta 728:339、及びFukunaga et al., (1984) Endocrinol. 115:757に記載されている例示的な方法の1つ以上の態様を含み得る。送達ビヒクルとして使用するための適切なサイズの脂質凝集体を調製するために通常使用される技術としては、超音波処理及び凍結融解に加えて押出成形が挙げられる（例えば、Mayer et al., (1986) Biochim. Biophys. Acta 858:161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ときには、顕微溶液化を使用することができる（Mayhew et al., (1984) Biochim. Biophys. Acta 775:169）。これら方法は、RNAi剤の調製物をリポソームに包含させるために容易に適合される。

20

30

【0719】

リポソームは、2つの広いクラスに分類される。カチオン性リポソームは、正に帯電したリポソームであって、負に帯電した核酸分子と相互作用して安定な複合体を形成するリポソームである。正に帯電した核酸／リポソーム複合体は、負に帯電した細胞表面に結合して、エンドソームに内在化される。エンドソーム内の酸性pHに起因して、リポソームは破裂して、その内容物を細胞質中へと放出する（Wang et al., (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 147:980-985）。

40

【0720】

リポソームは、pH感受性であるか又は負に帯電しており、それらとの複合体ではなく核酸を捕捉する。核酸と脂質との両方が、同様の電荷であるため、複合体形成ではなく反発が生じる。それにもかかわらず、一部の核酸は、これらリポソームの水性内側部分内に捕捉される。チミジンキナーゼ遺伝子をコードする核酸を、培養液中の細胞単一層に送達するために、pH感応性リポソームが使用されてきた。外因性遺伝子の発現が、標的細胞内において検出された（Zhou et al., (1992) Journal of Controlled Release, 19:269-274）。

50

【0721】

リポソーム組成物の主要なタイプの1つは、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、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)又はジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)から形成され得る。アニオン性リポソーム組成物は、概して、ジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成され、一方で、アニオン性融合性リポソームは、主にジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)から形成される。別のタイプのリポソーム組成物は、ホスファチジルコリン(PC)から形成され、例えば、大豆製PC及び卵製PCなどである。別のタイプは、リン脂質又はホスファチジルコリン又はコレステロールの混合物から形成される。

10

【0722】

インビトロ及びインビボでリポソームを細胞に導入する他の方法の例としては、米国特許第5,283,185号、米国特許第5,171,678号、WO94/00569、WO93/24640、WO91/16024、Felgner, (1994) J. Biol. 269:2550、Nabel, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307、Nabel, (1992) Human Gene Ther. 3:649、Gershon, (1993) Biochem. 32:7143、及びStrauss, (1992) EMBO J. 11:417が挙げられる。

【0723】

非イオン性リポソーム系は、特に非イオン性界面活性剤とコレステロールとを含む系は、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性を判定するためにも試験されてきた。Novasome (商標) I (ジラウリン酸グリセリル/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) 及びNovasome (商標) 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中にシクロスポリンAを送達するために使用された。結果として、こうした非イオン性リポソーム系が、皮膚の異なる層中へのシクロスポリンAの蓄積を促進する際に有効であることが示された(Huet al., (1994) S. T. P. Pharma. Sci., 4(6):466)。

20

【0724】

リポソームはまた、「立体的に安定化した」リポソームも含み、本用語は、本明細書において使用する場合、1つ以上の特化された脂質を含むリポソームであって、リポソームに組み込まれた場合に、結果としてこの特化された脂質を欠くリポソームと比較して循環寿命の向上が生じるような1つ以上の特化された脂質を含むリポソームを指す。立体的に安定化したリポソームの例としては、リポソームのベシクル形成脂質部分が(A)例えばモノシアロガングリオシドGM₁などである1つ以上の糖脂質を含むか、又は(B)例えばポリエチレングリコール(PEG)部分などである1つ以上の親水性ポリマーで誘導体化されている、リポソームである。いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、少なくとも、ガングリオシド、スフィンゴミエリン、又はPEG誘導体化脂質を含む立体的に安定化されたリポソームの場合、これら立体的に安定化されたリポソームの循環半減期の向上は、細網内皮系(RES)の細胞内への取り込みの減少に由来すると、当技術分野では考えられている(Allen et al., (1987) FEBS Letters, 223:42、Wu et al., (1993) Cancer Research, 53:3765)。

30

40

【0725】

1つ以上の糖脂質を含む様々なリポソームが、当技術分野で既知である。Papahadjopoulosら(Ann. N. Y. Acad. Sci., (1987), 507:64)は、モノシアロガングリオシドGM₁、硫酸ガラクトセレブロシド、及びホスファチジルイノシトールがリポソームの血液半減期を向上させる能力について報告した。これらの知見は、Gabizonら(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1988), 85, :6949)によって解説されている。いずれもAllenらに

50

よる米国特許第4,837,028号及びWO88/04924では、(1)スフィンゴミエリンと(2)ガングリオシドG_{M1}又はガラクトセレブロシド硫酸エステルとを含むリポソームが開示されている。米国特許第5,543,152号(Webbら)は、スフィンゴミエリンを含むリポソームについて開示している。1,2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含むリポソームが、WO97/13499(Limら)において開示されている。

【0726】

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、細胞膜に融合することができるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、原形質膜と効率的には融合することができないが、インビボ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。

10

【0727】

リポソームの更なる利点としては、天然のリン脂質から得られるリポソームが生体適合性及び生分解性であること、リポソームは広範囲の水及び脂質溶解性薬物を組み込むことができること、リポソームはそれらの内部コンパートメント内のカプセル化されたRNAi剤を代謝及び分解から保護することができること、が挙げられる(Rosoff, in「Pharmaceutical Dosage Forms,」Lieberman, Rieger and Banker(Eds.), 1988, volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製における重要な検討事項は、脂質表面の電荷、ベシクルのサイズ、及びリポソームの水の量である。

20

【0728】

正に帯電した合成カチオン性脂質である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リド(DOTMA)は、小リポソームを形成するために使用することができ、この小リポソームは、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合することができる脂質-核酸複合体を形成する核酸と自発的に相互作用して、結果としてRNAi剤の送達となされる(例えば、Felgner, P. L. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417、並びにDOTMAの説明及びDNAとのその使用については米国特許第4,897,355号を参照されたい)。

【0729】

DOTMA類似体である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)は、リン脂質と組み合わせて使用することにより、DNA複合体化ベシクルを形成することができる。リポフェクチン(商標)(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.)は、負に帯電したポリヌクレオチドと自発的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、生組織培養細胞内へのアニオン性の核酸の高度な送達に有効な薬剤である。十分に正に帯電したリポソームを使用すると、結果として得られる複合体上の正味電荷も正である。この方法において調製された正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自発的に結合し、原形質膜と融合して、機能的核酸を、例えば組織培養細胞内へと効率的に送達する。別の市販のカチオン性脂質である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、エーテル連結ではなくエステルで連結している点がDOTMAと異なる。

30

40

【0730】

他の報告されたカチオン性脂質化合物としては、様々な部分にコンジュゲートしているものが挙げられ、例えば2つのタイプの脂質の一方にコンジュゲートしているカルボキシスベルミンなどが挙げられ、例えば5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタオレイルアミド(「DOGS」)(トランスフェクタム(Transfectam)(商標)、Promega, Madison, Wisconsin)及びジパルミトイルホスファチ

50

ジルエタノールアミン 5-カルボキシスペルミル-アミド（「DPPES」）などの化合物が挙げられる（例えば、米国特許第5,171,678号を参照されたい）。

【0731】

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中へと製剤化されているコレステロールでの脂質の誘導体化（「DC-Chol」）を含む（Gao, X. and Huang, L., (1991) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280を参照されたい）。ポリリジンとDOPEにコンジュゲートすることによって作製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効果的であることが報告されている（Zhou, X. et al., (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8）。ある特定の細胞系の場合、コンジュゲートしたカチオン性脂質を含むこれらリポソームは、低い毒性を示すと言われており、DOTMA含有組成物よりもより効率的なトランスフェクションをもたらす。他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIE及びDMRIE-HP（Vical, La Jolla, California）及びリポフェクタミン（DOSPA）（Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland）が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に好適な他のカチオン性脂質は、WO98/39359及びWO96/37194に記載されている。

10

【0732】

リポソーム製剤は、局所投与に特に適しており、リポソームは、他の製剤に勝るいくつかの利点をもたらす。こうした利点としては、投与された薬物の高い体内吸収に関連する副作用の減少、所望の標的での投与された薬物の蓄積の増加、及びRNAi剤を皮膚に投与する能力が挙げられる。いくつかの実践形態では、リポソームは、RNAi剤を上皮細胞に送達するため、及び真皮組織内、例えば、皮膚内へのRNAi剤の浸透を増強するために、使用される。例えば、リポソームは、局所的に塗布することができる。リポソームとして製剤化された薬物の皮膚への局所的な送達は、文献に報告されている（例えば、Weiner et al., (1992) *Journal of Drug Targeting*, vol. 2, 405-410及びdu Plessis et al., (1992) *Antiviral Research*, 18:259-265、Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., (1998) *Biotechniques* 6:682-690、Itani, T. et al., (1987) *Gene* 56:267-276、Nicolau, C. et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 149:157-176、Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. (1983) *Meth. Enzymol.* 101:512-527、Wang, C. Y. and Huang, L., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855を参照されたい）。

20

30

【0733】

非イオン性リポソーム系は、特に非イオン性界面活性剤とコレステロールとを含む系は、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性を判定するためにも試験されてきた。マウスの皮膚の真皮内に薬物を送達するために、Novasome I（ジラウリン酸グリセリル／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）及び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使用された。RNAi剤を含むこうした製剤は、皮膚障害を治療するのに有用である。

40

【0734】

RNAi剤を含むリポソームは、非常に変形可能に作製することができる。こうした変形能は、リポソームがリポソームの平均半径より小さい孔を通して浸透することを可能にする。例えば、トランスファーソーム（transferosome）は、変形可能なタイプのリポソームである。トランスファーソームは、表面エッジ活性化剤（surface edge activator）、通常は界面活性剤、を標準のリポソーム組成物に加え

50

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 剤を皮膚のケラチン生成細胞に送達するために、感染によって、例えば皮下に送達することができる。脂質ベシクルは、インタクトな哺乳動物の皮膚を通過するために、好適な経皮勾配の影響下において、それぞれが 50 nm 未満の直径を有する一連の微細孔を通過しなければならない。加えて、脂質特性に起因して、これらトランスファーソームは、自己最適性（例えば皮膚などにおいて、孔の形状に順応性のある）で、自己修復性であり得、断片化することなくそれらの標的に頻繁に到達することができ、また多くの場合、自己負荷性（self-loading）であり得る。

【0735】

本開示に従う他の製剤は、2008 年 1 月 2 日に出願された米国仮出願第 61/018, 616 号、2008 年 1 月 2 日に出願された第 61/018, 611 号、2008 年 3 月 26 日に出願された第 61/039, 748 号、2008 年 4 月 22 日に出願された第 61/047, 087 号、及び 2008 年 5 月 8 日に出願された第 61/051, 528 号に記載されている。2007 年 10 月 3 日に出願された PCT 出願第 PCT/US2007/080331 号にも、本開示に従う製剤が記載されている。

【0736】

トランスファーソームは、更に別のタイプのリポソームであり、薬物送達ビヒクルの関心ある候補である高度に変形可能な脂質集合体である。トランスファーソームは、脂質滴であって、この脂質滴より小さい孔を通して容易に浸透することができるほど高度に変形可能である脂質滴として説明することができる。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適応可能であり、例えば、それらは、自己最適性（皮膚において孔の形状に順応性のある）で、自己修復性であり、断片化することなくそれらの標的に頻繁に到達し、多くの場合自己負荷性である。トランスファーソームを作製するために、表面エッジ活性化剤、通常は界面活性剤、を標準リポソーム組成物に加えることができる。トランスファーソームは、皮膚に血清アルブミンを送達するために使用されてきた。血清アルブミンのトランスファーソーム媒介送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注入と同じくらい有効であることが分かっている。

【0737】

界面活性剤は、本明細書において説明されるような製剤において、特にエマルション（マイクロエマルションを含む）及びリポソームにおいて、広い応用が見出される。天然及び合成の、多くの異なるタイプの界面活性剤の特性を分類及び格付けする最もよくある手法としては、親水性／親油性バランス（HLB）を使用するものがある。親水性基（「頭」としても知られる）の性質が、製剤中で使用される様々な界面活性剤を分類するのに最も有用な手段となる（Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285）。

【0738】

界面活性剤分子がイオン化されない場合、これらは、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、医薬品及び化粧製品において広い応用が見出され、広範囲の pH 値にわたって使用可能である。概して、それらの HLB 値は、それらの構造に応じて 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、及びエトキシ化エステルが挙げられる。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、及びエトキシ化／プロポキシ化ブロックポリマーなどの非イオン性のアルカノールアミド及びエーテルもまた、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のクラスの最も普及した要素である。

【0739】

水に溶解又は分散されたときに、界面活性剤分子が負電荷を保持する場合、界面活性剤は、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、例えばセッケンなど

であるカルボン酸エステル、アシル乳酸エステル、アミノ酸のアシルアミド、例えば、アルキル硫酸エステル及びエトキシ化アルキル硫酸エステルなどである硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホン酸エステルなどであるスルホン酸エステル、アシルイセチオン酸エステル、アシルタウリン酸塩、及びスルホコハク酸塩、並びにリン酸塩が挙げられる。アニオン性剤のクラスの最も重要な要素は、アルキル硫酸エステル及びセッケンである。

【0740】

水に溶解又は分散されたときに、界面活性剤分子が正電荷を保持する場合、界面活性剤は、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及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、このクラスの最も使用される要素である。

【0741】

界面活性剤分子が、正電荷又は負電荷のどちらかを保持する能力を有する場合、界面活性剤は、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-アルキルペタイン、及びホスファチドが挙げられる。

【0742】

薬品、製剤、及びエマルション中での界面活性剤の使用は、概説されている (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285)。

【0743】

本開示の方法での使用のための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、本明細書においては、分子の全ての疎水性部分が内側に向くように両親媒性分子が球状構造で整列され、それによって親水性部分が周囲の水相に接触したままになる、特定のタイプの分子アセンブリとして定義される。環境が疎水性である場合、逆の配置で存在する。

【0744】

経皮的な膜を通る送達に好適な混合ミセル製剤は、siRNA組成物の水溶液と、アルカリ金属のC₈~C₂₂アルキル硫酸塩と、ミセル形成化合物とを混合することによって調製され得る。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、ルリジサ油、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 (tri hydroxy oxo cholanyl glycine) 及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、リシン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテル及びその類似体、ポリドカノールアルキルエーテル及びその類似体、ケノデオキシコール酸塩 (chenodeoxycholate)、デオキシコール酸塩、並びにそれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属のアルキル硫酸塩と同時に加えてもよく、それらを加えた後に加えてもよい。混合ミセルは、原材料の、実質的に任意の種類の混合によって形成されることとなるが、より小さいサイズのミセルを提供するために激しい混合によって形成されることとなる。

【0745】

一方法では、siRNA組成物と少なくともアルカリ金属のアルキル硫酸塩とを含む第1のミセル組成物が調製される。次いで、第1のミセル組成物を、少なくとも3種のミセル形成化合物と混合し、混合ミセル組成物を形成する。別の方法では、ミセル組成物は、siRNA組成物とアルカリ金属のアルキル硫酸塩と、ミセル形成化合物のうちの少なくとも1つとを混合して、その後激しく混合しながら、残りのミセル形成化合物を加えることによって調製される。

【0746】

製剤を安定化させるため、及び細菌増殖から保護するために、フェノール又はm-クレゾールを混合ミセル組成物に加えてもよい。あるいは、フェノール又はm-クレゾールを、ミセル形成原材料とともに加えてもよい。グリセリンなどの等張剤を、混合ミセル組成

10

20

30

40

50

物の形成後に加えてもよい。

【0747】

ミセル製剤を噴霧剤として送達する場合には、本製剤をエアロゾルディスペンサーに入れることができ、ディスペンサーには噴射剤を装填する。噴射剤は、加圧されており、ディスペンサー中では液体状態である。原材料の比率は、水相及び噴射剤の相が1つになるように、すなわち、一相で存在するように、調節される。二相で存在する場合には、例えば、計量弁などによって、内容物の一部を噴出する前に、ディスペンサーを振る必要がある。医薬品の分配用量が、微細な噴霧で計量弁から射出される。

【0748】

噴射剤は、含水素クロロフルオロカーボン、含水素フルオロカーボン、ジメチルエーテル、及びジエチルエーテルを含んでもよい。あ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) が使用されてもよい。

【0749】

必須の原材料の特定の濃度は、比較的簡単な実験によって決定することができる。口腔による吸収の場合には、注射での又は胃腸管経由の投与のための投与量を、例えば、少なくとも2倍又は3倍に、増加させることが望ましいことが多い。

【0750】

B. 脂質粒子

RNAi剤は、例えば、本開示のdsRNAは、例えば、LNPなどである脂質製剤において、又は他の核酸-脂質粒子において、完全にカプセル化され得る。

【0751】

本明細書において使用される場合、「LNP」という用語は、安定な核酸-脂質粒子を指す。LNPは、典型的には、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び粒子の凝集を防ぐ脂質（例えば、PEG-脂質コンジュゲート）を含む。LNPは、静脈(i.v.)注射後に循環寿命の延長を呈し、遠位部位（例えば、投与部位から物理的に離れた部位）において蓄積するため、全身投与に極めて有用である。LNPは「pSPLP」を含み、これはWO00/03683に記載されるようなカプセル化された縮合剤-核酸複合体を含む。本開示の粒子は、典型的には、平均粒径が約50nm～約150nmであり、より典型的には約60nm～約130nm、より典型的には約70nm～約110nmであり、最も典型的には約70nm～約90nmであり、実質的には無毒性である。加えて、核酸は、本開示の核酸-脂質粒子中に存在する場合、水溶液中において、ヌクレアーゼによる分解に対して抵抗性を有する。核酸-脂質粒子及びその調製方法は、例えば、米国特許第5,976,567号、第5,981,501号、第6,534,484号、第6,586,410号、第6,815,432号、米国特許出願公開第2010/0324120号、及びWO96/40964において開示されている。

【0752】

一実施形態では、薬物に対する脂質の比（質量/質量比）（例えば、dsRNAに対する脂質の比）は、約1:1～約50:1、約1:1～約25:1、約3:1～約15:1、約4:1～約10:1、約5:1～約9:1、又は約6:1～約9:1の範囲となる。上に列記した範囲の中間にある範囲も、本開示の一部であることが企図される。

【0753】

RNAi剤の送達用のある特定のLNP製剤は、当技術分野において記述されてきたものであり、例えば、WO2008/042973において説明されるような、例えば、「LNP01」製剤が挙げられ、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0754】

追加の例示的な脂質-dsRNA製剤を、下記の表で特定する。

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

	イオン化可能/カチオン性脂質	カチオン性脂質/非カチオン性脂質/コレステロール/PEG-脂質コンジュゲート 脂質:siRNA比
SNA LP-1	1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質:siRNA 約7:1
2-XT C	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂質:siRNA 約7:1
LNP0 5	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA 約6:1
LNP0 6	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA 約11:1
LNP0 7	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA 約6:1
LNP0 8	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA 約11:1
LNP0 9	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-ジメチル-2,2-di((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1,3]ジオキソール-5-アミン(ALN100)	ALN100/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP11	4-(ジメチルアミノ)ブタン酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル(MC3)	MC-3/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ジドデカン(didodecan)-2-オール(Tech G1)	Tech G1/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA:33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂質:siRNA:11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂質:siRNA:11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA:7:1

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA:10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA:12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂質:siRNA:8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA:10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA:7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA:10:1

10

20

D S P C : ジステアロイルホスファチジルコリン

D P P C : ジパルミトイルホスファチジルコリン

P E G - D M G : P E G - ジジミリストイルグリセロール (C 1 4 - P E G 、 又は P E G - C 1 4) (平均分子量 2 0 0 0 の P E G)

P E G - D S G : P E G - ジステリルグリセロール (C 1 8 - P E G 、 又は P E G - C 1 8) (平均分子量 2 0 0 0 の P E G)

P E G - c D M A : P E G - カルバモイル - 1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピルアミン (平均分子量 2 0 0 0 の P E G)

30

【 0 7 5 5 】

製剤を含む S N A L P (1 , 2 - ジリノレニルオキシ - N , N - ジメチルアミノプロパン (D L i n D M A)) は、W O 2 0 0 9 / 1 2 7 0 6 0 に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 7 5 6 】

製剤を含む X T C は、W O 2 0 1 0 / 0 8 8 5 3 7 に記載されており、これはその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 7 5 7 】

製剤を含む M C 3 は、例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 3 2 4 1 2 0 号に記載されており、これはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【 0 7 5 8 】

製剤を含む A L N Y - 1 0 0 は、W O 2 0 1 0 / 0 5 4 4 0 6 に記載されており、これはその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 7 5 9 】

製剤を含む C 1 2 - 2 0 0 は、W O 2 0 1 0 / 1 2 9 7 0 9 に記載されており、これはその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 7 6 0 】

経口投与のための組成物及び製剤には、粉末又は顆粒、微粒子、ナノ粒子、水又は非水性媒体中の懸濁剤又は溶液、カプセル剤、ゲルカプセル剤、サシェ剤、錠剤又はミニ錠剤が含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、又は結合剤が、望ましい場合

50

がある。いくつかの実施形態では、経口製剤は、本開示において取り上げる d s R N A が 1 つ以上の浸透促進剤、界面活性剤、及びキレート化剤とともに投与される製剤である。好適な界面活性剤としては、脂肪酸又はそのエステル若しくは塩、胆汁酸又はその塩が挙げられる。好適な胆汁酸／塩としては、ケノデオキシコール酸 (C D C A) 及びウルソデオキシケノデオキシコール酸 (U D C A)、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸 (g l u c h o l i c a c i d)、グリコール酸 (g l y c h o l i c a c i d)、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、タウロ-24, 25-ジヒドロ-7β-ヒドロキシジヒドロキシ酸ナトリウム、並びにグリコジヒドロキシジヒドロキシ酸ナトリウムが挙げられる。好適な脂肪酸としては、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレイン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、1-モノカプリン酸グリセリル、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、又はモノグリセリド、ジグリセリド、又はその薬学的に許容される塩 (例えば、ナトリウム) が挙げられる。いくつかの実施形態では、浸透促進剤の組み合わせが用いられ、例えば、胆汁酸／塩と組み合わせた脂肪酸／塩である。例示的な組み合わせの 1 つには、ラウリン酸、カプリン酸、及び U D C A のナトリウム塩がある。更に、浸透促進剤としては、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが挙げられる。本開示において取り上げる d s R N A は、噴霧された乾燥粒子などの粒状形態で、経口で送達することができ、あるいはマイクロ粒子又はナノ粒子を形成するために複合体化することができる。d s R N A 複合体化薬剤としては、ポリ-アミノ酸、ポリイミン、ポリアクリレート、ポリアルキルアクリレート、ポリオキシエタン、ポリアルキルシアノアクリレート、カチオン化ゼラチン、アルブミン、デンプン、アクリレート、ポリエチレングリコール (P E G) 及びデンプン、ポリアルキルシアノアクリレート、D E A E 誘導ポリイミン、プルラン (p o l l u l a n)、セルロース、及びデンプンが挙げられる。好適な複合体化薬剤としては、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リシン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスぺルミン、プロタミン、ポリビニルピリジン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレン P (T D A E)、ポリアミノスチレン (例えば、p-アミノ)、ポリ (メチルシアノアクリレート)、ポリ (エチルシアノアクリレート)、ポリ (ブチルシアノアクリレート)、ポリ (イソブチルシアノアクリレート)、ポリ (イソヘキシルシアノアクリレート)、D E A E-メタクリレート、D E A E-ヘキシルアクリレート、D E A E-アクリルアミド、D E A E-アルブミン、及び D E A E デキストラン、ポリメチルアクリレート、ポリヘキシルアクリレート、ポリ (D, L-乳酸)、ポリ (D L-乳酸-コ-グリコール酸 (P L G A)、アルギン酸塩、並びにポリエチレングリコール (P E G) が挙げられる。d s R N A のための経口製剤及びその調製は、米国特許第 6, 887, 906 号、米国特許出願公開第 2003/0027780 号、及び米国特許第 6, 747, 014 号において詳細に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0761】

非経口、実質内 (脳内へ)、髄腔内、脳室内、又は肝内への投与のための組成物及び製剤は、緩衝剤、希釈剤、及び他の好適な添加剤、例えば、限定するものではないが、浸透促進剤、担体化合物、及び他の薬学的に許容される担体又は賦形剤などを含むことができる滅菌水溶液を含むことができる。

【0762】

本開示の医薬組成物は、限定するものではないが、溶液、エマルション、及びリポソームを含む製剤を含む。これら組成物は、予め形成した液体、自己乳化型固体、及び自己乳化型半固体を含むがこれらに限定されない様々な構成要素から生成することができる。特に好ましいのは、A P P 関連疾患又は障害を処置する場合において脳を標的化する製剤である。

【0763】

単位剤形で簡便に提供され得る本開示の医薬製剤は、製薬産業において周知の従来技法

に従って調製することができる。こうした技法としては、活性成分を医薬担体又は賦形剤と会合させるステップを含む。概して、製剤は、活性成分を、液体担体又は微粉化された固体担体又はその両方と均一かつ密接に混合し、次いで、必要であれば、生成物を成形することによって調製される。

【0764】

本開示の組成物は、限定するものではないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、軟質ゲル剤、坐剤、及び浣腸剤などの多くの可能な剤形のうちのいずれかに製剤化することができる。本開示の組成物は、水性媒体、非水性媒体、又は混合媒体中の懸濁剤として製剤化することもできる。水性懸濁剤は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、又はデキストランを含む、懸濁剤の粘度を増加させる物質を更に含み得る。懸濁剤はまた、安定剤を含み得る。

10

【0765】

C. 追加の製剤

i. エマルション

本開示の組成物は、エマルションとして調製及び製剤化することができる。エマルションは、典型的には、一方の液体が、通常直径0.1 μm を超える液滴の形態でのもう一方の液体中に分散した不均一系である（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY, Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199, Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245, Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335, Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301を参照されたい）。エマルションは、多くの場合、互いに密に混合し分散した二種の不混和性液相を含む二相系である。概して、エマルションは、油中水型（w/o）又は水中油型（o/w）のいずれかのものであり得る。水相が、細かく分かれて微細な液滴として大量の油相中に分散している場合、その結果として得られる組成物を、油中水型（w/o）エマルションと呼ぶ。あるいは、油相が、細かく分かれて微細な液滴として大量の水相中に分散している場合、その結果として得られる組成物を、水中油型（o/w）エマルションと呼ぶ。エマルションは、分散相と、水相、油相、又は別個の相としてのそれ自体のいずれかの中に溶液として存在し得る活性薬物とに加えて、追加の成分を含み得る。乳化剤、安定剤、色素、及び抗酸化剤などの医薬賦形剤も、必要に応じてエマルション中に存在していてもよい。医薬エマルションは、例えば、油中水中油型（o/w/o）及び水中油中水型（w/o/w）エマルションの場合などで、二相超で構成される多相エマルションでもあってもよい。こうした複合剤形によれば、多くの場合、単純な二相エマルションでは与えられない一定の利点をもたらされる。w/o/wエマルションは、o/wエマルションの個々の油滴が小水滴を封入する多相エマルションにより構成される。同様に、o/w/oエマルションは、連続油相中で安定化した水の小滴中に封入された油滴の系によりもたらされる。

20

30

40

【0766】

エマルションは、熱力学的安定性がほとんどないか又は全くないことが特徴である。多

50

くの場合、エマルションの分散相又は不連続相は、外部相又は連続相中に良好に分散しており、乳化剤によって、又は製剤の粘度によってこの形態で維持される。エマルション形態の軟膏基剤及びクリーム剤の場合と同様に、エマルションの相のいずれかは、半固体又は固体であり得る。エマルションを安定化させる他の手段としては、エマルションのいずれかの相に組み込まれ得る乳化剤の使用を必要とする。乳化剤は、以下の4つのカテゴリ、合成界面活性剤、天然乳化剤、吸収基剤、及び微細分散固体に大きく分類することができる（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY、
Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199を参照されたい）。

10

【0767】

表面活性剤としても知られる合成界面活性剤は、エマルションの剤形において広い適用可能性が見出されており、文献において検討されている（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY、
Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 285、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, volume 1, p. 199を参照されたい）。界面活性剤は、典型的には両親媒性であるので、親水性部分及び疎水性部分を含む。界面活性剤の疎水性に対する親水性の比は、親水性／親油性バランス（HLB）と命名されており、製剤の調製において界面活性剤を分類及び選択する際の有益なツールである。
界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて以下の異なるクラス、非イオン性、アニオン性、カチオン性、及び両性に分類することができる（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY、
Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 285を参照されたい）。

20

30

【0768】

エマルション製剤において使用される天然の乳化剤としては、ラノリン、蜜蝋、ホスファチド、レシチン、及びアカシアが挙げられる。吸収基剤は、親水特性を有するため、これらは水を吸収してw/oエマルションを形成し、それでもなおそれらの半固体の稠度を維持することができるものであり、無水ラノリン及び親水ワセリンなどである。微粒子となった固体も、とりわけ界面活性剤との併用で、及び粘性調製物として、良好な乳化剤として使用されている。これらとしては、重金属水酸化物などの極性無機固体、ベントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウム、及びコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウムなどの非膨潤性粘土、顔料、並びに炭素又はトリステアリン酸グリセリルなどの非極性固体が挙げられる。

40

【0769】

50

非常に多様な非乳化材料もまた、エマルション製剤に含まれて、エマルションの特性に寄与する。これらとしては、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪酸エステル、湿潤剤、親水性コロイド、防腐剤、及び抗酸化剤が挙げられる (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 335、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199)。
【0770】

10

親水性コロイド又はハイドロコロイドとしては、天然ゴム及び合成ポリマー、例えば多糖 (例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲナン、グアーガム、カラヤガム、及びトラガント)、セルロース誘導体 (例えば、カルボキシメチルセルロース及びカルボキシプロピルセルロース)、及び合成ポリマー (例えば、カルボマー、セルロースエステル、及びカルボキシビニルポリマー) が挙げられる。これらは水中で分散又は膨潤して、コロイド状溶液を形成し、それが、分散相液滴の周囲に強力な界面膜を形成することと、外側相の粘度を増加させることとによって、エマルションを安定化する。

【0771】

エマルションは、多くの場合、微生物の増殖を容易に支援することができる多くの成分、例えば炭水化物、タンパク質、ステロール、及びホスファチドを含み、これら製剤は、多くの場合、防腐剤を組み込んでいる。エマルション製剤に含まれる通常使用される防腐剤としては、メチルパラベン、プロピルパラベン、四級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、及びホウ酸が挙げられる。製剤の劣化を防止するために、通常、抗酸化剤もエマルション製剤に加えられる。使用される抗酸化剤は、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンなどのフリーラジカル捕捉剤、又はアスコルビン酸又はメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元剤、並びにクエン酸、酒石酸、及びレシチンなどの酸化防止共力薬であり得る。

20

【0772】

経皮、経口、及び非経口経路によるエマルション製剤の適用並びにそれらの製造方法は、文献において検討されている (例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199を参照されたい)。経口送達用のエマルション製剤は、製剤化の容易さ、並びに吸収及びバイオアベイラビリティの見地からの有効性を理由に、非常に広く使用されている (例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY、Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199を参照されたい)。o/wエマルション

30

40

50

として通常は経口投与されている材料のなかには、鉱油系の緩下剤、脂溶性ビタミン、及び高脂肪栄養製剤がある。

【0773】

ii. マイクロエマルション

本開示の一実施形態では、RNAi剤及び核酸の組成物は、マイクロエマルションとして製剤化される。マイクロエマルションは、単一の、光学的等方性で熱力学的に安定した液体溶液である、水、油、及び両親媒性物質の系として規定され得る（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY、Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245を参照されたい）。典型的には、マイクロエマルションは、はじめに油を界面活性剤水溶液に分散させ、次いで十分な量の第4の成分、概して中鎖のアルコール、を加えて透明な系を形成することによって調製される系である。したがって、マイクロエマルションはまた、表面活性分子の界面膜によって安定化される、2つの不混和性液体の熱力学的に安定で等方的に透明な分散液として説明されてもいる（Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, 185～215頁）。マイクロエマルションは、通常、油、水、界面活性剤、補助界面活性剤、及び電解質を含む3～5個の成分を組み合わせることによって調製される。マイクロエマルションが油中水（w/o）型又は水中油（o/w）型のいずれであるかは、使用する油及び界面活性剤の特性並びに界面活性剤分子の極性の頭と炭化水素の尾との構造及び幾何学的パッキングに依存する（Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271）。

【0774】

状態図を利用する現象学的アプローチが、広く研究されており、これは、マイクロエマルションをどのようにして製剤化するか of 包括的な知識を当業者に与えた（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY、Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245、Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 335を参照されたい）。従来のエマルションと比較して、マイクロエマルションは、水不溶性薬物を、自発的に形成された熱力学的に安定な液滴の製剤中で可溶化するという利点を提供する。

【0775】

マイクロエマルションの調製において使用される界面活性剤としては、限定するものではないが、単独での、又は補助界面活性剤と組み合わせた、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brig 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート（ML310）、テトラグリセロールモノオレエート（MO310）、ヘキサグリセロールモノオレエート（PO310

）、ヘキサグリセロールペンタオレート（PO500）、デカグリセロールモノカプレー（decaglycerol monocaprates）（MCA750）、デカグリセロールモノオレート（MO750）、デカグリセロールセキオレート（decaglycerol sequioleates）（SO750）、デカグリセロールデカオレート（DAO750）が挙げられる。補助界面活性剤は、通常、エタノール、1-ブタンオール、及び1-ブタノールなどである単鎖アルコールであり、界面活性剤フィルムに浸透して、その結果界面活性剤分子の間で生じる空間を理由に乱れた膜が生じることによって、界面の流動性を増大させる働きをする。しかしながらマイクロエマルションは、補助界面活性剤を用いずに調製することもでき、アルコールを含まない自己乳化性マイクロエマルション系は、当技術分野で既知である。水相は、典型的には、限定するものではないが、水、薬物の水溶液、グリセリン、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、及びエチレングリコールの誘導体であり得る。油相は、限定するものではないが、Captex 300、Captex 355、Capmul MC M、脂肪酸エステル、中鎖（C8～C12）モノ、ジ、及びトリグリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリコール化グリセリド、飽和ポリグリコール化C8～C10グリセリド、植物油及びシリコン油を含み得る。

10

【0776】

マイクロエマルションは、薬物可溶化及び薬物吸収の向上の見地から、特に興味深い。脂質系マイクロエマルション（o/w及びw/oいずれも）は、薬物の経口バイオアベイラビリティを向上するために提案されてきたものであり、ペプチドが挙げられる（例えば、米国特許第6,191,105号、第7,063,860号、第7,070,802号、第7,157,099号、Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390、Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205を参照されたい）。マイクロエマルションは、薬物の可溶化の向上、酵素加水分解からの薬物の保護、界面活性剤によって誘導される膜流動性及び浸透性の変化に起因する薬物吸収の可能な増強、調製の容易さ、固体剤形よりも経口投与が容易であること、臨床効力の向上、並びに毒性の減少という利点をもたらす（例えば、米国特許第6,191,105号、第7,063,860号、第7,070,802号、第7,157,099号、Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385、Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143）。多くの場合、マイクロエマルションは、それらの成分が周囲温度において一緒にされたときに自然発生的に形成され得る。これは、熱的不安定性の薬物であるペプチド又はRNAi剤を製剤化する場合に、特に有利であり得る。更にマイクロエマルションは、美容及び医薬的な用途の両方で、活性成分の経皮送達にとっても有効であるとされている。本開示のマイクロエマルション組成物及び製剤は、胃腸管からのRNAi剤及び核酸の全身吸収の増加を促進し、RNAi剤及び核酸の局所的な細胞取り込みを向上することが予想される。

20

30

【0777】

本開示のマイクロエマルションは、製剤の性質を向上させるため、並びに本開示のRNAi剤及び核酸の吸収を高めるために、モノステアリン酸ソルビタン（Grill 3）、ラブラソール（Labrasol）、及び浸透促進剤などの追加の成分及び添加剤も含むことができる。本開示のマイクロエマルションにおいて使用される浸透促進剤は、5つの広いカテゴリ、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤、及び非キレート化非界面活性剤のうちの1つに属するとして分類することができる（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92）。これらクラスの各々は、上で考察した。

40

【0778】

i i i . マイクロ粒子

本開示のRNAi剤は、粒子に、例えば、マイクロ粒子などに組み込まれてもよい。マ

50

イクロ粒子は、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、又はこれらの技法の組み合わせを含む他の方法によって製造されてもよい。

【0779】

i v . 浸透促進剤

一実施形態では、本開示は、動物の皮膚への、核酸、特にRNAi剤の効率的な送達を実施するために、様々な浸透促進剤を採用する。大部分の薬物は、イオン化形態及び非イオン化形態の両方で溶液中に存在する。しかしながら、通常、脂溶性又は親油性の薬剤のみが、細胞膜を容易に横断する。横断しようとする膜が、浸透促進剤で処理されていれば、非親油性薬剤であっても細胞膜を横断することができることが分かっている。浸透促進剤はまた、非親油性薬剤が細胞膜を横断して拡散するのを補助することに加えて、親油性薬剤の透過性も高める。

10

【0780】

浸透促進剤は、5つの広いカテゴリ、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤、及び非キレート化非界面活性剤、のうちの1つに属するものとして分類することができる（例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002、Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92を参照されたい）。浸透促進剤の上述のクラスの各々については、以下で詳細に説明される。

20

【0781】

界面活性剤（又は「表面活性剤」）は、水溶液中に溶解されたとき、溶液の表面張力又は水溶液と別の液体との間の界面張力を低減し、結果として、粘膜を通過するRNAi剤の吸収を高める化学物質である。胆汁酸塩及び脂肪酸に加えて、これら浸透促進剤としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、及びポリオキシエチレン-20-セチルエーテル（例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002、Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92を参照されたい）、並びにFC-43などの過フルオロ化合物エマルジョン（Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252）が挙げられる。

30

【0782】

浸透促進剤として作用する種々の脂肪酸及びそれらの誘導体としては、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸（n-デカン酸）、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン（1-モノオレオイル-rac-グリセリン）、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、1-モノカプリン酸グリセリン、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、そのC₁~20アルキルエステル（例えば、メチル、イソプロピル、及びt-ブチル）、並びにそのモノ-グリセリド及びジ-グリセリド（すなわち、オレイン酸塩、ラウホスフェート、カプホスフェート、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、ステアホスフェート、リノール酸塩など）が挙げられる（例えば、Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006、Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92、Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33、El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654を参照されたい）。

40

【0783】

50

胆汁の生理的役割としては、脂質及び脂溶性ビタミンの分散及び吸収の促進が挙げられる（例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002、Brunton, Chapter 38 in: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935を参照されたい）。様々な天然の胆汁酸塩、及びそれらの合成誘導体が、浸透促進剤としての役割を果たす。このため、「胆汁酸塩」という用語は、胆汁の天然に存在する成分のいずれか、及びそれらの合成誘導体のいずれかを包含する。好適な胆汁酸塩としては、例えばコール酸（又はその薬学的に許容されるナトリウム塩、コール酸ナトリウム）、デヒドロコール酸（デヒドロコール酸ナトリウム）、デオキシコール酸（デオキシコール酸ナトリウム）、グルコール酸（glucolic acid）（グルコール酸ナトリウム）、グリコール酸（glycholic acid）（グリココール酸ナトリウム）、グリコデオキシコール酸（グリコデオキシコール酸ナトリウム）、タウロコール酸（タウロコール酸ナトリウム）、タウロデオキシコール酸（タウロデオキシコール酸ナトリウム）、ケノデオキシコール酸（ケノデオキシコール酸ナトリウム）、ウルソデオキシコール酸（UDCA）、タウロ-24, 25-ジヒドロ-フシジン酸ナトリウム（STDHF）、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、及びポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル（POE）が挙げられる（例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002、Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 92頁、Swinyard, Chapter 39 In: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, 782~783頁、Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33、Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25、Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583を参照されたい）。
【0784】

キレート化剤は、本開示に関連して使用する場合、金属イオンとの複合体を形成することによって溶液から金属イオンを除去し、結果として粘膜を通るRNAi剤の吸収を高めるものである化合物として定義され得る。本開示における浸透促進剤としての使用に関して、ほとんどの特徴的なDNAヌクレアーゼは、触媒作用のために二価金属イオンを必要とし、結果としてキレート化剤によって阻害されるため、キレート化剤は、DNase阻害剤としても機能する更なる利点を有する（Jarrett, J. *Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339）。好適なキレート化剤としては、限定するものではないが、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）、クエン酸、サリチル酸塩（例えば、サリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチレート及びホモバニホスフェート（homovanilate））、コラーゲンのN-アシル誘導体、ベータ-ジケトンのラウレス-9及びN-アミノアシル誘導体（エナミン）が挙げられる（例えば、Kadare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006、Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 92頁、Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33、Buur et al., *J. Contro*

10

20

30

40

50

l Rel., 1990, 14, 43-51を参照されたい)。

【0785】

本明細書において使用する場合、非キレート化の非界面活性剤である浸透促進剤は、キレート剤として又は界面活性剤として軽微な活性を示すが、それでもなお消化器粘膜を介したRNAi剤の吸収を増強する化合物として定義され得る(例えば、Muramishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33を参照されたい)。この浸透促進剤の分類は、例えば、不飽和環状尿素、1-アルキル-及び1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 92頁)、並びに非ステロイド性抗炎症剤、例えば、ジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、及びフェニルブタゾン(Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626)が挙げられる。

10

【0786】

細胞レベルでのRNAi剤の取り込みを増強する薬剤も、本開示の医薬組成物及び他の組成物に加えることができる。例えば、リポフェクチンなどのカチオン性脂質(Junichira, 米国特許第5,705,188号)、カチオン性グリセロール誘導体、及びポリリジンなどのポリカチオン性分子(国際公開第97/30731号)も、dsRNAの細胞取り込みを増強することが知られている。

【0787】

投与された核酸の浸透を高めるために、他の薬剤を利用することができ、これらの薬剤には、エチレングリコール及びプロピレングリコールなどのグリコール、2-ピロールなどのピロール、アゾン、並びにリモネン及びメントンなどのテルペンが含まれる。

20

【0788】

v i . 賦形剤

担体化合物とは対照的に、「医薬担体」又は「賦形剤」は、1つ以上の核酸を動物に送達するための、薬学的に許容される溶媒、懸濁剤、又は任意の他の薬理学的に不活性なビヒクルである。賦形剤は、液体であっても固体であってもよく、核酸及び所定の医薬組成物を他の成分と併用される場合に、所望の体積、稠度などをもたらすように計画された投与の様式を念頭において選択される。典型的な医薬担体としては、限定するものではないが、結合剤(例えば、予めゼラチン化されたトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、又はヒドロキシプロピルメチルセルロースなど)；充填剤(例えば、ラクトース及び他の糖、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、又はリン酸水素カルシウムなど)；潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、硬化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど)；崩壊剤(例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど)、及び湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど)が挙げられる。

30

【0789】

核酸と有害に反応しない、経口投与にとって好適な薬学的に許容される有機又は無機の賦形剤も、本開示の組成物を製剤化するために使用することができる。好適な薬学的に許容される担体としては、限定するものではないが、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

40

【0790】

核酸の局所投与用の製剤は、滅菌及び非滅菌水溶液、アルコールなどの通常の溶媒中の非水溶液、又は液体若しくは固体油基剤に中の核酸の溶液を含むことができる。溶液は、緩衝剤、希釈剤、及び他の好適な添加剤も含むことができる。核酸と有害に反応しない、経口投与にとって好適な薬学的に許容される有機又は無機の賦形剤を使用することができ

50

る。

【0791】

好適な薬学的に許容される賦形剤としては、限定するものではないが、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

【0792】

v i i . 他の成分

本開示の組成物は、医薬組成物中に従来見られる他の補助成分を、当技術分野において確立されたそれらの使用レベルで更に含むことができる。このため、例えば、組成物は、追加の適合性の、薬学的に活性な材料、例えば、止痒剤、収斂剤、局部麻酔薬、若しくは抗炎症剤などを含むことができ、又は本開示の組成物の様々な剤形を物理的に製剤化する際に有用な追加の材料、例えば、色素、香味剤、防腐剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤、及び安定剤を含むことができる。ただし、そのような材料は、添加したときに本開示の組成物の成分の生物活性を過度に妨害するものであってはならない。製剤は、滅菌され、所望により、製剤の核酸と有害に相互作用しない、補助剤、例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝剤、着色剤、香味剤、又は芳香物質などと混合され得る。

10

【0793】

水性懸濁剤は、懸濁剤の粘度を増加する物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、又はデキストランなどを含むことができる。懸濁剤はまた、安定剤を含み得る。

20

【0794】

いくつかの実施形態では、本開示において取り上げられる医薬組成物は、(a) 1つ以上のRNAi剤、及び(b) 非RNAi機序で機能し、C9orf72関連障害を治療する際に有用である1つ以上の薬剤を含む。こうした薬剤の例としては、限定するものではないが、モノアミン阻害剤、レゼルピン、抗痙攣薬、抗精神病薬、及び抗鬱薬が挙げられる。

【0795】

こうした化合物の毒性及び治療有効性は、例えば、LD₅₀（集団の50%に致死性である用量）及びED₅₀（集団の50%に治療的有効である用量）を決定するために、細胞培養物又は実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指数となり、LD₅₀/ED₅₀の比として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。

30

【0796】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得たデータは、ヒトにおける使用のためにある範囲の投薬量を製剤化する際に使用することができる。本開示における本明細書において取り上げる組成物の投与量は、概して、毒性がわずかであるか又は全くないED₅₀である循環濃度の範囲内である。投与量は、用いる剤形及び利用する投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本開示において取り上げる方法で使用する任意の化合物に対して、最初に、細胞培養アッセイから治療有効用量を見積もることができる。細胞培養において決定されたIC₅₀（すなわち、症状の最大半量の阻害を達成する被験化合物の濃度）を含む、化合物、又は適切な場合には、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲を達成する（例えば、ポリペプチドの濃度減少を達成する）ように、ある用量を動物モデルにおいて製剤化することができる。こうした情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって、測定することができる。

40

【0797】

本開示において取り上げるRNAi剤は、上記において説明したようなそれらの投与に加えて、ヌクレオチドリピートの発現によって媒介される病理学的プロセスの治療におい

50

て有効な他の公知の薬物と併用して投与することもできる。いずれにしても、投与する医師は、当技術分野で既知であるか又は本明細書において記載した、有効性の標準尺度を使用して観察された結果に基づいて、RNAi剤投与の量及びタイミングを調節することができる。

【0798】

VII. キット

ある特定の態様では、本開示は、例えば、二本鎖siRNA化合物又はssRNA化合物であるsiRNA化合物（例えば、前駆体、例えば、ssRNA化合物にプロセシングすることができるより大きなsiRNA化合物、又は例えば、二本鎖siRNA化合物若しくはssRNA化合物又はその前駆体であるsiRNA化合物をコードするDNA）の医薬製剤を含む好適な容器を含むキットを提供する。

10

【0799】

こうしたキットは、1つ以上のdsRNA剤と、使用のための使用説明書、例えば、予防有効量又は治療有効量のdsRNA剤を投与するための説明書とを含む。dsRNA剤は、バイアル瓶又は予め充填された注射器内にあってもよい。キットは、任意選択で、dsRNA剤を投与するための手段（例えば、予め充填された注射器などの注入デバイス）、又はC9orf72の阻害を測定するための手段（例えば、C9orf72 mRNA、C9orf72タンパク質、及び／又はC9orf72活性の阻害を測定するための手段）を更に含んでもよい。C9orf72の阻害を測定するためのこうした手段は、対象から試料を、例えば、CSF及び／又は血漿試料を得るための手段を含んでもよい。本発明のキットは、任意選択で、治療有効量又は予防有効量を決定するための手段を更に含んでもよい。

20

【0800】

ある特定の実施形態では、医薬製剤の個々の成分は、1つの容器で提供されてもよい。あるいは、医薬製剤の成分を別々に2以上の容器で、例えば、siRNA化合物調製物用の1つの容器と担体化合物用の少なくとももう1つの容器とで、提供するのが望ましいことがある。キットは、単一の箱内に1つ以上の容器など、ある数の様々な構成で包装されてもよい。様々な構成要素は、例えば、キットとともに提供される使用説明書に従って、組み合わせることができる。構成要素は、例えば、医薬組成物を調製及び投与するために、本明細書において説明した方法に従って組み合わせることができる。キットはまた、送達デバイスも含むことができる。

30

【0801】

VII. C9orf72発現を阻害するための方法

本開示はまた、細胞中のC9orf72遺伝子又はC9orf72座位と関連付けられる転写産物の発現を阻害する又はそのレベルを低減させる方法を提供する。本方法は、細胞を、細胞中のC9orf72又はC9orf72座位と関連付けられる転写産物の発現を阻害する又はそれらのレベルを低減させるのに有効な量で、RNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤と接触させ、それにより、細胞中のC9orf72の発現を阻害する若しくはそのレベルを低減させる又はC9orf72座位と関連付けられる転写産物の発現を低減させることを含む。本開示のある特定の実施形態では、C9orf72は、CNS（例えば、脳）細胞において優先的に阻害される。

40

【0802】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、C9orf72を標的とする2つ以上のdsRNA剤と接触させることを含む。2つ以上のdsRNA剤を含む方法のある特定の実施形態では、これら2つ以上のdsRNA剤は、同じ組成物にあっても、別個の組成物にあっても、それらのいずれかの組み合わせにあってもよい。

【0803】

細胞を、C9orf72を標的とする2つ以上のdsRNA剤と接触させることを含む方法の一実施形態では、少なくとも1つのdsRNA剤がC9orf72のアンチセンス鎖を標的とし、少なくとも1つのdsRNA剤がC9orf72のセンス鎖を標的とする

50

。

【0804】

いくつかの実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72のセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、これらの鎖は、

a) 表5、6、10B、及び10Dのうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

b) 配列番号1のヌクレオチド1～23、15～37、33～55、37～59、又は62～84のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

c) 配列番号15のヌクレオチド5197～5219、5226～5248、5233～5255、5248～5270、5539～5561、5547～5569、5917～5939、5936～5958、5954～5976、6008～6030、6021～6043、6036～6058、6043～6065、又は6048～6070のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

d) 配列番号15のヌクレオチド5015～5052、5017～5040、5032～5059、5032～5055、5033～5055、5035～5059、5036～5059、5058～5087、5059～5087、5059～5084、5064～5087、5197～5222、5213～5267、5223～5252、5229～5252、5233～5263、5516～5570、5539～5565、5539～5562、5545～5570、5545～5569、5593～5616、5883～5950、5917～5950、5919～5950、5923～5950、5934～5977、5934～5957、5938～5977、5938～5965、5938～5961、5947～5977、5947～5973、5972～6001、5973～5997、6006～6029、6011～6070、6011～6039、6011～6038、6015～6038、6019～6045、6019～6042、6033～6070、6035～6065、6035～6059、又は6040～6063のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

e) 配列番号1のヌクレオチド15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は64～87のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、並びに

f) 表8、9、10B、及び10Dのうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、からなる群から選択され、

センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

【0805】

ある特定の実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72、例えば、C9orf72エクソン又はイントロンセンス配列のセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、全内容が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO 2021/119226号に開示されるdsRNA剤である。

【0806】

ある特定の実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72のアンチセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、これらの鎖は、

a) 配列番号13のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号14のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

b) 表2、3、10A、10C、11、及び12のうちのいずれか1つにあるアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれかからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアンチセンス、

c) 配列番号13のヌクレオチド27573296～27573318、27573314～27573336、27573319～27573341、27573562～27573584、27573585～27573607、27573592～27573614、27573599～27573621、27573608～27573630、27573616～27573638、27573619～27573641、27573622～27573644、27573633～27573655、27573690～27573712、又は27573717～27573739とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

d) 配列番号13のヌクレオチド27573296～27573584、27573296～27573575、27573301～27573338、27573318～27573342、27573555～27573583、27573581～27573607、27573584～27573607、27573588～27573671、27573588～27573666、27573588～27573624、27573592～27573624、27573592～27573617、27573598～27573624、27573599～27573623、27573606～27573655、27573606～27573652、27573606～27573647、27573654～27573712、又は27573707～27573740のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号14の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、からなる群から選択され、

センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

【0807】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、細胞を、本発明の2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤、例えば、表2、3、5、6、8、9、10A、10B、10C、10D、11、及び12にあるdsRNA剤の群から選択されるdsRNA剤のうちのいずれか2つ以上を含む組成物と接触させることを含む。

【0808】

細胞を、本明細書に記載されるように、2つ以上のdsRNA剤、例えば、表2、3、5、6、8、9、10A、10B、10C、10D、11、及び12にあるdsRNA剤の群から選択されるdsRNA剤のうちのいずれか2つ以上、例えば、2つ、3つ、又は4つと接触させることを含む本発明の方法のいくつかの実施形態では、細胞を、第1の薬剤（又は第1の薬剤を含む組成物）と第1の時点で、第2の薬剤（又は第2の薬剤を含む組成物）と第2の時点で、第3の薬剤（又は第3の薬剤を含む組成物）と第3の時点で、及び第4の薬剤（又は第4の薬剤を含む組成物）と第4の時点で接触させてもよく、又は細胞を、全ての薬剤（又は全ての薬剤を含む組成物）と同時に接触させてもよい。あるいは、細胞を、第1の薬剤（又は第1の薬剤を含む組成物）と第1の時点で、第2、第3、及び／又は第4の薬剤（又は第2、第3、及び／又は第4の薬剤を含む組成物）と第2の時点で接触させてもよい。細胞を本発明の2つ以上の薬剤（又は2つ以上のdsRNA剤

10

20

30

40

50

を含む組成物)と接触させる他の組み合わせも企図される。

【0809】

細胞を、RNA i 剤、例えば、二本鎖 RNA i 剤と、接触させることは、インビトロで行っても、インビボで行ってもよい。細胞をインビボで RNA i 剤と接触させることは、対象、例えば、ヒト対象内の細胞又は細胞の群を、RNA i 剤と接触させることを含む。細胞をインビトロで接触させる方法とインビボで接触させる方法とを組み合わせることも可能である。

【0810】

細胞を接触させることは、上で考察したように、直接的であっても間接的であってもよい。更に、細胞を接触させることは、本明細書に記載する、又は当技術分野で既知の任意のリガンドを含む標的化リガンドを介して達成してもよい。いくつかの実施形態では、標的化リガンドは、炭水化物部分、例えば、GalNAc リガンドであるか、又は RNA i 剤を目的の部位に向ける任意の他のリガンドである。

【0811】

「阻害すること」という用語は、本明細書において使用する場合、「低減させること」、「サイレンシングすること」、「下方調節すること」、「抑制すること」、及び他の同様の用語と同義的に使用され、阻害の任意のレベルを含む。ある特定の実施形態では、例えば、本開示の RNA i 剤の阻害のレベルは、細胞培養条件、例えば、細胞培養物中の細胞が、10 nM 以下、1 nM 以下などの近傍の濃度での Lipofectamine (商標) 媒介性トランスフェクションを介してトランスフェクトされる細胞培養条件下で評価され得る。所与の RNA i 剤のノックダウンは、細胞培養物中で前処置されたレベルと細胞培養物中で後処置されたレベルとの比較によって決定でき、任意選択で、スクランブルされた又は他の形態の対照 RNA i 剤を用いて並行して処理した細胞と比較してもよい。細胞培養物中での例えば約 50 % のノックダウンは、それによって「阻害すること」又は「低減させること」、「下方調節すること」又は「抑制すること」などが生じたことを示すものとして特定され得る。標的 mRNA 又はコードされるタンパク質レベル (及びしたがって、本開示の RNA i 剤によって引き起こされる「阻害すること」の程度など) はまた、当技術分野で説明されているように、適当に制御された条件下で、本開示の RNA i 剤のためのインビボの系で評価され得るということが明示的に意図される。

【0812】

本明細書において使用する場合、「C9orf72 遺伝子の発現を阻害すること」又は「C9orf72 の発現を阻害すること」という語句は、任意の C9orf72 遺伝子 (例えば、マウス C9orf72 遺伝子、ラット C9orf72 遺伝子、サル C9orf72 遺伝子、又はヒト C9orf72 遺伝子など)、及び C9orf72 タンパク質をコードする C9orf72 遺伝子のバリエーション又は変異体、例えば、遺伝子のイントロン中に伸長ヘキサヌクレオチドリピートを有する C9orf72 遺伝子の発現の阻害又はそのレベルを低減させることを含む。このため、C9orf72 遺伝子は、遺伝子操作された細胞、細胞の群又は生物の文脈で、野生型 C9orf72 遺伝子、変異 C9orf72 遺伝子、又は遺伝子導入 C9orf72 遺伝子であってもよい。

【0813】

「C9orf72 座位と関連付けられる転写産物のレベル又は量を低減させること」又は「C9orf72 座位と関連付けられる転写産物をノックダウンすること」という語句は、C9orf72 のアンチセンス鎖又は C9orf72 のセンス鎖 (例えば、ヘキサヌクレオチドリピート伸長を含む C9orf72 センス鎖又はアンチセンス鎖転写産物など) の発現の阻害又はその細胞におけるレベル若しくは量を低減させることを含む。

【0814】

「C9orf72 遺伝子の発現を阻害すること」は、任意のレベルの C9orf72 遺伝子の阻害、例えば、少なくとも 20 % の阻害など、C9orf72 遺伝子の発現の少なくとも部分的抑制を含む。ある特定の実施形態では、阻害は、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、又は好ましくは少なくとも 50 % である。他の実施形態では、阻害は、50

%以下、例えば、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、又は5%以下である。

【0815】

C9orf72遺伝子の発現は、C9orf72遺伝子発現と関連付けられる任意の変数のレベル、例えば、C9orf72 mRNAレベル（例えば、センスmRNA、アンチセンスmRNA、総C9orf72 mRNA、センスC9orf72リピート含有mRNA、及び／又はアンチセンスC9orf72リピート含有mRNA）、又はC9orf72タンパク質レベル（例えば、総C9orf72タンパク質、野生型C9orf72タンパク質、又は伸長リピート含有タンパク質）、又は例えば、センス若しくはアンチセンス含有巢のレベル及び／又は異常なジペプチドリピータンパク質のレベルに基づいて評価され得る。

10

【0816】

阻害は、対照レベルと比較した、これら変数のうちの1つ以上の絶対レベル又は相対レベルの減少によって評価され得る。対照レベルは、当技術分野で利用される任意の種類の対照レベル、例えば、投与前ベースラインレベル、又は未処理であるか若しくは対照（例えば、緩衝剤のみの対照又は不活性薬剤対照など）で処理された同様の対象、細胞若しくは試料から決定されるレベルであってもよい。

【0817】

例えば、本開示の方法のいくつかの実施形態では、C9orf72遺伝子の発現（例えば、センス若しくはアンチセンス含有巢及び／又は異常なジペプチドリピータンパク質レベルによって評価される）は、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、若しくは95%、又はアッセイの検出レベルを下回るまで阻害される。本開示の方法の他の実施形態では、C9orf72遺伝子の発現（例えば、mRNA又はタンパク質発現レベルによって評価される）は、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、又は5%以下阻害される。ある特定の実施形態では、本方法は、例えば、C9orf72の発現を低減させる薬剤で対象を処理した後で臨床的に関連する転帰によって示されるような、C9orf72の発現の臨床的に関連する阻害を含む。

20

【0818】

C9orf72遺伝子の発現の阻害は、第1の細胞又は細胞の群と実質的に同一であるが、そのように処理されていない第2の細胞又は細胞の群（RNAi剤で処理されていない、又は目的の遺伝子を標的とするRNAi剤で処理されていない対照細胞）と比較した、C9orf72遺伝子が転写され、C9orf72遺伝子の発現が阻害されるように処理（例えば、細胞を本開示のRNAi剤と接触させることによって、又は本開示のRNAi剤を、細胞が存在している若しくは存在していた対象に投与することによって）されている第1の細胞又は細胞の群（このような細胞は、例えば、対象に由来する試料中に存在し得る）によって発現されるmRNAの量の低減によって示されてもよい。阻害の程度は、以下の観点で表すことができる：

30

【数2】

$$\frac{(\text{対照細胞中の RNA}) - (\text{処理した細胞中の RNA})}{\text{対照細胞中の RNA}} \times 100\%$$

40

【0819】

他の実施形態では、C9orf72遺伝子の発現の阻害は、C9orf72遺伝子発現、例えば、C9orf72タンパク質発現、センス若しくはアンチセンス含有巢、及び／又は異常なジペプチドリピータンパク質のレベルに機能的に関係するパラメータの低減の観点から評価され得る。C9orf72遺伝子サイレンシングは、発現コンストラクトからの内因性又は異種性いずれかのC9orf72を発現する任意の細胞において、当技

50

術分野で既知の任意のアッセイによって決定され得る。

【0820】

C9orf72タンパク質の発現の阻害は、細胞又は細胞の群によって発現されるC9orf72タンパク質（又は機能パラメータ、例えば、本明細書に記載されるもの）のレベル（例えば、対象に由来する試料中で発現されたタンパク質のレベル）の低減によって示され得る。上で説明したように、mRNAの抑制を評価する場合、処置された細胞又は細胞の群におけるタンパク質発現レベルの阻害は、対照細胞又は細胞の群におけるタンパク質のレベルの百分率として同様に表現され得る。

【0821】

C9orf72遺伝子の発現の阻害を評価するために使用できる対照細胞又は細胞の群には、本開示のRNAi剤とまだ接触していない細胞又は細胞の群が含まれる。例えば、対照細胞又は細胞の群は、RNAi剤で対象を処理する前の個々の対象（例えば、ヒト又は動物対象）から得られてもよい。

【0822】

細胞又は細胞の群によって発現されるC9orf72 mRNAのレベルは、mRNA発現を評価するための当技術分野で既知の任意の方法を使用して判定され得る。一実施形態では、試料中のC9orf72の発現のレベルは、転写されたポリヌクレオチド又はその一部、例えば、C9orf72遺伝子のmRNAを検出することによって判定される。RNAは、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物（RNAzol B; Biogenesis）、RNeasy（商標）RNA調製キット（Qiagen（登録商標））又はPAXgene（PreAnalytix、Switzerland）を使用することを含む、RNA抽出技法を使用して細胞から抽出され得る。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、RT-PCR、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、インサイチュハイブリダイゼーション、及びマイクロアレイ分析が挙げられる。鎖特異的C9orf72 mRNAは、例えば、Jiang, et al.、上記、Lagier-Tourenne, et al.、上記、及びJiang, et al.、上記に記載される定量的RT-PCR及び又は液滴デジタルPCR法を使用して検出され得る。循環C9orf72 mRNAは、WO2012/177906において記載される方法を使用して検出することができ、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0823】

いくつかの実施形態では、C9orf72の発現のレベルは、核酸プローブを使用して判定される。「プローブ」という用語は、本明細書において使用する場合、特定のC9orf72核酸又はタンパク質若しくはその断片に選択的に結合可能である任意の分子を指す。プローブは、当業者によって合成することも、適切な生物学的調製物から誘導することもできる。プローブは、標識されるように特別に設計してもよい。プローブとして利用できる分子の例としては、限定するものではないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体、及び有機分子が挙げられる。

【0824】

単離されたmRNAは、限定するものではないが、サザン分析又はノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析、及びプローブアレイを含む、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅アッセイにおいて使用することができる。mRNAレベルを判定するための一方法は、単離されたmRNAを、C9orf72 mRNAとハイブリダイズできる核酸分子（プローブ）と接触させることを含む。一実施形態では、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲルにかけてmRNAをゲルからニトロセルロースなどの膜に移行させることによって、mRNAを固体表面上に固定化し、プローブと接触させる。代替的な実施形態では、例えばAffymetrix（登録商標）遺伝子チップアレイにおいて、プローブを固体表面に固定化して、mRNAをプローブと接触させる。当業者ならば、既知のmRNA検出方法を、C9orf72 mRNAのレベルを判定する際に使用するために容易に適応させることができる。

【0825】

試料中のC9orf72の発現レベルを判定するための代替的な方法は、例えばRT-PCR (Mullisによる1987年の米国特許第4,683,202号に記載の実験実施形態)、リガーゼ連鎖反応 (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193)、自己持続的配列複製 (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-ベータレプリカーゼ (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)、又は任意の他の核酸増幅法などの、試料中の例えばmRNAなどの核酸増幅又は逆転写酵素 (cDNAを調製するため) のプロセスを伴い、その後、当業者に周知の技法を使用した増幅分子の検出を行う。これら検出スキームは、特に、こうした核酸分子が非常に少ない数で存在する場合に核酸分子の検出のために有用である。本開示の特定の態様では、C9orf72の発現のレベルは、定量的蛍光発生的RT-PCR (すなわち、TaqMan (商標) システム) によって、Dual-Glo (登録商標) ルシフェラーゼアッセイによって、又はC9orf72発現若しくはmRNAレベルの測定のための他の技術分野によって認識された方法によって判定される。

10

【0826】

C9orf72 mRNAの発現レベルは、メンブレンブロット (例えば、ノーザン、サザン、ドットなどといったハイブリダイゼーション分析において使用されるようなもの)、又はマイクロウェル、試料チューブ、ゲル、ビーズ、若しくは繊維 (又は結合している核酸を含む任意の固相支持体) を使用して観察され得る。参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第5,770,722号、第5,874,219号、第5,744,305号、第5,677,195号、及び第5,445,934号を参照されたい。C9orf72発現レベルの判定はまた、溶液中で核酸プローブを使用することを含んでもよい。

20

【0827】

いくつかの実施形態では、mRNA発現のレベルは、分枝DNA (bDNA) アッセイ又はリアルタイムPCR (qPCR) を使用して評価される。このPCR方法の使用は、本明細書において示される実施例において記載され、例示されている。こうした方法はまた、C9orf72核酸の検出のために使用できる。

30

【0828】

C9orf72タンパク質の発現レベルは、タンパク質レベルの測定のための当技術分野で既知の任意の方法を使用して判定され得る。こうした方法としては、例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、超拡散 (hyperdiffusion) クロマトグラフィー、流体又はゲル沈降反応、吸収分光法、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 (一重又は二重)、免疫電気泳動、ウェスタンブロッティング、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、免疫蛍光アッセイ、電気化学発光アッセイなどが挙げられる。こうしたアッセイは、C9orf72タンパク質の存在又は複製を示すタンパク質の検出のために使用することもできる。

40

【0829】

センス又はアンチセンス含有巢のレベル及び異常なジペプチドリピータンパク質のレベルは、例えば、蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH)、免疫組織化学、及びイムノアッセイを含む、当業者に周知の方法を使用して評価され得る (例えば、Jiang, et al., 上記を参照されたい)。いくつかの実施形態では、C9orf72関連疾患の治療における本開示の方法の有効性は、C9orf72 mRNAレベルの減少によって (例えば、C9orf72レベルについてのCSF試料及び／又は血漿試料の評価によって、脳生検によって又は別様に) 評価される。

50

【0830】

本開示の方法のいくつかの実施形態では、RNAi剤は、RNAi剤が対象内の特定の部位に送達されるように、対象に投与される。C9orf72の発現の阻害は、対象内の特定の部位、例えば、CNS細胞に由来する試料における、C9orf72 mRNA（例えば、センスmRNA、アンチセンスmRNA、総C9orf72 mRNA、センスC9orf72リピート含有mRNA、及び／又はアンチセンスC9orf72リピート含有mRNA）、C9orf72タンパク質（例えば、総C9orf72タンパク質、野生型C9orf72タンパク質、又は伸長リピート含有タンパク質）、センス含有巢、アンチセンス含有巢、異常なジペプチドリピータンパク質のレベル又はレベルの変化の測定を使用して評価されてもよい。ある特定の実施形態では、本方法は、例えばC9orf72の発現を低減させる薬剤での対象の処置後の臨床的に関連する転帰によって、例えば尾状核萎縮の安定化又は阻害（例えば、容積測定MRI（vMRI）によって評価されるような）、対象から得たCSF試料中の神経細線維軽鎖（NfL）レベルの安定化又は低減、変異C9orf72 mRNA又は切断された変異C9orf72タンパク質の、例えば全長変異C9orf72 mRNA若しくはタンパク質及び切断された変異C9orf72 mRNA若しくはタンパク質の一方若しくは両方の低減、並びに統一C9orf72関連疾患評価尺度（UHDRS）スコアの安定化又は改善などによって示されるような、C9orf72の発現の臨床的に関連する阻害を含む。

10

【0831】

本明細書において使用する場合、分析物のレベルを検出すること又は判定することという用語は、物質、例えば、タンパク質、RNAが存在するか否かを判定するステップを実施することを意味すると理解される。本明細書において使用する場合、検出する又は判定する方法は、使用方法の検出のレベルを下回る分析物のレベルの検出又は判定を含む。

20

【0832】

IX. C9orf72関連疾患を治療又は予防する方法

本明細書に開示される方法は、C9orf72リピート伸長疾患の主要な病原性成分であるジペプチドリピータンパク質の合成の治療的低減を提供する一方で、C9orf72 mRNAは温存し、それにより、核内の一次C9orf72転写産物を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用などの治療戦略で生じ得る、C9orf72タンパク質の低減の有害作用の可能性を回避する。

30

【0833】

本明細書に開示される方法のうちのいくつかは、細胞内にヘキサヌクレオチドリピーの複数の連続コピーを含むヘキサヌクレオチドリピーを含むC9orf72標的RNAの発現を阻害する又はそのレベルを低減するためのものである。C9orf72標的RNAは、例えば、病原性ヘキサヌクレオチドリピー伸長を伴う（例えば、ヘキサヌクレオチドリピーの少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、又は少なくとも約500コピーを有する）ものであり得る。こうした方法は、本明細書に開示されるdsRNA剤のうちのいずれかを細胞内に導入し、それにより、細胞内のC9orf72標的RNAの発現を阻害することを含み得る。

40

【0834】

このため、本開示はまた、細胞中の1つ以上のC9orf72 RNA転写産物のレベルを低減するために、本開示のRNAi剤、又は本開示のRNAi剤を含む組成物（医薬組成物など）を使用する方法を提供する。これらの方法は、細胞を、本開示のdsRNA、2つ以上のdsRNA剤、例えば、2、3、若しくは4つ、本開示の2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つのdsRNA剤を含む組成物（医薬組成物など）、又は各々独立して本発明のdsRNA剤を含む2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの組成物（医薬組成物など）と接触させることと、細胞を、C9orf72遺伝子のmRNA転写産物

50

の分解を得るのに十分な時間維持し、それにより、細胞における1つ以上のC9orf72 RNAのレベルを低減することと、を含む。

【0835】

加えて、本開示はまた、細胞においてセンス及びアンチセンス含有巢のレベルを低減及び／又はその形成を阻害するために本開示のRNAi剤又は本開示のRNAi剤を含む組成物（医薬組成物など）を使用する方法を提供する。これらの方法は、細胞を、本開示のdsRNA、本開示の2つ以上のdsRNA、例えば、2、3、若しくは4つ、本開示の2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つのdsRNAを含む組成物（医薬組成物など）、又は各々独立して本発明のdsRNA剤を含む2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの組成物（医薬組成物など）と接触させ、それにより、細胞におけるC9orf72センス及びアンチセンス含有巢のレベルを低減させることを含む。

10

【0836】

本開示はまた、細胞において異常なジペプチドリピータンパク質のレベルを低減及び／又はその形成を阻害するために本開示のRNAi剤又は本開示のRNAi剤を含む組成物（医薬組成物など）を使用する方法を提供する。これらの方法は、細胞を、本開示のdsRNA、本開示の2つ以上のdsRNA、例えば、2、3、若しくは4つ、本開示の2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つのdsRNAを含む組成物（医薬組成物など）、又は各々独立して本発明のdsRNA剤を含む2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの組成物（医薬組成物など）と接触させ、それにより、細胞における異常なジペプチドリピータンパク質のレベルを低減させることを含む。

20

【0837】

こうした方法は、細胞におけるC9orf72標的RNAの発現を評価すること、及び／又は細胞における成熟C9orf72 mRNAの発現を評価することを更に含み得る。評価は、例えば、C9orf72標的RNAを検出するための逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって行うことができる。しかしながら、任意の他の好適な方法を使用してもよい。

【0838】

本開示の方法では、細胞をインビトロ又はインビボで接触させてもよく、すなわち、細胞は対象内にあってもよい。

【0839】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、C9orf72を標的とする2つ以上のdsRNA剤と接触させることを含む。2つ以上のdsRNA剤を含む方法のある特定の実施形態では、これら2つ以上のdsRNA剤は、同じ組成物にあっても、別個の組成物にあっても、それらのいずれかの組み合わせにあってもよい。

30

【0840】

細胞を、C9orf72を標的とする2つ以上のdsRNA剤と接触させることを含む方法の一実施形態では、C9orf72のアンチセンス鎖を標的とする少なくとも1つのdsRNA剤、及びC9orf72のセンス鎖を標的とする少なくとも1つのdsRNA剤。

【0841】

いくつかの実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72のセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、これらの鎖は、

40

a) 配列番号1のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

b) 配列番号15のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号16のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチド

50

を含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

c) 表5、6、10B、及び10Dのうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

d) 配列番号1のヌクレオチド1～23、15～37、33～55、37～59、62～84、又は69～91のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

e) 配列番号15のヌクレオチド5197～5219、5223～5245、5226～5248、5227～5249、5233～5255、5248～5270、5539～5561、5547～5569、5917～5939、5936～5958、5954～5976、6008～6030、6021～6043、6036～6058、6043～6065、又は6048～6070のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

f) 配列番号15のヌクレオチド5015～5052、5017～5040、5032～5059、5032～5055、5033～5055、5035～5059、5036～5059、5058～5087、5059～5087、5059～5084、5064～5087、5197～5222、5213～5267、5223～5252、5229～5252、5233～5263、5516～5570、5539～5565、5539～5562、5545～5570、5545～5569、5593～5616、5883～5950、5917～5950、5919～5950、5923～5950、5934～5977、5934～5957、5938～5977、5938～5965、5938～5961、5947～5977、5947～5973、5972～6001、5973～5997、6006～6029、6011～6070、6011～6039、6011～6038、6015～6038、6019～6045、6019～6042、6033～6070、6035～6065、6035～6059、又は6040～6063のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号16の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、

g) 配列番号1のヌクレオチド15～52、17～40、32～59、32～55、35～59、36～59、58～87、59～87、59～84、又は64～87のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号5の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、並びに

h) 表8及び9のうちのいずれか1つにあるアンチセンスヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、からなる群から選択され、

センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0842】

いくつかの実施形態では、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

【0843】

ある特定の実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72、例えば、C9orf72エクソン又はイントロンセンス配列のセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、全内容が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO 2021/119226号に開示されるdsRNA剤である。

10

20

30

40

50

【0844】

ある特定の実施形態では、2つ以上のdsRNA剤を含む本発明の方法で使用するためのC9orf72のアンチセンス鎖を標的とする好適な薬剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、これらの鎖は、

a) 配列番号13のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号14のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

b) 配列番号17のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号18のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

c) 配列番号19のヌクレオチド配列とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号20のヌクレオチド配列の対応する部分とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、

d) 表2、3、10A、10C、11、及び12のうちのいずれか1つにあるアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちのいずれかからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアンチセンス、

e) 配列番号13のヌクレオチド27573296～27573318、27573314～27573336、27573319～27573341、27573562～27573584、27573585～27573607、27573592～27573614、27573599～27573621、27573608～27573630、27573616～27573638、27573619～27573641、27573622～27573644、27573633～27573655、27573690～27573712、又は27573717～27573739とはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、

f) 配列番号13のヌクレオチド27573296～27573584、27573296～27573575、27573301～27573338、27573318～27573342、27573555～27573583、27573581～27573607、27573584～27573607、27573588～27573671、27573588～27573666、27573588～27573624、27573592～27573624、27573592～27573617、27573598～27573624、27573599～27573623、27573606～27573655、27573606～27573652、27573606～27573647、27573654～27573712、又は27573707～27573740のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つとはヌクレオチドが3個以下異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むセンス鎖、及び配列番号14の対応するヌクレオチド配列からの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むアンチセンス鎖、からなる群から選択され、

センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0845】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、細胞を、本発明の2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤、例えば、表2、3、5、6、8、9、10A、10B、10C、10D、11、及び12にあるdsRNA剤の群から選択されるdsRNA剤のうちのいずれか2つ以上と接触させることを含む。

【0846】

いくつかの実施形態では、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方は、1つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる。

【0847】

本開示の方法を使用した治療に好適な細胞は、C9orf72遺伝子を発現する任意の細胞、又は伸長ヘキサヌクレオチド（例えば、GGGGCC）リピートを有するC9orf72遺伝子を発現する細胞であってもよい。本開示の方法における使用に好適な細胞は、哺乳動物細胞、例えば、霊長類細胞（ヒト細胞又は非ヒト霊長類細胞、例えば、サル細胞又はチンパンジー細胞など）、非霊長類細胞（ラット細胞又はマウス細胞など）であってもよい。一実施形態では、細胞は、ヒト細胞、例えば、ヒトCNS細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、非ヒト動物一細胞期胚、非ヒト動物胚性幹細胞、胚性幹細胞由来運動ニューロン、脳細胞、皮質細胞、神経細胞、筋細胞、心細胞、又は生殖細胞である。

10

【0848】

いくつかの実施形態では、細胞は、病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長を含むC9orf72座位を含み得る。病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、以下の病原性リードアウトの一方又は両方と関連付けられる遺伝子C9orf72における2つの推定上の最初の非コードエクソン（エクソン1A及び1B）を分離している介在配列中のGGGGCC（配列番号100）のある数のリピートからなる伸長である：（1）センス及びアンチセンスリピート含有RNAが、ニューロン及び他の細胞中の別個の巣として可視化され得ること、並びに（2）センス及びアンチセンスリピート含有RNAからリピート関連非AUG依存性翻訳によって合成されるジペプチドリピータンパク質—ポリ（グリシン—アラニン）、ポリ（グリシン—プロリン）、ポリ（グリシン—アルギニン）、ポリ（アラニン—プロリン）、及びポリ（プロリン—アルギニン）—が、細胞中で検出され得ること。リピートの数は、C9orf72 ALS又はC9orf72 FTDを有しない人からの座位で通常見られるリピート数よりも多いリピート数であり得る。あるいは、病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、C9orf72 ALS又はC9orf72 FTDを有する対象からのC9orf72座位における伸長（すなわち、リピートの数）であり得る。病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、GGGGCC（配列番号100）の複数のリピートを有する。例えば、病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、例えば、ヘキサヌクレオチドリピートの少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、又は少なくとも約500コピーを有し得る。

20

30

【0849】

細胞は、例えば、C9orf72 ALS又はC9orf72 FTDを含むC9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長関連疾患を有する又は発症するリスクがある対象由来の細胞（例えば、ニューロン又は運動ニューロン）であり得る。

【0850】

本明細書に開示される方法における細胞は、C9orf72座位を含む任意のタイプの細胞であることができる。C9orf72座位は、本明細書の他の箇所に記載されるヘキサヌクレオチドリピート伸長配列又は病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長配列を含み得る。ヘキサヌクレオチドリピート伸長配列は、配列番号100として示されるヘキサヌクレオチド配列の100を超えるリピートを含んでもよい。

40

【0851】

C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長配列は、概して、配列番号100として示されるヘキサヌクレオチド配列GGGGCCを少なくとも2実体（すなわち、2回のリピート）を含むヌクレオチド配列である。いくつかのヘキサヌクレオチドリピート伸長配列では、リピートは連続している（介在配列なしで互いに隣接している）。リピート伸長配列は、例えば、内因性C9orf72座位の第1の非コード内因性エクソンとエクソン2との間に位置し得る。

【0852】

ヘキサヌクレオチドリピート伸長配列は、任意の数のリピートを有することができる。

50

例えば、リピート伸長配列は、約 95 を超えるリピート、約 96 を超えるリピート、約 97 を超えるリピート、約 98 を超えるリピート、約 99 を超えるリピート、約 100 を超えるリピート、約 101 を超えるリピート、約 102 を超えるリピート、約 103 を超えるリピート、約 104 を超えるリピート、約 105 を超えるリピート、約 150 を超えるリピート、約 200 を超えるリピート、約 250 を超えるリピート、約 295 を超えるリピート、約 296 を超えるリピート、約 297 を超えるリピート、約 298 を超えるリピート、約 299 を超えるリピート、約 300 を超えるリピート、約 301 を超えるリピート、約 302 を超えるリピート、約 303 を超えるリピート、約 304 を超えるリピート、約 305 を超えるリピート、約 350 を超えるリピート、約 400 を超えるリピート、約 450 を超えるリピート、約 500 を超えるリピート、約 550 を超えるリピート、約 595 を超えるリピート、約 596 を超えるリピート、約 597 を超えるリピート、約 598 を超えるリピート、約 599 を超えるリピート、約 600 を超えるリピート、約 601 を超えるリピート、約 602 を超えるリピート、約 603 を超えるリピート、約 604 を超えるリピート、又は約 605 を超えるリピートを含み得る。あるいは、リピート伸長配列は、少なくとも約 95 リピート、少なくとも約 96 リピート、少なくとも約 97 リピート、少なくとも約 98 リピート、少なくとも約 99 リピート、少なくとも約 100 リピート、少なくとも約 101 リピート、少なくとも約 102 リピート、少なくとも約 103 リピート、少なくとも約 104 リピート、少なくとも約 105 リピート、少なくとも約 150 リピート、少なくとも約 200 リピート、少なくとも約 250 リピート、少なくとも約 295 リピート、少なくとも約 296 リピート、少なくとも約 297 リピート、少なくとも約 298 リピート、少なくとも約 299 リピート、少なくとも約 300 リピート、少なくとも約 301 リピート、少なくとも約 302 リピート、少なくとも約 303 リピート、少なくとも約 304 リピート、少なくとも約 305 リピート、少なくとも約 350 リピート、少なくとも約 400 リピート、少なくとも約 450 リピート、少なくとも約 500 リピート、少なくとも約 550 リピート、少なくとも約 595 リピート、少なくとも約 596 リピート、少なくとも約 597 リピート、少なくとも約 598 リピート、少なくとも約 599 リピート、少なくとも約 600 リピート、少なくとも約 601 リピート、少なくとも約 602 リピート、少なくとも約 603 リピート、少なくとも約 604 リピート、又は少なくとも約 605 リピートを含み得る。特定の例では、ヘキサヌクレオチドリピート伸長配列は、約 100 を超えるリピート、約 300 を超えるリピート、約 600 を超えるリピート、少なくとも約 100 リピート、少なくとも約 300 リピート、又は少なくとも約 600 リピートを含む。

10

20

30

40

【0853】

細胞は、インビトロであっても、エクスピボであっても、インビボであってもよい。例えば、細胞は動物内でインビボであることができる。細胞又は動物は、雄であっても雌であってもよい。細胞又は動物は、内因性 C9orf72 座位に挿入されたヘキサヌクレオチドリピート伸長配列に対してヘテロ接合性であってもホモ接合性であってもよい。2 倍体生物は、各遺伝子座に 2 つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の座位に 2 つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合性として、2 つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合性として記載される。非ヒト動物は、その生殖細胞ゲノム中の内因性 C9orf72 座位に挿入された異種ヘキサヌクレオチドリピート伸長配列を含み得る。

【0854】

C9orf72 発現（例えば、センス mRNA、アンチセンス mRNA、総 C9orf72 mRNA、センス C9orf72 リピート含有 mRNA、アンチセンス C9orf72 リピート含有 mRNA レベル、総 C9orf72 タンパク質、及び／又は C9orf72 リピート含有タンパク質によって評価される）は、細胞において約 20、25、30、35、40、45、又は 50% 阻害される。他の実施形態では、C9orf72 発現は、50% 以下、例えば、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、又は 5% 以下阻害される。

50

【0855】

C9orf72 標的 RNA における発現の減少は、いずれの量であることもできる。センス若しくはアンチセンス含有巢及び／又は異常なジペプチドリピータンパク質レベルによって評価される阻害は、細胞において、少なくとも20%、30%、40%、好ましくは少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、若しくは95%、又はアッセイの検出レベルを下回るまで阻害される。

【0856】

いくつかの実施形態では、dsRNA 剤により、ヘキサヌクレオチドリピートを含む C9orf72 標的 RNA などの C9orf72 標的 RNA の発現が、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%、又は少なくとも約90%（又は C9orf72 標的 RNA が検出不能であるところまで）阻害されてもよい。例えば、これらの阻害レベルは、ヘキサヌクレオチドリピートを含む C9orf72 標的 RNA を発現する細胞への投与後約1日以内、約2日以内、約3日以内、約4日以内、約5日以内、約6日以内、約1週間以内、又は約24～約48時間以内とすることができる。減少は、例えば、dsRNA 剤で処理する前の細胞と比べたもの、又は dsRNA 剤で処理しなかった対照細胞と比べたものであり得る。

【0857】

方法のうちのいくつかでは、本発明の dsRNA 剤は、成熟 C9orf72 メッセンジャー RNA の発現と比較して、ヘキサヌクレオチドリピートを含む C9orf72 標的 RNA などの C9orf72 標的 RNA の発現を選択的に阻害する。この背景における成熟 C9orf72 メッセンジャー RNA は、スプライシング及びプロセシングされた C9orf72 RNA 転写産物である。成熟 C9orf72 メッセンジャー RNA は、エクソンのみからなり、全てのイントロンが除去されている。dsRNA 剤は、C9orf72 標的 RNA の発現の相対的減少が、C9orf72 標的 RNA を発現する細胞への dsRNA 剤の投与後の成熟 C9orf72 メッセンジャー RNA の発現の相対的減少よりも大きい場合に、成熟 C9orf72 メッセンジャー RNA の発現と比べて、イントロンヘキサヌクレオチドリピートを含む C9orf72 標的 RNA の発現を選択的に阻害する。例えば、ある特定の実施形態では、本発明の dsRNA 剤は、成熟 C9orf72 メッセンジャー RNA の発現を、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、又は約5%未満阻害してもよい（又は例えば、発現に対して統計的に有意若しくは機能的に有意な効果を一切有しない）。例えば、これらの阻害レベルは、ヘキサヌクレオチドリピートを含む C9orf72 標的 RNA を発現する細胞への投与後約1日以内、約2日以内、約3日以内、約4日以内、約5日以内、約6日以内、約1週間以内、又は約24～約48時間以内とすることができる。減少は、例えば、dsRNA 剤で処理する前の細胞と比べたもの、又は dsRNA 剤で処理しなかった対照細胞と比べたものであり得る。

【0858】

本明細書に開示される方法のうちのいくつかは、細胞内のジペプチドリピータンパク質合成又はジペプチドリピータンパク質凝集体を低減させるためのものである。こうした方法は、細胞を、本明細書に開示される dsRNA 剤のうちのいずれか、本開示の2つ以上の dsRNA、例えば、2、3、若しくは4つ、本開示の2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの dsRNA 剤を含む組成物（医薬組成物など）、又は各々独立して本発明の dsRNA 剤を含む2つ以上、例えば、2、3、若しくは4つの組成物（医薬組成物など）を細胞に導入し、それにより、細胞におけるジペプチドリピータンパク質合成又はジペプチドリピータンパク質凝集体を低減させることを含む。

【0859】

こうした方法は、細胞内のジペプチドリピータンパク質凝集体（例えば、ポリ（グリシン-アラニン）、ポリ（グリシン-プロリン）、ポリ（グリシン-アルギニン）、ポリ（アラニン-プロリン）、及びポリ（プロリン-アルギニン））の存在を評価することを

10

20

30

40

50

更に含み得る。特定の例では、ジペプチドリピータンパク質は、ポリ（グリシンーアラニン）及び／又はポリ（グリシンープロリン）であり得る。例えば、免疫組織化学又はウェスタンブロット分析によって評価を行い、ジペプチドリピータンパク質凝集体を検出することができる。しかしながら、任意の他の好適な方法を使用してもよい。

【0860】

ジペプチドリピータンパク質合成又はジペプチドリピータンパク質凝集体の減少は、任意の量とすることができる。例えば、dsRNA剤により、ジペプチドリピータンパク質合成又はジペプチドリピータンパク質凝集が、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%、又は少なくとも約90%（又はジペプチドリピータンパク質凝集体が検出不能であるところまで）低減され得る。例えば、これらの阻害レベルは、ヘキサヌクレオチドリピーを含むC9orf72標的RNAを発現する細胞への投与後約1日以内、約2日以内、約3日以内、約4日以内、約5日以内、約6日以内、約1週間以内、又は約24～約48時間以内とすることができる。減少は、例えば、dsRNA剤で処理する前の細胞と比べたもの、又はdsRNA剤で処理しなかった対照細胞と比べたものであり得る。

10

【0861】

こうした方法は、細胞における核及び／又は細胞質センス及び／又はアンチセンスC9orf72 RNA巢の存在を評価することを更に含み得る。

【0862】

核及び／又は細胞質センス及び／又はアンチセンスC9orf72 RNA巢の存在下での減少は、任意の量とすることができる。例えば、dsRNA剤により、核及び／又は細胞質センス及び／又はアンチセンスC9orf72 RNA巢の存在が、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%、又は少なくとも約90%（又は核及び／又は細胞質センス及び／又はアンチセンスC9orf72 RNA巢が検出不能であるところまで）低減され得る。例えば、これらの阻害レベルは、ヘキサヌクレオチドリピーを含むC9orf72標的RNAを発現する細胞への投与後約1日以内、約2日以内、約3日以内、約4日以内、約5日以内、約6日以内、約1週間以内、又は約24～約48時間以内とすることができる。減少は、例えば、dsRNA剤で処理する前の細胞と比べたもの、又はdsRNA剤で処理しなかった対照細胞と比べたものであり得る。

20

30

【0863】

本開示のインピボ法は、対象に、RNAi剤を含む組成物を投与することを含むことができ、RNAi剤は、処置されるべき哺乳動物のC9orf72遺伝子のRNA転写産物の少なくとも一部と相補的であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、対象は、各々独立して本発明のRNAi剤を含む、2つ以上の、例えば、2、3、又は4つの組成物の投与を受ける。組成物は、同一であっても異なってもよい。他の実施形態では、対象は、各々独立してC9orf72遺伝子の一部分を標的とする、2つ以上の、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤を含む組成物の投与を受ける。

40

【0864】

処理しようとする生物が哺乳動物、例えばヒトである場合には、組成物は、限定するものではないが、経口、腹腔内、又は頭蓋内（例えば、脳室内、実質内、及び髄腔内）、静脈内の、筋肉内の、硝子体内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、鼻腔、直腸、及び局所（頬側及び舌下を含む）の投与を含む非経口経路を含む、当技術分野で既知の任意の手段によって投与され得る。ある特定の実施形態では、組成物は、静脈内への注入又は注射によって投与される。ある特定の実施形態では、組成物は、皮下注射によって投与される。ある特定の実施形態では、組成物は、髄腔内注射によって投与される。

【0865】

いくつかの実施形態では、投与は、蓄積注射による。蓄積注射は、長期的な時間にわた

50

って一貫した様式でRNAi剤を放出し得る。このため、蓄積注射は、所望の効果、例えば、所望のC9orf72阻害又は治療若しくは予防効果を得るために必要とされる投薬の回数を減らすことができる。蓄積注射はまた、より一貫した血清濃度を提供することもできる。蓄積注射には、皮下注射又は筋肉内注射が含まれてもよい。好ましい実施形態では、蓄積注射は、皮下注射である。

【0866】

いくつかの実施形態では、投与は、ポンプによる。ポンプは、外部ポンプであっても、外科的に植え込んだポンプであってもよい。ある特定の実施形態では、ポンプは、皮下に植え込んだ浸透圧ポンプである。他の実施形態では、ポンプは、注入ポンプである。注入ポンプは、頭蓋内、静脈内、皮下、動脈、又は硬膜外注入のために使用され得る。好ましい実施形態では、注入ポンプは、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CNSに送達する外科的に埋め込まれたポンプである。

【0867】

投与様式は、局所的な治療が望まれるのか全身的な治療が望まれるのかに応じて、また処理しようとする面積に基づいて、選択され得る。投与の経路及び部位は、標的化を増強するように選択され得る。

【0868】

一態様では、本開示はまた、哺乳動物においてC9orf72遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。本方法は、哺乳動物に、哺乳動物の細胞内においてC9orf72遺伝子を標的とするdsRNAを含む組成物を投与し、それによって、細胞内においてC9orf72遺伝子の発現を阻害することを含む。いくつかの実施形態では、dsRNAは、医薬組成物などの組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、本発明の2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤の投与を受ける。いくつかの実施形態では、対象に投与される各dsRNA剤は、独立して組成物中に存在する。他の実施形態では、哺乳動物は、本発明の2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤を含む組成物の投与を受ける。

【0869】

遺伝子発現の低減は、当技術分野で既知の任意の方法によって、また本明細書において記載される方法、例えば、qRT-PCRによって評価することができる。

【0870】

タンパク質産生の低減は、当技術分野で既知の任意の方法によって、また本明細書において記載される方法、例えば、ELISAによって評価することができる。一実施形態では、CNS生検試料又は脳脊髄液(CSF)試料は、C9orf72遺伝子又はタンパク質発現の(又はしたがってプロキシの)低減を監視するための組織材料として機能する。

【0871】

本開示は、治療を必要とする対象の治療方法を更に提供する。本開示の治療方法は、本開示のRNAi剤を、対象、例えば、C9orf72遺伝子のイントロン内にGGGGC伸長ヌクレオチドリピートを有する対象など、C9orf72発現の阻害から利益を受け得る対象に、C9orf72遺伝子を標的とするRNAi剤又はC9orf72遺伝子を標的とするRNAi剤を含む医薬組成物の治療有効量で投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、本発明の2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤の治療有効量の投与を受ける。いくつかの実施形態では、対象に投与される各dsRNA剤は、独立して組成物中に存在する。他の実施形態では、対象は、本発明の2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤を含む組成物の投与を受ける。

【0872】

加えて、本開示は、対象において、C9orf72関連疾患又は障害(例えば、C9orf72関連障害)の進行を、予防、治療、又は阻害する方法を提供する。本方法は、対象に、本明細書において提供されるRNAi剤、例えば、dsRNA剤、又は本明細書において提供される医薬組成物のうちのいずれかの治療有効量を投与し、それによって、対象においてC9orf72関連疾患又は障害の進行を、予防、治療、又は阻害することを

含む。いくつかの実施形態では、対象は、本発明の2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤の治療有効量の投与を受ける。いくつかの実施形態では、対象に投与される各dsRNA剤は、独立して組成物中に存在する。他の実施形態では、対象は、本発明の2つ以上、例えば、2、3、又は4つのdsRNA剤を含む組成物の投与を受ける。

【0873】

いくつかの実施形態では、本方法は、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長関連の疾患、状態、又は障害に罹患している対象を治療するためのものである。こうした方法はまた、配列番号100の複数の連続コピーを含むヘキサヌクレオチドリピートを含むC9orf72標的RNAの発現の低減から利益を受け得る疾患、障害、又は状態を有する対象（例えば、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長関連の疾患、状態、又は障害を有するか又はそれを発症するリスクがある対象）における少なくとも1つの症状を予防又は改善するためのものであり得る。C9orf72標的RNAは、例えば、病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長を伴う（例えば、ヘキサヌクレオチドリピートの少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、又は少なくとも約500コピーを有する）ものであり得る。C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長関連の疾患、状態、又は障害は、C9orf72遺伝子の5'非コード部分におけるヘキサヌクレオチドリピート（GGGGCC、配列番号100）の伸長により引き起こされる又はそれと関連付けられる疾患、状態、又は障害である。例としては、筋萎縮性側索硬化症（ALS）及び前頭側頭型認知症（FTD）が挙げられる。FTD及び／又はALSと関連付けられる兆候又は症状には、限定するものではないが、ニューロンにおけるリピート関連非AUG（AUG）翻訳から生じる、RNA巢のリピート長依存性の形成、特定のRNA結合タンパク質の分画、並びにジペプチドリピートタンパク質（例えば、ポリ（グリシン-アラニン）、ポリ（グリシン-プロリン）、ポリ（グリシン-アルギニン）、ポリ（アラニン-プロリン）、及びポリ（プロリン-アルギニン））の蓄積及び凝集が含まれる。本発明のdsRNA剤は、運動ニューロン疾患の兆候及び症状、並びに認知症の兆候及び症状を含むがこれらに限定されない、FTD及び／又はALSと関連付けられる兆候又は症状の治療処置及び／又は予防のための方法に使用されてもよい。運動ニューロン疾患の徴候及び症状には、例えば、つまずき、物を落とすこと、腕及び／又は脚の異常な疲労、不明瞭な発話、筋肉の痙攣及び引きつり、笑うこと又は泣くことを制御できない期間、並びに呼吸困難が含まれ得る。認知症の徴候及び症状には、例えば、行動変化、性格変化、発話及び言語の障害、並びに運動関連障害が含まれ得る。

【0874】

本明細書に記載されるように、2つ以上のdsRNA剤、例えば、表2、3、5、6、8、9、10A、10B、10C、10D、11、及び12にあるdsRNA剤の群から選択されるdsRNA剤のうちのいずれか2つ以上、例えば、2つ、3つ、又は4つを投与することを含む本発明の方法のいくつかの実施形態では、対象は、第1の薬剤（又は第1の薬剤を含む組成物）を第1の時点で、第2の薬剤（又は第2の薬剤を含む組成物）を第2の時点で、第3の薬剤（又は第3の薬剤を含む組成物）を第3の時点で、及び第4の薬剤（又は第4の薬剤を含む組成物）を第4の時点で投与されてもよく、又は対象は、全ての薬剤（又は全ての薬剤を含む組成物）と同時に投与されてもよい。あるいは、対象は、第1の薬剤（又は第1の薬剤を含む組成物）を第1の時点で、第2、第3、及び／又は第4の薬剤（又は第2、第3、及び／又は第4の薬剤を含む組成物）を第2の時点で投与されてもよい。細胞を本発明の2つ以上の薬剤と接触させる他の組み合わせも企図される。

【0875】

本開示のRNAi剤は、「遊離RNAi剤」として投与されてもよい。遊離RNAi剤は、医薬組成物の不在下で投与される。裸のRNAi剤は、好適な緩衝溶液中にあっててもよい。緩衝溶液は、酢酸塩、クエン酸塩、プロラミン、炭酸塩、又はリン酸塩、又はそれ

らのいずれかの組み合わせを含んでもよい。一実施形態では、緩衝溶液は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）である。RNAi剤を含む緩衝溶液のpH及び浸透圧は、対象への投与に好適であるように調整することができる。

【0876】

あるいは、本開示のRNAi剤は、dsRNAリボソーム製剤などの医薬組成物として投与されてもよい。

【0877】

C9orf72遺伝子発現の低減又は阻害から利益を受け得る対象は、C9orf72関連疾患、例えば、C9orf72関連疾患を有する対象である。例示的なC9orf72関連疾患としては、ALS、FTD、C9ALS/FTD、及びC9orf72伸長に起因するハンチントン様症候群、パーキンソニズム、オリブ橋小脳変性、皮質基底核症候群、又はアルツハイマー病、例えば、C9orf72遺伝子のイントロン内に伸長GGGGCCヘキサヌクレオチドリピートを有する対象が挙げられるが、これらに限定されない。

【0878】

本開示は、例えば、C9orf72発現の低減若しくは阻害から利益を受け得る対象、例えば、C9orf72関連障害を有する対象を治療するために、他の医薬又は他の治療方法と、例えば、これらの障害を治療するために現在用いられているものなどの既知の医薬又は既知の治療方法と組み合わせた、RNAi剤又はその医薬組成物の使用のための方法を更に提供する。例えば、ある特定の実施形態では、C9orf72を標的とするRNAi剤は、例えば、本明細書において別の場所に記載される又は別様に当技術分野で既知である、C9orf72関連障害の治療に有用な薬剤と組み合わせて投与される。例えば、C9orf72発現の低減から利益を受け得る対象、例えば、C9orf72関連障害を有する対象を治療するのに好適な追加の薬剤は、C9orf72関連障害の症状を治療するために現在使用されている薬剤を含んでもよい。RNAi剤及び追加の治療薬は、同時に又は同じ組み合わせで、例えば、髄腔内投与されてもよく、あるいは追加の治療薬は、別個の組成物の一部として、若しくは別個の時間で、又は当技術分野で既知の若しくは本明細書に記載される別の方法によって投与され得る。

【0879】

例示的な追加の治療薬としては、例えばモノアミン阻害剤、例えばテトラベナジン（Xenazine）、デューテトラベナジン（Austedo）及びレセルピン、抗痙攣剤、例えばバルプロ酸（Depakote、Depakene、Depacon）、及びクロナゼパム（Klonopin）、抗精神病剤、例えばリスペリドン（Risperdal）、及びハロペリドール（Haldol）、及び抗うつ剤、例えばパロキセチン（Paxil）が挙げられる。

【0880】

一実施形態では、本方法は、標的C9orf72遺伝子の発現が少なくとも1か月間減少するように、本明細書において取り上げる組成物を投与することを含む。好ましい実施形態では、発現は、少なくとも2か月、3か月、又は6か月間減少する。

【0881】

好ましくは、本明細書において取り上げる方法及び組成物に有用なRNAi剤は、標的C9orf72遺伝子のRNA（一次又はプロセシングされた）を特異的に標的とする。RNAi剤を使用してこれら遺伝子の発現を阻害する組成物及び方法は、本明細書において記載するように調製及び実施することができる。

【0882】

本開示の方法によるdsRNAの投与は、C9orf72関連障害を有する患者においてこのような疾患又は障害の重症度、徴候、症状、又はマーカーの低減をもたらし得る。この文脈での「低減」と、かかるレベルの統計学的に有意な又は臨床的に有意な減少を意味する。低減は、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、

10

20

30

40

50

85%、90%、95%、又は約100%であり得る。

【0883】

疾患の治療又は予防の有効性は、例えば、疾患進行、疾患緩解、症状の重症度、疼痛の低減、生活の質、処置効果を持続するために必要とされる投薬の用量、疾患マーカー、又は治療されている若しくは予防のために標的とされる所与の疾患に適切な任意の他の測定可能なパラメータを測定することによって評価することができる。こうしたパラメータのうちいずれか1つ又はパラメータのいずれかの組み合わせを測定することによって治療又は予防の有効性を観察することは、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、C9orf72関連障害の治療の有効性は、例えば、対象のものの定期的な観察によって評価されてもよい。最初の読み取り値と後の読み取り値とを比較することによって、治療が有効であるか否かの指標が医師に提供される。こうしたパラメータのうちいずれか1つ又はパラメータのいずれかの組み合わせを測定することによって治療又は予防の有効性を観察することは、十分に当業者の能力の範囲内である。C9orf72を標的とするRNAi剤又はその医薬組成物の投与に関連して、C9orf72関連障害「に対して有効な」は、臨床的に適切な様式での投与により、少なくとも統計学的に有意な割合の患者にとって有益な効果、例えば、症状の改善、治癒、疾患の低減、寿命の延長、生活の質の改善、又はC9orf72関連障害及び関連原因の治療に精通している医師によって肯定的であると通常認識される他の効果が生じることを示す。

10

【0884】

治療又は予防効果は、疾患状態の1つ以上のパラメータにおいて統計的に有意な改善がある場合に、又は悪化しなかったこと若しくは別様に予測される症状を発症しなかったときに明白である。例として、疾患の測定可能なパラメータが、少なくとも10%、好ましくは、少なくとも20%、30%、40%、50%、又はそれ以上好ましく変化することが、有効な治療の指標であり得る。所与のRNAi剤の薬物又はその薬物の製剤の有効性はまた、当技術分野で既知である所与の疾患の実験動物モデルを使用して判断することができる。実験動物モデルを使用する場合には、治療の有効性は、マーカー又は症状の統計学的に有意な低減が観察されたときに明白である。

20

【0885】

あるいは、有効性は、臨床的に許容される疾患重症度類別スケールに基づいて、診断の当業者によって決定される疾患の重症度の低減によって測定することができる。例えば、適切なスケールを使用して測定される疾患の重症度の軽減をもたらすいずれの肯定的な変化も、本明細書において記載するRNAi剤又はRNAi剤製剤を使用する妥当な治療を表している。

30

【0886】

対象には、dsRNAの治療量、例えば、約0.01mg/kg～約200mg/kgが投与され得る。

【0887】

RNAi剤は、一定期間にわたって定期的に、髄腔内に、硝子体内注射を介して、又は静脈内注入によって投与され得る。ある特定の実施形態では、最初の治療レジメン後に、より少ない頻度で治療を施すことができる。RNAi剤の投与は、例えば、患者の細胞、組織、血液、CSF試料、又は他のコンパートメントにおいて、C9orf72レベルを低減させ得る。一実施形態では、RNAi剤の投与は、例えば、患者の細胞、組織、血液、CSF試料、又は他のコンパートメントにおいて、C9orf72レベルを50%以下低減させ得る。

40

【0888】

RNAi剤の全用量の投与の前に、患者に、5%の注入反応など、より少ない用量を投与し、アレルギー反応などの有害作用について監視することができる。別の例では、患者を、サイトカイン（例えば、TNF- α 又はINF- α ）レベルの増加などの望まれない免疫活性化作用について監視することができる。

【0889】

50

あるいは、RNA i 剤を、皮下に、すなわち、皮下注射によって投与することができる。RNA i 剤の所望の、例えば、毎月の用量を対象に送達するために、1 回以上の注射を使用してもよい。一定期間にわたって、注射を繰り返してもよい。投与を定期的に繰り返してもよい。ある特定の実施形態では、最初の治療レジメン後に、より少ない頻度で治療を施すことができる。反復投薬レジメンは、定期的な、例えば、毎月、又は四半期に 1 回、年に 2 回、年に 1 回にわたる、RNA i 剤の治療量の投与を含んでもよい。ある特定の実施形態では、RNA i 剤は、月に約 1 回から四半期に約 1 回（すなわち、約 3 か月ごとに 1 回）投与される。

【0890】

別段の定義がない限り、本明細書において使用する全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載するものと類似又は同等の方法及び材料を、本発明において取り上げる RNA i 剤及び方法の実施又は試験において使用できるが、好適な方法及び材料を以下に記載する。本明細書において言及する全ての公開公報、特許出願、特許、及び他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含めて、本明細書が統制することとなる。加えて、材料、方法、及び例は、例示的なものでしかなく、限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0891】

実施例 1. C9orf72 遺伝子座位でのヘキサヌクレオチドリピート伸長

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及び前頭側頭型認知症 (FTD) は、ALS の症例では運動ニューロン疾患を引き起こし、FTD の症例では認知症を引き起こす壊滅的な神経変性疾患である。どちらも常に致命的である。ALS 及び FTD は、自然疾患又は家族性（すなわち、遺伝性）疾患のいずれかとして存在し得る。ALS 及び FTD の最も一般的な遺伝的原因は、C9orf72 遺伝子の 5' 非コード部分におけるヘキサヌクレオチドリピート (GGGGCC、配列番号 1) の伸長であり、これは、機能が完全には理解されていないタンパク質をコードするものである。罹患していない人は、通常、C9orf72 遺伝子に数個から数十個のヘキサヌクレオチドリピートを有するが、ALS 及び FTD を発症する人は、親の一方のみからヘキサヌクレオチドリピートの数百から数千のコピーのリピート伸長を受け継ぐ。C9orf72 ALS 及び FTD が優性遺伝疾患であり、病理学的機能の獲得から生じることが、遺伝的観察により示唆される。

【0892】

C9orf72 ヘキサヌクレオチドリピート伸長がどのようにして運動ニューロン疾患及び認知症を引き起こすのかは分かっていないが、C9orf72 ALS 及び FTD 患者における 2 つの普遍的死後病理所見がリピート伸長と関連付けられる：(1) センス及びアンチセンスリピート含有 RNA が、蛍光インサイツハイブリダイゼーションによってニューロン及び他の細胞中の別個の巣として可視化され得ること、並びに (2) リピート関連非 AUG 依存性翻訳によってセンス及びアンチセンスリピート含有 RNA から合成されるジペプチドリピータンパク質—ポリ (グリシン—アラニン)、ポリ (グリシン—プロリン)、ポリ (グリシン—アルギニン)、ポリ (グリシン—プロリン)、及びポリ (プロリン—アルギニン)—が、免疫組織化学によって細胞中で検出され得ること。1 つの疾患仮説は、巣として可視化されたリピート含有 RNA が、RNA 結合タンパク質を分画することによって細胞 RNA 代謝を破壊すると提案している。第 2 の疾患仮説は、ジペプチドリピータンパク質が、RNA 代謝、タンパク質恒常性、及び核細胞質輸送に広範な毒性効果を及ぼすと仮定する。両方の病原性機序が疾患に寄与し得る。C9orf72 リピート含有 RNA 転写産物が、それ自体で、又はジペプチドリピータンパク質の翻訳のための鋳型としてのいずれかで、ALS 及び FTD における病因を促進する場合には、一般的な治療戦略は、GGGGCC リピート含有 RNA (センスリピート含有 RNA) 及び／又は GGCCCC リピート含有 RNA (アンチセンスリピート含有 RNA) を破壊するか、又はセンス及び／若しくはアンチセンスジペプチドリピータンパク質に翻訳され

10

20

30

40

50

るその能力を無効化することである。

【0893】

C9orf72遺伝子は、2つの転写開始部位から転写産物を産生する。上流部位は、代替的な非コードエクソン1Aで転写を開始し、下流部位は、代替的なエクソン1Bで転写を開始する。エクソン1Aとエクソン1Bとの両方は、タンパク質コード配列の開始を含むエクソン2にスプライシングされ得る。病原性ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、エクソン1Aとエクソン1Bの間に位置する。したがって、エクソン1Aから開始される転写はリピート含有RNAを産生することができるが、エクソン1Bから開始することでは、アンチセンス方向に進まない限り、これらを産生することはできない。

【0894】

2020年12月10日に出願されたPCT出願第 PCT/US2020/064159号に記載されているように、マウスにおいてC9orf72リピート伸長疾患をモデル化するために、マウス胚性幹（ES）細胞においてアレル系列を構築し、この中で、エクソン1Aの一部、1Aと1Bの間のイントロン配列、エクソン1Bの全て、凹帯下流イントロンの一部を含むヒトC9orf72遺伝子由来の断片を、マウスC9orf72遺伝子の1つの対立遺伝子中のその相同位置に正確に配置する。例えば、各々全体が全ての目的で参照により本明細書に組み込まれるUS2018/0094267及びWO2018/064600を参照されたい。一連のヘキサヌクレオチドリピート伸長を、正常な3回のリピートから病的な600回のリピートまでの範囲のヒト遺伝子に見られる位置に配置した。

【0895】

異なるリピート伸長を担持するマウスES細胞クローンを培養において運動ニューロンに分化させて、伸長がALSに関連する細胞型に与える影響を試験した。遺伝子修飾されたヒト化C9orf72対立遺伝子から産生された転写産物を調べると、3つのリピート正常対照で優勢であるエクソン1Bスプライシング転写産物から、より長いリピート拡張を有する対立遺伝子におけるエクソン1Aスプライシング転写産物の増加した出現への切り替えがあることが見出された。また、その存在量がヘキサヌクレオチドリピート伸長の長さとは直接相関するスプライシングされていないイントロン含有転写産物の蓄積を観察すると、リピート伸長が長くなるほど、C9orf72遺伝子からより多くのリピート含有転写産物が産生される、自家的なフィードフォワードループが示唆された。正常なC9orf72 mRNA及びタンパク質の合成を温存しながら、ジペプチドリピータンパク質合成の鋳型として、リピート含有イントロン転写産物を破壊又は不活性化のために標的化することは、C9orf72リピート伸長疾患に対する安全かつ効果的な治療戦略であると予想される。

【0896】

C9orf72リピート含有RNAを低減させるための1つの可能なアプローチは、RNA干渉の天然プロセスによるものであり、このプロセスでは、siRNAが、RNA誘導型サイレンシング複合体による標的RNAの切断を司り、その後、細胞ヌクレアーゼによるRNA切断断片の分解をもたらす。しかしながら、RNA干渉は、主に、核内に保持されたRNAに作用するとは予想されない細胞質プロセスである。イントロン含有RNAは、通常、成熟mRNAに急速にスプライシングされるmRNA前駆体、又は核中で急速に分解されるスプライシングアウトされたイントロンのいずれかとして、寿命が短い。したがって、イントロン含有RNAがRNA干渉による標的化に利用できないと予想することは妥当である。

【0897】

しかしながら、GGGGCCリピート伸長に隣接するイントロン配列を標的としたsiRNAは、イントロン含有C9orf72 RNAの蓄積の低減を促進する一方、C9orf72成熟mRNAにほとんど又は全く影響を有しないことが示されている。イントロン標的化siRNAはまた、ジペプチドリピータンパク質の産生を低減させた。これらの予想外の実験結果により、C9orf72ヘキサヌクレオチドリピート伸長を有する細

10

20

30

40

50

胞に蓄積するイントロン含有RNAがRNA干渉の影響を受けやすいことが示される。結果は、ジペプチドリピータンパク質合成に關与するイントロン含有C9orf72 RNAのかなりの割合が細胞質内に存在することを示す。対照的に、C9orf72 mRNAタンパク質コード配列を標的としたsiRNAは、mRNAの強力なノックダウンを生んだが、イントロン含有転写産物には効果がなく、ジペプチドリピータンパク質合成を感知できるほどには低減させなかった。イントロン標的化siRNAとmRNA標的化siRNAとの間の結果の相違は、2つのクラスの標的配列が、共有結合していない個々のRNA上に存在することを示唆している。

【0898】

本明細書に開示される方法及び組成物は、C9orf72リピート伸長疾患の主要な病原性成分であるジペプチドリピータンパク質の合成の治療的低減を提供する一方で、C9orf72 mRNAは温存し、それにより、核内の一次C9orf72転写産物を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用などの治療戦略で生じ得る、C9orf72タンパク質の低減の有害作用の可能性を回避する。

【0899】

実施例2. RNAi剤の設計、合成、選択、及びインビトロでの評価

この実施例は、C9orf72 RNAi剤の設計、合成、選択、及びインビトロでの評価の方法を記載する。

【0900】

試薬の供給元

本明細書において試薬の供給元が具体的に与えられていない場合には、こうした試薬は、分子生物学で応用するための品質／純度基準にある分子生物学用の試薬の任意の供給元から得ることができる。

【0901】

バイオインフォマティクス

ヒトC9orf72遺伝子におけるエクソン1Aとエクソン1Bの間のイントロンのアンチセンス鎖を標的とするsiRNA (GenBank受入番号NC_000009.12)を、カスタムRスクリプト及びPythonスクリプトを使用して設計した。未修飾C9orf72のセンス鎖及びアンチセンス鎖のヌクレオチド配列の詳細なリストを、表2に示す。修飾されたC9orf72のセンス鎖及びアンチセンス鎖のヌクレオチド配列の詳細なリストを、表3に示す。

【0902】

ヒトC9orf72遺伝子のエクソン1Aのセンス鎖を標的とするsiRNA (GenBank受入番号NM_001256054.2)を、カスタムRスクリプト及びPythonスクリプトを使用して設計した。ヒトC9orf72遺伝子のエクソン1Aとエクソン1Bとの間のイントロンのセンス鎖におけるイントロンリピートの3'末端を標的とするsiRNA (GenBank受入番号NG_031977.2)も、カスタムRスクリプト及びPythonスクリプトを使用して設計した。未修飾C9orf72のセンス鎖及びアンチセンス鎖のヌクレオチド配列の詳細なリストを、表5に示す。修飾されたC9orf72のセンス鎖及びアンチセンス鎖のヌクレオチド配列の詳細なリストを、表6に示す。

【0903】

本願全体にわたって、小数のない二本鎖名は、小数付きの二本鎖名と同等であり、単に二本鎖のバッチ番号を指しているということを理解されたい。例えば、AD-347430は、AD-347430.1と同等である。

【0904】

インビトロCos-7 (デュアルルシフェラーゼpsiCHECK2ベクター)、BE(2)-C、及びNeuro-2aスクリーニング

細胞培養及びトランスフェクション:

Cos-7 (ATCC)は、384ウェルプレートに、Opti-MEMで希釈した、

10

20

30

40

50

C9orf72イントロン1 psiCHECK2ベクター (Blue Heron Biotechnology) 2 ng/μLの5 μL、ウェル当たり4.9 μLのOpti-MEMと0.1 μLのリポフェクタミン2000 (Invitrogen, Carlsbad CA、カタログ番号11668-019)を、ウェル当たり5 μLのsiRNA二本鎖に加え、各siRNA二本鎖を4回複製してトランスフェクトし、室温で15分間インキュベートする。次いで、約 1×10^3 個の細胞を含むダルベッコ修飾イーグル培地 (ThermoFisher) 35 μLをsiRNA混合物に加えた。細胞を48時間インキュベートし、続いてホタル (トランスフェクション対照) 及びウミシイタケ (標的配列に融合) ルシフェラーゼ測定を行った。三用量実験を、10 nM、1 nM、及び0.1 nMで実施した。

10

【0905】

DYNABEADS mRNA単離キットを使用した全RNAの単離

DYNABEAD (Invitrogen、カタログ番号61012)を使用するBioTek-EL406プラットフォームで自動化プロトコルを使用し、RNAを単離した。簡潔には、細胞を含んだプレートに、70 μLの溶解/結合緩衝液、及び3 μLの磁性ビーズを含む10 μLの溶解緩衝液を加えた。プレートを、電磁振とう機上で、室温で10分間インキュベートし、次いで磁性ビーズを捕捉して上清を除去した。次いでビーズに結合したRNAを、150 μLの洗浄緩衝液Aで2回、洗浄緩衝液Bで1回洗浄した。次いでビーズを、150 μLの溶出緩衝液で洗浄し、再捕捉し、上清を除去した。

20

【0906】

ABI High capacity cDNA逆転写キット (Applied Biosystems, Foster City, CA、カタログ番号#4368813)を使用したcDNA合成

1反応当たり、1 μLの10×緩衝液、0.4 μLの25×dNTP、1 μLの10×ランダムプライマー、0.5 μLの逆転写酵素、0.5 μLのRNase阻害剤、及び6.6 μLのH₂Oを含むマスターミックス10 μLを、上記で単離したRNAに加えた。プレートを密封し、混合し、電磁振とう機上で、室温で10分間インキュベートし、その後2時間37℃でインキュベートした。

【0907】

リアルタイムPCR

30

2 μLのcDNA及び5 μLのLightcycler 480プローブマスターミックス (Rocheカタログ番号04887301001)を、384ウェルプレート (Rocheカタログ番号04887301001)中、ウェル当たり0.5 μLのヒトGAPDH TaqManプローブ (4326317E) 及び0.5 μLのC9orf72ヒトプローブ (Hs00376619_m1、Thermo) 又は0.5 μLのマウスGAPDH TaqManプローブ (4352339E) 及び0.5 μLのC9orf72マウスプローブ (Mm01216837_m1、Thermo)のいずれかに加えた。リアルタイムPCRを、LightCycler 480リアルタイムPCRシステム (Roche)において行った。各二本鎖を、少なくとも2回試験し、データを、非標的化対照siRNAでトランスフェクトされた細胞に対して正規化した。相対変化倍数を算出するために、 $\Delta\Delta C_t$ 法を使用してリアルタイムデータを分析し、非標的化対照siRNAでトランスフェクトされた細胞を用いて実施されたアッセイに対して正規化した。

40

【0908】

Cos-7細胞における表2及び3に列記されるdsRNA剤のスクリーニングの結果を、表4並びに図1及び2に示す。Cos-7細胞における表5及び6に列記されるdsRNA剤のスクリーニングの結果を、表7並びに図3及び4に示す。

【0909】

表1. 核酸配列の表現で使用するヌクレオチドモノマーの略語。これらのモノマーは、オリゴヌクレオチド中に存在する場合、5'-3'-ホスホジエステル結合によって相互に連結されることが理解される。

50

【表 4 - 1】

略語	ヌクレオチド
A	アデノシン-3' -ホスフェート
Ab	ベータ-L-アデノシン-3' -ホスフェート
Abs	ベータ-L-アデノシン-3' -ホスホロチオエート
Af	2' -フルオロアデノシン-3' -ホスフェート
Afs	2' -フルオロアデノシン-3' -ホスホロチオエート
As	アデノシン-3' -ホスホロチオエート
C	シチジン-3' -ホスフェート
Cb	ベータ-L-シチジン-3' -ホスフェート
Cbs	ベータ-L-シチジン-3' -ホスホロチオエート
Cf	2' -フルオロシチジン-3' -ホスフェート
Cfs	2' -フルオロシチジン-3' -ホスホロチオエート
Cs	シチジン-3' -ホスホロチオエート
G	グアノシン-3' -ホスフェート
Gb	ベータ-L-グアノシン-3' -ホスフェート
Gbs	ベータ-L-グアノシン-3' -ホスホロチオエート
Gf	2' -フルオログアノシン-3' -ホスフェート
Gfs	2' -フルオログアノシン-3' -ホスホロチオエート
Gs	グアノシン-3' -ホスホロチオエート
T	5' -メチルウリジン-3' -ホスフェート
Tf	2' -フルオロ-5-メチルウリジン-3' -ホスフェート
Tfs	2' -フルオロ-5-メチルウリジン-3' -ホスホロチオエート
Ts	5-メチルウリジン-3' -ホスホロチオエート

10

20

【表 4 - 2】

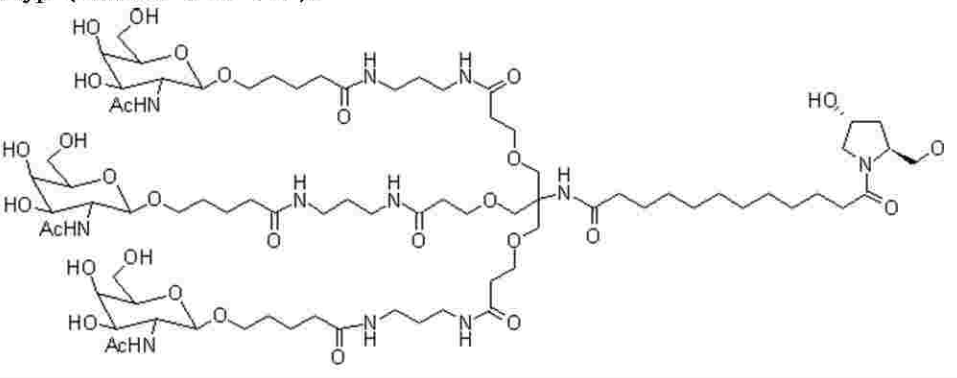
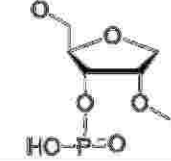
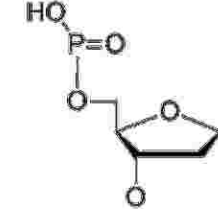
U	ウリジン-3' -ホスフェート
Uf	2' -フルオロウリジン-3' -ホスフェート
Ufs	2' -フルオロウリジン-3' -ホスホロチオエート
Us	ウリジン-3' -ホスホロチオエート
N	修飾又は未修飾の任意のヌクレオチド
a	2' -O-メチルアデノシン-3' -ホスフェート
as	2' -O-メチルアデノシン-3' -ホスホロチオエート
c	2' -O-メチルシチジン-3' -ホスフェート
cs	2' -O-メチルシチジン-3' -ホスホロチオエート
g	2' -O-メチलगアノシン-3' -ホスフェート
gs	2' -O-メチलगアノシン-3' -ホスホロチオエート
t	2' -O-メチル-5-メチルウリジン-3' -ホスフェート
ts	2' -O-メチル-5-メチルウリジン-3' -ホスホロチオエート
u	2' -O-メチルウリジン-3' -ホスフェート
us	2' -O-メチルウリジン-3' -ホスホロチオエート
s	ホスホロチオエート結合

30

40

50

【表 4 - 3】

L96	N-[トリス(GalNAc-アルキル)-アミドデカノイル]-4-ヒドロキシプロリノール Hyp-(GalNAc-アルキル)₃ 
Y34	2-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-4-メトキシ-3-ホスフェート(脱塩基2'-OMeフラノース) 
Y44	逆方向脱塩基DNA(2-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-5-ホスフェート) 

10

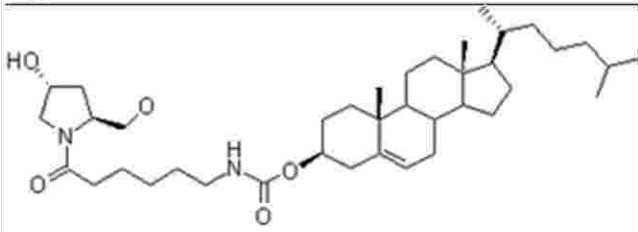
20

30

40

50

【表 4 - 4】

L10	N-(コレステリルカルボキサミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-Chol)
	
(Agn)	アデノシン-グリコール核酸(GNA)S異性体
(Cgn)	シチジン-グリコール核酸(GNA)S異性体
(Ggn)	グアノシン-グリコール核酸(GNA)S異性体
(Tgn)	チミジン-グリコール核酸(GNA)S-異性体
P	ホスフェート
VP	ビニル-ホスホネート
dA	2' -デオキシアデノシン-3' -ホスフェート
dAs	2' -デオキシアデノシン-3' -ホスホロチオエート
dC	2' -デオキシシチジン-3' -ホスフェート
dCs	2' -デオキシシチジン-3' -ホスホロチオエート
dG	2' -デオキシグアノシン-3' -ホスフェート
dGs	2' -デオキシグアノシン-3' -ホスホロチオエート
dT	2' -デオキシチミジン-3' -ホスフェート
dTs	2' -デオキシチミジン-3' -ホスホロチオエート
dU	2' -デオキシウリジン
dUs	2' -デオキシウリジン-3' -ホスホロチオエート

10

20

【表 4 - 5】

(C2p)	シチジン-2' -ホスフェート
(G2p)	グアノシン-2' -ホスフェート
(U2p)	ウリジン-2' -ホスフェート
(A2p)	アデノシン-2' -ホスフェート
(Ahd)	2' -O-ヘキサデシル-アデノシン-3' -ホスフェート
(Ahds)	2' -O-ヘキサデシル-アデノシン-3' -ホスホロチオエート)
(Chd)	2' -O-ヘキサデシル-シチジン-3' -ホスフェート
(Chds)	2' -O-ヘキサデシル-シチジン-3' -ホスホロチオエート)
(Ghd)	2' -O-ヘキサデシル-グアノシン-3' -ホスフェート
(Ghds)	2' -O-ヘキサデシル-グアノシン-3' -ホスホロチオエート)
(Uhd)	2' -O-ヘキサデシル-ウリジン-3' -ホスフェート
(Uhds)	2' -O-ヘキサデシル-ウリジン-3' -ホスホロチオエート)

30

40

50

【表 5 - 1】

表 2. ヒト C9orf72 のイントロン 1a のアンチセンス鎖を標的とする dsRNA 刻の非修飾センス鎖配列及びアンチセンス鎖配列

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000009.1 2'での範囲	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000009.12 での範囲
AD- 1446206.1	CCGAGGCUCUCCUUUUCUCG AA		5761-5781	27573086- 27573106	UUCGAGAAAAGGGAGCCUCG GGU		5761-5783	27573084- 27573106
AD- 1446207.1	AGGCAAUUCCACCAGUCGC UA		5591-5611	27573256- 27573276	UAGCGACUGGUGGAAUUGCC UGC		5591-5613	27573254- 27573276
AD- 1446208.1	CACCAGUCGCUAGAGGCG AAA		5582-5602	27573265- 27573285	UUUCGCCUCUAGCGACUGGU GGA		5582-5604	27573263- 27573285
AD- 1446209.1	ACCAGUCGCUAGAGGCGA AAA		5581-5601	27573266- 27573286	UUUCGCCUCUAGCGACUGG UUU		5581-5603	27573264- 27573286
AD- 1446210.1	CACCCAGCUUCGGUCAGAG AA		5555-5575	27573292- 27573312	UUCUCGACCGAAGCUGGGU GUC		5555-5577	27573290- 27573312
AD- 1446211.1	CCCAGCUUCGGUCAGAGA AAA		5553-5573	27573294- 27573314	UUUCUCUGACCGAAGCUGG GUG		5553-5575	27573292- 27573314
AD- 1446212.1	CAGCUUCGGUCAGAGAAA UGA		5551-5571	27573296- 27573316	UCAUUUCUCUGACCGAAGCU GGG		5551-5573	27573294- 27573316
AD- 1446213.1	GCUUCGGUCAGAGAAAUG AGA		5549-5569	27573298- 27573318	UCUCAUUUCUCUGACCGAAG CUG		5549-5571	27573296- 27573318
AD- 1446214.1	UCGGUCAGAGAAAUGAGA GGA		5546-5566	27573301- 27573321	UCCUCUCAUUUCUCUGACCG AAG		5546-5568	27573299- 27573321
AD- 1446215.1	GGUCAGAGAAAUGAGAGG GAA		5544-5564	27573303- 27573323	UUCCUCUCAUUUUCUCUGACC GA		5544-5566	27573301- 27573323
AD- 1446216.1	UCAGAGAAAUGAGAGGGA AAA		5542-5562	27573305- 27573325	UUUCCUCUCUCAUUUCUCUG ACC		5542-5564	27573303- 27573325
AD- 1446217.1	AGAGGGAAGUAAAAAUG CGA		5531-5551	27573316- 27573336	UCGCAUUUUUACUUUCCUC UCA		5531-5553	27573314- 27573336
AD- 1446218.1	GAGGGAAGUAAAAAUGC GUA		5530-5550	27573317- 27573337	UACGCAUUUUUACUUUCCCU CUC		5530-5552	27573315- 27573337
AD- 1446219.1	AGGGAAGUAAAAAUGC UCA		5529-5549	27573318- 27573338	UGACGCAUUUUUACUUUCC UCU		5529-5551	27573316- 27573338
AD- 1446220.1	GGGAAGUAAAAAUGC CGA		5528-5548	27573319- 27573339	UCGACGCAUUUUUACUUUCC CUC		5528-5550	27573317- 27573339
AD- 1446221.1	GGAAGUAAAAAUGC GAA		5527-5547	27573320- 27573340	UUCGACGCAUUUUUACUUUC CCU		5527-5549	27573318- 27573340
AD-	GAAAGUAAAAAUGCUGC		5526-5546	27573321-	UCUCGACGCAUUUUUACUUU		5526-5548	27573319-

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000009.1 12 での範囲	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000009.1 2 での範囲
1446222.1	AGA			27573341	CCC			27573341
AD- 1446223.1	AAAGUAAAAAUGCGUCGA GCA		5525-5545	27573322- 27573342	UGCUCGACGCAUUUUUACUU UCC		5525-5547	27573320- 27573342
AD- 1446224.1	AAGUAAAAAUGCGUCGAG CUA		5524-5544	27573323- 27573343	UAGCUCGACGCAUUUUUACU UUC		5524-5546	27573321- 27573343
AD- 1446225.1	AGUAAAAAUGCGUCGAGC UCA		5523-5543	27573324- 27573344	UGAGCUCGACGCAUUUUUAC UUU		5523-5545	27573322- 27573344
AD- 1446226.1	CGACUCCUGAGUUCCAGA GCA		5293-5313	27573554- 27573574	UGCUCUGGAACUCAGGAGUC GCG		5293-5315	27573552- 27573574
AD- 1446227.1	GACUCCUGAGUUCGAGAG CUA		5292-5312	27573555- 27573575	UAGCUCUGGAACUCAGGAGU CGC		5292-5314	27573553- 27573575
AD- 1446228.1	ACUCCUGAGUUCGAGAGC UUA		5291-5311	27573556- 27573576	UAGCUCUGGAACUCAGGAG UCG		5291-5313	27573554- 27573576
AD- 1446229.1	CUCCUGAGUUCGAGAGCU UGA		5290-5310	27573557- 27573577	UCAAGCTCUGGAACUCAGGA GUC		5290-5312	27573555- 27573577
AD- 1446230.1	UCCUGAGUUCGAGAGCUU GCA		5289-5309	27573558- 27573578	UGCAAGCUCUGGAACUCAGG AGU		5289-5311	27573556- 27573578
AD- 1446231.1	CCUGAGUUCGAGAGCUUG CUA		5288-5308	27573559- 27573579	UAGCAAGCUCUGGAACUCAG GAG		5288-5310	27573557- 27573579
AD- 1446232.1	GAGUUCGAGAGCUUGCUA CAA		5285-5305	27573562- 27573582	UUGUAGCAAGCUCUGGAACU CAG		5285-5307	27573560- 27573582
AD- 1446233.1	AGUUCGAGAGCUUGCUAC AGA		5284-5304	27573563- 27573583	UCUGUAGCAAGCUCUGGAAC UCA		5284-5306	27573561- 27573583
AD- 1446234.1	GUUCGAGAGCUUGCUACA GGA		5283-5303	27573564- 27573584	UCCUGUAGCAAGCUCUGGAA CUC		5283-5305	27573562- 27573584
AD- 1446235.1	UUCGAGAGCUUGCUACAG GCA		5282-5302	27573565- 27573585	UGCCUGTAGCAAGCUCUGGA ACU		5282-5304	27573563- 27573585
AD- 1446236.1	UCCAGAGCUUGCUACAGG CUA		5281-5301	27573566- 27573586	UAGCCUGUAGCAAGCUCUGG AAC		5281-5303	27573564- 27573586
AD- 1446237.1	CCAGAGCUUGCUACAGGC UGA		5280-5300	27573567- 27573587	UCAGCCUGUAGCAAGCUCUG GAA		5280-5302	27573565- 27573587
AD- 1446238.1	CAGAGCUUGCUACAGGCU GCA		5279-5299	27573568- 27573588	UGCAGCCUGUAGCAAGCUCU GGA		5279-5301	27573566- 27573588
AD- 1446239.1	UACAGGCUUGCGGUUGUU CCA		5269-5289	27573578- 27573598	UGGAAACAACCCGACGCCUGU AGC		5269-5291	27573576- 27573598

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000099.12 での範囲	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000099.12 での範囲
AD-1446240.1	GCUGCGGUUGUUUCCCUCCUA		5264-5284	27573583-27573603	UAGGAGGGGAAACAACCCGAGCCU		5264-5286	27573581-27573603
AD-1446241.1	CUGCGGUUGUUUCCCUCCUUA		5263-5283	27573584-27573604	UAGGAGGGGAAACAACCCGCA		5263-5285	27573582-27573604
AD-1446242.1	GCGGUUGUUUCCCUCCCUUA		5261-5281	27573586-27573606	UACAAGGAGGGAAACAACCCGAG		5261-5283	27573584-27573606
AD-1446243.1	CGGUUGUUUCCCUCCCUUGUUA		5260-5280	27573587-27573607	UAACAAGGAGGGGAAACAACCCGCA		5260-5282	27573585-27573607
AD-1446244.1	GUUGUUUCCCUCCCUUGUUUA		5258-5278	27573589-27573609	UAAAACAAGGAGGGGAAACAACCCG		5258-5280	27573587-27573609
AD-1446245.1	UUGUUUCCCUCCCUUGUUUA		5257-5277	27573590-27573610	UGAAAACAAGGAGGGGAAACAACCC		5257-5279	27573588-27573610
AD-1446246.1	UUCUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5253-5273	27573594-27573614	UAGAAGAAACAAGGAGGGGA		5253-5275	27573592-27573614
AD-1446247.1	UCCUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5252-5272	27573595-27573615	UCAGAAGAAACAAGGAGGGG		5252-5274	27573593-27573615
AD-1446248.1	CCUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5251-5271	27573596-27573616	UCCAGAAGAAACAAGGAGGGGAA		5251-5273	27573594-27573616
AD-1446249.1	CUUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5250-5270	27573597-27573617	UACCAGAAGAAACAAGGAGGGGGA		5250-5272	27573595-27573617
AD-1446250.1	CUUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5249-5269	27573598-27573618	UAAACCAGAAGAAACAAGGAGGGG		5249-5271	27573596-27573618
AD-1446251.1	CUUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5247-5267	27573600-27573620	UUUUAACCAGAAGAAACAAGGAGGAG		5247-5269	27573598-27573620
AD-1446252.1	CUUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5246-5266	27573601-27573621	UAUUUAACCAGAAGAAACAAGGAGGGA		5246-5268	27573599-27573621
AD-1446253.1	UUGUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5245-5265	27573602-27573622	UGAUUAACCAGAAGAAACAAGGAGGAGG		5245-5267	27573600-27573622
AD-1446254.1	UGUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5244-5264	27573603-27573623	UAGAUUAACCAGAAGAAACAAGGAGGAGG		5244-5266	27573601-27573623
AD-1446255.1	GUUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5243-5263	27573604-27573624	UAAGAUUAACCAGAAGAAACAAGGAGGAGG		5243-5265	27573602-27573624
AD-1446256.1	UUCUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5240-5260	27573607-27573627	UAUAAAGAUUAACCAGAAGGAGGAGG		5240-5262	27573605-27573627
AD-	UCUUUUUUUUUUUUUUUUUA		5239-5259	27573608-	UGAUAAAGAUUAACCAGAAGGAGG		5239-5261	27573606-

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000009.1 2での範囲	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000009.12 での範囲
1446257.1	UCA			27573628	AAA			27573628
AD- 1446258.1	CUUCUGGUAAUUCUUUAU		5238-5258	27573609- 27573629	UUGAUAAAGAUUAAACCAGAA		5238-5260	27573607- 27573629
AD- 1446259.1	UUCUGGUAAUUCUUUAUC AGA		5237-5257	27573610- 27573630	UCUGAUAAAGAUUAAACCAGA		5237-5259	27573608- 27573630
AD- 1446260.1	UCUGGUAAUUCUUUAUCA GGA		5236-5256	27573611- 27573631	UCCUGAUAAAGAUUAAACCAG		5236-5258	27573609- 27573631
AD- 1446261.1	CUGGUAAUUCUUUAUCAG GUA		5235-5255	27573612- 27573632	UACCUGAUAAAGAUUAAACCA		5235-5257	27573610- 27573632
AD- 1446262.1	UGGUAAUUCUUUAUCAGG UCA		5234-5254	27573613- 27573633	UGACCUGAUAAAGAUUAAACC		5234-5256	27573611- 27573633
AD- 1446263.1	GUUAAUUCUUUAUCAGGUC UUA		5232-5252	27573615- 27573635	UAGAGCCUGAUAAAGAUUAA		5232-5254	27573613- 27573635
AD- 1446264.1	UUAUUCUUUAUCAGGUCU UUA		5231-5251	27573616- 27573636	UAAAGACCUGAUAAAGAUUA		5231-5253	27573614- 27573636
AD- 1446265.1	AUUCUUUAUCAGGUCUUU UCA		5229-5249	27573618- 27573638	UGAAAAGACCUGAUAAAGAU		5229-5251	27573616- 27573638
AD- 1446266.1	AUCUUUAUCAGGUCUUUU CUA		5228-5248	27573619- 27573639	UAGAAAAGACCUGAUAAAGA		5228-5250	27573617- 27573639
AD- 1446267.1	UCUUUAUCAGGUCUUUUC UUA		5227-5247	27573620- 27573640	UAAGAAAAGACCUGAUAAAG		5227-5249	27573618- 27573640
AD- 1446268.1	CUUUAUCAGGUCUUUUCU UGA		5226-5246	27573621- 27573641	UCAAGAAAAGACCUGAUAAA		5226-5248	27573619- 27573641
AD- 1446269.1	UUUAUCAGGUCUUUUCUU GUA		5225-5245	27573622- 27573642	UACAAGAAAAGACCUGAUAA		5225-5247	27573620- 27573642
AD- 1446270.1	UUUAUCAGGUCUUUUCUUG UUA		5224-5244	27573623- 27573643	UAACAAGAAAAGACCUGAUA		5224-5246	27573621- 27573643
AD- 1446271.1	UAUCAGGUCUUUUCUUGU UCA		5223-5243	27573624- 27573644	UGAACAAGAAAAGACCUGAU		5223-5245	27573622- 27573644
AD- 1446272.1	AUCAGGUCUUUUCUUGUU CAA		5222-5242	27573625- 27573645	UUGAACAAGAAAAGACCUGA		5222-5244	27573623- 27573645
AD- 1446273.1	UCAGGUCUUUUCUUGUUC ACA		5221-5241	27573626- 27573646	UGUGAACAAGAAAAGACCUG		5221-5243	27573624- 27573646
AD- 1446274.1	CAGGUCUUUUCUUGUUCA CCA		5220-5240	27573627- 27573647	UGUGAACAAGAAAAGACCUCU		5220-5242	27573625- 27573647

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000009.1 12 での範囲	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	NG_31977.2 での範囲	NC_000009.1 2 での範囲
AD-1446275.1	GGUUCUUUCUUGUUCACC CUA		5218-5238	27573629- 27573649	UAGGGUGAACAAAGAAAAGAC CUG		5218-5240	27573627- 27573649
AD-1446276.1	UCUUUCUUUGUUCACCCUC AA		5216-5236	27573631- 27573651	UUGAGGGUGAACAAAGAAAAG ACC		5216-5238	27573629- 27573651
AD-1446277.1	CUUUUCUUUGUUCACCCUCA GA		5215-5235	27573632- 27573652	UCUGAGGGUGAACAAAGAAA GAC		5215-5237	27573630- 27573652
AD-1446278.1	UUUUCUUUGUUCACCCUCA GCA		5214-5234	27573633- 27573653	UGCUGAGGGUGAACAAAGAAA AGA		5214-5236	27573631- 27573653
AD-1446279.1	UUUCUUUGUUCACCCUCAGCG AA		5212-5232	27573635- 27573655	UUCGCUAGGGUGAACAAAGA AAA		5212-5234	27573633- 27573655
AD-1446280.1	CCUCAGCGAGUACUGUGA GAA		5201-5221	27573646- 27573666	UUCUCACAGUACUCCGUCGAG GGU		5201-5223	27573644- 27573666
AD-1446281.1	UCAGCGAGUACUGUGAGA GCA		5199-5219	27573648- 27573668	UGCUCACACAGUACUCCGUCG AGG		5199-5221	27573646- 27573668
AD-1446282.1	CAGCGAGUACUGUGAGAG CAA		5198-5218	27573649- 27573669	UUGCUCTCACAGUACUCCGUCG AG		5198-5220	27573647- 27573669
AD-1446283.1	AGCGAGUACUGUGAGAGC AAA		5197-5217	27573650- 27573670	UUUGCUCUCACAGUACUCGC UGA		5197-5219	27573648- 27573670
AD-1446284.1	GCGAGUACUGUGAGAGCA AGA		5196-5216	27573651- 27573671	UCUUGCTCUCACAGUACUCCGC UG		5196-5218	27573649- 27573671
AD-1446285.1	CGAGUACUGUGAGAGCAA GUA		5195-5215	27573652- 27573672	UACUUGCUCUCACAGUACUC GCU		5195-5217	27573650- 27573672
AD-1446286.1	GAGUACUGUGAGAGCAAG UAA		5194-5214	27573653- 27573673	UUACUUGCUUCACACAGUACU CGC		5194-5216	27573651- 27573673
AD-1446287.1	AGUACUGUGAGAGCAAGU AGA		5193-5213	27573654- 27573674	UCUACUUGCUCUCACACAGUAC UCG		5193-5215	27573652- 27573674
AD-1446288.1	UACUGUGAGAGCAAGUAG UGA		5191-5211	27573656- 27573676	UCACUACUUGCUCUCACACAGU ACU		5191-5213	27573654- 27573676
AD-1446289.1	AAACAAAAACACACACC UCA		5155-5175	27573692- 27573712	UGAGGUGUGUGUUUUUGUUU UUC		5155-5177	27573690- 27573712
AD-1446290.1	ACACCUCCUAAACCCACAC CA		5142-5162	27573705- 27573725	UGGUGUGGGUUUAGGAGGUG UGU		5142-5164	27573703- 27573725
AD-1446291.1	ACCUCCUAAACCCACACCU GA		5140-5160	27573707- 27573727	UCAGGUGUGGGUUUAGGAGG UGU		5140-5162	27573705- 27573727
AD-	CUCCUAAACCCACACCCUGC		5138-5158	27573709- 27573729	UAGCAGGUGUGGGUUUAGGA		5138-5160	27573707-

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	NG 31977.2 での範囲	NC_000009.1 2 での範囲	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	NG 31977.2 での範囲	NC_000009.12 での範囲
1446292.1	UA			27573729	GGU			27573729
AD- 1446293.1	CCACACCUGCUCUUGCUAG AA		5129-5149	27573718- 27573738	UUCUAGCAAGAGCAGGUGUG GGU		5129-5151	27573716- 27573738
AD- 1446294.1	CACACCUGCUCUUGCUAGA CA		5128-5148	27573719- 27573739	UGUCUAGCAAGAGCAGGUGU GGG		5128-5150	27573717- 27573739
AD- 1446295.1	ACACCUGCUCUUGCUAGAC CA		5127-5147	27573720- 27573740	UGGUCUAGCAAGAGCAGGUG UGG		5127-5149	27573718- 27573740

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 3. ヒト C9orf72 のイントロン 1a のアンチセンス鎖を標的とする dsRNA 剤の修飾センス鎖配列及びアンチセンス鎖配列

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 5'から 3'	配列番号
AD-1446206.1	cscsag(Ghd)CfuCfCfCfuuuuuegsasa		VPusUfscgaGfaAfAfagggAfGcfuegsgsgsu		ACCCGAGGCUCCCUUUUUCUCGAG	
AD-1446207.1	asgsgeat(Ahd)UfuCfCfAfccagucgsusa		VPusAfsgecAfCfUfGfguggAfUfugecugsc		GCAGGCAAUUCCACCAAGUCGCUA	
AD-1446208.1	csasccat(Ghd)UfcGfCfUfagaggcgasasa		VPusUfscgc(C2p)ucuaagCfGfCfugugsgsa		UCCACCAAGUCGCUAGAGGCGAAA	
AD-1446209.1	ascscag(Uhd)CfGCUfAfagaggcgasasa		VPusUfscueg(C2p)cucuaagCfGfCfugugsgsg		CCACCAAGUCGCUAGAGGCGAAAAG	
AD-1446210.1	csasccc(Ahd)GfcUfuCfGfucagaggsasa		VPusUfscueu(C2p)accgaaGfcUfGgugsgusc		GACACCCAGCUUCGGUUCAGAGAA	
AD-1446211.1	cscscag(Chd)UfuCfGfGfucagagaggsasa		VPusUfscueu(C2p)ugaccgAfGfCfugugsgsg		CACCCAGCUUCGGUUCAGAGAAAU	
AD-1446212.1	csasgeut(Uhd)CfGfGfUfCfagagaauggsa		VPusCfsaun(C2p)ucuaagCfGfCfagcugsgsg		CCCAGCUUCGGUUCAGAGAAUUA	
AD-1446213.1	gsesunec(Ghd)GfuCfAfGfagaauggsasa		VPusCfsucaUfuUfCfueugAfCfGgaagcsug		CAGCUUCGGUUCAGAGAAAUAGAGA	
AD-1446214.1	uscsggu(Chd)AfGfAfGfAfaugagaggsa		VPusCfscueu(C2p)auuuuUfuGfaccgagsg		CUUCGGUUCAGAGAAAUAGAGAGGG	
AD-1446215.1	gsesuca(Ghd)AfGfAfAfugagagaggsasa		VPusUfscueu(C2p)ucauuUfuCfugacsgsa		UCGGUUCAGAGAAAUAGAGAGGGAA	
AD-1446216.1	uscsga(Ghd)AfaAfUfGfagagaggsasa		VPusUfscuec(C2p)ueuauUfuCfueugascsc		GGUUCAGAGAAAUAGAGAGGGGAAAAG	

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 5'から 3'	配列番号
AD-1446217.1	asgsagc(Ghd)AfaAfGfUfaaaauagcsusa		VPusCfsgeaUfuUfuUfuacuUfuCfcccuesesa		UGAGAGGGAAAGUAAAAAUGCGU	
AD-1446218.1	gsasggc(Ahd)AfaGfUfaaaauagcsusa		VPusAfsgecAfuUfuUfuacuUfuUfccucuesc		GAGAGGGAAAGUAAAAAUGCGUC	
AD-1446219.1	asgsaga(Ahd)AfgUfaAfAaaauagcsusa		VPusGfsagcCfaUfuUfuuaCfuUfuccuescu		AGAGGGAAGUAAAAAUGCGUCG	
AD-1446220.1	gsgsaa(Ahd)GfuAfaAfAaaugcuesusa		VPusCfsagcGfcAfUfuuuuAfcUfuuccuesc		GAGGGAAGUAAAAAUGCGUCGA	
AD-1446221.1	gsgsaa(Ahd)UfaAfaAfAauegucgsusa		VPusUfscgaCfcCfAfuiuuUfaCfuuucescu		AGGGAAGUAAAAAUGCGUCGAG	
AD-1446222.1	gsasaag(Uhd)AfaAfaAfAuegucgsusa		VPusCfsuecAfcGfcCfauuUfuAfcuucesc		GGGAAGUAAAAAUGCGUCGAGC	
AD-1446223.1	asasagu(Ahd)AfaAfaUfgeugcgsusa		VPusGfsuecGfaCfcGfcauuUfuUfauuuuesc		GGAAAGUAAAAAUGCGUCGAGCU	
AD-1446224.1	asasguat(Ahd)AfaAfuUfGfcugcgsusa		VPusAfsgecCfaCfcGfcauUfuUfuacuuesc		GAAAGUAAAAAUGCGUCGAGCUC	
AD-1446225.1	asgsuaa(Ahd)AfaUfGfCfugcagcusa		VPusGfsagcu(C2p)gagcgaUfuUfuacuusuu		AAAGUAAAAAUGCGUCGAGCUCU	
AD-1446226.1	esgsacu(Chd)CfuGfAfGfuuccagcusa		VPusGfsuec(G2p)gaaucAfgGfagucgscg		CGGACUCCUGAGUUAUCCAGAGCU	
AD-1446227.1	gsascuc(Chd)UfgAfGfUfuuccagcusa		VPusAfsgec(Tgn)ggaaucCfaGfagucgsc		GCGACUCCUGAGUUAUCCAGAGCUU	
AD-1446228.1	ascsucc(Uhd)GfaGfUfucagcusa		VPusAfsagcu(C2p)uggaucUfcAfgagucscg		CGACUCCUGAGUUAUCCAGAGCUUG	
AD-1446229.1	esuscuc(Ghd)AfgUfuUfCfcagcuaesusa		VPusCfsaagc(Tgn)cuugaaCfuCfagagcusc		GACUCCUGAGUUAUCCAGAGCUUUGC	
AD-1446230.1	uscsucg(Ahd)GfuUfCfCfagcuaesusa		VPusGfsuaag(C2p)ucuggaAfcUfcaggagcscu		ACUCCUGAGUUAUCCAGAGCUUUGCU	
AD-1446231.1	escsuga(Ghd)UfuCfCfAfgagcuaesusa		VPusAfsgeaa(G2p)cuucggAfaCfucaggcsag		CUCCUGAGUUAUCCAGAGCUUUGCUA	
AD-1446232.1	gsasguu(Chd)CfaGfAfGfucugcuacsusa		VPusUfsguag(C2p)aggcucUfgGfaucucsag		CUGAGUUAUCCAGAGCUUUGCUACAG	
AD-1446233.1	asgsuuc(Chd)AfgAfGfCfuugcuacsusa		VPusCfsuuaa(G2p)cuagcuCfuGfuaucusesa		UGAGUUAUCCAGAGCUUUGCUACAGG	

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 5'から 3'	配列番号
AD-1446234.1	gsusucc(Ahd)GfaGfCfUfugcuacagsgsa		VPusCfsccuUfaGfCfaagcUfcUfgaacsunc		GAGUCCAGAGCUUGCUACAGGC	
AD-1446235.1	ususcca(Ghd)AfgCfUfUfgcuacagsgsa		VPusGfsccu(Tgn)agcaagCfuCfugaaacsu		AGUCCAGAGCUUGCUACAGGCU	
AD-1446236.1	uscscag(Ahd)GfcUfUfGfcuacagsgsa		VPusAfsccu(G2p)puagcaGfcUfcuagaaasc		GUUCCAGAGCUUGCUACAGGCU	
AD-1446237.1	csasaga(Ghd)CfaUfGfCfuaacagsgsa		VPusCfsagc(Tgn)guagcaAfgCfueugsgsa		UUCCAGAGCUUGCUACAGGCU	
AD-1446238.1	csasgag(Chd)UfuGfCfUfuaagsgsa		VPusGfsagc(C2p)puagcaAfaGfcuagsgsa		UCCAGAGCUUGCUACAGGCU	
AD-1446239.1	usascag(Ghd)CfuGfCfGfguuguuucsa		VPusGfsagaa(C2p)puagccAfgCfueugaaasc		GCUACAGGCUUGCUUGCUUCC	
AD-1446240.1	gscsugc(Ghd)GfuUfGfUfuuccuucsa		VPusAfsagaa(C2p)puagcaAfcCfueagsgsa		AGGCUUGCUUGCUUCCCUU	
AD-1446241.1	csusgcg(Ghd)UfuGfUfUfuccuucsa		VPusAfsagaa(C2p)puagcaAfaCfueagsgsa		GGCUUGCUUGCUUCCCUU	
AD-1446242.1	gscsggu(Uhd)GfuUfUfCfuccuugsa		VPusAfsagaa(C2p)puagcaAfaCfueagsgsa		CUGCGGUUGCUUCCCUU	
AD-1446243.1	esgsggu(Ghd)UfuUfCfCfuccuugsa		VPusAfsagaa(C2p)puagcaAfaCfueagsgsa		UGCGGUUGCUUCCCUU	
AD-1446244.1	gsusugc(Uhd)UfcCfCfUfuccuugsa		VPusAfsagaa(C2p)puagcaAfaCfueagsgsa		CGGUUGCUUCCCUU	
AD-1446245.1	usuggu(Uhd)CfcCfUfCfuccuugsa		VPusAfsagaa(C2p)puagcaAfaCfueagsgsa		GGUUGCUUCCCUU	
AD-1446246.1	ususcce(Uhd)CfcUfUfGfuuuucsa		VPusAfsagaa(C2p)puagcaAfaCfueagsgsa		GUUCCCUUUGCUUCCCUU	
AD-1446247.1	uscscu(Chd)CfuUfGfUfuuuucsa		VPusCfsagaAfaAfaaAfaGfagsgsa		UUUCCCUUUGCUUCCCUU	
AD-1446248.1	csccu(Chd)UfuGfUfuuuucsa		VPusCfsagaAfaAfaaAfaGfagsgsa		UUUCCCUUUGCUUCCCUU	
AD-1446249.1	csccu(Chd)UfuGfUfuuuucsa		VPusAfsagaAfaAfaaAfaGfagsgsa		UUUCCCUUUGCUUCCCUU	
AD-1446250.1	csccu(Chd)UfuGfUfuuuucsa		VPusAfsagaAfaAfaaAfaGfagsgsa		UUUCCCUUUGCUUCCCUU	

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	mRNA 標的配列 5'から 3'	配列 番号
AD- 1446251.1	escsuug(Uhd)UfuUfCfUfUfucugguuasasa		VPusUfsuuaa(C2p)apagaAfaAfcaggsasg		CUCUUGUUUUUCUUCUGGUAAU	
AD- 1446252.1	esusuug(Uhd)UfuCfUfUfucugguuasasa		VPusAfsuuaAfcCfAfcuagAfaAfcaggsasa		UCCUUGUUUUUCUUCUGGUAAUUC	
AD- 1446253.1	ususuug(Uhd)UfcUfUfCfugguuaasasa		VPusGfsuuaAfaCfCfugaAfaAfaaasgsa		CCUUGUUUUUCUUCUGGUAAUUCU	
AD- 1446254.1	usgsuuu(Uhd)CfuUfCfUfUfugguuaasasa		VPusAfsuuaUfaAfcCfagaAfaAfaaasgsa		CUUGUUUUUCUUCUGGUAAUUCU	
AD- 1446255.1	gsusuuu(Uhd)UfuCfUfUfGfugguuaasasa		VPusAfsagaUfuAfaAfcagAfaAfaaasgsa		UUGUUUUUCUUCUGGUAAUUCUU	
AD- 1446256.1	ususcuu(Uhd)UfgGfuUfUfaucuuuasasa		VPusAfsuuaAfaAfuAfaaCfaAfaaasgsa		UUUUCUUCUGGUAAUUCUUAAUUC	
AD- 1446257.1	uscsuuu(Uhd)GfgUfUfAfaucuuuasasa		VPusGfsuuaAfaGfAfuuaCfaAfaaasgsa		UUUCUUCUGGUAAUUCUUAAUUC	
AD- 1446258.1	csusuu(Uhd)GfuUfUfAfaucuuuasasa		VPusUfsuuaAfaAfcGfaaAfaCfagaasgsa		UUCUUCUGGUAAUUCUUAAUUCAG	
AD- 1446259.1	ususcug(Uhd)UfuAfaUfUfuuuaasgsa		VPusCfsagaUfaAfaAfcuuaAfaCfagaasgsa		UCUUCUGGUAAUUCUUAAUUCAGG	
AD- 1446260.1	uscsuug(Uhd)UfaAfuUfCfuuaucaggsa		VPusCfsuagAfuAfaAfcuuaUfaAfcaggsa		CUUCUGGUAAUUCUUAAUUCAGGU	
AD- 1446261.1	csusgguu(Uhd)AfaUfCfuuaucaggsa		VPusAfsuuaAgnhuuaaAfuAfaaasgsa		UUCUGGUAAUUCUUAAUUCAGGUC	
AD- 1446262.1	usgsuu(Uhd)AfuCfuUfUfuuucaggsa		VPusGfsuua(C2p)auuaaAfuUfaaasgsa		UCUGGUAAUUCUUAAUUCAGGUCU	
AD- 1446263.1	gsusuuaa(Uhd)CfuUfUfAfuucagguuasasa		VPusAfsaga(C2p)ugauaAfaAfaaasgsa		UGGUAAUUCUUAAUUCAGGUCUUU	
AD- 1446264.1	ususaau(Uhd)UfuUfaUfUfagguuuuasasa		VPusAfsaga(C2p)cuuaaAfaAfaaasgsa		GGUAAUUCUUAAUUCAGGUCUUUU	
AD- 1446265.1	asusuu(Uhd)UfaUfCfAfgguuuuasasa		VPusGfsuuaAfaAfcCfugaUfaAfaaasgsa		UUAAUUCUUAAUUCAGGUCUUUUUCU	
AD- 1446266.1	asuscuu(Uhd)AfuCfAfgguuuuasasa		VPusAfsagaAfaGfAfcuagAfaAfaaasgsa		UAAUUCUUAAUUCAGGUCUUUUUCU	
AD- 1446267.1	uscsuu(Uhd)UfcAfgGfuUfUfuuuuuasasa		VPusAfsagaAfaAfcGfuuuGfaUfaaasgsa		AAUUCUUAAUUCAGGUCUUUUUCUUG	

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 5'から 3'	配列番号
AD-1446268.1	csusuaa(Uhd)CfaGfGfufcunucunsgsa		VPusCfsaagAfaAfaGaacUfgAfaaagsasu		AUCUUUAUCAGGUCUUUUCUUGU	
AD-1446269.1	usustau(Chd)AfgGfufcunucunsgsusa		VPusAfsaagAfaAfaGaacCfuGfuaaasgsa		UCUUUAUCAGGUCUUUUCUUGU	
AD-1446270.1	usustaue(Ahd)GfGfufcufunucunugsusa		VPusAfsaagAfaAfaGaacCfuGfuaaasgsa		CUUUUAUCAGGUCUUUUCUUGUUC	
AD-1446271.1	usastuca(Ghd)Gfufcufunucunugsusa		VPusGfsaagAfaAfaGaacAfcCfugaasasa		UUUAUCAGGUCUUUUCUUGUUCA	
AD-1446272.1	asuscag(Ghd)UfcUfufcunucunugsusa		VPusUfsgaaCfaAfgfaaagAfaCfugaasasa		UUUAUCAGGUCUUUUCUUGUUCAC	
AD-1446273.1	uscagag(Uhd)Cfufcufunucunugsusa		VPusGfsuagaa(C2p)aaagaaAfaAfcuagasa		UAUCAGGUCUUUUCUUGUUCACC	
AD-1446274.1	csasgguf(Chd)UfuUfufcufunucunugsusa		VPusGfsuagaa(C2p)aaagaaAfaAfcuagasa		AUCAGGUCUUUUCUUGUUCACCC	
AD-1446275.1	gsgsuf(Uhd)UfuUfufcufunucunugsusa		VPusAfsuagaa(C2p)aaagaaAfaAfcuagasa		CAGGUCUUUUCUUGUUCACCCUC	
AD-1446276.1	uscstuu(Uhd)Cfufcufunucunugsusa		VPusUfsgag(G2p)aaagaaAfaAfcuagasa		GGUCUUUUCUUGUUCACCCUCAG	
AD-1446277.1	csustuu(Chd)UfuUfufcufunucunugsusa		VPusCfsuagaa(C2p)aaagaaAfaAfcuagasa		GUCUUUUCUUGUUCACCCUCAGC	
AD-1446278.1	usustuu(Uhd)UfgUfufcufunucunugsusa		VPusGfsuagaa(C2p)aaagaaAfaAfcuagasa		UCUUUUCUUGUUCACCCUCAGCG	
AD-1446279.1	uscstuu(Ghd)UfuUfufcufunucunugsusa		VPusUfsgag(G2p)aaagaaAfaAfcuagasa		UUUUUUCUUGUUCACCCUCAGCGAG	
AD-1446280.1	csustuu(Chd)UfuUfufcufunucunugsusa		VPusUfsgag(G2p)aaagaaAfaAfcuagasa		ACCCUCAGCGAGUACUGUGAGAGAG	
AD-1446281.1	uscstuu(Ghd)UfuUfufcufunucunugsusa		VPusUfsgag(G2p)aaagaaAfaAfcuagasa		CCUCAGCGAGUACUGUGAGAGAGCA	
AD-1446282.1	csustuu(Chd)UfuUfufcufunucunugsusa		VPusUfsgag(G2p)aaagaaAfaAfcuagasa		CUUCAGCGAGUACUGUGAGAGAGCA	
AD-1446283.1	asgscga(Ghd)UfaCfufcufunucunugsusa		VPusUfsgag(G2p)aaagaaAfaAfcuagasa		UCAGCGAGUACUGUGAGAGAGCAAG	
AD-1446284.1	gscsgag(Uhd)AfcUfufcufunucunugsusa		VPusUfsgag(G2p)aaagaaAfaAfcuagasa		CAGCGAGUACUGUGAGAGAGCAAGU	

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 5'から 3'	配列番号
AD-1446285.1	csagsau(Ahd)ChuGfUfGfagacagusa		VPusAfsuug(C2p)ucueacAfgUfacucgsesu		AGCGAGUACUGUGAGAGCAAGUA	
AD-1446286.1	gsasguu(Chd)UfgUfGfAfgacagusa		VPusUfsactu(G2p)ucucuaCfaGftacucgsc		GCGAGUACUGUGAGAGCAAGUAG	
AD-1446287.1	asgsuac(Uhd)GfuGfAfgfagcagusa		VPusCfsuacUfuGfCfucueAfcAfguacuscsg		CGAGUACUGUGAGAGCAAGUAGU	
AD-1446288.1	usascug(Uhd)GfaGfAfgfcaagucgusa		VPusCfsacuAfcUfUfgcueUfcAfcagucscsu		AGUACUGUGAGAGCAAGUAGUGG	
AD-1446289.1	asasaac(Ahd)AfaAfcAfcacacucusa		VPusGfsaggu(G2p)uguguuUfuUfguuuuusc		GAAAAACA AAAACACACACCUCC	
AD-1446290.1	ascsacc(Uhd)CfcUfAfafacecacscsa		VPusGfsuguu(G2p)gguuuaGfgAfgugugsgu		ACACACCUCCUAAACCCACACCU	
AD-1446291.1	asescuc(Chd)UfaAfcAfcacacucgusa		VPusCfsaggu(G2p)uggguuUfaGfgagugsgsu		ACACCUCCUAAACCCACACCUGC	
AD-1446292.1	csuscuc(Ahd)AfaCfcCfcacacucgusa		VPusAfsagcag(G2p)ugugggUfuUfagagsgsu		ACCUCCUAAACCCACACCUGCUC	
AD-1446293.1	escsacu(Chd)CfuGfCfUfcuugcagusa		VPusUfscuag(C2p)aaagacAfgGfugugsgsu		ACCCACACCUCCUUCUUGCUAGAC	
AD-1446294.1	esascac(Chd)UfgCfuCfUfcuugcagusa		VPusGfsuacu(G2p)caagagCfaGfgugugsgsg		CCCACACCUCCUUCUUGCUAGACC	
AD-1446295.1	ascsacc(Uhd)GfcUfCfUfugcagacscsa		VPusGfsuguu(Agn)gcaagagGfcAfgugugsgsg		CCACACCUCCUUCUUGCUAGACCC	

表 4. C o s - 7 細胞におけるヒト C 9 o r f 7 2 のイントロン 1 a のアンチセンス鎖を標的とする d s R N A 剤の単回投与スクリーニング

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

二本鎖	10nM メッセージ の残存率%	STDEV	1nM メッセージ の残存率%	STDEV	0.1nM メッセージ の残存率%	STDEV
AD-1446206.1	45	9	65	12	85	18
AD-1446207.1	18	4	23	3	38	4
AD-1446208.1	51	5	52	8	68	15
AD-1446209.1	77	11	81	15	95	9
AD-1446210.1	81	24	98	10	102	10
AD-1446211.1	19	3	25	2	39	7
AD-1446212.1	64	11	61	6	83	7
AD-1446213.1	9	2	11	1	20	2
AD-1446214.1	18	1	23	3	30	5
AD-1446215.1	18	5	18	4	28	9
AD-1446216.1	15	3	18	4	28	5
AD-1446217.1	14	3	17	2	26	2
AD-1446218.1	12	1	15	1	22	7
AD-1446219.1	12	3	19	4	24	5
AD-1446220.1	15	4	21	3	28	5
AD-1446221.1	7	0	11	2	17	5
AD-1446222.1	10	2	16	4	26	6
AD-1446223.1	11	1	18	6	37	4
AD-1446224.1	15	2	20	3	34	7
AD-1446225.1	17	3	25	2	42	5
AD-1446226.1	19	4	22	3	28	2
AD-1446227.1	16	7	22	5	31	7

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

AD-1446228.1	25	8	28	6	42	9
AD-1446229.1	16	3	21	2	31	2
AD-1446230.1	21	2	20	6	28	3
AD-1446231.1	17	1	22	4	25	4
AD-1446232.1	11	2	18	4	22	2
AD-1446233.1	16	1	23	3	32	6
AD-1446234.1	18	3	26	3	34	7
AD-1446235.1	30	9	37	5	53	8
AD-1446236.1	66	12	82	11	105	25
AD-1446237.1	23	4	34	5	49	5
AD-1446238.1	44	8	41	12	49	7
AD-1446239.1	53	9	61	8	74	7
AD-1446240.1	25	5	33	8	44	4
AD-1446241.1	23	4	31	7	38	6
AD-1446242.1	12	2	16	4	26	3
AD-1446243.1	18	1	22	2	27	2
AD-1446244.1	53	7	44	7	51	16
AD-1446245.1	18	2	16	1	22	2
AD-1446246.1	7	1	10	1	13	3
AD-1446247.1	7	1	9	1	12	2
AD-1446248.1	5	1	6	1	9	3
AD-1446249.1	7	1	9	2	12	2
AD-1446250.1	12	1	14	2	17	4
AD-1446251.1	7	2	7	0	10	2
AD-1446252.1	4	1	4	1	6	4
AD-1446253.1	1	1	4	1	7	3
AD-1446254.1	6	3	5	0	7	3

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

AD-1446255.1	11	2	7	1	9	1
AD-1446256.1	34	7	27	4	31	2
AD-1446257.1	5	1	5	0	6	1
AD-1446258.1	5	2	4	1	6	1
AD-1446259.1	6	2	7	1	8	1
AD-1446260.1	4	1	4	1	5	1
AD-1446261.1	10	4	9	1	10	2
AD-1446262.1	6	1	6	0	7	1
AD-1446263.1	5	1	6	1	9	2
AD-1446264.1	11	4	8	1	9	1
AD-1446265.1	6	1	6	1	7	1
AD-1446266.1	6	1	6	0	8	2
AD-1446267.1	8	4	8	3	11	1
AD-1446268.1	4	1	3	1	6	1
AD-1446269.1	5	1	6	0	7	2
AD-1446270.1	5	1	7	3	8	2
AD-1446271.1	3	1	4	2	7	1
AD-1446272.1	8	4	7	1	9	2
AD-1446273.1	6	2	8	2	10	1
AD-1446274.1	5	2	6	1	9	2
AD-1446275.1	10	3	15	5	17	3
AD-1446276.1	6	1	6	1	8	2
AD-1446277.1	12	1	12	1	16	4
AD-1446278.1	16	2	16	2	22	7

【表 7 - 4】

AD-1446279.1	23	3	19	3	28	4
AD-1446280.1	20	8	30	12	40	14
AD-1446281.1	21	4	31	3	51	14
AD-1446282.1	18	5	17	4	40	9
AD-1446283.1	44	6	32	7	50	14
AD-1446284.1	25	8	31	3	52	13
AD-1446285.1	38	9	49	4	52	11
AD-1446286.1	28	6	48	8	67	15
AD-1446287.1	64	19	56	10	72	13
AD-1446288.1	34	5	34	7	54	10
AD-1446289.1	17	1	21	3	35	9
AD-1446290.1	40	2	61	10	76	12
AD-1446291.1	60	9	69	5	89	16
AD-1446292.1	23	2	32	5	38	6
AD-1446293.1	20	6	32	4	44	4
AD-1446294.1	11	2	21	2	33	4
AD-1446295.1	23	5	34	6	53	6
*この例の「メッセージ」はアンチセンス転写産物である						

10

20

表 4 A . 表 4 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにアンチセンス転写産物が 5 0 %以下残存している C 9 O R F 7 2 I N T R O N - 1 A アンチセンス R N A 標的配列。

【表 8】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2の逆相補体)	配列 番号
5523	5571	CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGGAAAGTAAAAATGC GTCGAGCTCT	21
5283	5315	CGCGACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAGGC	22
5260	5286	AGGCTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT	23
5201	5279	GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTTATC AGGTCTTTTCTTGTTTCACCCTCAGCGAGTACTGTGAGAG	24
5197	5220	CTCAGCGAGTACTGTGAGAGCAAG	25
5128	5160	ACCTCCTAAACCCACACCTGCTCTTGCTAGACC	26

30

40

表 4 B . 表 4 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにアンチセンス転写産物が 4 0 %以下残存している C 9 O R F 7 2 I N T R O N - 1 A アンチセンス R N A 標的配列。

50

【表 9】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2の逆相補体)	配列 番号
5524	5571	CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGAAAGTAAAAATGC GTCGAGCTC	27
5292	5315	CGCGACTCCTGAGTTCCAGAGCTT	28
5283	5312	GACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAGGC	29
5260	5285	GGCTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT	30
5201	5279	GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTTATC AGGTCTTTTCTTGTTACACCCTCAGCGAGTACTGTGAGAG	31

10

20

表 4 C. 表 4 で測定した場合、0.1 nMでの投薬のためにアンチセンス転写産物が30%以下残存しているC9ORF72 INTRON-1AアンチセンスRNA標的配列。

【表 10】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2の逆相補体)	配列 番号
5526	5571	CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGAAAGTAAAAATG CGTCGAGC	32
5285	5311	ACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAG	33
5260	5283	CTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT	34
5243	5279	GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT	35
5212	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCA CCCTCAGCGAG	36

30

40

表 4 D. 表 4 で測定した場合、0.1 nMでの投薬のためにアンチセンス転写産物が25%以下残存しているC9ORF72 INTRON-1AアンチセンスRNA標的配列。

50

【表 1 1】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2の逆相補体)	配列 番号
5529	5552	GAGAGGGAAAGTAAAAATGCGTCG	37
5243	5279	GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT	38
5214	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCA CCCTCAGCG	39

10

表 4 E . 表 4 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにアンチセンス転写産物が20 %以下残存しているC9ORF72 INTRON-1AアンチセンスRNA標的配列。

【表 1 2】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2の逆相補体)	配列 番号
5243	5275	GTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT	40
5215	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCA CCCTCAGC	41

20

表 4 F . 表 4 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにアンチセンス転写産物が15 %以下残存しているC9ORF72 INTRON-1AアンチセンスRNA標的配列。

【表 1 3】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2の逆相補体)	配列 番号
5250	5275	GTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTT	42
5243	5269	CTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT	43
5220	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGT TCACCC	44

30

表 4 G . 表 4 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにアンチセンス転写産物が10 %以下残存しているC9ORF72 INTRON-1AアンチセンスRNA標的配列。

【表 1 4】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2の逆相補体)	配列 番号
5243	5268	TCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT	45
5228	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCT T	46
5220	5248	ATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTACCCC	47

40

50

【表 15 - 1】

表 5. エクソン 1A、又はエクソン 1A とエクソン 1B¹ との間のイントロントの下の流れいずれかのセンス鎖を標的とする dsRNA 剤の非修飾センス鎖及びアンチセンス鎖配列。

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)
AD-1446073.1	GUAAACCUACGGUGUCC CGCUA		3 to 23	5003-5023	UAGCGGACACCGUAG GUUACGU		1 to 23	5001-5023
AD-1446074.1	GUCCCGCUAGGAAAGA GAGGA		15-35	5015-5035	UCCUCUUCUUCUAGCG GGACAC		13-35	5013-5035
AD-1446075.1	CCGCUAGGAAAGAGA GGUGA		17-37	5017-5037	UCACCUUCUUCUUCUAG CGGAC		15-37	5015-5037
AD-1446076.1	CGUAGGAAAGAGAG GUGCGA		19-39	5019-5039	UGCACCUUCUUCUUCU AGCGG		17-39	5017-5039
AD-1446077.1	GUAGGAAAGAGAGG UGCGUA		20-40	5020-5040	UACGCACCUUCUUCU UAGCGG		18-40	5018-5040
AD-1446078.1	UAGGAAAGAGAGGUG CGUCAA		22-42	5022-5042	UUGACGCACCUUCUUCU CCUAGC		20-42	5020-5042
AD-1446079.1	AGGUGCGUCAAACAGC GACAA		32-52	5032-5052	UUUGCGUGUUCUAGCG CACCUCU		30-52	5030-5052
AD-1446080.1	GGUGCGUCAAACAGCG ACAAA		33-53	5033-5053	UUUGUGCGUGUUCUAGC GCACCU		31-53	5031-5053
AD-1446081.1	GUGCGUCAAACAGCGA CAAGA		34-54	5034-5054	UCUUGUGCGUGUUCUAG CGCACCU		32-54	5032-5054
AD-1285246.2	UUGGUCAAACAGCGAC AAGUA		35-55	5035-5055	UACUUGTCGUGUUCUAG ACGCACC		33-55	5033-5055
AD-1285246.1	UUGGUCAAACAGCGAC AAGUA		35-55	5035-5055	UACUUGTCGUGUUCUAG ACGCACC		33-55	5033-5055
AD-1446082.1	GGUCUCAAACAGCGACA AGUUA		36-56	5036-5056	UACUUCUUGCGUGUUCU GACGCAC		34-56	5034-5056
AD-1285245.2	CGUCAAACAGCGACAA GUUCA		37-57	5037-5057	UGAACUUGCGUGUUCU UGACGCA		35-57	5035-5057
AD-1285245.1	CGUCAAACAGCGACAA GUUCA		37-57	5037-5057	UGAACUUGCGUGUUCU UGACGCA		35-57	5035-5057
AD-1446083.1	GUCAAACAGCGACAAG UUCCA		38-58	5038-5058	UGGAACUUGCGUGUUCU UUGACGC		36-58	5036-5058
AD-1446084.1	UCAAAACAGCGACAAGU UCCGA		39-59	5039-5059	UCGGAACUUGCGUGUUCU UUUGACG		37-59	5037-5059

¹ エクソン 1a 及び 1b は、NG_031977.2 の 5001~5158 位及び 5386~5436 位に対応する。

10

20

30

40

50

【表 15 - 2】

二本鎖名	センサ配列 5'から 3'	配列番号	範囲 (NM 001256054.2)	範囲 (NG 031977.2)	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	範囲 (NM 001256054.2)	範囲 (NG 031977.2)
AD-1446085.1	CGCCACGUAAGA		56-76	5056-5076	UGUCAUCUUUACGUG		54-76	5054-5076
AD-1446086.1	UGACA				GCGGAA			
AD-1446086.1	CCACGUAAAAGAUGAC		60-80	5060-5080	UAAGCGUCAUCUUUA		58-80	5058-5080
AD-1285247.1	GCUIUA		60-80	5060-5080	CGUUGGC		58-80	5058-5080
AD-1446087.1	CCACGUAAAAGAUGAC				UAAGCGTCAUCUUUAC			
AD-1446087.1	GCUIUA		61-81	5061-5081	GUUGGC		59-81	5059-5081
AD-1446088.1	CACGUAAAAGAUGACG		61-81	5061-5081	UCAAAGCGUCAUUU		60-82	5060-5082
AD-1446088.1	ACGUAAAAGAUGACGC		62-82	5062-5082	ACGUGG		61-83	5061-5083
AD-1446089.1	UUGGA		63-83	5063-5083	UACCAAGCGUCAUCUU		62-84	5062-5084
AD-1446090.1	CGUAAAAGAUGACGCU		64-84	5064-5084	UUACGU		63-85	5063-5085
AD-1446091.1	GUAAAAGAUGACGCU		65-85	5065-5085	UACACCAAGCGUCAUCU			
AD-1446092.1	GGUGUA		66-86	5066-5086	UUUAC		64-86	5064-5086
AD-1446093.1	AAAAGAUGACGCUUG		67-87	5067-5087	UACACCAAGCGUCAUC		65-87	5065-5087
AD-1446094.1	AAAGAUGACGCUUG		69-89	5069-5089	UUUUA		67-89	5067-5089
AD-1446095.1	UGUGUA		71-91	5071-5091	UUGACACACCAAGCGUC		69-91	5069-5091
AD-1446096.1	AUGACGCUUGGUGUG		73-93	5073-5093	UUCUGACACACCAAGCG		71-93	5071-5093
AD-1446097.1	GACGCUUGGUGUGUCA		98-118	5098-5118	UACACCAAGCGUCAUC		96-118	5096-5118
AD-1446098.1	GCUGCCGGUUGCUUC		129-149	5129-5149	UUUUA		127-149	5127-5149
AD-1446099.1	UCUUA		140-160	5140-5160	UACACCAAGCGUCAUC		138-160	5138-5160
AD-1446100.1	GUCUAGCAAGAGCAGG		141-161	5141-5161	CGUUA		139-161	5139-5161
AD-1446101.1	UGUGA		142-162	5142-5162	UACACCUUGCUUUGCU		140-162	5140-5162
AD-1446102.1	GCAGGUGUGGUGUUA		144-164	5144-5164	AGACCC		142-164	5142-5164
AD-	GGAGGA				UCCUCCUAAACCCACAC			
AD-	CAGGUGUGGUGUUAAG				CUGCUC			
AD-	GAGGUA				UACCUCCUAAACCCACA			
AD-	AGGUGUGGUGUUAAGG				CCUGCU			
AD-	AGGUGA				UACCUCCUAAACCCAC			
AD-	GUGUGGUGUUAAGGAG				ACCUCC			
AD-	GUGUGA				UACACCUCCUAAACCC			
AD-	UGCUCUCACAGUACUC				ACACCU			
					UCAGCGAGUACUGUGA			

10

20

30

40

50

【表 15 - 3】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)
1285244.1	GCUGA				GAGCAAG			
AD- 1446103.1	UCUCACAGUACUCGCU GAGGA			5202-5222	UCCUCAGCGAGUACUG UGAGAGC			5200-5222
AD- 1446104.1	UCACAGUACUCGCUGA GGUA			5204-5224	UACCCUCAGCGAGUACU GUGAGA			5202-5224
AD- 1285235.1	GCUGAGGGUGAACAA GAAAA			5215-5235	UUUUUCUUUGUUCACCC UCAGCGA			5213-5235
AD- 1285238.1	AACAAAGAAAGACCUG AUAAA			5225-5245	UUUAUCAGGUCUUUUC UUGUUA			5223-5245
AD- 1285243.1	AAGAAAAGACCUGAU AAAGAA			5228-5248	UUCUUUAUCAGGUCUU UUCUUGU			5226-5248
AD- 1285234.1	AGAAAAGACCUGAUA AAGAU			5229-5249	UAUCUUUAUCAGGUCU UUUCUUG			5227-5249
AD- 1285239.1	GAAAAGACCUGAUAA AGAUU			5230-5250	UAAUCUUUAUCAGGUC UUUUCUU			5228-5250
AD- 1285232.1	AAAAGACCUGAUAAA GAUUAA			5231-5251	UUAAUCUUUAUCAGGU CUUUUCU			5229-5251
AD- 1285231.1	AAAGACCUGAUAAAG AUUAAA			5232-5252	UUAUAUCUUUAUCAGG UCUUUUC			5230-5252
AD- 1285240.1	AAGACCUGAUAAAGA UUAAAC			5233-5253	UGUUAACUUUAUCAG GUCUUUU			5231-5253
AD- 1285241.1	GACCUGAUAAAGAUU AACCAA			5235-5255	UUGGUAAUCUUUAUC AGGUCUU			5233-5255
AD- 1285242.1	ACCUGAUAAAGAUUA ACCAGA			5236-5256	UCUGGUUAUCUUUAU CAGGUCU			5234-5256
AD- 1285233.1	AAAGAUUAACACAGAA GAAAA			5243-5263	UUUUUCUUCUGGUUAA UCUUUAU			5241-5263
AD- 1285237.1	AUUAACCAAGAAAGAA ACAAGA			5247-5267	UCUUGUUUUCUUCUGG UUAAUCU			5245-5267
AD- 1285236.1	AACCAAGAGAAAAACAA GGAGA			5250-5270	UCUCCUUGUUUUUCUUC UGGUUAA			5248-5270
AD- 1446105.1	GGAGGGAACAACCCGC AGCCA			5266-5286	UGGUCGCGGUUGUUUC CCUCCUU			5264-5286
AD- 1446106.1	GAGGGAACAACCCGCA GCCUA			5267-5287	UAGGCUUGCGGUUGUUU CCUCCUU			5265-5287
AD- 1446107.1	CAGCCUGUAGCAAGCU CUGGA			5281-5301	UCCAGAGCUUGCUACA GGCUGCG			5279-5301
AD- 1446108.1	CUCUGGAACUCAGGAG UCGCA			5295-5315	UCCGACTCCUGAGUUCU AGAGCU			5293-5315

10

20

30

40

50

【表 15 - 4】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)
AD-1446109.1	UCUCCUCAGAGCUCGA CGAA			5516-5536	UUUCGUCGAGCUCUGA GGAGAGC			5514-5536
AD-1446110.1	UCCUCAGAGCUCGACG CAUUA			5518-5538	UAUUGCGUCGAGCUCU GAGGAGA			5516-5538
AD-1446111.1	ACUUUCCUCUCAUUI CUCUA			5541-5561	UAGAGAAUUGAGAGGG AAAGUAA			5539-5561
AD-1446112.1	CUUCCUCUCAUUIUC UCUGA			5542-5562	UCAGAGAAUUGAGAGG GAAAGUA			5540-5562
AD-1446113.1	UUUCCUCUCAUUIUCU CUGAA			5543-5563	UUCAGAGAAUUGAGAG GGAAAGU			5541-5563
AD-1446114.1	UCCUCUCAUUIUCUCU GACCA			5545-5565	UGGUCAGAGAAUUGAG AGGAAA			5543-5565
AD-1446115.1	CCUCUCAUUIUCUCUG ACCGA			5546-5566	UCGGUCAGAGAAUUGA GAGGAA			5544-5566
AD-1446116.1	CCUCUCAUUIUCUCUGA CCGAA			5547-5567	UUCGGUCAGAGAAUUG AGAGGA			5545-5567
AD-1446117.1	UCUCAUUIUCUCUGACC GAAGA			5549-5569	UCUUCGGUCAGAGAAA UGAGAGG			5547-5569
AD-1446118.1	CUCAUUIUCUCUGACCG AAGCA			5550-5570	UGCUCGGUCAGAGAA AUGAGAG			5548-5570
AD-1446119.1	UCAUUIUCUCUGACCGA AGCUA			5551-5571	UAGCUUCGGUCAGAG AAUGAGA			5549-5571
AD-1446120.1	CUCUGACCGAAGCUGG GUGUA			5557-5577	UACACCCAGCUUCGGUC AGAGAA			5555-5577
AD-1446121.1	GGUGCGGGCUUUCGC CUCUA			5572-5592	UAGAGCGCGAAAGCCCG ACACCCA			5570-5592
AD-1446122.1	UCGGGCUUUCGCCUCU AGCGA			5576-5596	UCGCUAGAGCGCGAAAG CCCGACA			5574-5596
AD-1446123.1	CUUUCGCCUCUAGCGA CUGGA			5581-5601	UCCAGUCGCUAGAGGC GAAAGCC			5579-5601
AD-1446124.1	UUCGCCUCUAGCGACU GGUGA			5583-5603	UCACCAGUCGCUAGAG GCGAAAG			5581-5603
AD-1446125.1	UCGCCUCUAGCGACUG GUGGA			5584-5604	UCCACCAGUCCCUAGAG GCGAAA			5582-5604
AD-1446126.1	CGCCUCUAGCGACUGG UGGAA			5585-5605	UUCACCAGUCCCUAGA GGCGAA			5583-5605
AD-1446127.1	GCCUCUAGCGACUGGU GGAAA			5586-5606	UUUCCACCAGUCCCUAG AGCGGA			5584-5606
AD-	CUCUAGCGACUGGUGG			5588-5608	UAAUUUCCACCAGUCGCU			5586-5608

10

20

30

40

50

【表 15 - 5】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM 001256054.2)	範囲 (NG 031977.2)	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM 001256054.2)	範囲 (NG 031977.2)
1446128.1	AAUUA				AGAGGC			
AD- 1446129.1	UCUAGCGACUGGUGGA AUUGA			5589-5609	UCAAUCCACACAGUCGC UAGAGG			5587-5609
AD- 1446130.1	GACUGUGGAAUUGCC UGCAA			5595-5615	UUGCAGGCAAUUCCACC AGUCGC			5593-5615
AD- 1446131.1	ACUGGUGGAAUUGCCU GCAUA			5596-5616	UAUGCAGGCAAUUCCA CCAGUCG			5594-5616
AD- 1446132.1	UGGUGGAAUUGCCUGC AUCCA			5598-5618	UGGAUGCAGGCAAUUC CACCAGU			5596-5618
AD- 1446134.1	UCUGGCCUCUUCUUCUG CUUUA			5678-5698	UAAAGCAAGGAAGAGG CCAGAUC			5676-5698
AD- 1446135.1	CUGGCCUCUUCUUCUGC UUUCA			5679-5699	UGAAAGCAAGGAAGAG GCCAGAU			5677-5699
AD- 1446136.1	UGGCCUCUUCUUCUUCU UUCCA			5680-5700	UGGAAGCAAGGAAGA GGCCAGA			5678-5700
AD- 1446137.1	GGCCUCUUCUUCUUCU UCCCA			5681-5701	UGGAAGCAAGGAAGA AGCCAG			5679-5701
AD- 1446138.1	GCUCUUCUUCUUCUUCU CCCGA			5682-5702	UCGGAAAGCAAGGAAG GAGGCCA			5680-5702
AD- 1446139.1	UUCUUCUUCUUCUUCU CCUCA			5687-5707	UGAGGGCGGGAAGCA AGGAAGA			5685-5707
AD- 1446140.1	UCCUUCUUCUUCUUCU CUCAA			5688-5708	UUGAGGGCGGGAAGC AAGGAAG			5686-5708
AD- 1446141.1	CCUUGCUUCUUCUUCU UCAGA			5689-5709	UCUGAGGGCGGGAAG CAAGGAA			5687-5709
AD- 1446142.1	CUUGCUUCUUCUUCU CAGUA			5690-5710	GCAAGGA			5688-5710
AD- 1446143.1	AGUACCCGAGCUGUCU CCUUA			5707-5727	UAAGGAGACAGCUCGG GUACUGA			5705-5727
AD- 1446144.1	UACCCGAGCUGUCUCC UUCCA			5709-5729	UGGAAGGAGACAGCUC GGGUACU			5707-5729
AD- 1446145.1	GAGGAGAUCAU'GCGG GAUGAA			5885-5905	UUCAUCCCGCAUGAUCU CCUUCG			5883-5905
AD- 1446146.1	AGACGCCUGCACAAUU UCAGA			5918-5938	UCUGAAAUUGUCAGG CGUUCU			5916-5938
AD- 1446147.1	GACGCCUGCACAAUUU CAGCA			5919-5939	UGCUGAAAUUGUCAG GCGUCUC			5917-5939
AD- 1446148.1	CGCCUGCACAAUUA GCCCCA			5921-5941	UGGCGUGAAAUUGUC AGCGUC			5919-5941

10

20

30

40

50

【表 15 - 6】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)	アンセンス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)
AD-1446149.1	CCUCCACAAUUCAGC			5923-5943	UUUGGGCUGAAAUUGU			5921-5943
AD-1446150.1	CUGCACAAUUCAGCC			5924-5944	UCUUGGGCUGAAAUUG			5922-5944
AD-1446151.1	UCCACAAUUCAGCCC			5925-5945	UGCUGGGCUGAAAUU			5923-5945
AD-1446152.1	CAAUUUCAGCCCAAGC			5929-5949	UAGAAAGCUUGGGCUGA			5927-5949
AD-1446153.1	AAUUCAGCCCAAGCU			5930-5950	AAAUUGU			5928-5950
AD-1446154.1	CAGCCCAAGCUUCUAG			5935-5955	UCUCUCTAGAAGCUUUG			5933-5955
AD-1446155.1	AGCCCAAGCUUCUAGA			5936-5956	UACUCUCUAGAAGCUU			5934-5956
AD-1446156.1	GCCCAAGCUUCUAGAG			5937-5957	UCACUCUCUAGAAGCUU			5935-5957
AD-1446157.1	CCCAAGCUUCUAGAGA			5938-5958	UGGCU			5936-5958
AD-1446158.1	CCAAGCUUCUAGAGAG			5939-5959	UACACTCUCUAGAAGC			5937-5959
AD-1446159.1	CAAGCUUCUAGAGAGU			5940-5960	UCACCACUCUCUAGAAG			5938-5960
AD-1446160.1	AAGCUUCUAGAGAGU			5941-5961	UUCACCACUCUCUAGAA			5939-5961
AD-1446161.1	AGCUUCUAGAGAGUG			5942-5962	UAUCACCACUCUCUAGA			5940-5962
AD-1446162.1	GCUUCUAGAGAGUGG			5943-5963	UACUACCACUCUCUAG			5941-5963
AD-1446163.1	UUCUAGAGAGUGGUG			5945-5965	UGUACUACCACUCUCU			5943-5965
AD-1446164.1	UAGAGAGUGGUGAUG			5948-5968	UCAAAGUCAUACCACUC			5946-5968
AD-1446165.1	AGAGAGUGGUGAUGA			5949-5969	UGCAAGTCAUACCACU			5947-5969
AD-1446166.1	GAGAGUGGUGAUGAC			5950-5970	UUGCAAGUCAUACCAC			5948-5970
AD-1446167.1	AGUGGUGAUGACUUG			5953-5973	UAUAUGCAAGUCAUCA			5951-5973
AD-	GGUGAUGACUUGCAU			5956-5976	UCUCAUAUGCAAGUCA			5954-5976

10

20

30

40

50

【表 15 - 7】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)
I446168.1	AUGAGA				UCACCAC			
AD- I446169.1	GUGAUGACUUGCAUA UGAGGA			5957-5977	UCCUCAUAUGCAAGUC AUCACCA			5955-5977
AD- I446170.1	UGAUGACUUGCAUAU GAGGGA			5958-5978	UCCUCAUAUGCAAGUC AUCACC			5956-5978
AD- I446171.1	AGGCAGCAAUUGCAAG UCGGA			5974-5994	UCCGACUUGCAUUGCU GCCUCA			5972-5994
AD- I446172.1	GGCAGCAAUUGCAAGU CGGUA			5975-5995	UACCGACUUGCAUUGC UGCCUC			5973-5995
AD- I446173.1	GGCAGCAAUUGCAAGUC GGUGA			5976-5996	UACCGGACUUGCAUUGC UGCCCU			5974-5996
AD- I446174.1	GCAGCAUUGCAAGUCG GUGUA			5977-5997	UACACCGACUUGCAUUGC GCUGCC			5975-5997
AD- I446175.1	CAGCAUUGCAAGUCGG UGUGA			5978-5998	UACACCGACUUGCAUUGC GCUGCC			5976-5998
AD- I446176.1	CAUUGCAAGUCGGUGU GCUCA			5981-6001	UGAGCACACCGACUUGC AUUGCU			5979-6001
AD- I446177.1	CUGUGGACAUUGACCU GGUUA			6007-6027	UAACCGAGGUCUUGUCCC ACAGAA			6005-6027
AD- I446178.1	UGUGGACAUUGACCUUG GUUGA			6008-6028	UACACCGAGGUCUUGUCCC CACAGA			6006-6028
AD- I446179.1	GUGGACAUUGACCUUGG UUGCA			6009-6029	UGCAACCGAGGUCUUGU CCCACAG			6007-6029
AD- I446180.1	UGGACAUUGACCUUGGU UGCUA			6010-6030	UAGCAACCGAGGUCUUG UCCACA			6008-6030
AD- I446181.1	GACAUUGACCUUGGUUGC UUCAA			6013-6033	UUGAAGCAACCGAGGUC AUGUCCC			6011-6033
AD- I446182.1	ACAUGACCUUGGUUGCU UCACA			6014-6034	UGUGAAGCAACCGAGGU CAUGUCC			6012-6034
AD- I446183.1	UGACCUUGGUUGCUUCA CAGCA			6017-6037	UGCUGUGAAGCAACCA GGUCAUG			6015-6037
AD- I446184.1	GACCUUGGUUGCUUCAC AGCUA			6018-6038	UAGCUGTGAAGCAACCA GGUCAU			6016-6038
AD- I446185.1	ACCUUGGUUGCUUCACA GCUCA			6019-6039	UGAGCUGUGAAGCAAC CAGGUCA			6017-6039
AD- I446186.1	CCUGGUUGCUUCACAG CUCCA			6020-6040	UGGAGCTGUGAAGCAA CCAGGUC			6018-6040
AD- I446187.1	CUGGUUGCUUCACAGC UCCGA			6021-6041	UCGGAGCUGUGAAGCA ACCAAGU			6019-6041

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 8】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	範囲 (NM_001256054.2)	範囲 (NG_031977.2)
AD- 1446188.1	UGGUUGCUUCACAGCU CCGAA			6022-6042	UUCGGAGCUGUGAAGC AACGAGG			6020-6042
AD- 1446189.1	GGUUGCUUCACAGCUC CGAGA			6023-6043	UCUCGGAGCUGUGAAG CAACCAG			6021-6043
AD- 1446190.1	GUUGCUUCACAGCUCC GAGAA			6024-6044	UUCUCGGAGCUGUGAA GCAACCA			6022-6044
AD- 1446191.1	UUGCUUCACAGCUCCG AGAU A			6025-6045	UAUCUCGGAGCUGUGA AGCAACC			6023-6045
AD- 1446192.1	CAGCUCGAGAUAGACA CAGAA			6033-6053	UUCUGUGUCAUCUCGG AGCUGUG			6031-6053
AD- 1446193.1	GCUCGAGAUAGACACA GACUA			6035-6055	UAGUCUGUGUCAUCUC GGAGCUG			6033-6055
AD- 1446194.1	CUCCGAGAUAGACACAG ACUUA			6036-6056	UAAGUCUGUGUCAUCUC GGAGCU			6034-6056
AD- 1446195.1	UCCGAGAUAGACACAGA CUUGA			6037-6057	UCAAGUCUGUGUCAUC UCGGAGC			6035-6057
AD- 1446196.1	CCGAGAUAGACACAGAC UUGCA			6038-6058	UGCAAAGCUGUGUCAUC UCGGAG			6036-6058
AD- 1446197.1	CGAGAUAGACACAGACU UGCUA			6039-6059	UAGCAAAGCUGUGUCA AUCUCGG			6037-6059
AD- 1446198.1	GAGAUAGACACAGACUU GCUUA			6040-6060	UAAGCAAAGCUGUGUG AUCUCGG			6038-6060
AD- 1446199.1	GAUGACACAGACUUGC UUAAA			6042-6062	UUUAAGCAAAGCUGUG UCAUCUC			6040-6062
AD- 1446200.1	AUGACACAGACUUGC UAAAA			6043-6063	UUUAAGCAAAGCUGUG GUCAUUC			6041-6063
AD- 1446201.1	UGACACAGACUUGC AAAGA			6044-6064	UCUUUAAGCAAAGCUG UGUCAUC			6042-6064
AD- 1446202.1	GACACAGACUUGC AAGGA			6045-6065	UCCUUUAAGCAAAGCUG GUGUCAU			6043-6065
AD- 1446203.1	ACACAGACUUGC AGGAA			6046-6066	UUCUUUAAGCAAAGCUG UGUGUCA			6044-6066
AD- 1446204.1	CAGACUUGC AAGUA			6049-6069	UACUUCUUUAAGCAA GUCUGUG			6047-6069
AD- 1446205.1	AGACUUGC AAGUGA			6050-6070	UCACUUCUUUAAGCA AGUCUGU			6048-6070

10

20

30

40

50

【表 16-1】

表 6. エクソン 1A、又はエクソン 1A とエクソン 1B との間のイントロントの 3'側いずれかのセンス鎖を標的とする dsRNA 剤の修飾センス鎖及びアンチセンス鎖配列

[illegible]

【表 16 - 2】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 (NM_001256054.2)	配列番号	mRNA 標的配列 (NM_001256054.2)	配列番号
AD-1446086.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		VPusAifsaicGfucfAifucuuUfuAifc		GCCCACGUAAAAAGA		GCCCACGUAAAAAGAUGA	
AD-1285247.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		gugsgsc		UGACGCUUG		GCCCACGUAAAAAGAUGA	
AD-1446087.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		gugsgsc		UGACGCUUG		CCCACGUAAAAAGAUGAC	
AD-1446088.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		gugsgsc		GACGCUUGG		CCACGUAAAAAGAUGACG	
AD-1446089.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		acgugsg		ACGCUUGGU		CACGUAAAAAGAUGACGC	
AD-1446090.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsug		CGCUUGGUG		ACGUAAAAAGAUGACGCU	
AD-1446091.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		CGUAAAAAGAUGACGCU		GGUGUG	
AD-1446092.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		GUAAAAAGAUGACGC		GUAAAAAGAUGACGCUUG	
AD-1446093.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UAAAGAUGACGCUUGG	
AD-1446094.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1446095.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1446096.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1446097.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1446098.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1446099.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1446100.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1446101.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1446102.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-1285244.1	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	
AD-	cscsacg(Uhd)AfuAifAifGfanga		uacgsu		UUGGUGUG		UUGGUG	

10

20

30

40

50

【表 16 - 3】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 3'から 5'	配列番号	mRNA 標的配列 (NM_001256054.2)	配列番号	mRNA 標的配列 (NM_001256054.2)	配列番号
1446103.1	ugagsgsa		gagagsgc				UGAGGG	
AD-1446104.1	uscsacat(Ghd)UfaCtUfCfGcug		VPusAfsccu(C2p)agecagUfaCfu				UCUCACAGUACUCGCUG	
AD-1285235.1	agggsusa		gugagsga				AGGGUG	
AD-1285238.1	gscugat(Ghd)GfgUfGfAfaa		VPusUfsuuCfuUfGfuaCfCfu				UCGCUGAGGGUGAACAA	
AD-1285243.1	agaaasasa		cagsgsa				GAAAG	
AD-1285234.1	asasacat(Ghd)AfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfaGfGfucuuUfuCfu				UGAACCAAGAAAAGACCU	
AD-1285239.1	gaaasasa		gaaasasa				GAUAAA	
AD-1285232.1	asagaa(Ahd)AfgAfcCfGgau		VPusUfscuuUfaUfCfaggCfuUfu				ACAAGAAAAGACCTUGAU	
AD-1285231.1	asgsaa(Ahd)GfaCfCfUfgana		VPusAfsuuUfuAUfCaggUfcUfu				AAAGAU	
AD-1285240.1	aaggsusa		VPusAfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				CAAGAAAAGACCTUGAU	
AD-1285241.1	asasacat(Ghd)AfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AAGAUU	
AD-1285242.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AGAAGAGACCTUGAUAAA	
AD-1285233.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				GAUUA	
AD-1285237.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				GAAAGACCTUGAUAAA	
AD-1285236.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AUUAAC	
AD-1446105.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AAAAGACCTUGAUAAA	
AD-1446106.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				UUAACC	
AD-1446107.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AAGACCTUGAUAAA	
AD-1446108.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AGCCAG	
AD-1446109.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AGACCTUGAUAAA	
AD-1446110.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				ACCAGA	
AD-1446111.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AUAAAGAUUAAACAGAA	
AD-1446112.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				GAAAC	
AD-1446113.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AGAUUAAACAGAGAAA	
AD-1446114.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				ACAAGG	
AD-1446115.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				UUAACCAGAGAGAAAACA	
AD-1446116.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AGGAGG	
AD-1446117.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AAGGAGGAGAAACAACCG	
AD-1446118.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				CAGCCU	
AD-1446119.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AGGAGGAGAAACAACCG	
AD-1446120.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AGCCUG	
AD-1446121.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				CGCAGCCUGUAGCAAGC	
AD-1446122.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				UCUGA	
AD-1446123.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				AGCUCUGGACUCAGGA	
AD-1446124.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				GUCGC	
AD-1446125.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				GCUCUCUCAGAGCUCG	
AD-1446126.1	asgsaa(Ahd)UfaAfaGfaccu		VPusUfsuaCfuUfAfuacGfuCfu				ACGCAU	

10

20

30

40

50

【表 16-4】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 (NM 001256054.2)	配列番号	mRNA 標的配列 (NG 031977.2)	配列番号
AD-1446110.1	uscsuac(Ahd)GfAGfGfUfGfagc		VPlusAfsange(G2p)ucgagcUfcUfg				UUCUCACAGAGCUCGAC	
	gcususa		agagsusa				GC AUU	
AD-1446111.1	ascsumu(Chd)CfcUfUfUfcaum		VPlusAfsagAfaAfuUfgagAfgGfa				UUAUUUCCCUUCUCAU	
	ucususa		augusasa				UCUCUG	
AD-1446112.1	csusnu(Chd)CfuCfUfUfcaum		VPlusCfsagAfaAfaUfgagAfgGfg				UUAUUUCCCUUCUCAU	
	ucusgsa		auugssusa				CUGA	
AD-1446113.1	usnucc(Chd)UfcUfUfUfcaum		VPlusUfscag(G2p)aaugagAfgAfg				ACUUUCCCUUCUCAU	
	ucusgsa		gaugssusa				UCUGAC	
AD-1446114.1	uscscu(Chd)UfcAUfUfUfuc		VPlusGfsguac(G2p)ugaaauGfaGfa				UUUCCCUUCUCAU	
	ugacsusa		ggugssasa				UGACCG	
AD-1446115.1	csesnu(Chd)CfaUfUfUfUfuc		VPlusCfsguac(Agm)gagaaUfgAfg				UUCUUCUCAU	
	gacgsusa		aggsasasa				GACCGA	
AD-1446116.1	csesnu(Chd)AfuUfUfUfUfuc		VPlusUfscgu(G2p)agagaaAfuGfa				UCCUUCUCAU	
	gacgsusa		ggugssasa				ACCGAA	
AD-1446117.1	uscscu(Chd)UfuCfUfUfUfagc		VPlusCfsuag(G2p)ucagagAfaAfu				CCUCUCAU	
	cgaggsusa		ggugssg				CGAAGC	
AD-1446118.1	csesnu(Chd)UfcUfUfUfUfagc		VPlusGfscnu(G2p)guenagAfaAfa				CUCUCAU	
	gaagssusa		ugagsag				GGAAGU	
AD-1446119.1	uscsumu(Chd)CfuCfUfUfUfagc		VPlusAfsgnu(G2p)fgnuagAfgAfa				UUCUCAU	
	aggsusa		augasasa				AAGCUG	
AD-1446120.1	csuscu(Chd)CfcGfAfuAfu		VPlusAfscc(G2p)agcnuCfGfUfc				UUCUCUGAC	
	ggugssusa		agagssasa				GUUGUC	
AD-1446121.1	gsgsu(Chd)GfGfGfUfUfuc		VPlusAfs ggg(G2p)gaagagCfcGfa				UGGUGUGCGGCU	
	gccususa		cuacgsusa				CCUCA	
AD-1446122.1	uscsgg(Chd)UfuUfUfUfUfagc		VPlusCfs gnuAfgAfgUfgcgaAfaGfc				UUCUGGCU	
	cuagcsusa		ccgagssusa				UAGCA	
AD-1446123.1	csusnu(Chd)CfcUfUfUfUfagc		VPlusCfsag(G2p)fgcuaGfGfCfG				GGCUUUCGCU	
	acugssusa		aaugssc				ACUGU	
AD-1446124.1	ususc(Chd)UfcUfAfuGfagc		VPlusCfsaccAfgUfUfUfUfUfagc				CUUUGCGCU	
	ugugssusa		guasag				UGUGG	
AD-1446125.1	uscgcc(Chd)CfuAfuGfUfUfagc		VPlusCfsacCfaGfUfUfUfUfUfagc				UUUCGCCU	
	ggugssusa		ggagssasa				GUUGGA	
AD-1446126.1	csgccu(Chd)UfaGfUfUfUfagc		VPlusUfscac(G2p)ugagcUfaGfa				UUGCCU	
	ggugssusa		ggagssasa				GUUGAA	
AD-1446127.1	gscscu(Chd)AfuCfUfUfUfagc		VPlusUfscuac(G2p)ucagcCfuAfg				UCGCCU	
	ggugssusa		aggsasasa				UGAAU	
AD-1446128.1	csuscu(Chd)CfGfAfuUfUfUfagc		VPlusAfsnu(G2p)accagCfGfUf				GCUCU	
	ggagssusa		agagssc				AGGACU	
AD-1446129.1	uscsumu(Chd)GfAfuUfUfUfagc		VPlusCfsuau(G2p)ccagCfGfUf				CCUCU	

10

20

30

40

50

【表 16-5】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 (NM_001256054.2)	配列番号	mRNA 標的配列 (NG_031977.2)	配列番号
1446129.1	gaauusgsa		uaagsgsg				AAUUGC	
AD-1446130.1	gsasug(Chd)UfgGfAfaUhg		VPusUfsgcag(G2p)caauucCfaCfc				GGACUGUGGAAUUGC	
AD-1446131.1	ccugcsasa		agucsgsc				CUGCAU	
AD-1446132.1	acsugsg(Uhd)GfGfAfaUhg		VPusAfsugca(G2p)gcuaauCfaCfc				CGACUGUGGAAUUGCC	
AD-1446133.1	cugcsusa		caugcsng				UGCAUC	
AD-1446134.1	usgug(Chd)AfaUfUfGfenu		VPusGfsgaag(C2p)uag gcaUfUfCfc				ACUGUGGAAUUGCCUG	
AD-1446135.1	gaucscsa		accuagstu				CAUCCG	
AD-1446136.1	usugsg(Chd)CfaCUfUfUfenu		VPusAfsaagCfaAIGfgaag AfaGfc				GAUCUGGCCUCUCCUUC	
AD-1446137.1	uucncsa		caugcsuc				GCUUUC	
AD-1446138.1	gscscug(Uhd)UfcCUfUfUfenu		VPusGfsaag(C2p)uag gnaGfaGfG				AUCUGGCCUCUCCUUG	
AD-1446139.1	uucncsgsa		ccugcsasu				CUUCC	
AD-1446140.1	usgsgc(Uhd)CfuUfUfUfUfenu		VPusGfsgaag(G2p)caag gnaAfaGfG				CUUGCCUCUCCUUGC	
AD-1446141.1	ccucsa		gccuagsga				UUUCC	
AD-1446142.1	gsgscu(Chd)UfUfCfUfUfUfenu		VPusGfsgaagAfaGfCfaag AfaGfa				CUGGCCUCUCCUUGCU	
AD-1446143.1	uucncsgsa		ggccsng				UUCGCG	
AD-1446144.1	csuug(Chd)UfUfUfUfUfUfenu		VPusCfsggg AfaAIGfcaagGfaAfg				UGGCCUCUCCUUGCUU	
AD-1446145.1	uucncsgsa		agucscsa				UCCGCG	
AD-1446146.1	usugsg(Uhd)UfUfUfUfUfUfenu		VPusGfsaag(C2p)gg gnaGfCfAfa				UCUCCUUGCUUCCCG	
AD-1446147.1	gscscu(Chd)CfuUfUfUfUfUfenu		ggcuagsga				CCUCA	
AD-1446148.1	ccucsa		VPusUfsgag(G2p)cg gnaAfgCfa				CUUCUUGCUUUCGCG	
AD-1446149.1	csuug(Chd)UfUfUfUfUfUfenu		agcuagsg				CCUCAG	
AD-1446150.1	csuug(Chd)UfUfUfUfUfUfenu		VPusCfsgag(G2p)gcggg AfaGfC				UUCUUGCUUUCGCGC	
AD-1446151.1	uucncsgsa		angcsasa				CUCAGU	
AD-1446152.1	csuugsg(Uhd)UfUfUfUfUfUfenu		VPusAfsugca(G2p)ggcggg AfaAfg				UCCUUGCUUUCGCGCC	
AD-1446153.1	uucncsa		ccuagsgsa				UCAGUA	
AD-1446154.1	agcuag(Chd)CfGfAIGfCfUfenu		VPusAfsaag(G2p)uacugcuCfGfG				UACAGU	
AD-1446155.1	uucncsa		uucnsgsa				UCCUUC	
AD-1446156.1	usagsg(Chd)AfaGfCfUfUfUfenu		VPusGfsgaag(G2p)uag gnaCfuCfG				AGUACCCGAGCUGUC	
AD-1446157.1	ccucsa		ggcuagsga				CUUCC	
AD-1446158.1	gsgsg(Chd)AfuCfAfuUfUfenu		VPusUfscuac(C2p)cg gnaAfuCfu				GCGAGGAGAUCAUGCGG	
AD-1446159.1	gcuagsgsa		ccucsgsc				GAGAG	
AD-1446160.1	agsgsg(Chd)CfuCfuGfCfAfaau		VPusCfsgaagAfaUfUfUfUfGfG				GGAGAGCCUGCACAAU	
AD-1446161.1	uucncsgsa		gucnsc				UUCAGC	
AD-1446162.1	gsgsg(Chd)UfUfUfUfUfUfenu		VPusGfsgc AfaAUfUfUfUfGfG				GAGAGCCUGCACAAU	
AD-1446163.1	uucncsgsa		cuagsgsc				UCAGCC	
AD-1446164.1	csuugsg(Uhd)UfUfUfUfUfUfenu		VPusGfsgc(Uhd)UfUfUfUfUfUfenu				GACGCCUGCACAAUUC	
AD-1446165.1	agcsusa		ggcuagsg				AGCCCA	
AD-1446166.1	csuug(Chd)CfAfaUfUfUfUfenu		VPusUfsgag(C2p)uag gnaUfUfG				CGCCUGCACAAUUCAG	
AD-1446167.1	ccucsa		cuagsgsa				CCCAAG	

【表 16 - 6】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 (NM_001256054.2)	配列番号	mRNA 標的配列 (NG_031977.2)	配列番号
AD-1446150.1	csasgcac(Chd)AfaUfuUfagccccaasgsa		VPusCfsuagc(G2p)cuagaaaUfuGfugcagsgsc				GCCUGCACAAUUCAGCCCAAGC	
AD-1446151.1	usgsacac(Chd)AfuUfuUfagcccuagcsca		VPusGfscuag(G2p)gcugaaAfuUfugcagsgsc				CCUGCACAAUUCAGCCCAAGCU	
AD-1446152.1	csasuuu(Chd)CfaGfCfCfagccuucscsa		VPusAfsuagc(G2p)hugggcUfGfAfaaugsuag				CACAAUUCAGCCCAAGCUUCUA	
AD-1446153.1	asasuuu(Chd)AfgCfCfCfagccuucscsa		VPusUfsagaa(G2p)cuugggCfuGfAfaaugsu				ACAAUUCAGCCCAAGCUUCUAG	
AD-1446154.1	csasgcac(Chd)AfaGfCfUfucuaagagsgsa		VPusCfsuenc(Tgn)agaagcUfuGfGfugcagsa				UUCAGCCCAAGCUUCUAAGAGAGU	
AD-1446155.1	asgsccac(Chd)AfgCfUfUfucuaagagsgsa		VPusAfsuenc(G2p)hugaagCfuUfugcagsa				UCAGCCCAAGCUUCUAGAGAGU	
AD-1446156.1	gsccscac(Chd)GfclUfCfucuaagagsgsa		VPusCfsuenc(Tgn)cuagaaGfclUfugcagsa				CAGCCCAAGCUUCUAGAGAGUG	
AD-1446157.1	csccscac(Chd)CfuUfCfUfagagagsgsa		VPusCfsuencUfCfUfCfuagAfgCfuugcagsa				AGCCCAAGCUUCUAGAGAGUGGU	
AD-1446158.1	csccsaug(Chd)UfuCfUfAfgagagagsgsa		VPusAfsuenc(Tgn)cuuagAfaGfclUfugsgsc				GCCCAAGCUUCUAGAGAGUGGU	
AD-1446159.1	csasgcac(Chd)UfclUfAfgagagagsgsa		VPusCfsuencAfgCfUfCfuagAfgCfclUfugsgsa				CCCAAGCUUCUAGAGAGAGUGGUGA	
AD-1446160.1	asasgcac(Chd)CfuAfgAfgagagagsgsa		VPusUfsuenc(Agn)cuuencAfgAfaagcagsa				CCAAGCUUCUAGAGAGAGUGGUGAU	
AD-1446161.1	asgsuuc(Chd)UfaGfAfgagagagsgsa		VPusAfsuenc(G2p)hucucUfaGfagcagsa				CAAGCUUCUAGAGAGAGUGGUGAU	
AD-1446162.1	gsesunc(Chd)AfgAfgAfgagagagsgsa		VPusCfsuenc(G2p)cuuencCfuAfgaagesu				AAGCUUCUAGAGAGAGUGGUGAUGA	
AD-1446163.1	ususcua(Chd)AfgAfgUfagagagsgsa		VPusGfscuag(G2p)hucacCfuAfgaagesu				GCUUCUAGAGAGAGUGGUGAUGAUGACU	
AD-1446164.1	usasgcac(Chd)GfagGfUfagagagsgsa		VPusCfsuagc(G2p)hucacAfgCfclUfclucsga				UCUAGAGAGUGGUGAUGAUGACUUGC	
AD-1446165.1	asgsagac(Chd)UfgGfUfGfagagagsgsa		VPusGfscuag(Tgn)cuuencCfuAfgclucsga				CUAGAGAGUGGUGAUGAUGACUUGCA	
AD-1446166.1	gsasgcac(Chd)GfagUfGfAfgagagsgsa		VPusUfsuagc(G2p)hucacAfgCfclucsga				UAGAGAGUGGUGAUGAUGACUUGCAU	
AD-1446167.1	asgsagac(Chd)GfagUfGfAfgagagsgsa		VPusAfsuagc(G2p)hucacUfclucsga				AGAGUGGUGAUGAUGACUUGCAUUG	
AD-1446168.1	gsasgcac(Chd)GfagCfUfUfagagagsgsa		VPusCfsuagcUfclUfGfagagUfclucsga				CAUUGGUGGUGAUGAUGACUUGCAUUGAGG	
AD-	gsusgcac(Chd)AfgCfUfUfagagagsgsa		VPusCfsuencAfuAfuUfagagCfuAfgclucsga				UGGUGAUGACUUGCAUUGAUGAUGA	

10

20

30

40

50

【表 16 - 7】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列 (NM_001256054.2)	配列番号	mRNA 標的配列 (NG_031977.2)	配列番号
1446169.1	augagsgsa		uacscsa				UGAGGG	
AD-1446170.1	usgsaug(Ahd)ChaUIGfCfana		VPusCfscuChUfAfhgcaAfgUfca				GGUGAUgACUUGCAUUAU	
	ugagsgsa		ueasee				GAGGGC	
AD-1446171.1	asgsagc(Ahd)GfcaAfaUfca		VPusCfscgaChUfGfcauuGfcaUfg				UGAGGGCAGCAAUgCAA	
	agucsgsa		ccucscsa				GUCGGU	
AD-1446172.1	gsagc(Ahd)CfcaAfaUfcaag		VPusAfsccgAfcUfUfcauuUfgCfu				GAGGGCAGCAAUgCAAAG	
	ucgggsa		gcccusc				UCGGUG	
AD-1446173.1	gsagc(Ahd)AfaUfGfCfaagu		VPusCfsaccGfcaCUfhgcaUfuGfca				AGGGCAGCAAUgCAAAGU	
	cggusgsa		gccscu				CGGUGU	
AD-1446174.1	gsagc(Ahd)AfaUfGfCfAfa		VPusAfsaacCfcaAfcCfcaUfg				GGGCAGCAAUgCAAAGUC	
	cggusgsa		cuqscsc				GGUGUG	
AD-1446175.1	csasgc(Ahd)UfgCfAfaAfguc		VPusCfsaacCfcaAfcCfcaUfg				GGAGCAAUgCAAAGUCG	
	gguusgsa		cuqscsc				GUGUGC	
AD-1446176.1	csasgc(Ahd)AfaUfGfCfCfgu		VPusGfsagc(C2p)accgacUfuGfca				AGCAAUgCAAAGUCGGUG	
	gugcscsa		auugscsu				UGCUCC	
AD-1446177.1	csasgc(Ahd)GfcaCfAfaUfgac		VPusAfsaac(C2p)gucaugUfcCfc				UUCUGGGGACAUgACC	
	cugusgsa		acagsasa				UGGUUG	
AD-1446178.1	usgsagc(Ahd)AfaUfGfCfacc		VPusCfsaacCfcaAfcCfcaUfg				UUCUGGGGACAUgACC	
	ugguusgsa		acagsa				GGUUGC	
AD-1446179.1	gsasgc(Ahd)CfcaUfGfAfcu		VPusGfsaac(C2p)gagcuaUfgUfc				CUGGGGACAUgACCUG	
	gguugscsa		ccucscag				GUUGCU	
AD-1446180.1	usgsagc(Ahd)AfaUfGfCfCfug		VPusAfsaacCfcaAfcCfcaUfg				UGUGGGACAUgACCUGG	
	gugcscsa		ccacscsa				UUGCUU	
AD-1446181.1	gsasgc(Ahd)AfaUfGfCfGfuu		VPusUfsgag(C2p)uaccagGfuCfa				GGGACAUgACCUGGUUG	
	gucscsa		uqucsc				CUUCAC	
AD-1446182.1	usgsagc(Ahd)CfcaUfGfCfCfug		VPusGfsagc(C2p)caaccaGfUfc				GGACAUgACCUGGUUGC	
	cuucscsa		auugsc				UUCACA	
AD-1446183.1	usgsagc(Uhd)GfcaUfUfGfCfuu		VPusGfsagc(C2p)uaccagCfcaAfg				CAUGACCUGGUUGCUUC	
	cacagscsa		gucscag				ACAGCU	
AD-1446184.1	gsasgc(Ahd)GfcaUfGfCfCfuc		VPusAfsagc(Tgn)gagcuaAfcCfa				AUGACCUGGUUGCUUCA	
	acagcsusa		ggucscsu				CAGCUC	
AD-1446185.1	ascscgc(Ahd)UfGfCfUfCfacc		VPusGfsagc(C2p)uaccagAfaCfc				UGACCUGGUUGCUUCAC	
	agucscsa		auugscsa				AGCUCC	
AD-1446186.1	csasgc(Uhd)UfGfCfUfCfCfca		VPusGfsagc(Tgn)gagcuaAfaCfc				GACCUGGUUGCUUCACA	
	gucscsa		caggsusc				GCUCCG	
AD-1446187.1	csasgc(Uhd)GfcaUfUfCfCfca		VPusCfsagc(C2p)uaccagGfcaAfa				ACCUUGGUUGCUUCACAG	
	gucscgsa		ccaggsu				CUCCGA	
AD-1446188.1	usgsagc(Ahd)CfcaUfGfCfCfag		VPusUfscgc(C2p)uaccagAfaCfc				CCUUGGUUGCUUCACAGC	
	cucggsasa		accagsg				UCCGAG	

10

20

30

40

50

【表 16 - 8】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	mRNA 標的配列 (NM_001256054.2)	配列 番号	mRNA 標的配列(NG_031977.2)	配列 番号
AD- 1446189.1	gsguug(Chd)UfuCfAICfagc uccgsgsa		VPusCfscugGfAICfugugAfaGfc aaccsasg				CUGGUUGCUUCACAGCU CCGAGA	
AD- 1446190.1	gsusugc(Uhd)UfcAUCfAfgcu ccgsgsusa		VPusUfscucg(G2p)ugcugugGfAafg cuacsca				UGGUUGCUUCACAGCUC CGAGAU	
AD- 1446191.1	usugscu(Uhd)CfaCfAIGfcuucc gugastusa		VPusAfsuunc(G2p)gagcugUfgAfa gcuascc				GGUUGCUUCACAGCUCC GAGAUg	
AD- 1446192.1	csasgcu(Chd)CfGfAIGfAIfagac acaggsusa		VPusUfscug(G2p)ucacucCfGfGfa gcuasug				CACAGCUCGAGAUgAC ACAGAC	
AD- 1446193.1	gscsuc(Chd)AfgAfuGfGfagac agacgsusa		VPusAfsugcu(G2p)ugucacCfuCfG gagcsug				CAGCUCGAGAUgACAC AGACUU	
AD- 1446194.1	csuscg(Ahd)GfAUGfAIfacaca gactususa		VPusAfsaguc(Tgn)gugucUfcUfc ggagcsu				AGCUCGAGAUgACACA GACUUG	
AD- 1446195.1	uscscg(Chd)AfuGfAIfAIfacag acuuagsa		VPusCfsaigu(C2p)ugugucAfuCfu cgagsgc				GCUCGAGAUgACACAG ACUUGC	
AD- 1446196.1	cscsgag(Ahd)UfgAIfAIfAIfagac cuugscsa		VPusGfscuag(Tgn)kugugUfcUfc ucggsasg				CUCGAGAUgACACAGA CUUGCU	
AD- 1446197.1	csgsagc(Uhd)GfAICfAIfAIfagac uugcsusa		VPusAfsagcu(G2p)ucugugUfcAfu cuaggsa				UCCGAGAUgACACAGAC UUGCUU	
AD- 1446198.1	gsasgcu(Chd)AfcAIfAIfAIfagac uugctususa		VPusUfscuag(C2p)aagucUfuCfu ucucsgg				CCGAGAUgACACAGACU UGCUUA	
AD- 1446199.1	gsasgcu(Chd)AfcAIfAIfAIfagac gcuuasasa		VPusUfscuag(C2p)ucugucUfuCfu cuacsuc				GAGAUgACACAGACUUG CUUAAA	
AD- 1446200.1	asugac(Ahd)CfAIGHAIfcInugc uuuakasa		VPusUfscuag(C2p)ucugucUfgUfg ucacsu				AGAUgACACAGACUUGC UUAAAG	
AD- 1446201.1	ugsacat(Chd)AfgAIfAIfAIfagac uuuaggsusa		VPusCfscuUfaGfCfagucUfcUfg gucacsuc				GAUGACACAGACUUGCU UAAAGG	
AD- 1446202.1	gsasgcu(Chd)GfAICfUfUfgcun aaaggsusa		VPusCfscuUfaAIGfcaugUfcUfg uugcsu				AUGACACAGACUUGCUU AAAGGA	
AD- 1446203.1	ascacat(Chd)AfcUfUfGfGfma aaggsusa		VPusUfscuUfuAIfAIfcaugGfuCfu gugscsa				UGACACAGACUUGCUUA AAGGAA	
AD- 1446204.1	csasgcu(Uhd)UfgCfUfUfaag gaaggsusa		VPusAfsuunc(C2p)uuuagCfaAfg ucugsg				CACAGACUUGCUUAAAG GAAGUG	
AD- 1446205.1	agsacuc(Uhd)GfCfUfUfAIfag gaugugsa		VPusCfscu(C2p)cuuuaGfCfAfa gucugsu				ACAGACUUGCUUAAAGG AAGUGA	

表 7. エクソン 1 A、又はエクソン 1 A とエクソン 1 B との間のイントロンリピートの 3' 側いずれかのセンス鎖を標的とする dsRNA 剤の単回投与スクリーニング

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 1】

試料名	10nM メッセージの 残存率%	STDEV	1nM Messageの 残存率%	STDEV	0.1nM Messageの 残存率%	STDEV
AD-1285232.1	9	1	11	1	17	3
AD-1446196.1	9	1	10	1	16	3
AD-1446111.1	9	2	10	2	16	1
AD-1446182.1	10	1	12	4	24	1
AD-1446084.1	10	2	10	1	19	4
AD-1285231.1	10	2	12	1	15	1
AD-1446185.1	10	2	15	1	22	3
AD-1446200.1	10	1	15	3	18	2
AD-1446083.1	11	1	18	6	24	2
AD-1285233.1	11	3	15	3	21	3
AD-1446202.1	11	2	14	2	18	4
AD-1446152.1	12	1	14	2	22	4
AD-1446188.1	12	1	13	1	18	1
AD-1285241.1	12	2	12	4	20	5
AD-1446113.1	12	2	21	4	29	8
AD-1446150.1	12	2	20	1	30	3
AD-1446090.1	13	2	17	4	24	3
AD-1446197.1	13	3	11	2	19	2
AD-1446194.1	14	3	17	1	27	2
AD-1446184.1	14	1	17	4	24	3
AD-1446199.1	14	2	20	4	23	6

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 2】

AD-1285237.1	16	5	17	1	23	3
AD-1285242.1	16	2	16	2	20	5
AD-1285234.1	17	3	18	2	23	4
AD-1446087.1	17	1	24	3	32	6
AD-1446112.1	17	3	15	7	20	7
AD-1446103.1	17	2	27	7	40	5
AD-1285238.1	17	3	18	3	23	6
AD-1446156.1	17	3	21	2	33	4
AD-1446161.1	17	1	15	5	25	4
AD-1446114.1	18	5	22	3	37	8
AD-1446154.1	18	2	21	4	32	5
AD-1285239.1	18	7	16	2	21	1
AD-1285236.1	18	4	25	2	25	7
AD-1446166.1	18	1	17	2	37	5
AD-1446180.1	18	5	25	4	36	9
AD-1446192.1	18	2	19	2	29	4
AD-1446095.1	18	4	20	1	31	1
AD-1285243.1	18	4	18	4	24	2
AD-1446167.1	18	2	22	4	40	7

10

20

【表 1 7 - 3】

AD-1285244.1	19	3	19	3	31	3
AD-1446158.1	19	3	20	2	30	1
AD-1446201.1	19	4	23	0	24	2
AD-1446168.1	19	3	23	3	44	9
AD-1446092.1	20	5	20	3	27	4
AD-1446157.1	20	3	32	3	41	9
AD-1446170.1	21	3	25	2	52	3
AD-1446149.1	22	2	27	6	37	4
AD-1446091.1	22	5	26	6	41	4
AD-1446198.1	22	3	23	2	41	7
AD-1446117.1	23	4	26	3	26	4
AD-1446073.1	23	3	27	2	37	3
AD-1446148.1	23	3	33	2	42	5
AD-1446088.1	23	3	21	5	33	4
AD-1446160.1	23	4	23	3	30	6
AD-1446183.1	23	6	24	1	40	7
AD-1446153.1	24	4	23	1	35	3
AD-1446147.1	24	2	36	6	41	3
AD-1285240.1	24	3	22	1	25	3
AD-1446089.1	24	1	23	5	37	6
AD-1446205.1	24	10	26	5	31	3

30

40

50

【表 1 7 - 4】

AD-1446195.1	25	3	28	5	45	4
AD-1446162.1	25	1	26	2	33	6
AD-1285246.2	25	8	26	4	34	6
AD-1446177.1	25	3	27	6	46	4
AD-1446189.1	26	5	27	5	42	4
AD-1446169.1	26	5	27	2	52	1
AD-1446086.1	27	5	34	4	47	7
AD-1446151.1	27	7	28	5	32	7
AD-1285235.1	27	5	23	2	34	7
AD-1446203.1	27	7	28	3	37	3
AD-1446163.1	27	4	28	6	47	3
AD-1446179.1	27	2	27	1	41	5
AD-1446193.1	27	3	41	4	50	9
AD-1285247.1	28	5	33	2	42	11
AD-1446075.1	29	4	41	4	51	4
AD-1446107.1	29	3	30	1	43	10
AD-1446146.1	30	4	31	7	43	4
AD-1285246.1	30	6	29	3	38	5
AD-1285245.2	31	1	31	4	40	6
AD-1446190.1	31	6	35	2	49	10
AD-1446173.1	31	4	39	4	56	4

【表 1 7 - 5】

AD-1285245.1	32	3	30	7	43	6
AD-1446174.1	32	4	38	7	59	8
AD-1446175.1	32	3	38	7	59	5
AD-1446204.1	33	4	28	4	41	7
AD-1446116.1	34	5	27	4	35	4
AD-1446186.1	35	10	40	3	57	8
AD-1446165.1	36	5	39	8	52	5
AD-1446077.1	36	2	37	2	53	8
AD-1446164.1	36	2	28	4	46	9
AD-1446081.1	37	3	39	4	52	4
AD-1446131.1	38	5	42	4	55	5
AD-1446102.1	38	7	45	3	54	11
AD-1446172.1	39	5	49	12	61	9
AD-1446118.1	39	10	37	10	50	11
AD-1446130.1	40	10	42	3	60	4
AD-1446187.1	40	5	43	9	59	2
AD-1446145.1	40	6	50	9	69	14

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 6】

AD-1446076.1	41	4	38	7	43	5
AD-1446191.1	43	4	36	8	43	8
AD-1446098.1	43	12	45	7	56	7
AD-1446125.1	44	7	50	3	55	7
AD-1446078.1	45	10	42	4	56	6
AD-1446110.1	45	9	45	4	51	7
AD-1446082.1	45	6	40	5	51	7
AD-1446115.1	46	6	50	11	65	5
AD-1446080.1	46	8	52	10	70	14
AD-1446181.1	48	2	52	5	74	11
AD-1446159.1	49	3	43	5	46	4
AD-1446099.1	51	7	60	5	74	11
AD-1446101.1	51	1	56	4	65	13
AD-1446126.1	52	8	49	8	59	11
AD-1446176.1	52	9	49	4	61	4
AD-1446079.1	53	3	41	2	42	3
AD-1446124.1	54	3	61	5	67	4
AD-1446122.1	54	3	72	14	74	20
AD-1446105.1	56	14	61	9	74	9
AD-1446074.1	56	7	75	6	76	8
AD-1446136.1	56	9	63	10	79	6
AD-1446097.1	56	9	67	9	74	16
AD-1446129.1	58	6	54	6	55	3
AD-1446108.1	58	7	56	7	64	9

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 7】

AD-1446178.1	59	6	57	6	77	4
AD-1446128.1	60	10	54	2	68	5
AD-1446155.1	61	7	54	3	67	9
AD-1446137.1	63	9	62	8	77	8
AD-1446085.1	65	5	60	11	72	6
AD-1446106.1	65	5	66	2	64	13
AD-1446132.1	67	1	77	10	85	8
AD-1446104.1	68	17	57	10	68	12
AD-1446127.1	68	6	54	10	56	3
AD-1446171.1	69	10	78	7	88	9
AD-1446120.1	70	14	79	9	79	20
AD-1446144.1	71	7	81	2	86	2
AD-1446135.1	71	6	69	8	84	15
AD-1446096.1	73	7	68	9	89	8
AD-1446094.1	73	10	78	8	76	19
AD-1446100.1	74	8	68	3	79	4
AD-1446140.1	76	13	81	10	83	11
AD-1446143.1	77	5	73	3	78	12

10

20

【表 1 7 - 8】

AD-1446141.1	78	9	82	4	89	16
AD-1446138.1	81	8	89	6	97	16
AD-1446134.1	85	14	81	4	89	15
AD-1446139.1	87	12	91	14	90	19
AD-1446123.1	89	28	100	8	94	14
AD-1446121.1	89	3	89	3	91	8
AD-1446109.1	90	8	93	15	100	10
AD-1446119.1	92	5	85	14	83	5
AD-1446142.1	93	19	89	8	87	10
AD-1446093.1	NA	17	21	3	24	2

30

40

表 7 a . 表 7 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにメッセージが 5 0 % 以下残存している C 9 O R F 7 2 R N A 標的配列。

50

【表 18】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2)	配列 番号
5035	5059	TGCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC	51
5058	5087	GCCACGTAAGATGACGCTTGGTGTGTC	52
5197	5222	CTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGG	53
5213	5270	TCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGA TTAACCAGAAGAAAACAAGGAGG	54
5539	5565	TTACTTTCCCTCTCATTCTCTGACCG	55
5545	5570	TCCCTCTCATTCTCTGACCGAAGCT	56
5916	5955	GGAGACGCCTGCACAATTCAGCCCAAGCTTCTAG AGAGT	57
5935	5968	CAGCCCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATGACTTGC	58
5948	5976	TAGAGAGTGGTGATGACTTGCATATGAGG	59
6007	6030	CTGTGGGACATGACCTGGTTGCTT	60
6012	6039	GGACATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC	61
6020	6070	CCTGGTTGCTTCACAGCTCCGAGATGACACAGACT TGCTTAAAGGAAGTGA	62

10

20

30

表 7 b . 表 7 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにメッセージが 4 0 % 以下残存している C 9 O R F 7 2 RNA 標的配列。

40

50

【表 19】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2)	配列 番号
5035	5059	TGCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC	63
5059	5084	CCCACGTAAAAGATGACGCTTGGTGT	64
5064	5087	GTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTC	65
5197	5222	CTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGG	66
5213	5270	TCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGA TTAACCAGAAGAAAACAAGGAGG	67
5539	5565	TTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGACCG	68
5545	5569	TCCCTCTCATTTCTCTGACCGAAGC	69
5921	5955	CGCCTGCACAATTTCAAGCCCAAGCTTCTAGAGAGT	70
5939	5963	CCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATGA	71
5948	5973	TAGAGAGTGGTGATGACTTGCATATG	72
6012	6039	GGACATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC	73
6036	6059	CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT	74
6040	6066	GAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGAA	75

10

20

30

表 7 c . 表 7 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにメッセージが30%以下残存しているC9ORF72 RNA標的配列。

40

50

【表 2 0】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2)	配列 番号
5036	5059	GCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC	76
5064	5087	GTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTC	77
5223	5270	TGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAG AAGAAAACAAGGAGG	78
5539	5563	TTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGAC	79
5939	5962	CCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATG	80
6016	6039	ATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC	81
6036	6059	CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT	82
6040	6065	GAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGA	83

10

表 7 d . 表 7 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにメッセージが 2 5 % 以下残存している C 9 O R F 7 2 RNA 標的配列。

【表 2 1】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2)	配列 番号
5036	5059	GCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC	84
5223	5270	TGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAG AAGAAAACAAGGAGG	85
5539	5562	TTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGA	86
6016	6039	ATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC	87
6036	6059	CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT	88
6040	6065	GAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGA	89

20

30

40

表 7 e . 表 7 で測定した場合、0 . 1 n Mでの投薬のためにメッセージが 2 0 % 以下残存している C 9 O R F 7 2 RNA 標的配列。

50

【表 2 2】

標的 開始	標的 終了	RNA標的配列(NG_031977.2)	配列 番号
5229	5252	AGAAAAGACCTGATAAAGATTAAC	90
5233	5256	AAGACCTGATAAAGATTAACCAGA	91
5539	5562	TTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGA	92
6036	6059	CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT	93

10

【0910】

実施例 3. 遺伝子導入マウスにおけるインビボ評価

本実施例は、遺伝子修飾マウスの対立遺伝子系においてC9orf72 RNAi剤を評価するための方法を記載する(US10,781,453、WO/2018/064600、US2020/0196581、及びWO/2020/131632、前述の出願の各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる)。対立遺伝子系は、エクソン1A及び1B、並びに隣接するイントロン配列を含むマウスC9orf72遺伝子の一部が、3〜30のリピートの正常範囲から500超のリピートまでの様々な長さのGGGGCCヘキサヌクレオチドリピート伸長を担持するヒトC9orf72遺伝子からの相同断片で正確に代置される、マウスES細胞のセットを含む。対立遺伝子系のES細胞を使用して、8細胞胚注射のVelociMouse法などの標準的な方法によって、マウスを得る(Poueymiro et al., 2007)。

20

【0911】

実施例5で設計及びアッセイしたdsRNA剤を、エクソン1A及び1B又は全C9orf72 mRNAからのセンス若しくはアンチセンスGGGGCCリピート含有若しくはイントロン含有RNA又はスプライシングされたRNAのレベルを低減させるその能力について、例えば、鎖特異的プローブ(Exiqon, Inc.)、逆転写共役定量PCR(R-qPCR)を用いたRNA巢のための蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)によって、又は例えば、対立遺伝子系のマウスにおけるNanosttring(登録商標)、Qantigene(登録商標)、又はLucerna(登録商標)アッセイ技術を用いた鎖特異的プローブへのハイブリダイゼーションによって、評価する。

30

【0912】

簡潔に述べると、最大500又は500超のGGGGCCリピートを有するヘテロ接合性又はホモ接合性のマウスに、脳室内、髄腔内、又は皮下注射により、二本鎖AD-463858、AD-463860、AD-463862、AD-463863、AD-463869、AD-463871、AD-463872、AD-463873、AD-463877、又はプラセボを含む目的のdsRNA剤の単回用量を投与する。投与後2〜10週で、動物を殺し、大脳皮質、脊髄、肝臓、脾臓、及び子宮頸部リンパ節を含む血液及び組織試料を収集し、RNAを組織試料から精製する。遺伝子修飾C9orf72遺伝子から産生されたリピート含有若しくはイントロン含有RNA又は正常RNAを、RNA FISH、RT-qPCR、又は鎖特異的検出方法によりアッセイする。最大500又は500超のリピートの長いGGGGCCリピート伸長を担持するマウスからの結果を、3〜30リピートの正常なリピート長を担持する対照マウスと比較する。

40

【0913】

RNAに加えて、タンパク質をマウスの組織から抽出し、転写産物を含有するC9orf72センス及びアンチセンスGGGGCCリピートのリピート関連非AUG及び標準翻訳によって産生される、ポリ(GlyPro)、ポリ(GlyAla)、ポリ(GlyArg)、ポリ(ProAla)、及びポリ(ProArg)を含む病原性ジペプチドリピートタンパク質の存在についてアッセイする。ジペプチドリピートタンパク質及び正常なC9orf72タンパク質を、免疫組織化学、ウェスタンブロットティング、酵素結合免疫

50

吸着アッセイ、及び M e s o S c a l e D i s c o v e r y（登録商標）アッセイにより、個々のジペプチドリピータンパク質に対する利用可能な抗体を用いてマウス組織でアッセイする。最大500又は500超のリピートの長いGGGGCCリピート伸長を担持する細胞及びマウスからの結果を、3～30リピートの正常なリピート長を担持する細胞と比較する。

【0914】

結果は、対立遺伝子系のマウスへのdsRNA剤の投与が、センスリピート及びイントロン含有並びにアンチセンスリピート含有C9orf72転写産物の産生を阻害するが、C9orf72の総mRNAレベル及びエクソン1B含有mRNAレベルには影響を与えないことを示す。結果はまた、dsRNA剤の投与により、センス及びアンチセンスリピート含有C9orf72転写産物に由来するジペプチドリピータンパク質の産生が阻害されるが、正常なC9orf72タンパク質のレベルには影響を及ぼさないことも示す。結果は、dsRNA剤の投与により、脳、脳幹、及び脊髄を含む中枢神経系全体にわたってセンス及びアンチセンスリピート含有RNAのレベルが低減することを示す。結果は、GGGGCCリピート伸長対立遺伝子系のマウスによって産生されたジペプチドリピータンパク質の最大の低減が、C9orf72のセンス及びアンチセンス両方のGGGGCCリピート含有転写産物を標的とするdsRNA剤によって得られることを示す。

【表23】

二本鎖名	センストランス配列	アンチセンストランス配列
AD-463858	ACAAGAAAAGACCUGAUAAAU	AUUUAUCAGGUCUUUUCUUGUUC
AD-463860	AGAAAAGACCUGAUAAAGAUU	AAUCUUUAUCAGGUCUUUUCUUG
AD-463862	AAAAGACCUGAUAAAGAUUAA	UUAUAUCUUUAUCAGGUCUUUUCU
AD-463863	AAAGACCUGAUAAAGAUUAAU	AUUAUAUCUUUAUCAGGUCUUUUC
AD-463869	CUGAUAAAGAUUAACCAGAAU	AUUCUGGUUAAUCUUUAUCAGGU
AD-463871	GAUAAAGAUUAACCAGAAGAA	UUCUUCUGGUUAAUCUUUAUCAG
AD-463872	AUAAAGAUUAACCAGAAGAAA	UUUCUUCUGGUUAAUCUUUAUCA
AD-463873	AAAGAUUAACCAGAAGAAAAU	AUUUUCUUCUGGUUAAUCUUUAU
AD-463877	UAACCAGAAGAAAACAAGGAU	AUCCUUGUUUUCUUCUGGUUAAU

【表24】

二本鎖名	センスオリゴ配列	アンチセンスオリゴ配列
AD-463858	ascsaagaAfaAfGfAfcugauaaaL96	asUfsuuaUfcAfGfgucuUfuUfcuugususc
AD-463860	asgsaaaaGfaCfCfUfgauaaagauL96	asAfsucuUfuAfUfcaggUfcUfuuuucusug
AD-463862	asasaagaCfcUfGfAfaaagauuaaL96	usUfsaauCfuUfUfaucGfgUfcuuuuscsu
AD-463863	asasagacCfuGfAfUfaaagauuaaL96	asUfsuaaUfcUfUfaucAfgGfucuuususc
AD-463869	csusgauaAfaGfAfUfaaccagaauL96	asUfsucuGfgUfUfaucUfuUfaucagsgsu
AD-463871	gsasuaaaGfaUfUfAfacagaagaaL96	usUfscuuCfuGfGfuuaaUfcUfuuaucsasg
AD-463872	asusaaagAfuUfAfAfcagaagaaaL96	usUfsucuUfcUfGfguaaAfuCfuuaucsa
AD-463873	asasagauUfaAfCfCfagaagaaaL96	asUfsuuuCfuUfCfugguUfaAfucuuusasu
AD-463877	usasaccaGfaAfGfAfaaacaaggauL96	asUfscuuUfgUfUfuucuUfcUfgguuasasu

【0915】

実施例4．C9orf72を標的とする追加の薬剤

C9orf72を標的とする追加の薬剤を、上述のように設計及び合成した。

【0916】

これらの薬剤の非修飾ヌクレオチド配列を表8に提供し、これらの薬剤の修飾ヌクレオ

チド配列を表 9 に提供する。
【表 2 5】

表 8. C90H72 を標的とする dsRNA 剤の未修飾センス鎖及びアンチセンス鎖配列

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列 番号	NM_001256054 での範囲	アンチセンス配列 5'から 3'	配列 番号	NM_001256054 での範囲
AD-1285248	CAUAUGGACUAUCAUUUAUA		1092-1112	UUUAAATUGAUAGUCCAUAUGUG		526-548
AD-1285249	UGUUGCCAAAGACAGAGAUUGA		375-395	UCAAUCTCUGUCUUUGGCAACAGC		233-255
AD-1285250	CAAGACAGAGAUUGCUUUAAA		2015-2035	UUUAAAAGCAAUCUCUGUCUUGGC		239-261
AD-1285251	UAAAUUGGAGAAAUCCUUCGAA		1092-1112	UUCGAAAGGAUUUUCUCCAUUUAGA		400-422
AD-1285252	UGUGUGUUGAUAGAUUAACAA		594-614	UUGUUAAUCUAUCAACACACACU		589-611
AD-1285253	CAGAACUUAGUUUCUACCUCA		3227-3247	UGAGGUAGAAACUAAGUUCUGUC		556-578
AD-1285254	ACAGAACUUAGUUUCUACCUA		3228-3248	UAGGUAGAAACUAAGUUCUGUCU		555-577
AD-1285255	UGGACUAUCAAUUAUCUUCA		928-948	UGAAGUAUAAUUGAUAGUCCAUA		530-552
AD-1285256	AGUGAUGUCGACUCUUUGCCA		760-780	UGGCAAAGAGUICGACAUCAUCGC		197-219
AD-1285257	AAGACAGAGAUUGCUUUUAGA		1539-1559	UCUUAAAGCAAUCUCUGUCUUGG		240-262
AD-1285258	AUAUUCUUGGUCCUAGAGUA		616-636	UACUCUAGGACCAAGAAUAUUGU		303-325
AD-1285259	UGAUACAGUACUCAAUGAUGA		3089-3109	UCAUCATUGAGUACUGUAUCAGC		806-828
AD-1285260	UAGCUGAUACAGUACUCAAUA		2131-2151	UAUUGAGUACUGUAUCAGCUAUA		802-824
AD-1285261	CUGUCAUGAAGGCUUUCUUCA		373-393	UGAAGAAAAGCCUUCUAGACAGCU		842-864
AD-1285262	ACAUAUUUUAUAAUCAGCGUAA		1006-1026	UUACGCTGAUUUAUAAUAUGUUC		1169-1191
AD-1285263	GUCUUACACAGAGACACUCUA		1581-1601	UAGAGUGUCUCUCUGUGUAAGACAU		1308-1330

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 1】

表 9. C9Orf72 を標的とする dsRNA 剤の修飾センス鎖及びアンチセンス鎖配列

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列	配列番号
AD-1285248	csasuau(Ghd)GfaCTUfAfucauuuusa		VPusUfsauaa(Tgm)ugauagUfcCfaauangsug		CACAU AUGGACUAUCAA UUAUAC	

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 2】

二本鎖名	センス配列 5'から 3'	配列番号	アンチセンス配列 5'から 3'	配列番号	mRNA 標的配列	配列番号
AD-1285249	usgsuug(Chd)CfaAfGfAfcagagauusgsa		VPusCfsaau(Tgn)cugucUfGfcaacagsc		GCUGUUGCCAAAGACAGAGA	
AD-1285250	csasaga(Chd)AfgAfGfAfuugcuuuaasasa		VPusUfuaaa(Ggn)caauucCfuGfucuuugsc		GAUUGC	
AD-1285251	usasaau(Chd)GfaGfAfAfaucuuucgsasa		VPusUfscgaa(Ggn)gaauucUfcCfaauuaasgsa		UUUAAG	
AD-1285252	usgsuug(Chd)UfuGfAfUfagauuaacsasa		VPusUfsguaa(Agn)ucuaucAfaCfacacacsu		UCUAAUUGGAGAAAUCC	
AD-1285253	csasgaa(Chd)UfuAfGfUfuucuaucscsa		VPusGfsaggu(Agn)gaauucAfaGfuuucugsc		UUCGAA	
AD-1285254	ascasaga(Ahd)CfuUfAfGfuuucuaucscsa		VPusAfsaggu(Ggn)aaauucAfgUfucuuugsc		AGUGUGUGUUGAUAGAU	
AD-1285255	usgsagac(Uhd)AfuCfAfAfuuaucscsa		VPusGfsaggu(Agn)uaauugAfuAfguucscsa		UAACAC	
AD-1285256	asgsuuga(Uhd)GfuCfGfAfcuucuuugscsa		VPusGfsaggu(Agn)gagucgAfcAfucaucscsa		GACAGAACUUAGUUUCU	
AD-1285257	asasgac(Ahd)GfaGfAfUfuguuuaasgsa		VPusCfsuuaa(Agn)gcauucUfcUfgucuuugsc		ACCUC	
AD-1285258	asasuau(Uhd)CfuUfGfGfucuuagaggsusa		VPusAfsuuaa(Agn)ggaccaAfgAfauuaugsc		AGACAGAACUUAGUUUC	
AD-1285259	usgsaua(Chd)AfgUfAfCfucauugauusgsa		VPusAfsuuaa(Agn)gcauucUfcUfgucuuugsc		UACCC	
AD-1285260	usasaau(Chd)AfuCfAfAfaucuaucscsa		VPusAfsuuaa(Agn)gcauucUfcUfgucuuugsc		UUGCCC	
AD-1285261	csusguc(Ahd)UfuAfGfGfucuuucscsa		VPusAfsuuaa(Agn)gcauucUfcUfgucuuugsc		CCAAGACAGAGAUUGCU	
AD-1285262	ascasaua(Uhd)UfuAfUfAfaucagcguusasa		VPusAfsuuaa(Agn)gcauucUfcUfgucuuugsc		UUAAGU	
AD-1285263	gsuscuu(Ahd)CfaCfAfGfagacacucscsa		VPusAfsuuaa(Agn)gcauucUfcUfgucuuugsc		ACAUAUUUUUGGUCCU	

【0917】

実施例 5. C9orf72 を標的とする 2 つ以上の dsRNA 剤を含む組成物のインビトロ評価

蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH) によって細胞質及び核巣として検出されたセンス及びアンチセンスリピート伸長 RNA は、RNA 結合タンパク質を分画し、結果として、細胞毒性をもたらし得る。加えて、ジペプチドリピート (DPR) タンパク質は、リピート関連非 AUG (RAN) 翻訳と称されてきた非標準プロセスによって、G4C2 リピート伸長センス及びアンチセンス RNA から産生されることが提案されており、また DPR タンパク質が細胞毒性である強力な証拠がある。全てのセンス及びアンチ

10

20

30

40

50

センスリーディングフレームから翻訳され得るDPRタンパク質。センスDPRタンパク質には、グリシン-アラニン、グリシン-アルギニン、及びグリシン-プロリンDPRタンパク質が含まれる。センスDPRタンパク質には、プロリン-アルギニン、プロリン-アラニン、及びグリシン-プロリンが含まれる。G₄C₂リピート含有RNAは、それ自体で、又はジペプチドリピータンパク質の翻訳のための鋳型としてのいずれかで、病原性であるように見えるため、一般的な治療戦略は、その合成を阻害するか、又はそれらの破壊を促進するかのいずれかである。以下の例では、ヒト化C9orf72モデルにおいてジペプチドリピータンパク質の最大ノックダウンを達成するために、C9orf72のセンスRNA及びアンチセンスRNAの両方を標的とするsiRNAが必要であることを示す。

10

【0918】

RNA干渉を、C9orf72 G₄C₂リピート含有RNAの破壊のためのモダリティとして探索した。G₄C₂リピートそれ自体、及び3'に直接隣接したGCリッチ配列は、エクソン1B(E1B)における特定のsiRNA設計及び標的化配列と相性が悪く、その隣接するイントロンは、C9orf72 mRNAと干渉する可能性があるため、siRNA設計は、E1Aとリピート伸長の開始との間のヒトC9orf72遺伝子の領域に由来する配列を担持するセンスRNA及びアンチセンスRNAに焦点を当てた。300×リピート伸長対立遺伝子を有するマウスES細胞において、2つの標的化センスRNA及び2つの標的化アンチセンス転写産物である4つのsiRNAを試験した。使用した薬剤の非修飾及び修飾ヌクレオチド配列を、以下の表10A~10Dに提供する。

20

【0919】

センスRNAを標的とするsiRNAは、E1A付近のイントロン配列に対するRT-qPCRアッセイによって決定して、イントロン含有転写産物の50~60%の低減を生じさせた(図5A)。2つのアンチセンス標的化siRNAは、同じアッセイで、シグナルの40~50%の増加を生じさせた(図5A)。センス標的化siRNAのうちの1つを2つのアンチセンス標的化siRNAのいずれかと組み合わせることでは、センス標的化siRNA単独によって生じるものと比べて、イントロン含有RNAの更なるノックダウンは生じなかった(図5A)。センス標的化siRNAもアンチセンス標的化siRNAも、C9orf72 mRNAに対して感知できるほどの効果を有しなかった(図5B)。

30

【0920】

ウェスタンスロットブロッキングによるDPRタンパク質合成に対するsiRNAの効果もアッセイした(図6A)。これらのアッセイの定量分析により、ビヒクル対照と比べて、両方のセンス標的化siRNAが、ポリ(GlyAla)をおよそ75%低減し(図6B)、一方で、アンチセンス標的化siRNAは、実のところ、ポリ(GlyAla)のわずかな増加しか引き起こさず(図6B)、これは、これらのsiRNAによって生じるイントロン含有RNAの中等度の増加と一貫していた(図5A)。センス標的化siRNAとアンチセンス標的化siRNAとの組み合わせは、センス標的化siRNA単独によって達成されるポリ(GlyAla)の阻害を強化しなかった。センス標的化siRNAは、ポリ(GlyPro)合成をおよそ20%阻害したが、アンチセンス標的化siRNAは、より強い60~70%のノックダウンを生じさせた(図6C)。センス標的化siRNAとアンチセンス標的化siRNAとを組み合わせることで、ポリ(GlyPro)合成が更に低減し、およそ80%のノックダウンが達成された(図6C)。これらの結果により、センスRNAがポリ(GlyAla)の翻訳のための鋳型として機能する一方で、ポリ(GlyPro)がセンスRNA鋳型とアンチセンスRNA鋳型との両方から合成されるという見込みが裏付けられる。アンチセンス標的化siRNAで達成されるポリ(GlyPro)合成のより強力な阻害は、このDPRタンパク質の大部分が、300×モデルにおいてアンチセンス転写産物から産生されることを示す。センス(ポリ(GlyAla)、ポリ(GlyPro)、及びポリ(GlyArg))及びアンチセンス(ポリ(GlyPro)、ポリ(AlaPro)、及びポリ(ProArg))RNA DP

40

50

R合成の代替として、ポリ（G l y A l a）及びポリ（G l y P r o）を用いると、結果は、C 9 o r f 7 2 A L Sの治療用RNA iが、D P Rタンパク質合成の最大阻害を達成するために、センス転写産物とアンチセンス転写産物との両方を標的とするs i R N Aを必要とし得ることを示す。

表 1 0 A . アンチセンス標的化RNA i 剤の非修飾ヌクレオチド配列
【表 2 7】

二本鎖名	センス	アンチセンス
AD-1446213	GCUUCGGUCAGAGAAA UGAGA	UCUCAUUUCUCUGACCGAA GCUG
AD-1446246	UUCCCUCCUUGUUUU CUUCUA	UAGAAGAAAACAAGGAGGG AAAC
AD-1446268	CUUUAUCAGGUCUUU UCUUGA	UCAAGAAAAGACCUGAUAA AGAU

10

20

30

表 1 0 B . センス標的化RNA i 剤の非修飾ヌクレオチド配列
【表 2 8】

二本鎖名	センス	アンチセンス
AD-1285238	AACAAGAAAAGACCUG AUAAA	UUUAUCAGGUCUUUUCUUG UUCA
AD-1285234	AGAAAAGACCUGAUAA AGAU	UAUCUUUAUCAGGUCUUUU CUUG

40

表 1 0 C . アンチセンス標的化RNA i 剤の修飾ヌクレオチド配列

50

【表 2 9】

二本鎖名	センス	アンチセンス
AD-14462 13.1	gscsuuc(Ghd)GfuCfAfGfagaa augasgsa	VPusCfsucaUfuUfCfucugAfcCfga agcsusg
AD-14462 46.1	ususccc(Uhd)CfcUfUfGfuuuu cuucsusa	VPusAfsгааGfaAfAfacaaGfgAfgg gaasasc
AD-14462 68.1	csusuua(Uhd)CfaGfGfUfcuuu ucuusgsa	VPusCfsaagAfaAfAfgaccUfgAfua aagsasu

10

表 1 0 D . センス標的化 R N A i 剤の修飾ヌクレオチド配列

【表 3 0】

二本鎖名	センス	アンチセンス
AD-128523 8.1	asascaa(Ghd)AfaAfAfGfaccu gauasasa	VPusUfsuauCfaGfGfucuuUfuCfuug uuscса
AD-128523 4.1	asgsaaa(Ahd)GfaCfCfUfgaua aagasusa	VPusAfsucuUfuAfUfcaggUfcUfuuu cususg

20

【0 9 2 1】

実施例 6 . マウスにおける d s R N A 二本鎖のインビボスクリーニング

C 9 o r f 7 2 のイントロン 1 A のアンチセンス鎖を標的とする二本鎖をインビボで評価した。

【0 9 2 2】

表 1 1 は、C 9 o r f 7 2 イントロン 1 A のアンチセンス鎖を標的とする薬剤の非修飾センス鎖及びアンチセンス鎖ヌクレオチド配列を提供し、表 1 2 は、この試験で使用した C 9 o r f 7 2 イントロン 1 A のアンチセンス鎖を標的とする薬剤の修飾センス鎖及びアンチセンス鎖ヌクレオチド配列を提供する。

30

【0 9 2 3】

投与前 - 1 4 日目に、野生型マウス (C 5 7 B L / 6) を、静脈内投与によるイントロン 1 A の一部を含む、エクソン 1 A とヒト C 9 o r f 7 2 のリピート伸長との間の領域を含む、アデノ随伴ウイルス 8 (A A V 8) ベクターの 2×10^{10} 又は 2×10^{11} いずれかのウイルス粒子を用いて形質導入した。アンチセンスベクター配列は、配列番号 9 4 に提供する。

【0 9 2 4】

0 日目に、3 匹のマウスの群に、目的の薬剤の $3 \text{ mg} / \text{kg}$ の単回用量、陽性対照として C 9 o r f 7 2 以外の遺伝子を標的とする d s R N A 剤の $3 \text{ mg} / \text{kg}$ 若しくは $10 \text{ mg} / \text{kg}$ の単回用量、又は P B S 対照を、腹腔内投与した。投与後 1 4 日目に、動物を殺し、脳試料を採取し、液体窒素中で瞬間凍結させた。脳 R N A を抽出し、R T - Q P C R 法によって分析した。

40

【0 9 2 5】

イントロンプローブを使用して、イントロン内の領域を検出した。ヒト C 9 o r f 7 2 のアンチセンスイントロンレベルを、ハウスキーピング遺伝子 G A P D H と比較した。次いで、値を P B S ビヒクル対照群の平均に対して正規化した。データは、ベースライン値のパーセントとして表し、平均 + 標準偏差として示した。表 1 3 に列記し、図 7 に示す結果は、ヒト C 9 o r f 7 2 のイントロン 1 A のアンチセンス鎖を標的とする試験した例示的な二本鎖薬剤が、インビボでのヒト C 9 o r f 9 2 アンチセンス R N A のレベルを強力

50

に低減させることを示す。
【表 3 1】

表 11. イントロソ 1A アンチセンス標的化 RNAi 剤の非修飾ヌクレオチド配列

二本鎖名	センス鎖 5'から 3'	配列 番号	アンチセンス鎖 5'から 3'	配列 番号
AD-1721933.1	CUUUUUCAGGUCUUUUUCUUGA		UCAAGAAAAAGACCUGAUAAAGAU	
AD-1721934.1	UUCUGGUUAAUCUUUAUCAGA		UCUGAUAAAAGAUUAAACCAGAAGA	
AD-1721935.1	CUUGUUUUCUUCUGGUUAAUA		UAUUAAACCAGAAAGAAACAAGGA	

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 12. イントロン 1A アンチセンス標的化 RNAi 剤の修飾ヌクレオチド配列

二本鎖名	センス鎖 5'から 3'	配列番号	アンチセンス鎖 5'から 3'	配列番号
AD-1721933.1	csusuaa(Uhd)CfaGfGfUfcuuuucuuugaL96		VPusCfsaagAfaAfAfgaccUfgAfuaaagsasu	
AD-1721934.1	ususcug(Ghd)UfuAfAfUfcuuuaucagaL96		VPusCfsugaUfaAfAfgauuAfaCfcagaagsa	
AD-1721935.1	csusugu(Uhd)UfuCfUfUfcugguuaauaL96		VPusAfsuuaAfcCfAfgaagAfaAfacaagsgsa	

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 1】

表 13.

群番号	動物番号	処置	AAV 力価	用量	平均/マウス	grp 平均	stdev	100 に対して 正規化	grp 平均
1	1	PBS	2.00E+10	該当なし	145.4583443	110.0603	42.5617662	132.1624	100
	2							110.7452	
	3				62.8360996			57.09241	
2	4	未感作			108.7414693	82.25354	55.868879	98.80168	74.73495
	5						16.41574		
	6			119.9519394			108.9874		
3	7	AD-64958(対照)			3	44.82748779	49.17021	3.84795464	40.72992

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 2】

群番号	動物番号	治療	AAV 力価	用量	平均/マウス	gtp 平均	stdev	100 に対して 正規化	gtp 平均
	8				52.15540902			47.38801	
	9				50.52772992			45.90911	
	10				57.90374506	51.88677	19.5410098	52.61091	47.14393
4	11	AD-64958(対照)		10	67.7117117			61.52235	
	12				30.04485251			27.29853	
	13				31.8631398	68.36251	32.7786689	28.95061	62.11366
5	14	AD-1721933.1		3	95.2890682			86.57893	
	15				77.935321			70.81144	
	16				82.4652133	82.03793	10.6144606	74.92727	74.53904
6	17	AD-1721934.1		3	71.21627551			64.70657	
	18				92.43229251			83.98328	
	19				45.68231369	75.5266	29.5045999	41.50661	68.6229
7	20	AD-1721935.1		3	76.21814549			69.25123	
	21				104.6793558			95.11087	
	22				117.7590945	106.9963	43.5190329	110.059	100
8	23	PBS		該当なし	59.10574588			55.24093	
	24				144.1240461			134.7	
	25				122.9141465	125.8956	17.1442589	114.877	117.6635
9	26	未感作		該当なし	110.4376191			103.2163	
	27				144.3350411			134.8972	
	28				78.98649992	52.80346	23.046316	73.82171	49.35074
10	29	AD-64958(対照)		3	35.59259337			33.26526	
	30				43.83128886			40.96524	
	31				103.7821236	60.751	37.3784316	96.996	56.77861
11	32	AD-64958(対照)		10	36.33902969			33.96289	
	33				42.13185889			39.37693	

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 3】

群 番号	動物 番号	処置	AAV 力価	用量	平均/マウス	grp 平均	stdev	100 に対して 正規化	grp 平均
12	34	AD-1721933.1		3	28.02191177	42.90744	21.6991653	26.18961	40.1018
	35				67.80499251			63.37135	
	36				32.89542331			30.74445	
13	37	AD-1721934.1		3	68.07513475	87.5624	17.4973685	63.62382	81.83686
	38				92.68622676			86.62564	
	39				101.9258501			95.2611	
14	40	AD-1721935.1		3	51.21572748	46.91163	8.93757275	47.86682	43.84416
	41				36.636385			34.2408	
	42				52.88276877			49.42486	

10

20

30

40

50

【表 3 4】

二本鎖 ID	鎖	修飾配列	非修飾配列
AD-64958 (対照)	センス	asascaguGfuUfcfUfugcucuaaaL96	AACAGUGUUUCUUGCUCUAUAA
	アンチセンス	usUfsauaGfiagcaagaAfcAfcuguususu	UUAUAGAGCAAGAACACACUGUUUU

【0926】

実施例 7. C9orf72 アンチセンス RNA 転写開始部位のマッピング

ヒト化マウスC9orf72 対立遺伝子によって産生されたアンチセンス転写産物の転写開始部位（TSS）の5'－RACEによるマッピングにより、cDNAクローンの全てが、同じ配列を共有したことがわかった。この配列は、エクソン1BコードDNAの3'末端の171bp下流、GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート伸長の約270bp下流にあるアデノシンにて単一のTSSをマッピングした。このマッピングを確認し、TSSから産生されたアンチセンスの存在量を測定するために、鎖特異的Nanosttring（登録商標）プローブの集合を用いて、C9orf72アンチセンスRNAを定量し

た。プローブは、マッピングされた開始部位の付近（プローブI）、並びに開始部位の上流（プローブG）及び下流の両方（プローブ3'リピート、5'リピート、E、及びA）の両方で、ヒト化対立遺伝子の異なる領域に由来するアンチセンスRNAにハイブリダイズするように設計した（図8）。また、マウスセンスRNAエクソン1Aの開始部位の200～1200ヌクレオチド上流から延在し得るアンチセンスRNAを認識するプローブを設計した。

【0927】

Nanosttringの結果から、96のヘキサヌクレオチドリピート（96×）以上（295×及び545×）を有するES細胞由来運動ニューロン（ESC-MN）において、アンチセンスRNAが、マッピングされた開始部位（プローブI）から産生され、リピート伸長（プローブ3'リピート、5'リピート、E、及びA）をとって、マウス遺伝子の5'隣接配列内に少なくとも1500bp出ることがわかった。マッピングされた開始部位と一貫して、プローブGを有するアンチセンス転写産物は検出されなかった。いくつかのアンチセンス転写が、3×対照ESC-MNの開始部位（プローブI）で検出されたが、3×リピート以上に延長した転写産物の有意な蓄積はなかった。したがって、延長した転写産物の蓄積である生産的なアンチセンスRNA転写は、より長いリピート拡張を必要とした。伸長アンチセンスRNAの蓄積は、ヒト化対立遺伝子及び3×超のリピート拡張に依存する。

【0928】

アンチセンスRNA TSSのマッピング及び延長した転写産物の伸長は、例えば、siRNA指向RNA干渉又はアンチセンスオリゴヌクレオチド指向RNase H分解によるアンチセンスRNA破壊の標的化を方向付けるためのガイドとして機能する。ヒト化マウス対立遺伝子のヒト挿入配列内にマッピングされたTSSは、ヒト細胞で使用される真正な部位である可能性が高い。エクソン1AにおけるTSSでのプローブIとプローブAとの間（すなわち、NG_031977（配列番号15）のヌクレオチド5026～5607）、及びエクソン1AにおけるTSSでのプローブIとプローブEとの間（すなわち、NG_031977（配列番号15）のヌクレオチド5130～5607）に広がるヒト配列を標的化することは、有効な治療剤をもたらす可能性が最も高い。Nanosttring定量プローブにより、アンチセンスRNAがマウスC9orf72遺伝子の5'隣接配列内に遠くまで延在することが示された。ヒト細胞において類似の伸長が生じる可能性が高いため、ヒトC9orf72遺伝子と関連付けられる相同配列を標的とすることは生産的であり得る。

【0929】

非公式配列表

配列番号1

```
>NM_001256054.2 Homo sapiens C9orf72-SMC  
R8複合体サブユニット（C9orf72）、転写バリエーション3、mRNA  
ACGTAACCTACGGTGTC CCGCTAGGAAAGAGAGGTTGCGTCA  
AAACAGCGACAAAGTTTCCGCCACGTA AAG  
ATGACGCTTGGTGTTGTCAGCCGTCCTCTGCTGCCCGGTTGCT  
TTCTCTTTTGGGGGCGGGGTTCTAGCAAGAG  
CAGGTGTGGGTTTATGGAGATATCTCCGGAGCATTTGGATA  
ATGTGACAGTTTGAATGCAGTGATGTCGAC  
TCTTTTGCCACCGCCATCTCCAGCTGTTTGCCAAAGACAGAG  
ATTGCTTTTAAGTGGCAAATCACCTTTATTA  
GCAGCTACTTTTGTCTTACTGGGACAATATTCTTGGTCTCTA  
GAGTAAGGCACATTTGGGGCTCCAAAGACAG  
AACAGGTACTTCTCAGTGATGGAGAAATAACTTTTCTTGC  
CAACCACACTCTAAATGGAGAAATCCTTCG  
AAATGCAGAGAGTGGTGCTATAGATGTAAAGTTTTTTGTCTC
```

TTGTCTGAAAAGGGAGTGATTATTGTTTCA
TTAATCTTTGATGGAAACTGGGAATGGGGATCGCAGCACAT
ATGGACTATCAATTATACTTCCACAGACAG
AACTTAGTTTTCTACCTCCCACCTTCATAGAGTGTTGTTGA
TAGATTAAACACATATAATCCGGAAAGGAAG
AATATGGATGCATAAGGAAAGACAAGAAAATGTCCAGAAAG
ATTATCTTAGAAGGACACAGAGAGAATGGAA
GATCAGGGTTCAGAGTATTATTCCAATGCTTACTGGAGAAG
TGATTCCCTGTAATGGAACTGCTTTTCATCTA
TGAAATCACACAGTGTTTCCTGAAGAAATAGATATAGCTGA
TACAGTACTCAATGATGATGATATTGGTG
CAGCTGTCTATGAAGGCTTTCTTCTCAATGCCATCAGCTCA
CACTTGCAAACCTGTGGCTGTTCCGTTGTA
GTAGGTAGCAGTGACAGAGAAAGTAATAAGATAGTCAGAA
CATTATGCCTTTTTTCTGACTCCAGCAGAGA
GAAAATGCTCCAGGTTATGTGAAGCAGAAATCATCATTTAA
ATATGAGTCAGGGCTCTTTGTACAAGGCCT
GCTAAAGGATTCAACTGGAAAGCTTTGTGCTGCCCTTTCCGG
CAAGTCATGTATGCTCCATATCCCACCCACA
CACATAGATGTGGATGTCAATACTGTGAAGCAGATGCCAC
CCTGTCTATGAACATATTTATAATCAGCGTA
GATACATGAGATCCGAGCTGACAGCCTTCTGGAGAGCCAC
TTCAGAAAGAACACATGGCTCAGGATACGAT
CATCTACACTGACGAAAGCTTTACTCCTGATTTTGAATATT
TTTCAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTA
GTGAAAGCCTTCCCTGGATCAGGTCTTTTCAGCTGAAACCTG
GCTTATCTCTCAGAAGTACTTTCCCTTGAC
AGTTTCTACTTGTCCCTTCACAGAAAAGCCTTGACACTAAT
AAAAATATATAGAAGACGATACGCAGAAAGGG
AAAAAAGCCCTTTAAATCTCTTCGGAACCTGAAGATAGAC
CTTGATTTAAACAGCAGAGGGCGATCTTAAC
ATAATAATGGCTCTGGCTGAGAAAATTA AACCCAGGCCTAC
ACTCTTTTATCTTTGGAAGACCTTTCTACA
CTAGTGTTGCAAGAACGAGATGTTCTAATGACTTTTTTAAAT
GTGTAACCTTAATAAGCCTATTCCATCACAA
TCATGATCGCTGGTAAGGTAGCTCAGTGGTGTTGGGGAAAC
GTTCCCCTGGATCATACTCCAGAATTCTGC
TCTCAGCAATTGCAAGTTAAGTAAGTTACACTACAGTTCTC
ACAAAGAGCCTGTGAGGGGGATGTCAGGTGCA
TCATTACATTGGGTGTCTCTTTTCCCTAGATTTATGCTTTT
GGGATACAGACCTATGTTTACAATATAATA
AATATTATTGCTATCTTTTAAAGATATAATAATAGGATGT
AAACTTTGACCACAACCTACTGTTTTTTTGA
ATACATGATTTCATGGTTTACATGTGTCAAGGTGAAATCTG
AGTTGGCTTTTACAGATAGTTGACTTTCTA
TCTTTTGGCATTCTTTGGTGTTAGAAATTA CTGTAATACT
TCTGCAATCAACTGAAAACCTAGAGCCTTTA
AATGATTTCAATTCCACAGAAAGAAAGTGAGCTTGAAACAT
AGGATGAGCTTTAGAAAGAAATTTGATCAA
GCAGATGTTTAAATTGGAATTGATTATTAGATCCTACTTTG

10

20

30

40

50

30

50

TGTCTGAAAAGGGAGTGATTATTGTTTTCAT
TAATCTTTGATGGAAACTGGGAATGGGGGATCGGCAGCACATA
CGGACTATCAATTATACTTCCACAGACAGA
ACTTAGTTTTCTACCTCCCACCTTCATAGAGTGTGTGTTGAT
AGATTAAACACATATAATCCGGAAAGGAAGA
ATATGGATGCATAAGGAAAGACAAGAAAATGTCCAGAAAGA
TTATCTTAGAAGGACACAGAGAGAATGGAAG
ATCAGGGTTCAGAGTATTATTCCAATGCTTACTGGAGAAGT
GATTCCTGTAAATGGAACCTGCTTTTCATCTAT
GAAATCACACAGTGTTCCTGAAGAAATAGATATAGCTGAT
ACAGTACTCAATGATGATGATATTGGTGAC
AGTTGTTCATGAAGGCTTTCTTCTCAATGCCATCAGCTCAC
ACTTGCAAACCTGTGGCTGTTCCGTTGTAG
TAGGTAGCAGTGCAGAGAAAGTAATAAGATAGTTCAGAAC
ATTATGCCTTTTTTCTGACTGCAGCAGAGAG
AAAATGCTCCAGGTTATGTGAAGCAGAAATCATCATTTTAAA
TATGAGTTCAGGGCTCTTTGTACAGGGGCTG
CTAAAGGATTCAACTGGAAAGCTTTGTGCTGCCCTTTCCGGC
AAGTCATGTATGCTCCATATCCCACCCACAC
ACATAGATGTGGATGTCAATACTGTGAAGCAGATGCCACC
CTGTTCATGAACATATTTATAATCAGCGTAG
ATACATGAGATCCGAGCTGACAGCCTTCTGGAGAGCCACT
TCAGAAAGAAAGACATGGCTCAGGATACGATC
ATCTACACTGACGAAAGCTTTACTCCTGATTTGAATATTT
TTCAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTAG
TGAAAGCCTTCCCTGGATCAGGTCTTTTCAGCTGAAACCTGG
CTTATCTCTCAGGAGTACTTTCCCTTGACACA
GTTTTTACTTGTCCCTTCACAGAAAGCCTTGACACTAATA
AAATATATAGAAGATGATACGCAGAAAGGGA
AAAAAGCCCTTTTAAATCTCTTCGGAACCTGAAGATAGACC
TTGATTTTAAACAGCAGAGGGCGATCTTAACA
TAATAATGGCTCTGGCTGAGAAATTA AACCCAGGCCCTACA
CTCTTTTATCTTTGGAAGACCTTTCTACAC
TAGTGTACAAGAACGAGATGTTCTAATGACTTTTTTAAATG
TGTAACCTTAATAAGCCTATTCCATCACAAAT
CGTGATCGCTGCTAAAGTAGCTCGGTGGTGTTGGGGAAACA
TTCCCCTGGATCATACTCCAGAGCTCTGCT
CGGCAGTTGCAGTTAAGTTAGTTACACTACAGTTCTCACA
AGAGTCTGTGAGGGGATGTCAGGTGCATCA
TTACATTGGATGTCTCTTTTCCCTAGATTTATGCTTTTGGG
ATACAGACCCTATGTTTACAATATAATAGGT
ATTATTGCTGTCTTTTAAATATATAATAATAGGATATAAA
CTTGACCAACAACCTGCTGTTTTTTTGAATA
TATGATTTCATGGTTTTACATGTATTAAAGGTGAAATCCGAGT
TCGCTTTTACAGATATTAGTTGACTTTCTA
TCTTTTGGCATTCTTTGGTGTTGTTGGAATTACTGTAATACT
TCTGCAATCAACTGAAAATTAGAGCCTTTA
AATGATTTTCAGTTCCACAGAAAGAAAGTGAGCTTCAACAT
AGGATAAGCTTTAGAAAGAGAAATTGATCAA
GCAGATGTTTAAATTGGAATTGATTATTAGATCCTGCTTTG

10

20

30

40

50

TGGATTTAGCCCTCGGGATTTCAGTCTGTAG
AAATGTCGTAGATTCTCTATAGTCCCTGCTCATGGTGAA
CCACAGTTAGGATGTTTTGTTTTGTTTTATT
GTTGTTGCTATTGTTGATGTTCTATATAGTTTGAGCTCTGT
AAAAGGAAATTGTATTTTATGTTTTTAGTAG
TTGTTGCCAACTTTTTTAAATTAAATTTTTCATTATTTTTTGAG
CCAAATTGAAATGTGCACCTCCTGTGCCTT
TTTTTTTCCTTGGAATAATCGAATTACTTTGGAAGAAGTTTCAG
ATTTCACTGGTTCAGTCGTTTTTCATCTTGTT
TTCCTTCTTGCGAGAGTCTTACCATGTACCTGCTTTGGCAAT 10
CATTGTAACTCTGAGATTATAAAAATGCATT
AGAGAATATATTAACTAATAAGATCTTTTTTTTTTCAGGAAC
AGAAAATAGTTTCCTTGAGTACTTTCCTTCTT
ACATTTCTGCCCATGTTTTTTGAAGTTGTTGCCATTTGCCCT
GCAATAGGCTATAAGGAATAGCAGGAGAAA
TTTTTACTGAAGTGCTATTTTTTCTAGGTGCTACTTTGGCAG
AGCTAAGTGGTCTGTTTTCTTTTGTTTTCTT
AATGCGTTTTGGACCATTTTTGCTGGCTGTAAAATAACTGAT
TAATATAATTCTAACACAATATTGACATTG
TAGTGTAACAAACACAATAATTTTATTTTAAAACTGGGAAG 20
TAACATAAAAAGGGAAATAATATTTATAAGA
AAGGAATAAAGGTAATAGAGCTCTTCTGTCCCCCAGCCAC
CAAATTTACACAACAAATGATATGTTCTA
ATGTGAAAGGTCATAATAGCTTTTCCCATCATTAATCAGAA
AGATGTGGCAGCTTGATTTTTTCAGACAACC
CCTGAACCTAGATGACTGTTGTACTGTAGCTCAGTCATTTA
AAAAATATATAAATACTATCTCGTAGTGTC
CCATACTATGTTTTTTTACATGATAGATTCTTATTTAAGTG
CTACCTGGTTATTTTTCTTTGGCTGGTTTTAT
TGTACTGTTATATAGAATGTAAAGTTGTACAGTGAAATAAG 30
TTATTAAAGCATGTGTAAACATTGTTATAT
ATCTTTTTCTCCTAGATGGAGAATTTTGAATAAAAATATATT
TGAAATTTT

配列番号 3

>NM_001081343.2 Mus musculus C9orf72、C9orf72-SMCR8複合体(C9orf72)のメンバー、転写バリエント1、mRNA
GCGGTTGCGGTCCCTGCGCCGGCGGTTGAAGGCGCAGCAGC
GGCGAGTGGCTATTGCAAGCGTTTCGGATAA
TGTGAGACCTGGAATGCAGTGAGACCTGGGATGCAGGGGAT 40
GTCGACTATCTGCCCCCCACCATCTCCTGC
TGTGTTGCCAAGACAGAGATTGCTTTAAGTGGTGAATCACCC
TTGTTGGCGGCTACCTTTGCTTACTGGGAT
AATATTCTTGGTCTAGAGTAAGGCATATTTGGGCTCCAA
AGACAGACCAAGTGCTTCTCAGTGATGGAG
AAATAAACTTTTTCTTGCCAACCACTCTAAATGGAGAAAT
TCTTCGAAATGCAGAGAGTGGGGCTATAGA
TGTAATAATTTTTTTGTCTTATCTGAAAAAGGGGTAAATTATT
GTTTCAATTAATCTTCGACGGAAACTGGAAT
GGAGATCGGAGCACTTATGGACTATCAATTATACTGCCGC 50

AGACAGAGCTGAGCTTCTACCTCCCACCTTC
ACAGAGTGTTGTTGACAGGCTAACACACATTTATTCGAAA
AGGAAGAATATGGATGCATAAGGAAAGACA
AGAAAATGTCCAGAAAATTGTCTTGGAAAGGCACAGAGAGG
ATGGAAGATCAGGGGTCAGAGGTATCATTTCCC
ATGCTTACTGGGGGAAGTCAATTCCTGTAAATGGAGCTGCTTG
CATCTATGAAATCCCACAGTGTTCCTGAAG
ACATTTGATATAGCTGATACAGTGCTCAATGATGATGACAT
TGGTGACAGCTGTCAAGGAAGGCTTTTCTTCT
CAATGCCATCAGCTCACACCTGCGAGACCTGTGGCTGTTCC
GTTGTAGTTGGCAGCAGTGCGAGAGAAAGTA
AATAAGATAGTAAGAACGCTGTGCTTTTCTGACACCAG
CAGAGAGGAAATGCTCCAGGCTGTGTGAAG
CAGAAATCGTCCCTTTAAGTACGAATCGGGACTCTTTGTGCA
AGGCTTGTCTAAAGGATGCAACAGGCAGTTT
TGTCCCTACCCTTCCGGCAAGTTATGTATGCCCCCGTACCCC
ACCACGACACATTTGATGTGGATGTCAACACT
GTCAAGCAGATGCCACCGTGTCATGAACATATTTATAATC
AACGCAGATACATGAGGTCAGAGCTGACAG
CCTTCTGGAGGGCAACTTTCAGAAAGAGGACATGGCGCAGGA
CACCATCATCTACACAGATGAGAGCTTCAC
TCCTGATTTGAATATTTTCCAAGATGTCTTACACAGAGAC
ACTCTAGTGAAAGCCTTCCCTGGATCAGGTC
TTCCATTTGAAGCCTGGCCTGTCTCTCAGGAGTACTTTCC
TTGCACAGTTCTCTCCTCATTTCTTACAGAA
AAGCCTTGACACTAATCAAGTACATCGAGGATGATACGCA
GAAGGGGAAAAAGCCCTTTAAGTCTCTTCG
GAACCTGAAGATAGATCTTGATTTAACAGCAGAGGGGCGAT
CTTAACATAATAATGGCTCTAGCTGAGAAA
ATTAAGCCAGGCCTACACTCTTTTCATCTTTGGGAGACCTT
TCTACACTAGTGTAACAAGAACGTGATGTTTC
TAATGACCTTTTGAACCGTGTTGGTTTGTCTGTCTCTCT
TCACAGTCACACCTGCTGTTACAGTGTCCTC
AGCAGTGTTGTGGGCACATCCTTCCCTCCCGAGTCCCTGCTGC
AGGACAGGGGTACACTACACTTTGTCAGTAGA
AGTCTGTACCTGATGTGAGGTGCATCGTTACAGTGAATGA
CTCTTCCCTAGAAATAGATGTACTCTTTTAGG
GCCTTATGTTTACAATTATCCTAAGTACTATTGCTGTCTT
TTAAAGATATGAATGATGGAATATACACTT
GACCATAACTGCTGATTTGGTTTTTTGTTTTGTTTTG
TTTTCTTGGAAACTTATGATTCCTGGTTTA
CATGTACCACACTGAAACCCTCGTTAGCTTTACAGATAAA
GTGTGAGTTGACTTCCCTGCCCTCTGTGTT
CTGTGGTATGTCCGATTACTTCTGCCACAGCTAAACATTA
GAGCATTTAAAGTTTTGCAGTTCCCTCAGAAA
GGAACCTTAGTCTGACTACAGATTAGTTCTTGAGAGAAAGAC
ACTGATAGGGCAGAGCTGTAGGTGAAATCA
GTTGTTAGCCCTTCCCTTTATAGACGTAGTCCCTTCAGATT
GGTCTGTACAGAAATGCCGAGGGGGTCATGC
ATGGGCCCTGAGTATCGTGACCTGTGACAAAGTTTTTTGTT

10

20

30

40

50

GGTTTATTGTAGTTCTGTCAAAGAAAGTG G
CATTTGTTTTTATAATTGTTGCCAACTTTTAAGGTTAATT
TTCATTATTTTTTGAGCCGAATTAAAATGCG
CACCTCCTGTGCTTTCCCAATCTTGGAAAATATAAATTT C
TTGGCAGAGGGTCAAGATTTTCAGGGGCCCAGT
CACTTTTCATCTGACCACTCTTTGCACGGCTGCCGTGTGCC
TGGCTTAGATTAGAAGTCTTTGTTAAGTAT
GTCAGAGTACATTCGCTGATAAGATCTTTGAAGAGCAGGG
AAGCGTCTTGCCCTCTTTCCCTTTGGTTTCTG
CCTGTACTCTGGTGTTTCCCGTGTCACTCTGCATCATAGGA 10
ACAGCAGAGAAATCTGACCCAGTGCTATTT
TTCTAGGTGCTACTATGGCAAACCTCAAGTGGTCTGTTTCT
GTTCCCTGTAAACGTTTCGACTATCTCGCTAGC
TGTGAAGTACTGATTAGTGGAGTTCTGTGCAACAGCAGTG
TAGGAGTATACACAAACACAAATATGTGTT
TCTATTTTAAAACCTGTGGACTTAGCATAAAAAGGGAGAAATA
TATTTATTTTTTTTACAAAAGGGATAAAAATG
GGCCCCGTTCCTCACCCACCAGATTTAGCGAGAAAAAGCT
TTCTATTCTGAAAGGTCAACGGTGGCTTTTG
CATTACAAATCAGAACACACACACTGACCATGATGGCTT 20
GTGAACATAACTGCAAGGCACCTCCGTCAATGG
TAAGCGAGTAGGTCCACCTCCTAGTGTGCCGCTCATTTGC
TTTACACAGTAGAATCTTATTTGAGTGCTA
ATTGTTGTCTTTGCTGCTTTACTGTGTTGTTATAGAAAAAT
GTAAGCTGTACAGTGAATAAGTTATTGAAG
CATGTGTAAACACTGTTATATATCTTTTCTCCTAGATGGG
GAATTTTGAATAAAATACCTTTGAAATTCT
G

配列番号 4

>NM_001007702.1 *Rattus norvegicus*, RIKEN 30
cDNA 3110043021と類似 (RGD1359108)、mRNA
CGTTTGTAGTGTCAAGCCATCCCAATTGCCCTGTTCCCTTCTC
TGTGGGAGTGGTGTCTAGACAGTCCAGGCA
GGGTATGCTAGGCAGGTGCGTTTTTGGTTGCTCAGATCGC
AACTTGACTCCATAACGGTGACCAAAGACA
AAAGAAAGGAACCAAGATTAAAAAGAACCGGACACAGACCC
CTGCAGAAATCTGGAGCGGCCGTGGTTGGGG
GCGGGGCTACGACGGGGGCGGACTCGGGGGGCGTGGGGAGGGC
GGGGCCGGGGGCGGGGGCCCGGAGCCGGCTGC
GGTTGCGGTCCCTGCGCCGGCGGTGAAGGCGCAGCGGCGG 40
CGAGTGGCTATTGCAAGCGTTTGGATAATG
TGAGACCTGGGATGCAAGGGATGTCGACTATCTGCCCCCCCA
CCATCTCCTGCTGTTGCCAAGACAGAGATT
GCTTTAAGTGGTGAATCACCTCTGTTGGCGGGCTACCTTTG
CTTACTGGGATAATATTCTTGGTCCCTAGAG
TAAGGCACATTTGGGCTCCAAAGACAGACCAAGTACTCCT
CAGTGATGGAGAAATCACTTTTCTTGGCCAA
CCACACTCTGAATGGAGAAATTTCTTCGGGAATGCGGAGAGT
GGGGCAATAGATGTAAAGTTTTTTTGTCTTA
TCTGAAAAGGGCGTCAATTATTGTTTCAATTAACTTTCGACG 50

G G A A C T G G A A C G G A G A T C G G A G C A C T T A C G
G A C T A T C A A T T A T A C T G C C G C A G A C G G A G C T G A G T T T C T A
C C T C C C A C T G C A C A G A G T G T G T G T T G A C A G
G C T A A C G C A C A T C A T T C G A A A A G G A A G G A T A T G G A T G C A C
A A G G A A A G A C A A G A A A A T G T C C A G A A A A T T
G T C T T G G A A G G C A C C G A G A G G A T G G A A G A T C A G G G T C A G A
G T A T C A T C C C T A T G C T T A C T G G G G A G G T C A
T C C C T G T G A T G G A G C T G C T T G C G T C T A T G A G A T C A C A C A G
T G T T C C T G A A G A C C T C G A T A T A G C T G A T A C
A G T A C T C A A T G A T G A T G A C A T T G G T G A C A G C T G T C A T G A A
G G C T T T C T T C T C A A T G C C A T C A G C T C A C A T
C T G C A G A C C T G C G G C T G T T C T G T G G T G G T A G G C A G C A G T G
C A G A G A A A G T A A A T A A G A T A G T A A G A A C A C
T G T G C C T T T T T C T G A C A C C A G C A G A G A G G A A G T G C T C C A G
G C T G T G T G A A G C C G A A T C G T C C T T T A A A T A
C G A A T C T G G A C T C T T T G T A C A A G G C T T G C T A A A G G A T G C G
A C T G G C A G T T T T G T A C T A C C T T T C C G G C A A
G T T A T G T A T G C C C C T T A T C C C A C C A C A C A C A T C G A T G T G G
A T G T C A A C A C T G T C A A G C A G A T G C C A C C G T
G T C A T G A A C A T A T T T A T A A T C A A C G C A G A T A C A T G A G G T C
A G A G C T G A C A G C C T T C T G G A G G G C A A C T T C
A G A A G A G G A C A T G G C T C A G G A C A C C A T C A T C T A C A C A G A T
G A G A G C T T C A C T C C T G A T T T G A A T A T T T T C
C A A G A T G T C T T A C A C A G A G A C A C T C T A G T G A A A G C C T T T C
T G G A T C A G G T C T T C C A T T T G A A G C C T G G C C
T G T C T C T C A G G A G T A C T T T C C T T G C A C A G T T C C T C C T C A T
T C T T C A C A G A A A A G C C T T G A C A C T A A T C A A
G T A C A T A G A G G A T G A C A C G C A G A A G G G G A A A A A G C C C T T T
A A G T C T C T T C G G A A C C T G A A G A T A G A T C T T
G A T T T A A C A G C A G A G G G C G A C C T T A A C A T A A T A A T G G C T C
T A G C T G A G A A A A T T A A G C C A G G C C T A C A C T
C T T T C A T C T T C G G G A G A C C T T T C T A C A C T A G T G T C C A A G A
A C G T G A T G T T C T A A T G A C T T T T T A A A C A T G
T G G T T T G C T C C G T G T G T C T C A T G A C A G T C A C A C T T G C T G T
T A C A G T G T C T C A G C G C T T T G G A C A C A T C C T
T C C T C C A G G G T C C T G C C G C A G G A C A C G T T A C A C T A C A C T T
G T C A G T A G A G G T C T G T A C C A G A T G T C A G G T
A C A T C G T T G T A G T G A A T G T C T C T T T T C C T A G A C T A G A T G T
A C C C T C G T A G G G A C T T A T G T T T A C A A C C C T
C C T A A G T A C T A G T G C T G T C T T G T A A G G A T A C G A A T G A A G G
G A T G T A A A C T T C A C C A C A A C T G C T G G T T G G
T T T T G T T G T T T T T G T T T T T G A A A C T T A T A A T T C A T G G T T
T A C A T G C A T C A C A C T G A A A C C C T A G T T A G C
T T T T T A C A G G T A A G C T G T G A G T T G A C T G C C T G T C C C T G T G
T T C T C T G G C C T G T A C G A T C T G T G G C G T G T A
G G A T C A C T T T T G C A A C A A C T A A A A A C T A A A G C A C T T T G T T
T G C A G T T C T A C A G A A A G C A A C T T A G T C T G T
C T G C A G A T T C G T T T T T G A A A G A A G A C A T G A G A A A G C G G A G
T T T T A G G T G A A G T C A G T T G T T G G A T C T T C C
T T T A T A G A C T T A G T C C T T T A G A T G T G G T C T G T A T A G A C A T

10

20

30

40

50

G C C C A A C C A T C A T G C A T G G G C A C T G A A T A T
C G T G A A C T G T G G T A T G C T T T T T G T T G G T T T A T T G T A C T T C
T G T C A A A G A A A G T G G C A T T G G T T T T T A T A A
T T G T T G C C A A G T T T T A A G G T T A A T T T T C A T T A T T T T T G A G
C C A A A T T A A A A T G T G C A C C T C C T G T G C C T T
T C C C A A T C T T G G A A A A T A T A A T T T C T T G G C A G A A G G T C A G
A T T T C A G G G C C C A G T C A C T T T C G T C T G A C T
T C C C T T T G C A C A G T C C G C C A T G G G C C T G G C T T A G A A G T T C
T T G T A A A C T A T G C C A G A G A G T A C A T T C G C T
G A T A A A A T C T T C T T T G C A G A G C A G G A G A G C T T C T T G C C T C
T T T C C T T T C A T T T C T G C C T G G A C T T T G G T G
T T C T C C A C G T T C C C T G C A T C C T A A G G A C A G C A G G A G A A C T
C T G A C C C C A G T G C T A T T T C T C T A G G T G C T A
T T G T G G C A A A C T C A A G C G G T C C G T C T C T G T C C C T G T A A C G
T T C G T A C C T T G C T G G C T G T G A A G T A C T G A C
T G G T A A A G C T C C G T G C T A C A G C A G T G T A G G G T A T A C A C A A
A C A C A A G T A A G T G T T T T A T T T A A A A C T G T G
G A C T T A G C A T A A A A A G G G A G A C T A T A T T T A T T T T T T A C A A
A A G G G A T A A A A A T G G A A C C C T T T C C T C A C C
C A C C A G A T T T A G T C A G A A A A A A A C A T T C T A T T C T G A A A G G
T C A C A G T G G T T T T G A C A T G A C A C A T C A G A A
C A A C G C A C A C T G T C C A T G A T G G C T T A T G A A C T C C A A G T C A
C T C C A T C A T G G T A A A T G G G T A G A T C C C T C C
T T C T A G T G T G C C A C A C C A T T G C T T C C C A C A G T A G A A T C T T
A T T T A A G T G C T A A G T G T T G T C T C T G C T G G T
T T A C T C T G T T G T T T T A G A G A A T G T A A G T T G T A T A G T G A A T
A A G T T A T T G A A G C A T G T G T A A A C A C T G T T A
T A C A T C T T T T C T C C T A G A T G G G G A A T T T G G A A T A A A A T A C
C T T T A A A A T T C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
A A A A A

10

20

30

配列番号 5

> 配列番号 1 の逆相補体

T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T A A A A T T T C A A A T A T A T T T T A T T
C A A A A T T C T C C A T T T A G G A G A A A A G A T A T A T A A C A A T G T T
T A C A C A T G C T T T A A T A A C T T A T T T C A C T G T A C A A C T T A C A
T T C T G T A T A A C A G T A C A A T A A A C C A G C C A A A G A A A A T A A C
C A G T T A G C A C T T A A A T A A G A A T C T A C C A T G T A A A A A A C A C
A G T A T G G G A C A C T A C A A G G T A G T A T T T A T A T A T T T T T T A A
A T G A C T G A G C T A C A G T A C A A C A G T C A T C T A G T T C A G T G G T
T G T C T A A A A C A T C A A G C T G T C C A C A T C T T T C T G A T T C A T G
A T G G G A A A G C T A T T A T G A C C T T T C A C A T T C G A A C A T G T C A
T T T T G T T G T G T A A A T T T G G T G G G T G G G G G G C A G A A G G G C T
C T A T T A C C T T T A T C C C T T T C T T A T A A A T A T A T T T T C C C T T
T T A T A T T A C T T C C A G A A T T T T A A A T A A A A T A T T T A T T T G T
G T T T G T G T A A C T A C A A T G T C A A C A T T G T G T T A G A A T T A T A
T T A A T C A G T T A T T T T A T A G C C A G C A A A A T G G T C C A A A C G C
A T T A A G A A A A C A A A A G A T A A C T T A G C T C T G C C A A A G T A G C
A C C T A G G A A A A C A G C A C T T C A G T A A A A T T T C T C C T G C T A T
T C C T T A T A G C C T A T T G C A G G C A A A C A G C A A C A A C T T C A A A
A A C A T A G G C A G A A A T G C A A G A A G G A A G T A C T C A A G G A A C T

40

50

A T T T T C T G T T T C T G A A A A A A A G A T C T T A T T A G T T A G T A T A
T T C T C T A A G G C A T T T T A T A A T C T C A G A G T T G C A A T G A T T G
C C A A A G C A G G T A C A T G G T A A G A C T T A G C A A G A A G A A A A C A
A G A T G A A A A T G A C T G A C C A G T G A A A T C T G A A C T T G T T C C A
A G T A A T T A G A T T T T C T A A G G A G A A A A A A G G C A C A G G A G G T
G C A C A T T T T C A A T T T T G G C T C A A A A A T A A T G A A A A T T A A T T T
A A A A A G T T G G C A A C A A T T A C T A A A A C A T A A A A T A C A A T T T
C C T T T T A C A G A G C T C A A C T A C A T A G A A T A T C A A C A A T A G C
A A G A A C A A T A A A A T A A A C A A A A C A C C C T A A C T G T G G T T C A
C C A G G A A C A A G G A C T A T A G A G A A C T A T T A G A C A T T T T C T A C
A G A C T G A A T C C C A G G G A C T A A A T C C A C A A A G T A G G A T C T A
A T A A T C A A T T C C A A T T A A A C A T C T G C T T G A T C A A T T T T C T
T T C T A A A G C T C A T C C T A T G T T C A A G C T C A C T T T C T T T C T G
T G G A A T T G A A A T C A T T T A A A G G C T C T A G T T T T C A G T T G A T
T G C A G A A G T A T T A C A G T A A T T C T A C A C A C C A A A G A A T G C C
A A A A G A T A G A A A G T C A A C T A T C T G T A A A A G C C A A C T C A G A
T T T C A C C T T G A C A C A T G T A A A C C A T G A A T C A T G T A T T T C A
A A A A A C A G T A G T T G T G G T C A A G T T T A C A T C C T A T T A T T A
T A T C T T T A A A A G A T A G C A A T A A T A T T T A T T A T A T T G T A A A
C A T A G G T C T G T A T C C C A A A A G C A T A A A T C T A G G A A A A G A G
A C A C C C A A T G T A A T G A T G C A C C T G A C A T C C C C T C A C A G G C
T C T T G T G A G A A C T G T A G T G T A A C T T A C T T A A C T G C A A T T G
C T G A G A G C A G A A T T C T G G A G T A T G A T C C A G G G G A A C G T T T
C C C C A C A C C A C T G A G C T A C T T T A C C A G C G A T C A T G A T T G T
G A T G G A A T A G G C T T A T T A A G T T A C A C A T T T A A A A A G T C A T
T A G A A C A T C T C G T T C T T G C A C A C T A G T G T A G A A A G G T C T T
C C A A A G A T A A A A G A G T G T A G G C C T G G T T T A A T T T T C T C A G
C C A G A G C C A T T A T T A T G T T A A G A T C G C C C T C T G C T G T T A A
A T C A A G G T C T A T C T T C A G G T T C C G A A G A G A T T T A A A G G G C
T T T T T T C C C T T C T G C G T A T C G T C T T C T A T A T A T T T T A T T A
G T G T C A A G G C T T T T C T G T G A A G G A C A A G T A G A A A C T G T G C
A A G G A A A G T A C T T C T G A G A G A T A A G C C A G G T T T C A G C T G A
A A G A C C T G A T C C A G G A A G G C T T T C A C T A G A G T G T C T C T G T
G T A A G A C A T C T T G A A A A A T A T T C A A A T C A G G A G T A A A G C T
T T C G T C A G T G T A G A T G A T C G T A T C C T G A G C C A T G T C T T C T
T C T G A A G T G G C T C T C C A G A A G G C T G T C A G C T C G G A T C T C A
T G T A T C T A C G C T G A T T A T A A A T A T G T T C A T G A C A G G G T G G
C A T C T G C T T C A C A G T A T T G A C A T C C A C A T C T A T G T G T G T G
G T G G G A T A T G G A G C A T A C A T G A C T T G C C G G A A A G G C A G C A
C A A A G C T T C C A G T T G A A T C C T T T A G C A G G C C T T G T A C A A A
G A G C C C T G A C T C A T A T T T A A A T G A T G A T T C T G C T T C A C A T
A A C C T G G A G C A T T T T C T C T C T G C T G G A G T C A G A A A A A G G C
A T A A T G T T C T G A C T A T C T T A T T T A C T T T C T C T G C A C T G C T
A C C T A C T A C A A C G G A A C A G C C A C A G G T T T G C A A G T G T G A G
C T G A T G G C A T T G A G A A G A A A G C C T T C A T G A C A G C T G T C A C
C A A T A T C A T C A T C A T T G A G T A C T G T A T C A G C T A T A T C T A T
T T C T T C A G G A A C A C T G T G T G A T T T C A T A G A T G A A A G C A G T
T C C A T T A C A G G A A T C A C T T C T C C A G T A A G C A T T G G A A T A A
T A C T C T G A C C C T G A T C T T C C A T T C T C T C T G T G C C T T C T A A
G A T A A T C T T C T G G A C A T T T T C T T G T C T T T C C T T A T G C A T C

10

20

30

40

50

C A T A T T C T T C C T T T C C G G A T T A T A T G T G T T A A T C T A T C A A
C A C A C A C T C T A T G A A G T G G G A G G T A G A A A C T A A G T T C T G T
C T G T G G A A G T A T A A T T G A T A G T C C A T A T G T G C T G C G A T C C
C C A T T C C A G T T T C C A T C A A A G A T T A A T G A A A C A A T A A T C A
C T C C C T T T T C A G A C A A G A C A A A A A A C T T T A C A T C T A T A G C
A C C A C T C T C T G C A T T T C G A A G G A T T T C T C C A T T T A G A G T G
T G G T T G G C A A G A A A A G T T A T T T C T C C A T C A C T G A G A A G T A
C C T G T T C T G T C T T T G G A G C C C A A A T G T G C C T T A C T C T A G G
A C C A A G A A T A T T G T C C C A G T A A G C A A A A G T A G C T G C T A A T
A A A G G T G A T T T G C C A C T T A A A G C A A T C T C T G T C T T G G C A A
C A G C T G G A G A T G G C G G T G G G C A A A G A G T C G A C A T C A C T G C
A T T C C A A C T G T C A C A T T A T C C A A A T G C T C C G G A G A T A T C T
C C T A A A C C C A C A C C T G C T C T T G C T A G A C C C C G C C C C C A A A
A G A G A A G C A A C C G G G C A G C A G G G A C G G C T G A C A C A C C A A G
C G T C A T C T T T T A C G T G G G C G G A A C T T G T C G C T G T T T G A C G
C A C C T C T C T T T C C T A G C G G G A C A C C G T A G G T T A C G T

配列番号 6

> 配列番号 2 の逆相補体

A A A A T T T C A A A T A T A T T T T A T T C A A A A T T C T C C A T C T A G G
A G A A A A G A T A T A T A A C A A T G T T T A C A C A T G C T T T A A T A A C
T T A T T T C A C T G T A C A A C T T A C A T T C T A T A T A A C A G T A C A A
T A A A C C A G C C A A A G A A A A T A A C C A G G T A G C A C T T A A A T A A
G A A T C T A T C A T G T A A A A A C A T A G T A T G G G A C A C T A C G A G
A T A G T A T T T A T A T A T T T T T T A A A T G A C T G A G C T A C A G T A C
A A C A G T C A T C T A G T T C A G G G G T T G T C T G A A A A A T C A A G C T
G C C A C A T C T T T C T G A T T A A T G A T G G G A A A G C T A T T A T G A C
C T T T C A C A T T A G A A C A T A T C A T T T T G T T G T G T A A A T T T G G
T G G C T G G G G G A C A G A A G A G C T C T A T T A C C T T T A T T C C T T T
C T T A T A A A T A T A T T T T C C C T T T T A T G T T A C T T C C A G T T T T
A A A T A A A A T A T T T G T G T T T G T G T A C A C T A C A A T G T C A A T A
T T G T G T T A G A A T T A T A T T A A T C A G T T A T T T T A C A G C C A G C
A A A A T G G T C C A A A C G C A T T A A G G A A A C A A A A G A A A C A G A C
C A C T T A G C T C T G C C A A A G T A G C A C C T A G A A A A A T A G C A C T
T C A G T A A A A T T T C T C C T G C T A T T C C T T A T A G C C T A T T G C A
G G C A A A T G G C A A C A A C T T C A A A A A C A T G G G C A G A A A T G T A
A G A A G G A A G T A C T C A A G G A A C T A T T T T C T G T T C C T G A A A A
A A A A G A T C T T A T T A G T T A A T A T A T T C T C T A A T G C A T T T T A
T A A T C T C A G A G T T A C A A T G A T T G C C A A A G C A G G T A C A T G G
T A A G A C T C T G C A A G A A G A A A A C A A G A T G A A A A C G A C T G A C
C A G T G A A A T C T G A A C T T C T T C C A A G T A A T T C G A T T T T C C A
A G G A A A A A A A A G G C A C A G G A G G T G C A C A T T T C A A T T T G G C
T C A A A A A T A A T G A A A A T T A A T T T A A A A A G T T G G C A A C A A C
T A C T A A A A C A T A A A A T A C A A T T T C C T T T T A C A G A G C T C A A
C T A T A T A G A A C A T C A A C A A T A G C A A C A A C A A T A A A A C A A A
C A A A A C A T C C T A A C T G T G G T T C A C C A T G A G C A G G G A C T A T
A G A G A A C T A T C A G A C A T T T C T A C A G A C T G A A T C C C G A G G G
C T A A A T C C A C A A A G C A G G A T C T A A T A A T C A A T T C C A A T T A
A A C A T C T G C T T G A T C A A T T C T C T T T C T A A A G C T T A T C C T A
T G T T G A A G C T C A C T T T C T T T C T G T G G A A C T G A A A T C A T T T
A A A G G C T C T A A T T T T C A G T T G A T T G C A G A A G T A T T A C A G T

10

20

30

40

50

A A T T C C A C A C A C C A A A G A A T G C C A A A A G A T A G A A A G T C A A
C T A A T A T C T G T A A A A G C G A A C T C G G A T T T C A C C T T A A T A C
A T G T A A A C C A T G A A T C A T A T A T T T C A A A A A A C A G C A G T T
G T G G T C A A G T T T A T A T C C T A T T A T T A T A T A T T T A A A A G A C
A G C A A T A A T A C C T A T T A T A T T G T A A A C A T A G G T C T G T A T C
C C A A A A G C A T A A A T C T A G G A A A A G A G A C A T C C A A T G T A A T
G A T G C A C C T G A C A T C C C C T C A C A G A C T C T T G T G A G A A C T G
T A G T G T A A C T A A C T T A A C T G C A A C T G C C G A G C A G A G C T C T
G G A G T A T G A T C C A G G G G A A T G T T T C C C C A C A C C A C C G A G C
T A C T T T A G C A G C G A T C A C G A T T G T G A T G G A A T A G G C T T A T
T A A G T T A C A C A T T T A A A A A G T C A T T A G A A C A T C T C G T T C T
T G T A C A C T A G T G T A G A A A G G T C T T C C A A A G A T A A A A G A G T
G T A G G C C T G G T T T A A T T T T C T C A G C C A G A G C C A T T A T T A T
G T T A A G A T C G C C C T C T G C T G T T A A A T C A A G G T C T A T C T T C
A G G T T C C G A A G A G A T T T A A A G G G C T T T T T T C C C T T C T G C G
T A T C A T C T T C T A T A T A T T T T A T T A G T G T C A A G G C T T T T C T
G T G A A G G A C A A G T A A A A A C T G T G C A A G G A A A G T A C T C C T G
A G A G A T A A G C C A G G T T T C A G C T G A A A G A C C T G A T C C A G G A
A G G C T T T C A C T A G A G T G T C T C T G T G T A A G A C A T C T T G A A A
A A T A T T C A A A T C A G G A G T A A A G C T T T C G T C A G T G T A G A T G
A T C G T A T C C T G A G C C A T G T C T T C T T C T G A A G T G G C T C T C C
A G A A G G C T G T C A G C T C G G A T C T C A T G T A T C T A C G C T G A T T
A T A A A T A T G T T C A T G A C A G G G T G G C A T C T G C T T C A C A G T A
T T G A C A T C C A C A T C T A T G T G T G T G G T G G G A T A T G G A G C A T
A C A T G A C T T G C C G G A A A G G C A G C A C A A A G C T T C C A G T T G A
A T C C T T T A G C A G G C C C T G T A C A A A G A G C C C T G A C T C A T A T
T T A A A T G A T G A T T C T G C T T C A C A T A A C C T G G A G C A T T T T C
T C T C T G C T G C A G T C A G A A A A A G G C A T A A T G T T C T G A C T A T
C T T A T T T A C T T T C T C T G C A C T G C T A C C T A C T A C A A C G G A A
C A G C C A C A G G T T T G C A A G T G T G A G C T G A T G G C A T T G A G A A
G A A A G C C T T C A T G A C A A C T G T C A C C A A T A T C A T C A T C A T T
G A G T A C T G T A T C A G C T A T A T C T A T T T C T T C A G G A A C A C T G
T G T G A T T T C A T A G A T G A A A G C A G T T C C A T T A C A G G A A T C A
C T T C T C C A G T A A G C A T T G G A A T A A T A C T C T G A C C C T G A T C
T T C C A T T C T C T C T G T G C C T T C T A A G A T A A T C T T C T G G A C A
T T T T C T T G T C T T T C C T T A T G C A T C C A T A T T C T T C C T T T C C
G G A T T A T A T G T G T T A A T C T A T C A A C A C A C A C T C T A T G A A G
T G G G A G G T A G A A A C T A A G T T C T G T C T G T G G A A G T A T A A T T
G A T A G T C C G T A T G T G C T G C G A T C C C C A T T C C A G T T T C C A T
C A A A G A T T A A T G A A A C A A T A A T C A C T C C C T T T T C A G A C A A
G A C A A A A A A C T T T A C A T C T A T A G C A C C A C T C T C T G C A T T T
C G A A G G A T T T C T C C A T T T A G A G T G T G G T T G G C A A G A A A A G
T T A T T T C T C C G T C A C T G A G A A G T A C C T G T T C T G T C T T T G G
A G C C C A A A T G T G C C T T A C T C T A G G A C C A A G A A T A T T G T C C
C A G T A A G C A A A A G T A G C T G C T A A T A A A G G T G A T T C A C C A C
T T A A A G C A A T C T C T G T C T T G G C A A C A G C T G G A G A T G G C G G
T G G G C A A A G A G T C G A C A T C A C T G C A T T C C A A C T G T C A C A T
T A T C C A A A T G C T C C T G A G A T A T C T C C T A A A C C C A C A C C T G
C T C T A G C C A G G C C C C G C C C C C A G A G A G A A G G A A C C G G G C A
G C A G G G A C G G C T G A C G C A C C A A G C G T C A T C T T T T A C G T G G

10

20

30

40

50

G C G G A A C T T G T C G C T G T T T G A C G C G C C T C T C T T T C C T A G C
G G G A C A C C G T A G G T T A C G T

配列番号 7

> 配列番号 1 2 3 の逆相補体 配列番号 3

C A G A A T T T C A A A G G T A T T T T A T T C A A A A T T C C C C A T C T A G
G A G A A A A G A T A T A T A A C A G T G T T T A C A C A T G C T T C A A T A A
C T T A T T C A C T G T A C A G C T T A C A T T T T C T A T A A C A A C A C A G
T A A A G C A G C A A A G A C A A C A A T T A G C A C T C A A A T A A G A T T C
T A C T G T G T A A A G C A A T G A G C G G C A C A C T A G G A G G T G G G A C
C T A C T C G C T T A C C A T G A C G G A G T G C C T T G C A G T T A G T T C A
C A A G C C A T C A T G G T C A G T G T G T G T T G T T C T G A T T T G T A A T
G C C A A A G C C A C C G T G A C C T T T C A G A A T A G A A A G C T T T T T C
T C G C T A A A T C T G G T G G G T G A G G A A C G G G G C C C A T T T T T A T
C C C T T T T G T A A A A A T A A A T A T A T T C T C C C T T T T T A T G C T
A A G T C C A C A G T T T T A A A T A G A A A C A C A T A T T T G T G T T T G T
G T A T A C T C C T A C A C T G C T G T T G C A C A G A A C T C C A C T A A T C
A G T A C T T C A C A G C T A G C G A G A T A G T C G A A C G T T A C A G G A A
C A G A A A C A G A C C A C T T G A G T T T G C C A T A G T A G C A C C T A G A
A A A A T A G C A C T G G G T C A G A T T T C T C T G C T G T T C C T A T G A T
G C A G G T G A C A C G G G A A A C A C C A G A G T A C A G G C A G A A A C C A
A A G G A A A G A G G C A A G A C G C T T C C C T G C T C T T C A A A G A T C T
T A T C A G C G A A T G T A C T C T G A C A T A C T T A A C A A G G A C T T C T
A A T C T A A G C C A G G C A C A C G G C A G C C G T G C A A A G G G T G G T C
A G A T G A A A G T G A C T G G G C C C T G A A A T C T G A C C C T C T G C C A
A G A A A T T A T A T T T T C C A A G A T T G G G A A A G G C A C A G G A G G T
G C G C A T T T T A A T T C G G C T C A A A A A T A A T G A A A A T T A A C C T
T A A A A G T T G G C A A C A A T T A T A A A A A C A A A T G C C A C T T T C T
T T G A C A G A A C T A C A A T A A A C C A A C A A A A A A C T T G T C A C A G
G T C A C G A T A C T C A G G G C C C A T G C A T G A C C C C T C G G C A T T T
C T G T A C A G A C C G A A T C T G A A G G A C T A C G T C T A T A A A G G A A
G G G C T A A C A A C T G A T T T C A C C T A C A G C T C T G C C C T A T C A G
T G T C T T C T C T C A A G A A C T A A T C T G T A G T C A G A C T A A G T T C
C T T T C T G A G G A A C T G C A A A C T T T A A A T G C T C T A A T G T T T A
G C T G T G G C A G A A G T A A T C G G A C A T A C C A C A G A A C A C A G A G
G G G C A G G A A G T C A A C T C A C A C T T T A T C T G T A A A G C T A A C G
A G G G T T T C A G T G T G G T A C A T G T A A A C C A G G A A T C A T A A G T
T T C C A A G A A A A C A A A C A A A A C A A A A C A A A A A C C A A T C A G
C A G T T A T G G T C A A G T G T A T A T T C C A T C A T T C A T A T C T T T A
A A A G A C A G C A A T A G T A C T T A G G A T A A T T G T A A A C A T A A G G
C C C T A A A A G A G T A C A T C T A T T C T A G G A A G A G T C A T T C A C T
G T A A C G A T G C A C C T G A C A T C A G G T A C A G A C T T C T A C T G A C
A A G T G T A G T G T A C C C T G T C C T G C A G C A G G A C T C G G G A G G A
A G G A T G T G C C C A C A C A C T G C T G A G A C A C T G T A A C A G C A G G
T G T G A C T G T G A A G A G A C A G A C A C A G C A A A C C A C A C G G T C A
A A A G G T C A T T A G A A C A T C A C G T T C T T G T A C A C T A G T G T A G
A A A G G T C T C C C A A A G A T G A A A G A G T G T A G G C C T G G C T T A A
T T T T C T C A G C T A G A G C C A T T A T T A T G T T A A G A T C G C C C T C
T G C T G T T A A A T C A A G A T C T A T C T T C A G G T T C C G A A G A G A C
T T A A A G G G C T T T T T C C C C T T C T G C G T A T C A T C C T C G A T G T
A C T T G A T T A G T G T C A A G G C T T T T C T G T G A A G A A T G A G G A G

10

20

30

40

50

G A A C T G T G C A A G G A A A G T A C T C C T G A G A G A C A G G C C A G G C
T T C A A A T G G A A G A C C T G A T C C A G G A A G G C T T T C A C T A G A G
T G T C T C T G T G T A A G A C A T C T T G G A A A A T A T T C A A A T C A G G
A G T G A A G C T C T C A T C T G T G T A G A T G A T G G T G T C C T G C G C C
A T G T C C T C T T C T G A A G T T G C C C T C C A G A A G G C T G T C A G C T
C T G A C C T C A T G T A T C T G C G T T G A T T A T A A A T A T G T T C A T G
A C A C G G T G G C A T C T G C T T G A C A G T G T T G A C A T C C A C A T C A
A T G T G C G T G G T G G G G T A C G G G G C A T A C A T A A C T T G C C G G A
A G G G T A G G A C A A A A C T G C C T G T T G C A T C C T T T A G C A A G C C
T T G C A C A A A G A G T C C C G A T T C G T A C T T A A A G G A C G A T T C T
G C T T C A C A C A G C C T G G A G C A T T T C C T C T C T G C T G G T G T C A
G A A A A A G G C A C A G C G T T C T T A C T A T C T T A T T T A C T T T C T C
T G C A C T G C T G C C A A C T A C A A C G G A A C A G C C A C A G G T C T G C
A G G T G T G A G C T G A T G G C A T T G A G A A G A A A G C C T T C G T G A C
A G C T G T C A C C A A T G T C A T C A T C A T T G A G C A C T G T A T C A G C
T A T A T C A A T G T C T T C A G G A A C A C T G T G G G A T T T C A T A G A T
G C A A G C A G C T C C A T T A C A G G A A T G A C T T C C C C A G T A A G C A
T G G G A A T G A T A C T C T G A C C C T G A T C T T C C A T C C T C T C T G T
G C C T T C C A A G A C A A T T T T C T G G A C A T T T T C T T G T C T T T C C
T T A T G C A T C C A T A T T C T T C C T T T T C G A A T A A T G T G T G T T A
G C C T G T C A A C A C A C A C T C T G T G A A G T G G G A G G T A G A A G C T
C A G C T C T G T C T G C G G C A G T A T A A T T G A T A G T C C A T A A G T G
C T C C G A T C T C C A T T C C A G T T T C C G T C G A A G A T T A A T G A A A
C A A T A A T T A C C C C T T T T T C A G A T A A G A C A A A A A A T T T T A C
A T C T A T A G C C C C A C T C T C T G C A T T T C G A A G A A T T T C T C C A
T T T A G A G T G T G G T T G G C A A G A A A A G T T A T T T C T C C A T C A C
T G A G A A G C A C T T G G T C T G T C T T T G G A G C C C A A A T A T G C C T
T A C T C T A G G A C C A A G A A T A T T A T C C C A G T A A G C A A A G G T A
G C C G C C A A C A A G G G T G A T T C A C C A C T T A A A G C A A T C T C T G
T C T T G G C A A C A G C A G G A G A T G G T G G G G G G C A G A T A G T C G A
C A T C C C T G C A T C C C A G G T C T C A C T G C A T T C C A G G T C T C A C
A T T A T C C G A A C G C T T G C A A T A G C C A C T C G C C G C T G C T G C G
C C T T C A C C G C C G G C G C A G G G A C C G C A A C C G C

配列番号 8

> 配列番号 4 の逆相補体

T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T G A A T T T T A A A G G T A T T
T T A T T C C A A A T T C C C C A T C T A G G A G A A A A G A T G T A T A A C A
G T G T T T A C A C A T G C T T C A A T A A C T T A T T C A C T A T A C A A C T
T A C A T T C T C T A A A A C A A C A G A G T A A A C C A G C A G A G A C A A C
A C T T A G C A C T T A A A T A A G A T T C T A C T G T G G G A A G C A A T G G
T G T G G C A C A C T A G A A G G A G G G A T C T A C C C A T T T A C C A T G A
T G G A G T G A C T T G G A G T T C A T A A G C C A T C A T G G A C A G T G T G
C G T T G T T C T G A T G T G T C A T G T C A A A A C C A C T G T G A C C T T T
C A G A A T A G A A T G T T T T T T T C T G A C T A A A T C T G G T G G G T G A
G G A A A G G G T T C C A T T T T T A T C C C T T T T G T A A A A A A T A A A T
A T A G T C T C C C T T T T T A T G C T A A G T C C A C A G T T T T A A A T A A
A A C A C T T A C T T G T G T T T G T G T A T A C C C T A C A C T G C T G T A G
C A C G G A G C T T T A C C A G T C A G T A C T T C A C A G C C A G C A A G G T
A C G A A C G T T A C A G G G A C A G A G A C G G A C C G C T T G A G T T T G C
C A C A A T A G C A C C T A G A G A A A T A G C A C T G G G G T C A G A G T T C

T C C T G C T G T C C T T A G G A T G C A G G G A A C G T G G A G A A C A C C A
A A G T C C A G G C A G A A A T G A A A G G A A A G A G G C A A G A A G C T C T
C C T G C T C T G C A A A G A A G A T T T T A T C A G C G A A T G T A C T C T C
T G G C A T A G T T T A C A A G A A C T T C T A A G C C A G G C C C A T G G C G
G A C T G T G C A A A G G G A A G T C A G A C G A A A G T G A C T G G G C C C T
G A A A T C T G A C C T T C T G C C A A G A A A T T A T A T T T T C C A A G A T
T G G G A A A G G C A C A G G A G G T G C A C A T T T T A A T T T G G C T C A A
A A A T A A T G A A A A T T A A C C T T A A A A C T T G G C A A C A A T T A T A
A A A A C C A A T G C C A C T T T C T T T G A C A G A A G T A C A A T A A A C C
A A C A A A A A G C A T A C C A C A G T T C A C G A T A T T C A G T G C C C A T
G C A T G A T G G T T G G G C A T G T C T A T A C A G A C C A C A T C T A A A G
G A C T A A G T C T A T A A A G G A A G A T C C A A C A A C T G A C T T C A C C
T A A A A C T C C G C T T T C T C A T G T C T T C T T T C A A A A A C G A A T C
T G C A G A C A G A C T A A G T T G C T T T C T G T A G A A C T G C A A A C A A
A G T G C T T T A G T T T T T A G T T G T T G C A A A A G T G A T C C T A C A C
G C C A C A G A T C G T A C A G G C C A G A G A A C A C A G G G A C A G G C A G
T C A A C T C A C A G C T T A C C T G T A A A A A G C T A A C T A G G G T T T C
A G T G T G A T G C A T G T A A A C C A T G A A T T A T A A G T T T C A A A A A
A C A A A A A C A A C A A A A C C A A C C A G C A G T T G T G G T G A A G T T T
A C A T C C C T T C A T T C G T A T C C T T A C A A G A C A G C A C T A G T A C
T T A G G A G G G T T G T A A A C A T A A G T C C C T A C G A G G G T A C A T C
T A G T C T A G G A A A A G A G A C A T T C A C T A C A A C G A T G T A C C T G
A C A T C T G G T A C A G A C C T C T A C T G A C A A G T G T A G T G T A A C G
T G T C C T G C G G C A G G A C C C T G G A G G A A G G A T G T G T C C A A A G
C G C T G A G A C A C T G T A A C A G C A A G T G T G A C T G T C A T G A G A C
A C A C G G A G C A A A C C A C A T G T T T A A A A A G T C A T T A G A A C A T
C A C G T T C T T G G A C A C T A G T G T A G A A A G G T C T C C C G A A G A T
G A A A G A G T G T A G G C C T G G C T T A A T T T T C T C A G C T A G A G C C
A T T A T T A T G T T A A G G T C G C C C T C T G C T G T T A A A T C A A G A T
C T A T C T T C A G G T T C C G A A G A G A C T T A A A G G G C T T T T T C C C
C T T C T G C G T G T C A T C C T C T A T G T A C T T G A T T A G T G T C A A G
G C T T T T C T G T G A A G A A T G A G G A G G A A C T G T G C A A G G A A A G
T A C T C C T G A G A G A C A G G C C A G G C T T C A A A T G G A A G A C C T G
A T C C A G A A A G G C T T T C A C T A G A G T G T C T C T G T G T A A G A C A
T C T T G G A A A A T A T T C A A A T C A G G A G T G A A G C T C T C A T C T G
T G T A G A T G A T G G T G T C C T G A G C C A T G T C C T C T T C T G A A G T
T G C C C T C C A G A A A G G C T G T C A G C T C T G A C C T C A T G T A T C T G
C G T T G A T T A T A A A T A T G T T C A T G A C A C G G T G G C A T C T G C T
T G A C A G T G T T G A C A T C C A C A T C G A T G T G T G T G G T G G G A T A
A G G G G C A T A C A T A A C T T G C C G G A A A G G T A G T A C A A A A C T G
C C A G T C G C A T C C T T T A G C A A G C C T T G T A C A A A G A G T C C A G
A T T C G T A T T T A A A G G A C G A T T C G G C T T C A C A C A G C C T G G A
G C A C T T C C T C T C T G C T G G T G T C A G A A A A A G G C A C A G T G T T
C T T A C T A T C T T A T T T A C T T T C T C T G C A C T G C T G C C T A C C A
C C A C A G A A C A G C C G C A G G T C T G C A G A T G T G A G C T G A T G G C
A T T G A G A A G A A A G C C T T C A T G A C A G C T G T C A C C A A T G T C A
T C A T C A T T G A G T A C T G T A T C A G C T A T A T C G A G G T C T T C A G
G A A C A C T G T G T G A T C T C A T A G A C G C A A G C A G C T C C A T C A C
A G G G A T G A C C T C C C C A G T A A G C A T A G G G A T G A T A C T C T G A
C C C T G A T C T T C C A T C C T C T C G G T G C C T T C C A A G A C A A T T T

10

20

30

40

50

TCTGGACATTTTCTTGTCTTTCCTTGTGTCATCCATATCCT
TCCTTTTTCGAATGATGTGCGTTAGCCTGTCAACACACACT
CTGTGCAGTGGGAGGTAGAAACTCAGCTCCGTCTGCGGCA
GTATAATTGATAGTCCGTAAGTGCTCCGATCTCCGTTCCA
GTTCCCGTTCGAAGATTAAATGAAACAATAATGACGCCCTTT
TCAGATAAGACAAAAAACTTTACATCTATTGCCCCACTCT
CCGCATTCCGAAGAATTTCTCCATTTCAGAGTGTGGTTGGC
AAGAAAAAGTGATTTCTCCATCACTGAGGAGTACTTTGGTCT
GTCTTTTGGAGCCCAAATGTGCTTACTCTAGGACCAAGAA
TATTATCCCAGTAAGCAAAGGTAGCCGCCAACAAAGGGTGA
TTCACCACTTAAAGCAATCTCTGTCTTGGCAACAGCAGGA
GATGGTGGGGGGCAGATAGTGCACATCCCTGCATCCCAGG
TCTCACATTATCCAAACGCTTGTCAATAGCCACTCGCCGCC
GCTGCGCCTTCAACCGCCGGCGCAGGGACCGCAACCGCAGC
CGGCTCCGGGCCCCCGCCCGCCCGCCCTCCACGCCCCC
CGAGTCCGGCCCCGTCGTAGCCCCCGCCCCCAACCACGGCCG
CTCCAGATTCTGCAAGGGGTCTGTGTCCGGTTCTTTTAAAT
CTGGTTTTCCTTCTTTTGTCTTTGGTCAACCGTTATGGAGTC
AAGTTGCGATCTGAGGCAACCAAACGCACTCTGCTAGCA
TACCCTGCTGGAAGTGTCTAGACACCACTCCACAGAGAA
GGAAACAGGCAATTGGGATGGCTGACACTACAAACG

配列番号 9

>NM_145005.6 Homo sapiens C9orf72-SMCR8 複
合体サブユニット (C9orf72)、転写バリエーション 1、mRNA
ACGTAACCTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGTGCGTC
AAACAGCGACAAGTTCCGCCACGTAAG
ATGACGCTTGATATCTCCGGAGCATTTGGATAATGTGACA
GTTGGAATGCAGTGATGTGACTCTTTGCC
CACCGCCATCTCCAGCTGTTGCCAAGACAGAGATTGCTTT
AAGTGGCAAATCACCTTTATTAGCAGCTAC
TTTTTGCTTACTGGGACAATATTCTTGGTCTTAGAGTAAGG
CACATTTGGGCTCCAAAGACAGAACAGGTA
CTTCTCAGTGATGGAGAAATAACTTTTCTTGCCAAACCACA
CTCTAAATGGAGAAATCCTTCGAAATGCAG
AGAGTGGTGCTATAGATGTAAAGTTTTTTGTCTTGTCTGA
AAAGGGAGTGATTATTGTTTCAATTAATCTT
TGATGGAAACTGGAATGGGGATCGCAGCACATATGGACTA
TCAATTATACTTCCACAGACAGAACTTAGT
TTCTACCTCCCACTTTCATAGAGTGTGTGTGTTGATAGATTAA
CACATATAATCCGGAAAGGAAGAATATGGA
TGCATAAGGAAAGACAAGAAATGTCCAGAAAGATTATCTT
AGAAAGGCACAGAGAGAAATGGAAGATCAGGG
TCAGAGTATTATTCCAATGCTTACTGGAGAAAGTGATTCTT
GTAATGGAACCTGCTTTTCATCTATGAAATCA
CACAGTGTTCTCTGAAGAAATAGATATAGCTGATACAGTAC
TCAATGATGATGATATTGGTGACAGCTGTC
ATGAAGGCTTTCTTCTCAAGTAAGAAATTTTCTTTTTCATA
AAAGCTGGATGAAGCAGATACCATCTTATG
CTCACCTATGACAAGATTTGGGAAGAAAGAAATAACAGAC
TGTCTACTTAGATTGTCTAGGGACATTAC

GTATTTGAAC TGTGCTTAAATTTGTGTTATTTTTCAC TC
ATTATATTTCTATATATATTTGGTGTTATT
CCATTTGCTATTTTAAAGAAACCGAGTTTCCATCCCAGACA
AGAAATCATGGCCCCCTTGCTTGATTCTGGT
TTCCTTGTTTTACTTCTCATTTAAAGCTAACAGAAATCCTTT C
ATATTAAAGTTGTACTGTAGATGAACCTTAAG
TTATTTAGGCGTAGAACAAAATTTATTCATATTTATACTGA
TCTTTTTTCCATCCAGCAGTGGAGTTTAGTA
CTTAAGAGTTTGTGCCCCCTTAAACCAGACTCCCTGGATTAA
TGCTGTGTACCCGTGGGCAAGGTGCCTGAA
TTCCTCTATACACCTATTTTCCTCATCTGTAAATAATGGCAATA
ATAGTAATAGTACCTAATGTGTAGGGTTGT
TATAAGCATTGAGTAAGATAAATAAATAAAGCACTTAGA
ACAGTGCCTGGAACATAAAAAACACTTAATA
ATAGCTCATAGCTAACATTTTCCTATTTTACATTTCTTCTAG
AAATAGCCAGTATTTGTGTGAGTGCCTACAT
GTTAGTTTCCTTTTACTAGTTGCTTTTACATGTATTATCTTAT
ATTCTGTTTTTAAAGTTTCTTTCACAGTTACA
GATTTTTCATGAAATTTTACTTTTAAATAAAAGAGAAAGTAAA
AGTATAAAAGTATTCACCTTTTATGTTTCACAG
TCTTTTTCCTTTAGGCTCATGATGGAGTATCAGAGGCATGA
GTGTGTTTTAACCTAAGAGCCTTAATGGCTT
GAATCAGAAAGCACTTTAGTCCCTGTATCTGTTTCAGTGTCAG
CCTTTTCATACATCATTTTAAATCCCATT TTG
ACTTTAAAGTAAGTCACTTAATCTCTCTACATGTCAATTT C
TTCAGCTATAAAATGATGGTATTTTCAATAA
ATAAATACATTAAATTAAATGATATTATACTGACTAATTGG
GCTGTTTTTAAGGCTCAATAAGAAAAATTTCT
GTGAAAGGTCTCTAGAAAAATGTAGGTTTCTTATACAAATAA
AAGATAACATTGTGCTTATAAAAAAAA

10

20

30

配列番号 10

配列番号 9 の逆相補体

TTTTTTTTTATAAGCACCAATGTTATCTTTTATTTGTATAGG
AACCTACATTTTCTAGAGACCTTTTCACAGAAATTTTCTTA
TTGAGCCTTAAACAGCCCAATTAGTCAGTATAATATCAT
TTAATTAAATGTATTTATTTATTTGAAATACCATCATTTTAT
AGCTGAAGAAATTTGACATGTAGAGAGATTAAAGTGACTTAC
TTAAAGTCAAATGGGATTTAAATGATGTATGAAAGGCTG
ACACTGAACAGATACAGGACTAAAGTGCCTTCTGATTCAAG
CCATTAAAGGCTCTTAGGTTAAACACACTCATGCCCTCTGAT
ACTCCATCATGAGCCTAAAGGAAAGAGACTGTGAACATAAA
AGTGAATACTTTTATACTTTTACTTCTCTTTTATTTAAAGT
AAAAATTTTCATGAAATCTGTAACTGTGAAGAAACTTTTAA
ACAGAATATAAGATAATACATGTAAAGCAACTAGTAAAGG
AACTAACATGTAGGCACCTCAACAAATACTGGCTATTTCTA
GAAGAAATGTAAATAGGAAATGTTAGCTATGAGCTATTAT
TAAGTGTTTTTATGTTCCAGGCACCTGTTCTAAGTGCTTTA
TATTATTTATCTTACTCAATGCTTATAACAACCCCTACACA
TTAGGTACTATTACTATTATTGCCATTTTACAGATGAGGA
AATAGGTGTATAGAGAATTTCAGGCACCTTGCCCAACGGGTA

40

50

C A C A G C A T T A A T C C A G G G A G T C T G G T T T A A G G G C A C A A A C
T C T T A A G T A C T A A A C T C C A C T G C T G G A T G G A A A A G A T C A
G T A T A A A T A T G A A T A A T T T T G T T C T A C G C C T A A A T A A C T T
A A G T T C A T C T A C A G T A C A A C T T A A T A T G A A A G G A T T C T G T
T A G C T T T T A A T G A G A A G T A A A A C A A G A A A C C A G A A T C A A G C
A A G G G G C C A T G A T T T C T T G T C T G G G A T G G A A A C T C G G T T T
C T T T A A A T A G C A A A T G G A A T A A C A C C A A A T A T A T A T A G A A
A T A T A A T G A G T G A A A A A T A A C A C A A A T T T A A G C A A C A G T T
C A A A T A C G T A A T G T C C C T A G A A C A A T C T A A G T A G A C A G T C
T G T T A T T T T C T T T C T T C C A A A T C T T G T C A T A G G T G A G C A T 10
A A G A T G G T A T C T G C T T C A T C C A G C T T T T A T G A A A A G A A A A
A T T C T T A C T T G A G A A G A A A G C C T T C A T G A C A G C T G T C A C C
A A T A T C A T C A T C A T T G A G T A C T G T A T C A G C T A T A T C T A T T
T C T T C A G G A A C A C T G T G T G A T T T C A T A G A T G A A A G C A G T T
C C A T T A C A G G A A T C A C T T C T C C A G T A A G C A T T G G A A T A A T
A C T C T G A C C C T G A T C T T C C A T T C T C T C T G T G C C T T C T A A G
A T A A T C T T C T G G A C A T T T T C T T G T C T T T C C T T A T G C A T C C
A T A T T C T T C C T T T C C G G A T T A T A T G T G T T A A T C T A T C A A C
A C A C A C T C T A T G A A G T G G G A G G T A G A A A C T A A G T T C T G T C 20
T G T G G A A G T A T A A T T G A T A G T C C A T A T G T G C T G C G A T C C C
C A T T C C A G T T T C C A T C A A A G A T T A A T G A A A C A A T A A T C A C
T C C C T T T T C A G A C A A G A C A A A A A A C T T T A C A T C T A T A G C A
C C A C T C T C T G C A T T T C G A A G G A T T T C T C C A T T T A G A G T G T
G G T T G G C A A G A A A A G T T A T T T C T C C A T C A C T G A G A A G T A C
C T G T T C T G T C T T T G G A G C C C A A A T G T G C C T T A C T C T A G G A
C C A A G A A T A T T G T C C C A G T A A G C A A A A G T A G C T G C T A A T A
A A G G T G A T T T G C C A C T T A A A G C A A T C T C T G T C T T G G C A A C
A G C T G G A G A T G G C G G T G G G C A A A G A G T C G A C A T C A C T G C A
T T C C A A C T G T C A C A T T A T C C A A A T G C T C C G G A G A T A T C A A 30
G C G T C A T C T T T T A C G T G G G C G G A A C T T G T C G C T G T T T G A C
G C A C C T C T C T T T C C T A G C G G G A C A C C G T A G G T T A C G T

配列番号 1 1

>NM_018325.5 Homo sapiens C9orf72-SMCR8 複
合体サブユニット (C9orf72)、転写バリエント2、mRNA

G G T T G C G G T G C C T G C G C C C G C G G C G G C G G A G G C G C A G G C G
G T G G C G A G T G G A T A T C T C C G G A G C A T T T G G
A T A A T G T G A C A G T T G G A A T G C A G T G A T G T C G A C T C T T T G C
C C A C C G C C A T C T C C A G C T G T T G C C A A G A C A
G A G A T T G C T T T A A G T G G C A A A T C A C C T T T A T T A G C A G C T A 40
C T T T T G C T T A C T G G G A C A A T A T T C T T G G T C
C T A G A G T A A G G C A C A T T T G G G C T C C A A A G A C A G A A C A G G T
A C T T C T C A G T G A T G G A G A A A T A A C T T T T C T
T G C C A A C C A C A C T C T A A A T G G A G A A A T C C T T C G A A A T G C A
G A G A G T G G T G C T A T A G A T G T A A A G T T T T T T
G T C T T G T C T G A A A A G G G A G T G A T T A T T G T T T C A T T A A T C T
T T G A T G G A A A C T G G A A T G G G G A T C G C A G C A
C A T A T G G A C T A T C A A T T A T A C T T C C A C A G A C A G A A C T T A G
T T T C T A C C T C C C A C T T C A T A G A G T G T G T G T
T G A T A G A T T A A C A C A T A T A A T C C G G A A A G G A A G A A T A T G G
A T G C A T A A G G A A A G A C A A G A A A A T G T C C A G 50

AAGATTATCTTAGAAGGCCACAGAGAGAATGGGAAGATCAGG
GTCAGAGTATTATTCCAATGCTTACTGGAG
AAGTGATTTCCTGTAATGGAAGCTGCTTTTCATCTATGAAATC
ACACAGTGTTCCCTGAAGAAATAGATATAGC
TGATACAGTACTCAATGATGATGATATTGGTGACAGCTGT
CATGAAGGCTTTCTTCTCAATGCCATCAGC
TCACACTTGCAAACCTGTGGCTGTTCCGTTGTAGTAGGTA
GCAGTGCGAGAGAAAGTAAATAAGATAGTCA
GAACATTATGCCCTTTTCTGACTCCAGCAGAGAGAAATG
CTCCAGGTTATGTGAAGCAGAAATCATCAT
TAAATATGAGTCAGGGCTCTTTGTACAAGGCCCTGCTAAAG
GATTCAACTGGAAGCTTTGTGCTGCCCTTTC
CGGCAAGTCATGTATGCTCCATATCCCACCCACACACATAG
ATGTGGATGTCAATACTGTGAAGCAGATGC
CACCTGTGCATGAACATATTTATAATCAGCGTAGATACAT
GAGATCCGAGCTGACAGCCTTCTGGAGAGC
CACTTCAGAAAGAAAGACATGGCTCAGGATACGATCATCTAC
ACTGACGAAAGCTTTACTCCTGATTTGAAT
ATTTTTCAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTAGTGAAAG
CCTTCCCTGGATCAGGTCTTTCAGCTGAAAC
CTGGCTTATCTCTCAGAAAGTACTTTCCTTGCCACAGTTTCT
ACTTGTCCTTTCACAGAAAGCCTTGACACT
AATAAAATATATAGAAGACGATACGCAGAAAGGGGAAAAAG
CCCTTTTAAATCTCTTCGGAAACCTGAAGATA
GACCTTGATTTAACAGCAGAGGGCGATCTTAACATAATAA
TGGCTCTGGCTGAGAAATTA AACCCAGGCC
TACACTCTTTTATCTTTTGAAGACCTTTCTACACTAGTG
GCAAGAACGAGATGTTCTAATGACTTTTTTA
AATGTGTAACCTTAATAAGCCTATTCCATCACAAATCATGAT
CGCTGGTAAGAGTAGCTCAGTGGTGTGGGGA
AACGTTCCCTCTGGATCATACTCCAGAAATTCCTGCTCTCAGC
AATTGCAGTTAAGTAAGTTACACTACAGTT
CTCACAAAGAGCCTGTGAGGGGATGTCAGGTGCATCATTAC
ATTGGGTGTCTCTTTTCTCTAGATTTATGCT
TTTGGGATACAGACCTATGTTTACAATATAATAAATATTA
TTGCTATCTTTTAAAGATATAATAATAGGA
TGTAAACTTGACCACAACTACTGTTTTTTTGAAATACATG
ATTCATGGTTTACATGTGTCAAGGTGAAAT
CTGAGTTGGCTTTTACAGATAGTTGACTTTCTATCTTTTG
GCATTCCTTTGGTGTTGTAGAAATTAAGTAAAT
ACTTCTGCAATCAACTGAAAAGCTAGAGCCTTTAAATGATT
TCAATTCCACAGAAAGAAAGTGAGCTTGAA
CATAGGATGAGCTTTAGAAAGAAATTTGATCAAGCAGATG
TTTAATTGGAATTGATTATTAGATCCTACT
TTGTGGATTTAGTCCCTGGGATTCAGTCTGTAGAAATGTC
TAATAGTTCTCTATAGTCCTTGTTCTCTGGT
GAACCACAGTTAGGGTGTTTGTATTATTTTATTGTTCTTG
CTATTGTTGATATTCTATGTAGTTGAGCTC
TGTA AAAAGGAAATTTGTATTTTATGTTTTTAGTAATTGTTGC
CAACTTTTTTAAATTAATTTTTCATTATTTTT

10

20

30

40

50

GAGCCAAATTGAAATGTGACCTCCTGTGCTTTTCTC
CTTAGAAAATCTAATTACTTGGAACAAGTT
CAGATTTTCACTGGTCAGTCATTTTTCATCTTGTTTTCTTCT
TGCTAAGTCTTACCATGTACCTGCTTTGGC
AATCATTTGCAACTCTGAGATTATAAAATGCCCTTAGAGAAAT
ATACTAACTAATAAGATCTTTTTTTTCAGAA
ACAGAAAATAGTTTCTTTGAGTACTTCTCTTGCAATTTCT
GCCTATGTTTTTTGAAGTTGTTGCTGTTTTGC
CTGCAATAGGCTATAAGGAATAGCAGGAGAAATTTTACTG
AAGTGCTGTTTTTCTAGGTGCTACTTTGGC
AGAGCTAAGTTATCTTTTGTTTTCTTAATGCGTTTTGGACC
ATTTTGTCTGGCTATAAAATAAAGTATTAAAT
ATAATTCTAACACAATGTTGACATTGTAGTTACACAACA
CAAATAAATAATTTTATTTAAAATTTCTGGAA
GTAATATAAAAAGGGAAAATATATTTATAGAAAGGGATAA
AGGTAAATAGAGCCCTTCTGCCCCCCCACCCA
CCAAATTTACACAACAATAATGACATGTTTCGAATGTGAAAG
GTCATAATAGCTTTCCCATCATGAATCAGA
AAGATGTGGACAGCTTGATGTTTTAGACAACCACTGAACCT
AGATGACTGTTGTACTGTAGCTCAGTCATT
TAAAAAATATATAAATACTACCTTGTAGTGTCCCATACTG
TGTTTTTTTACATGGTAGATTCTTATTTAAG
TGCTAACTGGTTATTTTCTTTGGCTGGTTTTATTGTACTGT
TATACAGAATGTAAAGTTGTACAGTGAAATA
AGTTATTAAAGCATGTGTAAACATTGTTATATATCTTTTC
TCCTAAATGGAGAAATTTTGAATAAAATATA
TTTGAAATTTT

配列番号 1 2

配列番号 1 1 の逆相補体

AAAAATTTCAAATATATTTTATTTCAAAATTTCTCCATTTAGG
AGAAAAGATATATAACAATGTTTACACATGCTTTAATAAC
TTATTTTCACTGTACAACCTTACATTCTGTATAACAGTACAA
TAAACCAGCCAAAGAAAATAACCAGTTAGCACCTTAAATAA
GAATCTACCATGTAAAAAACACAGTATGGGACACTACAAG
GTAGTATTTATATATTTTAAATGACTGAGCTACAGTAC
AACAGTCATCTAGTTTCAGTGGTTGTCTAAAACATCAAGCT
GTCCACATCTTTCTGATTCATGATGGGAAAGCTATTATGA
CCTTTCACATTCGAACATGTCATTTTGTGTGTAAATTTG
GTGGGTGGGGGGCAGAAAGGGCTCTATTACCTTTATCCCTT
TCTTATAAATATATTTTCCCTTTTATATTACTTCCAGAAAT
TTTAAATAAAATATTTTATTTGTGTTTGTGTAACCTACAATG
TCAACATTGTGTTAGAAATTATATTAAATCAGTTATTTTATA
GCCAGCAAATGGTCCAAACGCATTAAAGAAAACAAGAGAT
AACTTAGCTCTGCCAAAGTAGCACCTAGGAAAACAGCACT
TCAGTAAAAATTTCTCCTGCTATTCTCTTATAGCCTATTGCA
GGCAAACAGCAAACAACCTTCAAAAACATAGGCAGAAATGCA
AGAAAGGAAGTACTCAAGGAACCTATTTTCTGTTTCTGAAAA
AAAGATCTTATTAGTTAGTATATTCTCTAAGGCATTTTAT
AATCTCAGAGTTGCAATGATTGCCAAAGCAGGTACATGGT
AAGACTTAGCAAGAAGAAAACAAGATGAAAATGACTGACC

10

20

30

40

50

AGTGAAATCTGAACCTTGTTTCCAAGTAATTAGATTTTCTAA
GGAGAAAAAAGGCACAGGAGGTGCACATTTCAATTTGGCT
CAAAAATAATGAAAATTAAATTTAAAAAGTTGGCAACAATT
ACTAAAACATAAAAATACAATTTCTCTTTTACAGAGCTCAAC
TACATAGAAATATCAACAATAGCAAGAACAATAAAAAATAAAC
AAAACACCCCTAACTGTGGTTTCAACCAGGAACAAGGACTATA
GAGAACTATTAGACATTTCTACAGACTGAATCCCAGGGAC
TAAATCCACAAAGTAGGATCTAATAATCAATTTCCAATTAA
ACATCTGCTTGATCAATTTTCTTTCTAAAGCTCATCCTAT
GTTCAAGCTCACTTTTCTTTTCTGTGGAATTGAAATCATTTA
AAGGCTCTAGTTTTCAGTTTGATTGCAGAAGTATTACAGTA
ATTCTACACACCAAGAATGCCAAAAGATAGAAAGTCAAC
TATCTGTAAAAGCCAACTCAGATTTTCACCTTGACACATGT
AAACCATGAATCATGTATTTCAAAAAAACAGTAGTTGTGG
TCAAGTTTACATCCTATTATTATATCTTTTAAAAGATAGCA
ATAATATTTATTATTATTGTAAACATAGGTCTGTATCCCAA
AAGCATAAATCTAGGAAAAGAGACACCCCAATGTAATGATG
CACCTGACATCCCCTCACAGGCTCTTGTGAGAACTGTAGT
GTAACCTTACTTAACCTGCAATTTGCTGAGAGCAGAATTCTGG
AGTATGATCCAGGGGAACGTTTCCCCACACCACTGAGCTA
CTTTACCAGCGATCATGATTGTGATGGAATAGGCTTATTA
AGTTACACATTTTAAAAAGTCAATTAGAACATCTCGTTCTTG
CACACTAGTGTAGAAAGGTCTTCCAAGATAAAAGAGTGT
AGGCCCTGGTTTAAATTTTCTCAGCCAGAGCCATTATTATGT
TAAGATCGCCCTCTGCTGTTAAATCAAGGTCTATCTTCAG
GTTCCGAAGAGATTTAAGGGCTTTTCTCTGCGTA
TCGTCTTCTATATATTTTATTAGTGTCAAGGCTTTTCTGT
GAAGGACAAGTAGAAACTGTGCAAGGAAAGTACTTCTGAG
AGATAAGCCAGGTTTTCAGCTGAAAGACCTGATCCAGGAAG
GCTTTTCACTAGAGTGTCTCTGTGTAAAGACATCTTGAAAAA
TATTCAAATCAGGAGTAAAGCTTTCTGTAGTGTAGATGAT
CGTATCCTGAGCCATGTCTTCTTCTGAAGTGGCTCTCCAG
AAGGCTGTGAGCTCGGATCTCATGTATCTACGCTGATTAT
AAATATGTTTCATGACAGGGTGGCATCTGCTTTCACAGTATT
GACATCCACATCTATGTGTGTGGTGGGATATGGAGCATAC
ATGACTTGGCCGGAAGGGCAGCACAAAGCTTCCAGTTGAAT
CCTTTAGCAGGCCTTGTACAAAGAGCCCTGACTCATATTT
AAATGATGATTCTGCTTTCACATAACCTGGAGCATTTTCTC
TCTGCTGGAGTCAAGAAAAAGGCATAATGTTCTGACTATCT
TATTTACTTTCTCTGCACTGCTACCTACTACAACGGGAACA
GCCACAGGTTTTCAGAGTGTGAGCTGATGGCATTTGAGAAGA
AAGCCTTCATGACAGCTGTCACCAATATCATCATCATTTGA
GTACTGTATCAGCTATATCTATTTCTTTCAGGAACAACCTGTG
TGATTTTCATAGATGAAAGCAGTTTCCATTACAGGAATCACT
TCTCCAGTAAGCATTTGGAATAATACTCTGACCCCTGATCTT
CCATTCTCTCTGTGCTTCTAAGATAATCTTCTGGACATT
TTCTTGTCTTTCCTTATGCATCCATATTCTTCTTCTCCGG
ATTATATGTGTTAATCTATCAACACACACTCTATGAAGTG
GGAGGTAGAAACTAAGTTCTGTCTGTGGAAGTATAATTGA
TAGTCCATATGTGCTGCGATCCCCATTCCAGTTTCCATCA

10

20

30

40

50

A A G A T T A A T G A A A C A A T A A T C A C T C C C T T T T C A G A C A A G A
C A A A A A A C T T T A C A T C T A T A G C A C C A C T C T C T G C A T T T C G
A A G G A T T T C T C C A T T T A G A G T G T G G T T G G C A A G A A A A G T T
A T T T C T C C A T C A C T G A G A A G T A C C T G T T C T G T C T T T G G A G
C C C A A A T G T G C C T T A C T C T A G G A C C A A G A A T A T T G T C C C A
G T A A G C A A A A G T A G C T G C T A A T A A A G G T G A T T T G C C A C T T
A A A G C A A T C T C T G T C T T G G C A A C A G C T G G A G A T G G C G G T G
G G C A A A G A G T C G A C A T C A C T G C A T T C C A A C T G T C A C A T T A
T C C A A A T G C T C C G G A G A T A T C C A C T C G C C A C C G C C T G C G C
C T C C G C C G C C G C G G G C G C A G G C A C C G C A A C C

10

配列番号 13

>NC_000009.12:c27573866-27546546 Homo sa
piens 9番染色体、GRCh38.p13 一次アセンブリ; C9orf72 遺伝
子を保有するヒト9番染色体の部分(9番染色体のアセンブリのヌクレオチド27546
546...27573866)

A C G T A A C C T A C G G T G T C C C G C T A G G A A A G A G A G G T G C G T C
A A A C A G C G A C A A G T T C C G C C C A C G T A A A A G A T G A C G C T T G
G T G T G T C A G C C G T C C C T G C T G C C C G G T T G C T T C T C T T T T G
G G G G C G G G G T C T A G C A A G A G C A G G T G T G G G T T T A G G A G G T
G T G T G T T T T T G T T T T T C C C A C C C T C T C T C C C A C T A C T T G
C T C T C A C A G T A C T C G C T G A G G G T G A A C A A G A A A A G A C C T G
A T A A A G A T T A A C C A G A A G A A A A C A A G G A G G G A A A C A A C C G
C A G C C T G T A G C A A G C T C T G G A A C T C A G G A G T C G C G C G C T A
G G G G C C G G G G C C G G G G C C G G G G C G T G G T C G G G G C G G G C C C
G G G G G C G G G C C C G G G G C G G G G C T G C G G T T G C G G T G C C T G C
G C C C G C G G C G G C G G A G G C G C A G G C G G T G G C G A G T G G G T G A
G T G A G G A G G C G G C A T C C T G G C G G G T G G C T G T T T G G G G T T C
G G C T G C C G G G A A G A G G C G C G G G T A G A A G C G G G G G C T C T C C
T C A G A G C T C G A C G C A T T T T T A C T T T C C C T C T C A T T T C T C T
G A C C G A A G C T G G G T G T C G G G C T T T C G C C T C T A G C G A C T G G
T G G A A T T G C C T G C A T C C G G G C C C C G G G C T T C C C G G C G G C G
G C G G C G G C G G C G G C G G C G C A G G G A C A A G G G A T G G G G A T C T
G G C C T C T T C C T T G C T T T C C C G C C C T C A G T A C C C G A G C T G T
C T C C T T C C C G G G G A C C C G C T G G G A G C G C T G C C G C T G C G G G
C T C G A G A A A A G G G A G C C T C G G G T A C T G A G A G G C C T C G C C T
G G G G G A A G G C C G G A G G G T G G G C G G C G C G C G G C T T C T G C G G
A C C A A G T C G G G G T T C G C T A G G A A C C C G A G A C G G T C C C T G C
C G G C G A G G A G A T C A T G C G G G A T G A G A T G G G G G T G T G G A G A
C G C C T G C A C A A T T T C A G C C C A A G C T T C T A G A G A G T G G T G A
T G A C T T G C A T A T G A G G G C A G C A A T G C A A G T C G G T G T G C T C
C C C A T T C T G T G G G A C A T G A C C T G G T T G C T T C A C A G C T C C G
A G A T G A C A C A G A C T T G C T T A A A G G A A G T G A C T A T T G T G A C
T T G G G C A T C A C T T G A C T G A T G G T A A T C A G T T G T C T A A A G A
A G T G C A C A G A T T A C A T G T C C G T G T G C T C A T T G G G T C T A T C
T G G C C G C G T T G A A C A C C A C C A G G C T T T G T A T T C A G A A A C A
G G A G G G A G G T C C T G C A C T T T C C C A G G A G G G G T G G C C C T T T
C A G A T G C A A T C G A G A T T G T T A G G C T C T G G G A G A G T A G T T G
C C T G G T T G T G G C A G T T G G T A A A T T T C T A T T C A A A C A G T T G
C C A T G C A C C A G T T G T T C A C A A C A A G G G T A C G T A A T C T G T C
T G G C A T T A C T T C T A C T T T T G T A C A A A G G A T C A A A A A A A A A

20

30

40

50

AAAGATACTGTTAAGATATGATTTTCTCAGACTTTGGGA
AACTTTTAACATAATCTGTGAATATCACAGAAACAAGACT
ATCATATAGGGGATATTAAATAACCTGGAGTCAGAATACTT
GAAATACGGTGTCATTTGACACGGGGCATTTGTTGTCACCCAC
CTCTGCCAAGGCCCTGCCACTTTAGGAAACCCCTGAATCAG
TTGGAAACTGCTACATGCTGATAGTACATCTGAAACAAGA
ACGAGAGGTAATTACCAACATTTCCAGATTGTTCACTAAGCCA
GCATTTTACCTGCTCCAGGAAAAAATTACAAGCACCTTATG
AAGTTGATAAAATATTTTGTGTTGGGCTATGTTGGGCACTCCA
CAATTTTGCTTTTCAGAGAAACAAGGTAAACCAAGGAGGACT
TCTGTTTTTCAAGTCTGCCCTCGGGTTCTATTCTACGTTA
ATTAGATAGTTCCCAGGAGGACTAGGTTAGCCTACCTATT
GTCTGAGAAACTTTGGAACCTGTGAGAAATGGCCAGATAGTG
ATATGAACCTTCACCTTCCAGTCTTCCCTGATGTTGAAGAT
TGAGAAAGTGTTGTGAACCTTTCTGGTACTGTAAACAGTTTC
ACTGTCCTTGAAAGTGGTCCTGGGCGAGCTCCTGTTGTGGAA
AGTGGACGGTTTTAGGATCCTGCTTCTCTTTGGGCTGGGAG
AAAAATAAACAGCATGGTTACAAGTATTGAGAGCCAGGTTG
GAGAAAGGTGGCTTACACCTGTAAATGCCAGAGCTTTGGGAG
GCGGAGGCAAGAGGATCACTTGAAAGCCAGGAGTTCAAGCT
CAACCTGGGCAACGTAGACCCTGTCTCTACAAAAAATTA
AAACTTAGCCGGGCGTGGTGATGTGCACCTGTAGTCCTAG
CTACTTTGGGAGGCTGAGGCGAGGAGGGTCATTTTGAGCCCAA
GAGTTTTGAAGTTACCGAGAGCTATGATCCTGCCAGTGCAT
TCCAGCCTGGATGACAAAAACGAGACCCTGTCTCTAAAAA
CAAGAAGTGAGGGCTTTATGATTTGTAGAAATTTTCACTACA
ATAGCAGTGGACCAACCACCTTTCTAAATACCAATCAGGG
AAGAGATGGTTGATTTTTTTAACAGACGTTTTAAAGAAAAAG
CAAAACCTCAAACTTAGCACTCTACTAACAGTTTTTAGCAG
ATGTTAATTAATGTAATCATGTCTGCATGTATGGGATTAT
TTCCAGAAAGTGTAATTGGGAAACCTCTCATGAACCCCTGTG
AGCAAGCCACCCTCTCACTCAATTTGAATCTTGGCTTCCC
TCAAAAGACTGGCTAATGTTTGGTAACCTCTCTGGAGTAGA
CAGCACTACATGTACGTAAGATAGGTACATAAACAACTAT
TGGTTTTTGAGCTGATTTTTTTTCAGCTGCATTTGCATGTAT
GGATTTTTTCTCACCAAAAGACGATGACTTCAAGTATTAGTA
AAATAATTGTACAGCTCTCCTGATTATACTTCTCTGTGAC
ATTTCATTTTCCAGGCTATTTCTTTTGGTAGGATTTTAAAA
CTAAGCAATTTCAGTATGATCTTTGTCTTTCATTTTCTTTTC
TTATTTCTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTTTTCTTGA
GGCAGAGTCTCTCTCTGTCTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGG
CGCCATCTCAGCTCATTTGCAACCTCTGCCACCTCCGGGGTT
CAAGAGATTCTCCTGCCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGAT
TACAGGTGTCCACCACCAACCCCGGCTAATTTTTTTGTATT
TTTAGTAGAGGTGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGT
CTTGAGCTCCTGACCTCAGGTGATCCACCTGCCCTCGGCCCT
ACCAAAGAGCTGGGATAACAGGTGTGACCCACCATGCCCG
GCCCATTTTTTTTTTTCTTATTCTGTTAGGAGTGAAGAGTGT
AACTAGCAGTATAATAGTTTCAATTTTCAACAACGTGGTAAA
AGTTTCCCTATAATTCAATCAGATTTTGCTCCAGGGTTCA

10

20

30

40

50

G T T C T G T T T T A G G A A A T A C T T T T A T T T T C A G T T T A A T G A T
G A A A T A T T A G A G T T G T A A T A T T G C C T T T A T G A T T A T C C A C
C T T T T T A A C C T A A A A G A A T G A A A G A A A A A T A T G T T T G C A A
T A T A A T T T T A T G G T T G T A T G T T A A C T T A A T T C A T T A T G T T
G G C C T C C A G T T T G C T G T T G T T A G T T A T G A C A G C A G T A G T G
T C A T T A C C A T T T T C A A T T C A G A T T A C A T T C C T A T A T T T G A T
C A T T G T A A A C T G A C T G C T T A C A T T G T A T T A A A A A C A G T G G
A T A T T T T T A A A G A A G C T G T A C G G C T T A T A T C T A G T G C T G T C
T C T T A A G A C T A T T A A A T T G A T A C A A C A T A T T T A A A A G T A A
A T A T T A C C T A A A T G A A T T T T T G A A A T T A C A A A T A C A C G T G
T T A A A A C T G T C G T T G T G T T C A A C C A T T T C T G T A C A T A C T T
A G A G T T A A C T G T T T T G C C A G G C T C T G T A T G C C T A C T C A T A
A T A T G A T A A A A G C A C T C A T C T A A T G C T C T G T A A A T A G A A G
T C A G T G C T T T C C A T C A G A C T G A A C T C T C T T G A C A A G A T G T
G G A T G A A A T T C T T T A A G T A A A A T T G T T T A C T T T T G T C A T A C
A T T T A C A G A T C A A A T G T T A G C T C C C A A A G C A A T C A T A T G G
C A A A G A T A G G T A T A T C A T A G T T T G C C T A T T A G C T G C T T T G
T A T T G C T A T T A T T A T A A A T A G A C T T C A C A G T T T T A G A C T T
G C T T A G G T G A A A T T G C A A T T C T T T T T A C T T T C A G T C T T A G
A T A A C A A G T C T T C A A T T A T A G T A C A A T C A C A C A T T G C T T A
G G A A T G C A T C A T T A G G C G A T T T T G T C A T T A T G C A A A C A T C
A T A G A G T G T A C T T A C A C A A A C C T A G A T A G T A T A G C C T T T A
T G T A C C T A G G C C G T A T G G T A T A G T C T G T T G C T C C T A G G C C
A C A A A C C T G T A C A A C T G T T A C T G T A C T G A A T A C T A T A G A C
A G T T G T A A C A C A G T G G T A A A T A T T T A T C T A A A T A T A T G C A
A A C A G A G A A A A G G T A C A G T A A A A G T A T G G T A T A A A A G A T A
A T G G T A T A C C T G T G T A G G C C A C T T A C C A C G A A T G G A G C T T
G C A G G A C T A G A A G T T G C T C T G G G T G A G T C A G T G A G T G A G T
G G T G A A T T A A T G T G A A G G C C T A G A A C A C T G T A C A C C A C T G
T A G A C T A T A A A C A C A G T A C G C T G A A G C T A C A C C A A A T T T A
T C T T A A C A G T T T T T C T T C A A T A A A A A A T T A T A A C T T T T T A
A C T T T G T A A A C T T T T T A A T T T T T T A A C T T T T A A A A T A C T T
A G C T T G A A A C A C A A A T A C A T T G T A T A G C T A T A C A A A A A T A
T T T T T T C T T T G T A T C C T T A T T C T A G A A G C T T T T T T C T A T T
T T C T A T T T T A A A T T T T T T T T T T T A C T T G T T A G T C G T T T T T
G T T A A A A A C T A A A A C A C A C A C A C T T T C A C C T A G G C A T A G A
C A G G A T T A G G A T C A T C A G T A T C A C T C C C T T C C A C C T C A C T
G C C T T C C A C C T C C A C A T C T T G T C C C A C T G G A A G G T T T T T A
G G G G C A A T A A C A C A C A T G T A G C T G T C A C C T A T G A T A A C A G
T G C T T T C T G T T G A A T A C C T C C T G A A G G A C T T G C C T G A G G C
T G T T T T A C A T T T T A A C T T A A A A A A A A A A A A A G T A G A A G G A G
T G C A C T C T A A A A T A A C A A T A A A A G G C A T A G T A T A G T G A A T
A C A T A A A C C A G C A A T G T A G T A G T T T A T T A T C A A G T G T T G T
A
C A C T G T A A T A A T T G T A T G T G C T A T A C T T T A A A T A A C T T G C
A A A A T A G T A C T A A G A C C T T A T G A T G G T T A C A G T G T C A C T A
A G G C A A T A G C A T A T T T T C A G G T C C A T T G T A A T C T A A T G G G
A C T A C C A T C A T A T A T G C A G T C T A C C A T T G A C T G A A A C G T T
A C A T G G C A C A T A A C T G T A T T T G C A A G A A T G A T T T G T T T T A
C A T T A A T A T C A C A T A G G A T G T A C C T T T T T A G A G T G G T A T G

10

20

30

40

50

TTTATGTGGATTAAAGATGTACAAAGTTTGAGCAAGGGGGACCA
AGAGCCCTGGGTCTGTCTTGGATGTGAGCGTTTATGTTTC
TTCTCCTCATGTCTGTTTTCTCATTTAAATTCAAAGGCTTG
AACGGGGCCCTATTTAGCCCTTCTGTTTTTCTACGTGTTCTA
AATAACTAAAGCTTTTTAAATTTCTAGCCATTTAGTGTAGAA
CTCTCTTTTGCAGTGATGAAATGCTGTATTGGTTTTCTTGGC
TAGCATATTAAATATTTTTTATCTTTGTCTTGATACTTCAA
TGTCGTTTTTAAACATCAGGATCGGGCTTTCAGTATTCTCAT
AACCAGAGAGTTCACTGAGGATACAGGACTGTTTGGCCCAT
TTTTTTGTTATGGCTCCAGACTTGTGGTATTTTCCATGTCTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTACCTTTTAGCGGCTTTAAAG
TATTTCTGTGTGTAGGTGTTGTATTACTTTTTCTAAGATTAA
CTTAACAAAGCACCCACAAACTGAGTGGCTTTAAACAACAG
CAATTTATTCTCTCACAAATTTCTAGAAGCTAGAAGTCCGAA
ATCAAAGTGTTGACAGGGGGCATGATCTTCAAAGAGAGAAAG
CTCTTTTCCTTGCCCTCTTCCCTGGCTTCTGGTGTTACCAGC
AATCCTGAGTGTTCTCTTTCTTGCCCTTGTAAGTTTCAACAAT
CCAGTATCTGCCCTTTTGTCTTTCACATGGCTGTCTACCATT
TGTCCTCTGTGTCTCCAAATCTCTCTCTCTTATAAACACAGC
AGTTATTGGATTAGGCCCCCACTCTAATCCAGTATGACCCC
ATTTTAAACATGATTACACTTATTTCTAGATAAGGTCACAT
TCACGTACACCAAGGGTTAGGAATTGAACATATCTTTTTTG
GGGGACACAATTCAACCCACAAAGTGTCAGTCTCTAGCTGA
GCCTTTTCCCTTCCCTGTTTTTTCTCCTTTTTTTAGTTTGCTATGG
GTTAGGGGGCCAAATCTCCAGTCACTAGAAATTGCACATG
GACTGGATATTTGGGAATACTGCGGGTCTATTCTATGAGC
TTTAGTATGTAACATTTAATATCAGTGTAAGAAGGCCCTT
TTTTTAAGTTATTTCTTTGAATTTCTAAATGTATGCCCTGA
ATATAAGTAACAAGTTACCATGTCTTGTAATAATGATCATA
TCAACAAACATTTAATGTGACCTACTGTGCTAGTTGAAT
GTCTTTATCCTGATAGGAGATAACAGGATTCCACATCTTT
GACTTAAGAGGACAAACCACAAATATGTCTAAATCATTTGGG
GTTTTGATGGATATCTTTAAATTTGCTGAACCTAATCATTG
GTTTTCATATGTCATTTGTTTAGATATCTCCGGAGCATTTTG
ATAATGTGACAGTTTGGAAATGCAGTGATGTCGACTCTTTGC
CCACCGCCATCTCCAGCTGTTGCCAAGACAGAGATTGCTT
TAAGTGGCAAATCACCTTTATTAGCAGCTACTTTTGTCTTA
CTGGGACAAATATTTCTTGGTCCCTAGAGTAAGGACACATTTGG
GCTCCAAAGACAGAACAGGTACTTCTCAGTGATGGAGAAA
TAACTTTTTCTTGCCAACCACACTCTAAATGGAGAAATCCT
TCGAAATGCAGAGAGGTGGTGCTATAGATGTAAAGTTTTTT
GTCTTGTCGTGAAAAGGGAGTGATTATTGTTTTCATTAATCT
TTGATGGAAACTGGAATGGGGATCGCAGCACATATGGACT
ATCAATTATACTTCCACAGACAGAACTTAGTTTTCTACCTC
CCACTTCATAGAGTGTTGTTGATAGATTAAACACATATAA
TCCGGAAAGGAAGAATATGGATGCATAAGGTAAAGTGATTT
TTCAGCTTATTAAATCATGTTAACCTATCTGTTGAAAGCTT
ATTTTCTGGTACATATAAATCTTATTTTTTTTTTAATTATATG
CAGTGAACATCAAACAATAAATGTTATTTTATTTTGCATTT
ACCTATTAGATACAAATACATCTGGTCTGATACCTGTCA

10

20

30

40

50

TCTTCATATTAACTGTGGAAAGGTACGAAATGGTAGCTCCA
CATTATAGATGAAAAGCTAAAGCTTAGACAAATAAAGAAA
CTTTTAGACCCTGGATTCTTCTTGGGAGCCTTTGACTCTA
ATACCTTTTGTTCCTTTTCATTGACACAATTCTGTCTTTT
GCTTACTACTATGTGTAAAGTATAACAGTTTCAAAGTAATAG
TTTCATAAAGCTGTTTGGTTCATGTAGCCTTTGGTCTCTTTAA
CCTCTTTTGCCAAGTTTCCCAGGTTTCATAAAAATGAGGGAGGTT
GAATGGAATGGTTTCCCAAGAGAATTCTTTTAAATCTTACA
GAAATTATTGTTTTTCTAAATCCTGTAGTTGAATATATAA
TGCTATTTACATTTTCAGTATAGTTTGTATCTAAAGA
ACACATTGAATTCTCCTTCTCTGTGTTCAGTTTGTACTA
ACCTGAAAGTCCATTAAAGCATTACCAGTTTTTAAAGGCTT
TTGCCCAATAGTAAGGAAAAATAATATCTTTTAAAGGAAT
AATTTTTTACTATGTTTGCAGGCTTACTTCTTTTTTCTC
ACATTATGAAACTCTTAAAAATCAGGAGAAATCTTTTAAACA
ACATCATAATGTTTAAATTTGAAAAGTGCAGTCAATCTTT
TCCTTTTTTGAAACTATGCAGATGTTACATTTGACTGTTTT
TGTGAAGTTATCTTTTTTTTCACTGCAGAAATAAAGGTTGT
TTGATTTTATTTTGTATTGTTTATGAGAACATGCATTTGT
TGGGTTAATTTCTACCCCTGCCCCCATTTTTTCTCCTAAA
GTAGAAAGTATTTTTTCTTGTGAACATAAATTAATAACAAG
AACATGTCTATTGAAAAATAAGCAAGTATCAAAATGTTGT
GGGTTGTTTTTTTAAATAAATTTTCTCTTGCTCAGGAAAG
ACAAGAAAAATGTCCAGAAAGATTATCTTAGAAAGGCACAGAG
AGAAATGGAAGATCAGGTATATGCAGAAATTGCATACTGTCAA
ATGTTTTTCTCACAGCATGTATCTGTATAAGGTTGATGGC
TACATTTGTCAAGGCCTTGGAGACATACGAATAAGCCTTT
AATGGAGCTTTTTATGGAGGTGTACAGAAATAAAGCTGGAGGA
AGATTTCCATATCTTAAACCACAAGAGTTAAATCAGTAAA
CAAAGGAAAAATAGTAATTGCATCTACAAATTAATATTTGC
TCCCTTTTTTTTTTCTGTTTGCACCAGAAATAAATTTTGGATA
ACTTGTTTCATAGTAATAAATAAATAAATAAATTTGTCTCTGATAT
GTTCTTTAAGGTACTACTTCTCGAACCTTTCCCTAGAAAGT
AGCTGTAAACAGAAAGGAGAGCATATGTACCCCTGAGGTATC
TGTCTGGGGGTGTAGGCCCCAGGTCCACACAATAATTTCTTCT
AAGTCTTATGTTGTATCGTTAAGACTCATGCATTTTACAT
TTTATTCCATAACTATTTTATAGTATTAAATTTGTGAGTGA
TATTTCTTACCTCTCCTCTAGGAAAAATGTGCCATGTTTA
TCCCTTGGCTTTTGAATGCCCTCTCAGGAACAGACACTAAGA
GTTTGAGAAAGCATGGTTACAAGGGGTGTGGCTTCCCCCTGCG
GAAACTAAAGTACAGACTATTTCACTGTAAAGCAGAGAAAGT
TCTTTTGAAAGGAGAAATCTCCAGTGAAGAAAGAGTTCTTCA
CTTTTACTTCCATTTTCTCTTGTGGGTGACCTTCAATGCT
CCTTGTAATAACTCCAATATTTTAAACATGGCTGTTTTTGCC
TTTTCTTTGCTTCTTTTTTAGCATGAATGAGACAGATGATAC
TTTAAAAAAGTAATTAAAAAATAAATAAATAAATAAATAA
TGGCCATAAATACAGAACCCAATACAATGATCTCCTTTACC
AAATTGTTATGTTTGTACTTTTGTAGATAGCTTTTCCAATT
CAGAGACAGTTATTCTGTGTAAAGGTCTGACTTAACAAGA
AAAGATTTCTCCTTTACCCAAGAAATCCCAGTCTTATTTG

10

20

30

40

50

CTGGTCAATAAGCAGGGTCCCCAGGAATGGGGTAACCTTTCA
AGCACCCCTCTAACCCACTAGTTATTAGTAGACTAATTAAAG
TAAACTTTATCGCAAGTTGAGGAAACTTTAGAACCAACTAAA
ATTCTGCTTTTACTGGGATTTTGTTTTTTCAAAACCAGAAA
CCTTTACTTTAAGTTGACTACTATTAAATGAATTTTGGTCTC
TCTTTTAAAGTGCTCTTCTTTAAAAAATGTTATCTTACTGCTG
AGAAGTTCAAGTTTGGGAAGTACAAGGAGGAATAGAAACT
TAAGAGATTTTCTTTTAGAGCCTCTTCTGTATTTAGCCCT
GTAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTGTTGTGA
GCTTCAGTGAGGCTATTCAATTCACCTTATACTGATAATGTC
TGAGATACTGTGAATGAAATACTATGTATGCTTAAACCTA
AGAGGAAATATTTTTCCCAAAATTTATTTCTTCCCGAAAAAGGA
GGAGTTGCCTTTTGTATTGAGTTCTTGC AAATCTCACAAACG
ACTTTATTTTGAACAATACTGTTTGGGGATGATGCATTAG
TTTGAAACAACCTTCAGTTGTAGCTGTCTGATAAAAATT
GCTTCACAGGGAAGGAAATTTAACACGGGATCTAGTCAATTA
TTCTTGTTAGATTGAATGTGTGAATTGTAAATTTGTAAACAG
GCATGATAATTATTACTTTAAAAAACTAAAAAACAGTGAATA
GTTAGTTGTGGAGGTTACTAAAGGATGGTTTTTTTTTTTAAA
TAAAAACTTTCAGCATTTATGCAAATGGGCATATGGCTTAGG
ATAAAAACTTCCAGAAAGTAGCATCACATTTAAATTCTCAAG
CAACTTAATAATATGGGGCTCTGAAAAAACTGGTTAAGGTT
A
CTCCAAAAAATGGCCCTGGGGTCTGACAAAGATTCTAACTTTA
AAGATGCTTATGAAGACTTTTGAGTA AAAATCATTTTCATAAA
ATAAGTGAGGAAAAAACAACCTAGTATTAAATTCTCTTAAA
TAATGTATGATTTAAAAAAATATGTTT TAGCTAAAAAATGCAT
AGTCATTTGACAAATTTCAATTTATATCTCAAAAAAATTTACT
TAACCAAGTTGGTCACAAAAACCTGATGAGACTGGTGTTGGT
AGTGAAATAAATGAGGGACCATCCATATTTGAGACACTTTA
CATTTGTGATGTGTTATACTGAATTTTTCAGTTTGTATTCTA
TAGACTACAAATTTCAAAAATTACAATTTCAAGATGTAATA
AGTAGTAATATCTTGAAATAGCTCTAAAGGGGAATTTTTCT
GTTTTTATTGATTTCTTAAAAATATATGTGCTGATTTTGTATT
GCATTTGGGTAGATTATACTTTTATGAGTATGGAGGGTTAG
GTATTGATTTCAAGTTTTCCTTACCTATTTGGTAAGGATTT
CAAAGTCTTTTTTGTGCTTGGTTTTCTCTATTTTTTAAATAT
GAAATATATTGATGACCTTTAACAAAATTTTTTTTTATCTCA
AATTTTTAAAGGAGATCTTTTCTAAAAAGAGGCATGATGACT
TAATCATTTGCATGTAACAGTA AACGATAAACCAATGATTC
CATACTCTCTAAAGAATAAAAAGTGAGCTTTAGGGCCGGGC
ATGGTCAAGAAATTTGACACCAACCTGGGCCAACATGGCGAA
ACCCCGTCTCTACTAAAAAATACAAAAAATCAGCCGGGGCATG
GTGGCGGCGACCTATAGTCCCAGCTACTTTGGGAGGATGAGA
CAGGAGAGTCACTTGAACCTGGGAGGAGAGGTTGCAGTGA
GCTGAGATCACGCCATTGCACCTCAGCCTGAGCAATGAAA
GCAAAAACCTCCATCTCAAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAA
TAAAAGTGAGCTTTGGATTGCATATAAATCCTTTAGACAT
GTAGTAGACTTGTTTGATACTGTGTTTGAACAAATTTACGA
AGTATTTTTCATCAAGAATGTTATTGTTTGATGTTATTTT

10

20

30

40

50

T A T T T T T T A T T G C C C A G C T T C T C T C A T A T T A C G T G A T T T T
C T T C A C T T C A T G T C A C T T T A T T G T G C A G G G T C A G A G T A T T
A T T C C A A T G C T T A C T G G A G A A G T G A T T C C T G T A A T G G A A C
T G C T T T C A T C T A T G A A A T C A C A C A G T G T T C C T G A A G A A A T
A G A T G T A A G T T T A A A T G A G A G C A A T T A T A C A C T T T A T G A G
T T T T T T G G G G T T A T A G T A T T A T T A T G T A T A T T A T T A A T A T
T C T A A T T T T A A T A G T A A G G A C T T T G T C A T A C A T A C T A T T C
A C A T A C A G T A T T A G C C A C T T T A G C A A A T A A G C A C A C A C A A
A A T C C T G G A T T T T A T G G C A A A A C A G A G G C A T T T T T G A T C A
G T G A T G A C A A A A T T A A A T T C A T T T T G T T T A T T T C A T T A C T
T T T A T A A T T C C T A A A A G T G G G A G G A T C C C A G C T C T T A T A G
G A G C A A T T A A T A T T T A A T G T A G T G T C T T T T G A A A C A A A A C
T G T G T G C C A A A G T A G T A A C C A T T A A T G G A A G T T T A C T T G T
A G T C A C A A A T T T A G T T T C C T T A A T C A T T T T G T T G A G G A C G T
T T T G A A T C A C A C A C T A T G A G T G T T A A G A G A T A C C T T T A G G
A A A C T A T T C T T G T T G T T T T C T G A T T T T G T C A T T T A G G T T A
G T C T C C T G A T T C T G A C A G C T C A G A A G A G G A A G T T G T T C T T
G T A A A A A T T G T T T A A C C T G C T T G A C C A G C T T T C A C A T T T G
T T C T T C T G A A G T T T A T G G T A G T G C A C A G A G A T T G T T T T T
G G G G A G T C T T G A T T C T C G G A A A T G A A G G C A G T G T G T T A T A
T T G A A T C C A G A C T T C C G A A A A C T T G T A T A T T A A A A G T G T T
A T T T C A A C A C T A T G T T A C A G C C A G A C T A A T T T T T T T A T T T
T T T G A T G C A T T T T A G A T A G C T G A T A C A G T A C T C A A T G A T G
A T G A T A T T G G T G A C A G C T G T C A T G A A G G C T T T C T T C T C A A
G T A A G A A T T T T T C T T T T C A T A A A A G C T G G A T G A A G C A G A T
A C C A T C T T A T G C T C A C C T A T G A C A A G A T T T G G A A G A A A G A
A A A T A A C A G A C T G T C T A C T T A G A T T G T T C T A G G G A C A T T A
C G T A T T T G A A C T G T T G C T T A A A T T T G T G T T A T T T T T C A C T
C A T T A T A T T T C T A T A T A T A T T T G G T G T T A T T C C A T T T G C T
A T T T A A A G A A A C C G A G T T T C C A T C C C A G A C A A G A A A T C A T
G G C C C C T T G C T T G A T T C T G G T T T C T T G T T T T A C T T C T C A T
T A A A G C T A A C A G A A T C C T T T C A T A T T A A G T T G T A C T G T A G
A T G A A C T T A A G T T A T T T A G G C G T A G A A C A A A A T T A T T C A T
A T T T A T A C T G A T C T T T T T C C A T C C A G C A G T G G A G T T T A G T
A C T T A A G A G T T T G T G C C C T T A A A C C A G A C T C C C T G G A T T A
A T G C T G T G T A C C C G T G G G C A A G G T G C C T G A A T T C T C T A T A
C A C C T A T T T C C T C A T C T G T A A A A T G G C A A T A A T A G T A A T A
G T A C C T A A T G T G T A G G G T T G T T A T A A G C A T T G A G T A A G A T
A A A T A A T A T A A A G C A C T T A G A A C A G T G C C T G G A A C A T A A A
A A C A C T T A A T A A T A G C T C A T A G C T A A C A T T T C C T A T T T A C
A T T T C T T C T A G A A A T A G C C A G T A T T T G T T G A G T G C C T A C A
T G T T A G T T C C T T T A C T A G T T G C T T T A C A T G T A T T A T C T T A
T A T T C T G T T T T A A A G T T T C T T C A C A G T T A C A G A T T T T C A T
G A A A T T T T A C T T T T A A T A A A A G A G A A G T A A A A G T A T A A A G
T A T T C A C T T T T A T G T T C A C A G T C T T T T C C T T T A G G C T C A T
G A T G G A G T A T C A G A G G C A T G A G T G T G T T T A A C C T A A G A G C
C T T A A T G G C T T G A A T C A G A A G C A C T T T A G T C C T G T A T C T G
T T C A G T G T C A G C C T T T C A T A C A T C A T T T T A A A T C C C A T T T
G A C T T T A A G T A A G T C A C T T A A T C T C T C T A C A T G T C A A T T T
C T T C A G C T A T A A A A T G A T G G T A T T T C A A T A A A T A A A T A C A

10

20

30

40

50

TTAATTAAATGATATTATACTGACTAATTGGGCTGTTTTTA
AGGCTCAATAAGAAAATTTCTGTGAAAGGTCTCTAGAAAAA
TGTAGGTTTCCTATACAAATAAAAAGATAACATTGTGCTTAT
AGCTTCGGTGTTTTATCATATAAAGCTATTCTGAGTTATTT
GAAGAGCTCACCTACTTTTTTTTTTGTTTTTTAGTTTTGTTAAA
TTGTTTTTATAGGCAATGTTTTTTAATCTGTTTTTCTTTAACT
TACAGTGCCATCAGCTCACACTTGCAAACCTGTGGCTGTT
CCGTTGTAGTAGGTAGCAGTGCAGAGAAAGTAATAAAGGT
AGTTTTATTTTATAATCTAGCAAATGATTTTGACTCTTTAAG
ACTGATGATATATCATGGATTGTCAATTTAAATGGTAGGTT
GCAATTAAAAATGATCTAGTAGTATAAGGAGGGCAATGTAA
CTCATCAAATTTGCTAAGACACCTTGTTGGCAAACAGTGAGTT
TGAAATAAACTGAGTAAGAATCATTTATCAGTTTTATTTTG
ATAGCTCGGAAATACCAGTGTCAGTAGTGTATAAATGGTT
TTGAGAATATATTAAAAATCAGATATATAAAAAAAATTA
CTTTCTATTTCCCAATGTTATCTTTTAACAAATCTGAAGATA
GTCATGTACTTTTTGGTAGTAGTTCCAAAGAAATGTTATTT
GTTTATTCATCTTGATTTCATTGTCTTCGCTTTCTCTCTA
AATCTGTCCCTTCTAGGGAGCTATTGGGATTAAAGTGGTCA
TTGATTATTATACTTTATTTCAGTAATGTTTTCTGACCCCTTT
CCTTCAGTGCTACTTTGAGTTAATTAAGGATTAAATGAACAG
TTACATTTTCCAAGCATTAGCTAATAAACTAAAGGATTTTG
CACTTTTCTTCACTGACCATTAGTTAGAAAGAGTTTCAGAG
ATAAGTATGTGTATCTTTCAATTTTCAGCAAACCTAATTTT
TTAAAAAAAGTTTTTACATAGGAAATATGTTGGAAATGATA
CTTTACAAAGATATTCAATAATTTTTTTTTTTGTAAATCAGCTA
CTTTGTATATTTACATGAGCCTTAATTTTATATTTCTCATA
TAACCATTTATGAGAGCTTAGGTATACCTGTGTCAATTAAT
TGCATCTACGAACCTAGTGACCTTATTCTCTTCTGTTAACCTC
AAACAGGTGGCTTTTCCATCTGTGATCTCCAAGGCCTTAGG
TTGCACAGAGTGACTGCCGAGCTGCTTTTATGAAGGGAGAA
AGGCTCCATAGTTGGAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAC
ATTTTTTCCCATCCTCCATCCTCTTGAGGGAGAAATAGCTTA
CCTTTTTATCTTGTTTTTAATTTGAGAAAGAAAGTTGCCACCA
CTCTAGGTTGAAAACCACTCCTTTTAACATAATAACTGTGG
ATATGGTTTTGAATTTCAAGATAGTTACATGCCCTTTTTTATT
TTTCTTAATAGAGCTGTAGGTCAAATATTATTAGAATCAG
ATTTCTAAATCCCAACCAATGACCTGCTTATTTTAAATCA
AATTCAATAATTAAATTTCTCTTTTGGAGGATCTGGAC
ATTCCTTTGATATTTCTTACAACGAATTTTCATGTGTAGACC
CACTAAACAGAAAGCTATAAAAGTTGCATGGTCAAATAAGT
CTGAGAAAGTCTGCAGATGATATAATTCACCTGAAGAGTCA
ACAGTATGTAGCCAAATGTTAAAGGTTTTTGAGATGCCATA
CAGTAAATTTACCAAGCATTTTCTAAATTTATTTGACCAC
AGAAATCCCTATTTTAAAGCAAACAACCTGTTACATCCCATGGA
TTCCAGGTGACTAAAGAATACTTATTTCTTAGGATATGTT
TTATTGATAATAACAATTAATAATTTTCAGATATCTTTCTA
AGCAAATCAGTGGTCTTTTTTACTTTCATGTTTTTAATGCTAA
AATATTTTTCTTTTTATAGATAGTCAAGAACATTATGCCTTTT
TCTGACTCCAGCAGAGAGAAATGCTCCAGGTTATGTGAA

10

20

30

40

50

G C A G A A T C A T C A T T T T A A A T A T G A G T C A G G G C T C T T T G T A C
A
A G G C C T G C T A A A G G T A T A G T T T C T A G T T A T C A C A A G T G A A
A C C A C T T T T C T A A A A T C A T T T T T G A G A C T C T T T A T A G A C A
A A T C T T A A A T A T T A G C A T T T T A A T G T A T C T C A T A T T G A C A T
G C C C A G A G A C T G A C T T C C T T T A C A C A G T T C T G C A C A T A G A
C T A T A T G T C T T A T G G A T T T A T A G T T A G T A T C A T C A G T G A A
A C A C C A T A G A A T A C C C T T T G T G T T C C A G G T G G G T C C C T G T
T C C T A C A T G T C T A G C C T C A G G A C T T T T T T T T T T T T A A C A C
A T G C T T A A A T C A G G T T G C A C A T C A A A A A T A A G A T C A T T T C
T T T T T A A C T A A A T A G A T T T G A A T T T T A T T G A A A A A A A A T T
T T A A A C A T C T T T A A G A A G C T T A T A G G A T T T A A G C A A T T C C
T A T G T A T G T G T A C T A A A A T A T A T A T A T T T C T A T A T A T A A T
A T A T A T T A G A A A A A A A T T G T A T T T T T C T T T T A T T T G A G T C
T A C T G T C A A G G A G C A A A A C A G A G A A A T G T A A A T T A G C A A T
T A T T T A T A A T A C T T A A A G G G A A G A A A G T T G T T C A C C T T G T
T G A A T C T A T T A T T G T T A T T T C A A T T A T A G T C C C A A G A C G T
G A A G A A A T A G C T T T C C T A A T G G T T A T G T G A T T G T C T C A T A
G T G A C T A C T T T C T T G A G G A T G T A G C C A C G G C A A A A T G A A A
T A A A A A A A T T T A A A A A T T G T T G C A A A T A C A A G T T A T A T T A
G G C T T T T G T G C A T T T T C A A T A A T G T G C T G C T A T G A A C T C A
G A A T G A T A G T A T T T A A A T A T A G A A A C T A G T T A A A G G A A A C
G T A G T T T C T A T T T G A G T T A T A C A T A T C T G T A A A T T A G A A C
T T C T C C T G T T A A A G G C A T A A T A A A G T G C T T A A T A C T T T T G
T T T C C T C A G C A C C C T C T C A T T T A A T T A T A T A A T T T T A G T T
C T G A A A G G G A C C T A T A C C A G A T G C C T A G A G G A A A T T T C A A
A A C T A T G A T C T A A T G A A A A A A T A T T T A A T A G T T C T C C A T G
C A A A T A C A A A T C A T A T A G T T T T C C A G A A A A T A C C T T T G A C
A T T A T A C A A A G A T G A T T A T C A C A G C A T T A T A A T A G T A A A A
A A A T G G A A A T A G C C T C T T T C T T C T G T T C T G T T C A T A G C A C
A G T G C C T C A T A C G C A G T A G G T T A T T A T T A C A T G G T A A C T G
G C T A C C C C A A C T G A T T A G G A A A G A A G T A A A T T T G T T T T A T
A A A A A T A C A T A C T C A T T G A G G T G C A T A G A A T A A T T A A G A A
A T T A A A A G A C A C T T G T A A T T T T G A A T C C A G T G A A T A C C C A
C T G T T A A T A T T T G G T A T A T C T C T T T C T A G T C T T T T T T T C C
C T T T T G C A T G T A T T T T C T T T A A G A C T C C C A C C C C C A C T G G
A T C A T C T C T G C A T G T T C T A A T C T G C T T T T T T T C A C A G C A G A
T T C T A A G C C T C T T T G A A T A T C A A C A C A A A C T T C A A C A A C T
T C A T C T A T A G A T G C C A A A T A A T A A A T T C A T T T T T A T T T A C
T T A A C C A C T T C C T T T G G A T G C T T A G G T C A T T C T G A T G T T T
T G C T A T T G A A A C C A A T G C T A T A C T G A A C A C T T C T G T C A C T
A A A A C T T T T G C A C A C A C T C A T G A A T A G C T T C T T A G G A T A A A
T T T T T A G A G A T G G A T T T G C T A A A T C A G A G A C C A T T T T T T A
A A A T T A A A A A A C A A T T A T T C A T A T C G T T T G G C A T G T A A G A
C A G T A A A T T T T C C T T T T A T T T T G A C A G G A T T C A A C T G G A A
G C T T T G T G C T G C C T T T C C G G C A A G T C A T G T A T G C T C C A T A
T C C C A C C A C A C A C A T A G A T G T G G A T G T C A A T A C T G T G A A G
C A G A T G C C A C C C T G T C A T G A A C A T A T T T A T A A T C A G C G T A
G A T A C A T G A G A T C C G A G C T G A C A G C C T T C T G G A G A G C C A C
T T C A G A A G A A G A C A T G G C T C A G G A T A C G A T C A T C T A C A C T

10

20

30

40

50

G A C G A A A G C T T T A C T C C T G A T T T T G T A C G T A A T G C T C T G C C
T G C T G G T A C T G T A G T C A A G C A A T A T G A A A T T G T G T C T T T T
A C G A A T A A A A A C A A A A C A G A A G T T G C A T T T A A A A A G A A A G
A A A T A T T A C C A G C A G A A T T A T G C T T G A A G A A A C A T T T T A A T
C A A G C A T T T T T T T T C T T A A A T G T T C T T C T T T T T C C A T A C A A
T T G T G T T T A C C C T A A A A T A G G T A A G A T T A A C C C C T T A A A G T
A A A T A T T T A A C T A T T T G T T T A A T A A A T A T A T A T T G A G C T C
C T A G G C A C T G T T C T A G G T A C C G G G C T T A A T A G T G G C C A A C
C A G A C A G C C C C A G C C C C A G C C C C T A C A T T G T G T A T A G T C T
A T T A T G T A A C A G T T A T T G A A T G G A C T T A T T A A C A A A A C C A
A A G A A G T A A T T C T A A G T C T T T T T T T T C T T G A C A T A T G A A T
A T A A A A T A C A G C A A A A C T G T T A A A A T A T A T T A A T G G A A C A
T T T T T T T A C T T T G C A T T T T A T A T T G T T A T T C A C T T C T T A T
T T T T T T T T A A A A A A A A A A G C C T G A A C A G T A A A T T C A A A A G
G A A A A G T A A T G A T A A T T A A T T G T T G A G C A T G G A C C C A A C T
T G A A A A A A A A A A A T G A T G A T G A T A A A T C T A T A A T C C T A A A A
C C C T A A G T A A A C A C T T A A A A G A T G T T C T G A A A T C A G G A A A
A G A A T T A T A G T A T A C T T T T G T G T T T C T C T T T T A T C A G T T G
A A A A A A G G C A C A G T A G C T C A T G C C T G T A A G A A C A G A G C T T
T G G G A G T G C A A G G C A G G C G G A T C A C T T G A G G C C A G G A G T T
C C A G A C C A G C C T G G G C A A C A T A G T G A A A C C C C A T C T C T A C
A A A A A A T A A A A A A G A A T T A T T G G A A T G T G T T T C T G T G T G C
C T G T A A T C C T A G C T A T T C C G A A A G C T G A G G C A G G A G G A T C
T T T T G A G C C C A G G A G T T T G A G G T T A C A G G G A G T T A T G A T G
T G C C A G T G T A C T C C A G C C T G G G G A A C A C C G A G A C T C T G T C
T T A T T T A A A A A A A A A A A A A A A A A A A T G C T T G C A A T A A T G C
C T G G C A C A T A G A A G G T A A C A G T A A G T G T T A A C T G T A A T A A
C C C A G G T C T A A G T G T G T A A G G C A A T A G A A A A A T T G G G G C A
A A T A A G C C T G A C C T A T G T A T C T A C A G A A T C A G T T T T G A G C T
T A G G T A A C A G A C C T G T G G A G C A C C A G T A A T T A C A C A G T A A
G T G T T A A C C A A A A G C A T A G A A T A G G A A T A T C T T G T T C A A G
G G A C C C C A G C C T T A T A C A T C T C A A G G T G C A G A A A G A T G A
C T T A A T A T A G G A C C C A T T T T T T C C T A G T T C T C C A G A G T T T
T T A T T G G T T C T T G A G A A A G T A G T A G G G G A A T G T T T T A G A A
A A T G A A T T G G T C C A A C T G A A A T T A C A T G T C A G T A A G T T T T
T A T A T A T T G G T A A A T T T T A G T A G A C A T G T A G A A G T T T T C T
A A T T A A T C T G T G C C T T G A A A C A T T T T C T T T T T T C C T A A A G
T G C T T A G T A T T T T T T C C G T T T T T G A T T G G T T A C T T G G G A
G C T T T T T T G A G G A A A T T T A G T G A A C T G C A G A A T G G G T T T G
C A A C C A T T T T G G T A T T T T T G T T T T G T T T T T A G A G G A T G T A
T G T G T A T T T T A A C A T T T C T T A A T C A T T T T T A G C C A G C T A T
G T T T G T T T T G C T G A T T T G A C A A A C T A C A G T T A G A C A G C T A
T T C T C A T T T T T G C T G A T C A T G A C A A A A T A A T A T C C T G A A T T
T T T A A A T T T T T G C A T C C A G C T C T A A A T T T T C T A A A C A T A A A
A T T G T C C A A A A A A T A G T A T T T T C A G C C A C T A G A T T G T G T G
T T A A G T C T A T T G T C A C A G A G T C A T T T T A C T T T T A A G T A T A
T G T T T T T A C A T G T T A A T T A T G T T T G T T A T T T T T A A T T T T A
A C T T T T T A A A A T A A T T C C A G T C A C T G C C A A T A C A T G A A A A
A T T G G T C A C T G G A A T T T T T T T T T T G A C T T T T A T T T T A G G T
T C A T G T G T A C A T G T G C A G G T G T G T T A T A C A G G T A A A T T G C

10

20

30

40

50

GTGTCATGAGGGGTTTGGTGTACAGGTGATTTTCATTACCCAG
GGTAATAAGCATAGTACCCCAATAGGTAGTTTTTTTGATCCT
CACCCCTTCTCCCACCCCTCAAGTAGGGCCCTGGTGTTGCTGT
TTCCTTCTTTGTGTCCATGTATACTCAGTGTTTGTAGCTCCC
ACTTAGAAGTGAGAACATGCGGGTAGTTTGGTTTTCTGTTC
TGGATTAGTTCACTTAGGATAAATGACCTCTAGCTCCATCT
GGTTTTTTATGGCTGCATAGTATTCCATGGTGATATATGTAT
CACATTTTTCTTTATCCAGTCTACCATTGATAGGCATTTAG
GTTGATTCCCTGTCTTTGTATTATCATGAATAGTGCTGTGAT
GAACATACACATGCATGTGTCTTTATGGTAGAAAAAATTTG
TATTCCTTTAGGTACATATAGAATAAATGGGGTTGCTAGGG
TGAATGGTAGTTCTATTTTTTCAGTTATTTTGAGAAATCTTCA
AACTGCTTTTTCATAAATAGCTAAACTAATTTACAGTCCCGC
CAGCAGTGATATAAGTGTTCCCTTTTCTCCACAACCTTGCC
AACATCTGTGATTTTTTTTGACTTTTTTAATAAATAGCCATTCC
TAGAGAATTGATTTTGCAATTCTCTATTAGTGATATTAAAGC
ATTTTTTTTCATATGCTTTTTTAGCTGTCTGTATATATTCTTC
TGAAAAAATTTTTCATGTCTCTTTTGCCCGAGTTTGTAGTGGGGT
GGGTGTTTTTTTTGCTTGTTAATTAGTTTTTAAGTTCCTTCC
AGATTCCTGCATATCCCTTTGTGTGGATACATGGTTTTGCAGA
TATTTTTCTCCCATTTGTGTAGGTGTCTTTTACTCTGTGTG
ATAGTTTTCTTTTGGCCATGCAGGAGCTCGTTAGGTCCCATTT
TGTGTTTTGTTTTTTGTGTGCAGTTGCTTTTTGGCGTCTTTCATC
ATAAAAATCTGTGCGCAGGGGCTATGTCCAGAAATGGTATTTTC
CTAGGTTGTCTTCCAGGGTTTTTTTACAATTTTAGATTTTAC
GTTTATGTCTTTAATCCATCTTGAGTTGATTTTTTGTATAT
GGCACAAGGAAGGGGTCCAGTTTCACTCCAATTCTCTATGG
CTAGCAATTATCCAGCACCATTTATTGAATACGGGAGTCC
TTTCCCCATTGCTTGTTTTTTTGTCAACTTTGTTGAAGATC
AGATGGTTGTAAAGTGTTGTGGCTTTATTTCTTGCTCTCTA
T
TCTCCATTGGTCTATGTGTCTGTTTTTTTATAACAGTACCCCT
GCTGTTTCAGGTTCCCTATAGCCTTTTTTAGTATAAAAATCGGGCT
AATGTGATGCCTCCAGCTTTGTCTTTTTTTGCTTAGGATTG
CTTTGGCTATTTGGGGCTCCTTTTTTTGGGTCCATATTAAATTT
TAAAAACAGTTTTTTTTCTGGTTTTTGTGAAGGATATCATTTGGT
AGTTTATAGGAATAGCATTTGAATCTGTAGATTGCTTTGGG
CAGTATGGCCATTTTAAACAATAATTCTTCCCTATCTAT
GAATATGGAATGTTTTTTCCATGTGTTTGTGTCTCTCTTT
ATACCTGATGTATAAAGAAAAAGCTGGTATTATTCTCTACTC
AATCTGTTCCAAATAAATTTGAGGAGGAGGAACCTCTTCCCTA
ATGAGGCCAGCATCATTTCTGATACCAAAAACCTGGGCAGAGA
CACAAACAGAAAAAAGAAAAAAGCTTCAAGGCCAATACTCTTGAT
GAATATAGATGCAAAAAATCCTCAACAAAAATACTAGCAAAAC
CAAAATCCAGCAGCACATCAAAAAAGCTGATCTACTTTGATC
AAGTAGGCTTTATCCCTGGGATGCAAGGTTGGTTCAACAT
ACACAAATCAATAAGTGTTGATTCTCATCAATAAACAGAGCT
AAAAACAAAAAACCAACAAGATTATCTCAATAGGTAGAGAAA
AGGTTGTCAATAAAAATTTAACATCCTCCATGTTAAAAAAC
TTCAGTAGGTGAGGTGTAGTGACTCACACCTGTAATCCCA

G C A C T T T T G G G A G G C C A A G G C G G G C A T A T C T C T T A A G C C C A
G G A G T T C A A G A C G A G C C T A G G C A G C A T G G T G A A A C C C C A T
C T C T A C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A T T A G C T T G G T A T G
G T G A C A T G C A C C T A T A G T C C C A G C T A T T C A G G A G G T T G A G
G T G G G A G G A T T G T T T G A G C C C G G G A G G C A G A G G T T G G C A G
C G A G C T G A G A T C A T G C C A C C G C A C T C C A G C C T G G G C A A C G
G A G T G A G A C C C T G T C T C A A A A A A G A A A A A T C A C A A A C A A T
C C T A A A C A A A C T A G G C A T T G A A G G A A C A T G C C T C A A A A A A
A T A A G A A C C A T C T A T G A C A G A C C C A T A G C C A A T A T C T T A C
C A A A T G G G C A A A A G C T G G A A G T A T T C T C C T T G A G A A C C G T
A A C A A G A C A A G G A T G T C C A C T C T C A C C A C T C C T T T T C A G C
A T A G T T C T G G A A G T C C T A G C C A G A G C A A T C A G G A A A G A G A
A A G A A A G A A A G A C A T T C A G A T A G G A A G A G A A G A A G T C A A A
C T A T T T C T G T T T G C A G G C A G T A T A A T T C T G T A C C T A G A A A
A T C T C A T A G T C T C T G C C C A G A A A C T C C T A A A T C T G T T A A A
A A T T T C A G C A A A G T T T T G G C A T T C T C T A T A C T C C A A C A C C
T T C C A A A G T G A G A G C A A A A T C A A G A A C A C A G T C C C A T T C A
C A A T A G C C G C A A A A C G A A T A A A A T A C C T A G G A A T C C A G C T
A A C C A G G G A G G T G A A A G A T C T C T A T G A G A A T T A C A A A A C A
C T G C T G A A A G A A A T C A G A G A T G A C A C A A A C A A A T G G A A A T
G T T C T T T T T T A A C A C C T T G C T T T A T C T A A T T C A C T T A T G A
T G A A G A T A C T C A T T C A G T G G A A C A G G T A T A A T A A G T C C A C
T C G A T T A A A T A T A A G C C T T A T T C T C T T T C C A G A G C C C A A G
A A G G G G C A C T A T C A G T G C C C A G T C A A T A A T G A C G A A A T G C
T A A T A T T T T T C C C C T T T A C G G T T T C T T T C T T C T G T A G T G T
G G T A C A C T C G T T T C T T A A G A T A A G G A A A C T T G A A C T A C C T
T C C T G T T T G C T T C T A C A C A T A C C C A T T C T C T T T T T T T G C C
A C T C T G G T C A G G T A T A G G A T G A T C C C T A C C A C T T T C A G T T
A A A A A C T C C T C C T C T T A C T A A A T G T T C T C T T A C C C T C T G G
C C T G A G T A G A A C C T A G G G A A A A T G G A A G A G A A A A A G A T G A
A A G G G A G G T G G G G C C T G G G A A G G G A A T A A G T A G T C C T G T T
T G T T T G T G T G T T T G C T T T A G C A C C T G C T A T A T C C T A G G T G
C T G T G T T A G G C A C A C A T T A T T T T A A G T G G C C A T T A T A T T A
C T A C T A C T C A C T C T G G T C G T T G C C A A G G T A G G T A G T A C T T
T C T T G G A T A G T T G G T T C A T G T T A C T T A C A G A T G G T G G G C T
T G T T G A G G C A A A C C C A G T G G A T A A T C A T C G G A G T G T G T T C
T C T A A T C T C A C T C A A A T T T T T C T T C A C A T T T T T T G G T T T G
T T T T G G T T T T T G A T G G T A G T G G C T T A T T T T T G T T G C T G G T
T T G T T T T T T G T T T T T T T T T T G A G A T G G C A A G A A T T G G T A G T
T T T A T T T A T T A A T T G C C T A A G G G T C T C T A C T T T T T T T A A A
A G A T G A G A G T A G T A A A A T A G A T T G A T A G A T A C A T A C A T A C
C C T T A C T G G G G A C T G C T T A T A T T C T T T A G A G A A A A A A T T A
C A T A T T A G C C T G A C A A A C A C C A G T A A A A T G T A A A T A T A T C
C T T G A G T A A A T A A A T G A A T G T A T A T T T T G T G T C T C C A A A T
A T A T A T A T C T A T A T T C T T A C A A A T G T G T T T A T A T G T A A T A
T C A A T T T A T A A G A A C T T A A A A T G T T G G C T C A A G T G A G G G A
T T G T G G A A G G T A G C A T T A T A T G G C C A T T T C A A C A T T T G A A
C T T T T T T C T T T T C T T C A T T T T C T T C T T T T C T T C A G G A A T A
T T T T T C A A G A T G T C T T A C A C A G A G A C A C T C T A G T G A A A G C
C T T C C T G G A T C A G G T A A A T G T T G A A C T T G A G A T T G T C A G A

10

20

30

40

50

GTGAATGATATGACATGTTTTCTTTTTTAATATATCCTAC
AATGCCTGTTCTATATATTTATATTTCCCTGGATCATGCC
CCAGAGTTCTGCTCAGCAATTGCGAGTTAAGTTAGTTACAC
TACAGTTCTCAGAAAGAGTCTGTGAGGGGCATGTC AAGTGCA
TCATTTACATTTGGTTTGCCTCTTGTCTAGATTTATGCTTCG
GGAATTTCAGACCTTTTGTTTTACAATATAAATAAATATTATTG
CTATCTTTTTTAAAGATATAAATAAATAAAGATATAAAGTTTGACC
ACAACCTACTGTTTTTTTGAAACATAGAAATTCCTGGTTTACA
TGTATCAAAGTGAAATCTGACTTTAGCTTTTTACAGATATAA
TATATACATATATATATATCCTGCAATGCTTGTACTATATAT
GTAGTACAAGTATATATATATATGTTTTGTGTGTGTATATATA
TATAGTACGAGCATATATACATATTACCAGCATTTGTAGGA
TATATATATGTTTTATATATTTAAAAAAAAGTTATAAACTTA
AAACCCTATTATGTTATGTAGAGTATATGTTATATATGAT
ATGTA AAAATATATAACATATACTCTATGATAGAGTGTAAT
ATATTTTTTTATATATATTTTTTAACATTTATAAAAATGATAGA
ATTAAGAATTGAGTCTTAATCTGTTTTTATTAGGTGCTTTTT
TGTAGTGTCTGGTCTTTCTAAAGTGTCTAAATGATTTTTTC
CTTTTTGACTTATTAATGGGGAAGAGCCTGTATATTAACAA
TTAAGAGTGCAGCATTTCCATACGTCAAACAACAACAACATTT
TAATTC AAGCATTAACCTATAACAAGTAAGTTTTTTTTTT
TTTTTTTGAGAAAGGGAGGTTGTTTTATTTGCCTGAAATGAC
TCAAAAATATTTTTTGAAACATAGTGTACTTTATTTAAATAA
CATCTTTATTTGTTTTCATTTCTTTTAAAAAATATCTACTTAA
TTACACAGTTGAAGGAAATCGTAGATTATATGGAACCTTAT
TTCTTAATATATTACAGTTTGTATATAATAACATTTCTGGGG
ATCAGGCCAGGAAACTGTGTCATAGATAAAGCTTTTGAAAT
AATGAGATCCTTATGTTTTACTAGAAATTTTGGATTGAGAT
CTATGAGGTCTGTGACATATTGCGAAGTTCAAGGAAAAATT
CGTAGGCCCTGGAATTTTCATGCTTCTCAAGCTGACATAAAA
TCCCTCCCACTCTCCACCTCATCATATGCACACATTTCTAC
TCCTACCCACCCACTCCACCCCCCTGCAAAAGTACAGGTAT
ATGAATGTCCTCAAAACCATAGGCTCATCTTCTAGGAGCTT
CAATGTTATTTTGAAAGATTTTGGGCGAGAAAAAATTAAAGTAAT
ACGAAATAACTTTATGTATGAGTTTTTAAAGTGAAAGTA AAC
ATGGATGTATTTCTGAAGTAGAATGCAAAATTTGAATGCAT
TTTTTAAAGATAAATTAGAAAACTTCTAAAAA ACTGTCAGAT
TGTCTGGGCCCTGGTGGCTTATGCCTGTAAATCCCAGCACTT
TGGGAGTCCGAGGTGGGTGGATCACAAAGGT CAGGAGATCG
AGACCATCCTGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAA
GTATACAAAAAATTAGCTGGGCGGTGGCAGCGTGTGCCCTGTA
ATCCCAGCTACCTGGGAGGCTGAGGCGAGGAGAAATCGCTTG
AACCCAGGAGGTGTAGGTTGCGAGTGAGTCAAGATCGCGCC
ACTGCACTTTTAGCCTGGTGACAGAGCTAGACTCCGTCTCA
AAAAAAA AAAAAAATAATCAGATTGTTCTCTACACCTAGTG
TTCTATACCA CACTCCTGTTAGGGGGCATCAGTGGAAATG
GTTAAGGAGATGTTTTAGTGTGTATTGTCTGCCAAGCACTG
TCAACACTGTCTATAGAAACTTCTGTACGAGTAGAATGTGA
GCAAAATTATGTGTTGAAATGGTTCTCTCCCTGCGAGGTCT
TTCAGCTGAAACCTGGCTTATCTCTCAGAAAGTACTTTCTCT

10

20

30

40

50

TGCACAGTTTCTACTTTGTCCTTTCACAGAAAAGCCTTGACA
CTAATAAAAATATATAGAAGACGATACGTGAGTAAAACTCC
TACACGGAAGAAAAACCTTTGTACATTGTTTTTTTTGTTTT
GTTTCTTTGTACATTTTCTATATCATAAATTTTTTGCGCTT
CTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCATTATTTTTTAG
GCAGAAGGGAAAAAAGCCCTTTAAATCTCTTCGGGAACCTG
AAGATAGACCTTGATTTAACAGCAGAGGGGCGATCTTAACA
TAATAATGGCTCTGGCTGAGAAAAATTAAACCAGGCCTACA
CTCTTTTATCTTTGGAAGACCTTCTACACTAGTG TGCAAG
G
AACGAGATGTTCTAATGACTTTTTTAAATGTGTAACTTTAAT
AAGCCTATTCCATCACAATCATGATCGCTGGTAAGTAGC
TCAGTGGTGTTGGGGAAACGTTCCCCCTGGATCATACTCCAG
AATTCTGCTCTCAGCAATTGCAAGTTAAGTAAGTTACACTA
CAGTTCTCACAAAGAGCCTGTGAGGGGGATGTCAGGTGCATC
ATTACATTGGGTGTCTCTTTTCTCTAGATTTATGCTTTTGG
GATACAGACCTATGTTTACAATATAATAAATATTATTGCT
ATCTTTTAAAGATATAATAAATAGGATGTAAACTTTGACCAC
AACTACTGTTTTTTTGA AATACATGATTCATGGTTTACAT
GTGTCAAGGTGAAATCTGAGTTGGCTTTTACAGATAGTTTG
ACTTTCTATCTTTTGGGCATTCCTTTGGTGTTGTAGAATTACT
GTAATACTTCTGCAATCAACTGAAAACTAGAGCCTTTAAA
TGATTTCAATTCCACAGAAAGAAAGTGAGCTTGAACATAG
GATGAGCTTTAGAAAGAA AATTTGATCAAGCAGATGTTTAA
TTGGAATTGATTATTAGATCCTACTTTGTGGATTTTAGTCC
CTGGGATTTCAGTCTGTAGAAATGTCTAATAGTTCTCTATA
GTCCTTGTTCCTGGTGAAACCACAGTTAGGGTGTTTTTGTTT
ATTTTATTGTTCTTGCTATTGTTGATATTCTATGTAGTTG
AGCTCTGTAAAAGGAA AATTTGTATTTTATGTTTTTAGTAATT
GTTGCCAACTTTTTTAAATTTAATTTTTCATTATTTTTTGAGCC
AAATTTGAAATGTGCACCTCCTGTGCCCTTTTTTCTCCTTAG
AAAAATCTAATTACTTTGGAACAAGTTTCAGATTTCACTGGTC
AGTCATTTTTCATCTTGTTTTCTTCTTGCTAAGTCTTACCA
TGTAACCTGCTTTTGGCAATCATTTGCAACTCTGAGATTATAA
AATGCCTTAGAGAAATATACTAACTAATAAGATCTTTTTTT
CAGAAACAGAA AATAGTTTCTTTGAGTACTTCTCTTCTTGCA
TTTTCTGCCTATGTTTTTTGAAGTTGTTGCTGTTTGCCTGCA
ATAGGCTATAAGGAATAGCAGGAGAAATTTTACTGAAGTG
CTGTTTTTCTAGGTGCTACTTTGGCAGAGCTAAGTTATCT
TTTTGTTTTCTTAATGCGTTTGGACCATTTTTGCTGGCTATA
AAATAAAGTGAATTAATATAAATTTCTAACACAATGTTGACATT
GTAGTTACACAAACACA AATAAATATTTTATTTAAAAATT
TGGAAGTAATATAA AAGGGAAAAATATATTTATAAGAAAGG
GATAAAGGTAATAGAGCCCTTCTGCCCCCCCACCACCAA
TTTACACAACA AATGACATGTTTCGAATGTGAAAGGTCA
AATAGCTTTTCCCATCATGAATCAGAAAGATGTGGACAGCT
TGATGTTTTAGACAACCACTGAACCTAGATGACTGTTGTAC
TGTAAGCTCAGTCATTTAAAAAATATATAAATACTACCTTG
TAGTGTCCTACTGTTGTTTTTTTACATGGTAGATTCTTAT
TTAAGTGCTAACTGGTTATTTTCTTTGGCTGGTTTATTGT

10

20

30

40

50

A C T G T T A T A C A G A A T G T A A G T T G T A C A G T G A A A T A A G T T A
T T A A A G C A T G T G T A A A C A T T G T T A T A T A T C T T T T C T C C T A
A A T G G A G A A T T T T G A A T A A A A T A T A T T T G A A A T T T T

配列番号 1 4

配列番号 1 3 の逆相補体

A A A A T T T C A A A T A T A T T T T A T T C A A A A T T C T C C A T T T A G G
A G A A A A G A T A T A T A A C A A T G T T T A C A C A T G C T T T A A T A A C
T T A T T T C A C T G T A C A A C T T A C A T T C T G T A T A A C A G T A C A A
T A A A C C A G C C A A A G A A A A T A A C C A G T T A G C A C T T A A A T A A
G A A T C T A C C A T G T A A A A A A C A C A G T A T G G G A C A C T A C A A G
G T A G T A T T T A T A T A T T T T T A A A T G A C T G A G C T A C A G T A C
A A C A G T C A T C T A G T T C A G T G G T T G T C T A A A A C A T C A A G C T
G T C C A C A T C T T T C T G A T T C A T G A T G G G A A A G C T A T T A T G A
C C T T T C A C A T T C G A A C A T G T C A T T T T G T T G T G T A A A T T T G
G T G G G T G G G G G C A G A A G G G C T C T A T T A C C T T T A T C C C T T
T C T T A T A A A T A T A T T T T C C C T T T A T A T T A C T T C C A G A A T
T T T A A A T A A A A T A T T T T A T T T G T G T T T G T G T A A C T A C A A T G
T C A A C A T T G T G T T A G A A T T A T A T T A A T C A G T T A T T T T A T A
G C C A G C A A A A T G G T C C A A A C G C A T T A A G A A A A C A A A A G A T
A A C T T A G C T C T G C C A A A G T A G C A C C T A G G A A A A C A G C A C T
T C A G T A A A A T T T C T C C T G C T A T T C C T T A T A G C C T A T T G C A
G G C A A A C A G C A A C A A C T T C A A A A A C A T A G G C A G A A A T G C A
A G A A G G A A G T A C T C A A G G A A C T A T T T T C T G T T T C T G A A A A
A A A G A T C T T A T T A G T T A G T A T A T T C T C T A A G G C A T T T T A T
A A T C T C A G A G T T G C A A T G A T T G C C A A A G C A G G T A C A T G G T
A A G A C T T A G C A A G A A G A A A A C A A G A T G A A A A T G A C T G A C C
A G T G A A A T C T G A A C T T G T T C C A A G T A A T T A G A T T T T C T A A
G G A G A A A A A A G G C A C A G G A G G T G C A C A T T T C A A T T T G G C T
C A A A A A T A A T G A A A A T T A A T T T A A A A A G T T G G C A A C A A T T
A C T A A A A C A T A A A A T A C A A T T T C C T T T T A C A G A G C T C A A C
T A C A T A G A A T A T C A A C A A T A G C A A G A A C A A T A A A A T A A A C
A A A A C A C C C T A A C T G T G G T T C A C C A G G A A C A A G G A C T A T A
G A G A A C T A T T A G A C A T T T C T A C A G A C T G A A T C C C A G G G A C
T A A A T C C A C A A A G T A G G A T C T A A T A A T C A A T T C C A A T T A A
A C A T C T G C T T G A T C A A T T T T C T T T C T A A A G C T C A T C C T A T
G T T C A A G C T C A C T T T C T T T C T G T G G A A T T G A A A T C A T T T A
A A G G C T C T A G T T T T C A G T T G A T T G C A G A A G T A T T A C A G T A
A T T C T A C A C A C C A A A G A A T G C C A A A A G A T A G A A A G T C A A C
T A T C T G T A A A A G C C A A C T C A G A T T T C A C C T T G A C A C A T G T
A A A C C A T G A A T C A T G T A T T T C A A A A A A A C A G T A G T T G T G G
T C A A G T T T A C A T C C T A T T A T T A T A T C T T T A A A A G A T A G C A
A T A A T A T T T A T T A T A T T G T A A A C A T A G G T C T G T A T C C C A A
A A G C A T A A A T C T A G G A A A A G A G A C A C C C A A T G T A A T G A T G
C A C C T G A C A T C C C C T C A C A G G C T C T T G T G A G A A C T G T A G T
G T A A C T T A C T T A A C T G C A A T T G C T G A G A G C A G A A T T C T G G
A G T A T G A T C C A G G G G A A C G T T T C C C C A C A C C A C T G A G C T A
C T T T A C C A G C G A T C A T G A T T G T G A T G G A A T A G G C T T A T T A
A G T T A C A C A T T T A A A A A G T C A T T A G A A C A T C T C G T T C T T G
C A C A C T A G T G T A G A A A G G T C T T C C A A A G A T A A A A G A G T G T
A G G C C T G G T T T A A T T T T C T C A G C C A G A G C C A T T A T T A T G T

10

20

30

40

50

T A A G A T C G C C C T C T G C T G T T A A A T C A A G G T C T A T C T T C A G
G T T C C G A A G A G A T T T A A A G G G C T T T T T T C C C T T C T G C C T A
A A A A T A A T G G A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A G A A G
C G C A A A A A T T A T G A T A T A G A A A A T G T A C A A A G G A A A C A A A
A C A A A A A A C A A T G T A C A A A G G T T T T T T C T T C C G T G T A G G A
G T T T T A C T C A C G T A T C G T C T T C T A T A T A T T T T A T T A G T G T
C A A G G C T T T T T C T G T G A A G G A C A A G T A G A A A C T G T G C A A G G
A A A G T A C T T C T G A G A G A T A A G C C A G G T T T C A G C T G A A A G A
C C T G C A G G G A G A G G A A C C A T T T C A A C A C A T A A T T T G C T C A
C A T T C T A C T C G T A C A G A A G T T T C T A T G A C A G T G T T G A C A G
T G C T T G G C A G A C A A T A C A C A C T A A A C A T C T C C T T A A C C A T
T T C C A C T G A T G C C C C C T A A C A G G A G T G T G G T A T A G A A G C A
C T A G G T G T A G G A A C A A T C T G A T A T T T T T T T T T T T T T T T G A
G A C G G A G T C T A G C T C T G T C A C C A G G C T A A A G T G C A G T G G C
G C G A T C T T G A C T C A C T G C A A C C T A C A C C T C C T G G G T T C A A
G C G A T T C T C C T G C C T C A G C C T C C C A G G T A G C T G G G A T T A C
A G G C A C A C G C T G C C A C G C C C A G C T A A T T T T T G T A T A C T T A
G T A G A G A C G G G G T T T C A C C A T G T T G G C A G G A T G G T C T C G A
T C T C C T G A C C T T G T G A T C C A C C C A C C T C G G A C T C C C A A A G
T G C T G G G A T T A C A G G C A T A A G C C A C C A G G C C C A G A C A A T C
T G A C A G T T T T T A G A A G T T T T C T A A T T T A T C T T T A A A A A T G
C A T T C A A A T T T T T G C A T T C T A C T T C A G A A T A C A T C C A T G T T
T A C T T C A C T T T T T A A A A C T C A T A C A T A A G T T A T T T C G T A T T
A C T T A A T T T T T T T C T G C C C A A A T C T T C A A A T A A C A T T G A A G
C T C C T A G A A G A T G A G C C T A T G G T T T T G A G A C A T T C A T A T A
C C T G T A C T T T T T G C A G G G G G T G G A G T G G G T G G G T A G G A G T A
G A A T G T G T G C A T A T G A T G A G G T G G A G A G T G G G A G G G A T T T
T A T G T C A G C T T G A G A A G C A T G A A A T T C C A G G C C T A C G A A T
T T T C C T T G A A C T T C G C A A T A T G T C A C A G A C C T C A T A G A T C
T C A A T C C A A A A T T T C T A G T A A A C A T A A G G A T C T C A T T A T T
T C A A A G C T T T A T C T A T G A C A C A G T T T C C T G G C C T G A T C C C
C A G A A T G T T A T T A T A A C A A A C T G T A A T A T A T T A A G A A A T A
A G T T C C A T A T A A T C T A C G A T T T C C T T C A A C T G T G T A A T T A
A G T A G A T A T T T T T T A A A A G A A T G A A A C A A T A A A G A T G T T A
T T T A A A T A A G T A C A C T A T G T T T C A A A A A T A T T T T T G A G T C
A T T T C A G G C A A A T A A A C A A C C T C C C T T T C T C A A A A A A A A A
A A A A A A A C T T A C T T G T T A T A G G T T A A T G C T T G A A T T A A A A
T G T T T G T T G T T T G A C G T A T G G A A T G C T G C A C T C T T A A T T G
T T A A T A T A C A G G C T C T T C C C C A T T A A T A A G T C A A A A G G A A
A A A T C A T T T A G A C A C T T T A G A A A G A C C A G A C A C T A C A A A A
A G C A C C T A A T A A A A C A G A T T A G G A C T C A A T T C T T A A T T C T
A T C A T T T T A T A A A T G T T A A A A T A T A T A T A A A A A A T A T A T T
A C A C T C T A T C A T A G A G T A T A T G T T A T A T A T T T T A C A T A T C
A T A T A T A A C A T A T A C T C T A C A T A A C A T A A T A G G G T T T T A A
G T T T A T A A C T T T T T T T T A A T A T A T A A A C A T A T A T A T A T C C
T A C A A T G C T G G T A A T A T G T A T A T A T G C T C G T A C T A T A T A T
A T A T A C A C A C A C A A A C A T A T A T A T A T A C T T G T A C T A C A T A
T A T A G T A C A A G C A T T G C A G G A T A T A T A T A T A T G T A T A T A T T A
T A T C T G T A A A A G C T A A G T C A G A T T T C A C T T T G A T A C A T G T
A A A C C A G G A A T T C T A T G T T T C A A A A A A C A G T A G T T G T G G T

10

20

30

40

50

CAACTTTATATCTTATTATTATATCTTTAAAAGATAGCAA
TAATAATTTATTATATTGTAAACAAAGGTCTGAATTCCCGA
AGCATAAATCTAGGACAAGAGGCAACCAATGTAATGATGC
ACTTGACATGCCCTCACAGACTCTTCTGAGAACTGTAGTGG
TAACTAACTTAACTGCAATTGCTGAGCAGAACTCTGGGGC
ATGATCCAGGGGAATATAAATATATAGAACAGGCGATTGT
GGATATATTAAAAAAGAAAAACATGTCATATCATTCCTCT
GACAATCTCAAGTTCAACATTTACCTGATCCAGGAAGGCT
TTCACCTAGAGTGTCTCTGTGTAAAGACATCTTGAAAAATAT
TCCTGAAGAAAAAGAAAGAAAAATGAAGAAAAAGAAAAAGTTTC
AAATGTTGAATGGCCATATAATGCTACCTTCCACAATCC
CTCACTTGAGCCAACATTTTAAAGTTCTTTATAAATTTGATAT
TACATATAAACACATTTGTAAAGAAATATAGATATATATATT
TGGAGACACAAAAATATACATTTCAATTTATTTACTCAAGGAT
ATATTTTACATTTTTACTGGTGTTTGTCTAGGCTAATATGTAA
TTTTTTTCTCTAAAGAATATAAGCAGTCCCCAGTAAGGGTA
TGTATGTATCTATCAATCTATTTTACTACTCTCATCTTTT
AAAAAAAGTAGAGACCCTTAGGCAATTAAATAAATAAACT
ACCAATTCTTGCCATCTCAAAAAAAACAAAAAACCAACC
AGCAACAAAAAATAAGCCACTACCATCAAAAAACCAAAACAA
ACCAAAAAAATGTGAAGAAAAAATTTGAGTGAGATTAGAGAA
CACACTCCGATGATTATCCACTGGGTTTGCCTCAACAAGC
CCACCATCTGTAAAGTAACATGAACCAACTATCCAAGAAAG
TACTACCTACCTTGGCAACGACCCAGAGTGAGTAGTAGTAA
TATAATGGCCACTTAAAAATAATGTGTGCTAACACAGCAC
CTAGGATATAGCAGGTGCTAAAGCAAAACACACAAACAAAC
AGGACTACTTTATTCCCTTCCCAGGCCCCACCTCCCTTTCA
TCTTTTCTCTTCCATTTTCCCTAGGTTCTACTCAGGCCCA
GAGGGTAAGAGAACATTTAGTAAGAGGGAGGAGTTTTTAAAC
TGAAAGTGGTAGGGATCATCCTATACCTGACCAGAGTGGC
AAAAAAAGAGAAATGGGTATGTGTAGAAAGCAAAACAGGAAGG
TAGTTCAAGTTTCTCTTATCTTAAAGAAACGAGTGTAACACA
CTACAGAAAGAAAGAAACCGTAAAGGGGAAAAAATATTAGCA
T
TTCGTCATTATTGACTGGGCACTGATAGTGCCCCCTTCTTG
GGCTCTGGAAAGAGAAATAAGGCTTATATTTAATCGAGTGG
ACTTATTATACCTGTTCCACTGAATGAGTATCTTTCATCAT
AAGTGAATTAGATAAAGCAAGGTGTTAAAAAAGAACATTT
CCATTTGTTTGTGTCATCTCTGATTTCTTTTCAGCAGTGTT
TTGTAAATCTCATAGAGATCTTTTACCCTCCCTGGTTAGCT
GGATTCCCTAGGTATTTTATTTCGTTTTGCGGCTATTGTGAA
TGGGACTGTGTTCTTGATTTTGTCTCTCACTTTGGAAGGTG
TTGGAGTATAGAGAAATGCCAAAACTTTGCTGAAATTTTAA
ACAGATTTAGGAGTTTCTGGGCAAGAGACTATGAGATTTTTC
TAGGTACAGAAATTAATACTGCCTGCAAAACAGAAATAGTTTG
ACTTCTTCTCTTCTCTATCTGAATGTCTTTCTTTCTTTCTC
TTTCCCTGATTGCTCTGGCTAGGACTTCCAGAACTATGCTG
AAAAGGAGTGGTGAGAGTGGAACATCCTTGTCCTTGTTACGG
TTCTCAAGGAGAAATACTTCCAGCTTTTGGCCATTTGGGTAA
GATATTGGCTATGGGTCTGTCTAGATGGTTCTTATTTTTT

10

20

30

40

50

TTGAGGCATGTTTCCTTCAATGCCTAGTTTTGTTTTAGGGATTG
TTTGTGATTTTCTTTTGTGAGACAGGGTCTCACTCCGTT
GCCCAGGCTGGAGTGCGGTGGCATGATCTCAGCTCGCTGC
CAACCTCTGCCCTCCCGGGCTCAAACAATCCTCCCACCTCA
ACCTCCTGAATAGCTGGGACTATAGGTGCATGTCACCATTA
CCAAGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGAGATGG
GGTTTCACCATGCTGCCCTAGGCTCGTCTTGAACCTCCTGGG
CTTAAGAGATATGCCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGG
ATTACAGGTGTGAGTCACTACACCTGACCTACTGAAGGTT
TTTAACATGGAGGATGTTAAATTTTATTGACAACCTTTTC
TCTACCTATTGAGATAATCTTGTGGTTTTTTGTTTTTTAGCT
CTGTTTTATGTGATGAATCACACTTATTGATTTGTGTATGT
TGAACCAACCTTGCATCCCAGGGATAAAGCCTACTTTGATC
AAAGTAGATCAGCTTTTTTGTATGTGCTGCTGGATTTGGTTTT
GCTAGTATTTTTGTGTGAGGATTTTTTGCATCTATATTCAATCA
AGGATATTGGCCTGAAGTTTTTCTTTTTTCTGTTGTGTCTC
TGCCAGGTTTTTGGTATCAGAATGATGCTGGCCTCATTAGG
GAAGAGTTCTCTCCTCCTCAATTTTTTTTGGAAACAGATTGAGT
AGGAATAATAACAGCTTTTTCTTTATACATCAGGTATAAAG
AGATGACACAAACACATGGAAACAAACATTCATATTCAATAG
ATAGGAAGAATAATAATTTGTTAAATGAGCCATACTGCCCA
AAGCAATCTACAGATTCAATGCTATTCTATATAAATCTACCA
ATGATATCCTTCACAAAACAGAAACAAACCTGTTTTTAAAT
TAATATGGACCCCAAAAGGAGCCCAAAATAGCCAAAGCAAT
CCTAAGCAAAAGAAACAAAGCTGGAGGCATCACATTAGCC
GATTTTTATACTAAAGGCTATAGGAACCTGAACAGCAGGG
TACTGTTATAAAACAGACACATAGACCAATGGAGAAATAG
AGAGCCAAGAAATAAAGCCACACACTTACAACCATCTGAT
CTTCAACAAAGTTGACAAACAAACAAAGCAATGGGGAAAGGA
CTCCGTATTCAATAAATGGTGCTGGGATAATTGCTAGCCA
TAGGAATTGGAGTGAAACTGGACCCCTTCTTGTGCCATA
TACAAAAATCAACTCAAGATGGATTAAAGACATAAACGTA
AAATCTAAATTTGTAAAAACCCCTGGAAGACAACCTAGGAA
ATACCATTTCTGGACATAGGCCCTGGCACAGATTTTATGAT
GAAGACGCCAAAGCAACTGCAACAAACAAACACAAAT
GGGACCTAACGAGCTCCTGCATGGCAAAAGAAACTATCAA
CAGAGTAAAGACAAACCTACACAATGGGAGAAAAATATCT
GCAAAACCATGTATCCAACAAGGGATATGCAGAACTCTGGA
AGGAACCTTAAACCTAATTAACAAGCAAAAAACAACCCACC
CCACTACAAACTGGGGCAAGGACATGAAAAATTTTTTCAGAA
GAATATATACAGACAGCTAAAAAGCATATGAAAAAATGCT
TAATATCACTAATAGAGAAATTGCAAAATCAATTCTCTAGGA
ATGGCTATTATTAAAAAGTCAAAAAATCACAGATGTTGGC
AAGGTTGTGGAGAAAAAGGGAACACTTATACACTGCTGGCG
GGACTGTAAATTAGTTTTAGCTATTATGAAAAGCAGTTTTGA
AGATTTCTCAAAATAACTGAAAAATAGAACTACCATTCACCC
TAGCAACCCCATTTATTCTATATGTACCTAAAGGAATACAA
ATTTTTCTACCATAAAGACACATGCATGTGTATGTTTCATC
ACAGCACTATTTCATGATAACAAAGACAGGGAATCAACCTA
AATGCCTATCAATGGTAGACTGGATAAAGAAAAATGTGATA

10

20

30

40

50

CATATACACCATGGAATACTATG CAGCCATAAAAAACCAG A
TGGAGCTAGAGGTCATTATCCTAAGTGAACCTAATCCAGGA
ACAGAAAAACCAACTACCGCATGTTCTCACTTCTAAGTGGG
AGCTAAACACTGAGTATACATGGACACAAGAAGGAAACA
GCAACACCCAGGGCCTACTTTGAGGGGTGGGAGGAAGGGGTGAGG
ATCAAAAAAACTACCTATTGGGGTACTATGCTTTATTACCTGG
GTAATGAAATCACCTGTACACCAAAACCCTCATGACACGCA
ATTTACCTGTATAACACACCTG CACATGTACACATGAACC
TAAAAATAAAAGTCAAAAAAATAATTCCAGTGACCAATTTT
TCATGTATTGGCAGTGACTGGAATTTATTTTAAAAAGTTAA
AATTA AAAAATAACAAACATAATTAAACATGTAAAAACATAT
ACTTA AAAAGTAAAAATGACTCTGTGACAATAGACTTTAACAC
ACAATCTAGTGGCTGAAAATACTATTTTTTTGGACAATTTT
ATGTTTTAGAAAAATTTAGAGCTGGATGCAAAAATTTAAAAAT
TCAGGATATTTATTTTGT CATGATCAGCAAAAATGAGAAATAG
CTGTCTAACTGTAGTTTGTCAAATCAGCAAAAACAAACATA
GCTGGCTAAAAAATGATTAAAGAAATGTTAAAAATACACATAC
ATCCTCTAAAAAACA AAAACAAAAAATACCAAAATGGTTGCAA
ACCCATTCTGCAGTTCACTAAATTTCTCTCAAAAAAAGCTCC
CAAGTAACCAATCAAAAAAACGGAAAAAATACTAAGCACTT
TAGGAAAAAAGAAAAATGTTTCAAGGCACAGATTAAATTAGA
AAACTTCTACATGTCTACTAAAAATTTACCAATATATAAAA
ACTTACTGACATGTAATTTCAAGTTGGACCAATTCATTTTTC
TAAAAACATTTCCCTACTACTTTCTCAAGAACCAATAAAAA
CTCTGGAGAACTAGGAAAAAATAAGGGTCTCTATTTAAGTCA
TCTTTCTGCACCTTGAGATGTATAAGGCTGGGGGGTCCCTT
GAACAAGATATTCCTATTCTATGCTTTTGGTTAACACTTTA
CTGTGTAATTA CTGGTGCTCCACAGGTCTGTTTACCTAAGC
TCAAACTGATTTCTGTAGATACATAGGT CAGGCTTATTTG C
CCCAATTTTTTCTATTGCTTTACACACTTAGACCTGGGGTTA
TTACAGTTTAAACACTTACTGTTTACCTTCTATGTGCCAGGCA
TTATTGCAAGCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAAGAC
AGAGTCTCGGTGTTCCCCAGGCTGGAGTACACTGGGCACAT
CATAACTCCCTGTAAACCTCAAACTCCTGGGGCTCAAAAAGAT
CCTCCTGCCTCAGCTTTTCGGAATAGCTAGGATTACAGGCA
CACAGAAACACATTTCCAATAATTCTTTTTTTATTTTTTTGTA
GAGATGGGGTTTTCACTATGTTTGCC CAGGCTGGTCTGGAAC
TCCTGGCCTCAAGTGATCCGCCCTGCCCTTGCACTCCCAAG
CTCTGTTCTTACAGGCATGAGCTACTGTGCCCTTTTTTTCAA
CTGATAAAAAGAGAAACACAAAAAGTATACTATAATTCTTTT
CCTGATTTTCAGAACATCTTTTAAAGTGTTTACTTAGGGTTT
TAGGATTATAGATTTATCATCATCATTTTTTTTTTCAAGT
TGGGTCCATGCTCAACAATTAATTTATCATTTACTTTTCTCTT
TTGAATTTACTGTTTCAGGCTTTTTTTTTTTTTAAAAAATA
AGAAAGTGAAATAACAATAATAAAATGCAAAAGTAAAAAATGT
TCCATTATAATATATTTTAAACAGTTTTTGCTGTATTTTATATT
CATATGTCAAGAAAAAAGACTTAGAAATTACTTCTTTTGG
TTTTTGTTAATAAGTCCATTCAATAACTGTTTACATAAATAGA
CTATACACAATGTAGGGGGCTGGGGGCTGGGGGCTGTCTGGTT
GGCCACTATTAAGCCCGGTACCTAGAACAGTGCCCTAGGAG

10

20

30

40

50

CTCAATATATATTTATTAAACAATAAGTTAAATATTTACT
TTAAGGGTTAATCTTACCTATTTTAGGGTAACAACAATTG
TATGGAAAAAGAAGAACATTTAAGAAAAAATGCTTGATT
AAATGTTTCTTCAAGCATAAATTCCTGCTGGTAATATTTCTT
TCTTTTTTAAATGCAACTTCTGTTTTTGTTTTTTATTCTGTA
AGACACAATTTCATATTGCTTGACTACAGTACCAGCAGGC
AGAGCATTACGTACAAATCAGGAGTAAGAGCTTTCGTCTAGT
GTAGATGATCGTATCCTGAGCCATGTCTTCTTCTGAAGTG
GCTCTCCAGAAGGCTGTCTAGCTCGGATCTCATGTATCTAC
GCTGATTATAAATATGTTCATGACAGGGTGGCATCTGCTT
CACAGTATTGACATCCACATCTATGTGTGTGGTGGGATAT
GGAGCATACATGACTTGCCGGAAAGGCAGCACAAAGCTTC
C
AGTTGAATCCTGTCAAAATAAAAAGGAAAAATTTACTGTCTT
ACATGCCAAACGATATGAATAATTGTTTTTTTAATTTTAAA
AAATGGTCTCTGATTTAGCAAAATCCATCTCTAAAAATTTA
TCCTAAGAAGCTATTCATGAGTGTTGTGCAAAAGTTTTAGTG
ACAGAAGTGTTTCAGTATAGCATTTGGTTTTCAATAGCAAAAC
ATCAGAATGACCTAAGCATCCAAAGGAAGTGGTTAAGTAA
ATAAAAAATGAATTTATTATTTTGGCATCTATAGATGAAGTT
GTTGAAGTTTTGTGTTGATATTCAAAGAGGCTTAGAATCTG
CTGTGAAAAAAGCAGATTAGAACATGCAGAGATGATCCAG
TGGGGGTGGGAGTCTTAAAGAAAAATACATGCAAAAGGGAA
AAAAAGACTAGAAAGAGATATACCAAAATATTAACAGTGGG
TATTCACCTGGATTCAAATTTACAAGTGTCTTTTTAATTTCT
TAATTTATTTCTATGCACCTCAATGAGTATGTATTTTTTATA
AACAAATTTACTTCTTTCTCTAATCAGTTGGGGTAGCCAGT
TACCATGTAAATAATAACCTACTGCGTATGAGGCCACTGTGC
TATGAACAGAACAGAAAGAAAGAGGCTATTTTCCATTTTTTT
ACTATTTATAATGCTGTGATAATCATCTTTGTATAATGTCA
AAGGTATTTTTCTGGAAAACTATATGATTTGTATTTGTCATG
GAGAACTATTAAATATTTTTTTTCATTAGATCATAGTTTTGA
AATTTCTCTAGGCATCTGGGTATAGGTCCCTTTTCAGAACT
AAAAATTTATATAATTTAAATGAGAGGGTGCTGAGGAAACAAA
AGTATTTAAGCACTTTATTATGCTTTTAACAGGAGAAAGTTTC
TAATTTTACAGATATGTATAACTCAAATAGAAACTACGTTT
CCTTTTAACTAGTTTTCTATATTTTAAATACTATCATTTCTGAG
TTCATAGCAGCACATTTATTGAAAAATGCACAAAAGCCCTAAT
ATAACTTTGTATTTTGCAACAATTTTTTTAAATTTTTTTATTTC
ATTTTGGCCGTGGCTACATCCTCAAGAAAGTAGTCACTATG
AGACAAATCACATAACCATTAGGAAAGCTATTTCTTCACTG
CTTGGGACTATAATTGAAATAACAATAATAGATTCAACAA
GGTGAACAACCTTTCTTCCCTTTAAGTATTTATAAATAATTG
CTAATTTTACATTTCTCTGTTTTTGTCTCCTTGACAGTAGACT
CAAATAAAAAGAAAAAATACAATTTTTTTCTAATATATATTA
TATATAGAAATATATATATTTTATAGTACACATACATAGGAA
TTGCTTTAAATCCTATAAGCTTCTTTAAAGATGTTTTAAAAAT
TTTTTTTCAATAAAAATTTCAAATCTATTTAGTTAAAAAGAAA
TGATCTTATTTTTTGATGTGCAACCTGATTTAAGCATGTGT
TAAAAAAGAGTCCCTGAGGCTAGACATGTAGGAAACAG

10

20

30

40

50

50

AGCCACAGGTTTGGCAAGTGTTGAGCTGATGGCACTGTAAGT
TAAAGAAAACAGATTAAAAACATTGCTATAAAAACAATTT
AACAAACTAAAAACAATAAGTAGGTGAGCTCTTCAAA
TAACTCAGAATAGCTTTATATGATAAACACCGAAGCTATA
AGCACAAATGTTATCTTTTATTTGTATAGGAACCTACATTT
TCTAGAGACCTTTTCACAGAAATTTTCTTATTGAGCCTTAA
AACAGCCCAATTAGTTCAGTATAATATCATTTAATTAAATGT
ATTTATTTTATTGAAATACCATCATTTTATAGCTGAAGAAA
TTGACATGTAGAGAGATTAAAGTGACTTACTTAAAGTCAAA
TGGGATTTTAAAAATGATGTATGAAAGGCTGACACTGAACAG
ATACAGGACTAAAGTGCTTCTGATTCAAGCCATTAAAGGCT
CTTAGGTTTAAACACACTCATGCTCTGATACTCCATCATG
AGCCTAAAGGAAAAGACTGTGAACATAAAAGTGAATACTT
TATACTTTTACTTCTCTTTTATTTAAAGTAAAAATTTTCATG
AAAAATCTGTAACTGTGAAGAAACTTTTAAACAGAAATATAA
GATAATACATGTAAAGCAACTAGTAAAGGAACATAACATGT
AGGCACTCAACAAATACTGGCTATTTCTAGAAAGAAATGTA
AATAGGAAATGTTAGCTATGAGCTATTATTAAAGTGTTTTT
ATGTTCCAGGCACTGTTCTAAGTGCTTTTATATTATTTATC
TTACTCAATGCTTATAACAACCCTACACATTAGGTACTAT
TACTATTATTGCCATTTTACAGATGAGGAAATAGGTGTAT
AGAGAATTTCAGGCACCTTGCCACCGGGTACACAGCATTA
TCCAGGGAGTCTGGTTTAAAGGGCACAAACTCTTAAAGTACT
AAACTCCACTGCTGGATGGAAAAAGATCAGTATAAATATG
AATAATTTTGTCTACGCCTAAATAAAGTTTCATCTA
CAGTACAACCTTAATATGAAAGGATTCTGTTAGCTTTAATG
AGAAGTAAAAACAAGAAACCAGAAATCAAGCAAGGGGGCCATG
ATTTCTTGCTCTGGGATGGAAACTCGGTTTCTTTAAATAGC
AAATGGAATAACACCAAATATATATAGAAATATAATGAGT
GAAAAATAACACAAATTTAAAGCAACAGTTCAAAATACGTAA
TGTCCCTAGAAACAATCTAAGTAGACAGTCTGTTATTTTCT
TTCTTCCAAATCTTGTCATAGGTGAGCATAAGATGGTATC
TGCTTCAATCCAGCTTTTATGAAAAAGAAAAATTCCTTACTTG
AGAAGAAAGCCTTTCATGACAGCTGTCAACCAATATCATCAT
CATTGAGTACTGTATCAGCTATCTAAAAATGCATCAAAAAA
TAAAAAAATTAGTCTGGCTGTAAACATAGTGTTGAAATAAC
ACTTTTAAATATACAAGTTTTTCGGAAGTCTGGATTCAATAT
AACACACTGCCTTCAATTTCCGAGAAATCAAGACTCCCCAAA
AAACAATCTCTGTGCACTACCATAAACTTTCAGAAAGAACAA
ATGTGAAAGCTGGTCAAGCAGGTTAACAATAATTTTACAAAG
AACAACTTCTCTCTCTGAGCTGTCAAGAAATCAGGAGACTAA
C
CTAAATGACAAAAATCAGAAAAACAACAAGAAATAGTTTTCTA
AAGGTATCTCTTAACACTCATAGTGTTGTGATTCAAAACGT
CCTCAACAAATGATTAAAGGAAACTAAATTTGTGACTACAA
GTAAACTTCCATTAAATGGTTACTACTTTGGCACACAGTTT
TGTTTCAAAAGACACTACATTAAATATTAAATTGCTCCTAT
AAGAGCTGGGATCCTCCCACCTTTTAGGAATTATAAAAGTA
ATGAAATAAACAAAAATGAATTTAAATTTTGTTCATCACTGAT
CAAAAAATGCCTCTGTTTTGCCATAAAAATCCAGGATTTTGT

10

20

30

40

50

50

TTCTATTTCCTCCTTGTACTTCCCAAACCTTGAACCTTCTCAG
CAGTAAGATAACATTTTAAAGAAAGAGCACTTAAAAGAGAG
ACCAAAATTCATTAAATAGTAGTCAACTTAAGTAAAGGTTT
CTGGTTTGA AAAAACAAAATCCCAGTAAAAGCAGAAATTTT
AGTTGGTTCTAAGTTTTCCTCAACTTGC GAT AAGTTTACTT
AATTAGTCTACTAATAACTAGTGGGTTAGAGGGGTGCTGAA
AGTTACCCCATTCCTGGGGACCCCTGCTTATTGACCAGCAA
ATAAGGACTGGGATTCTTTGGGTAAAGGGGAAATCTTTTCT
TGTTAAGTCAGACCTTTACACAGAATAACTGTCTCTGAAT
TGGAAAGCTATCTACAAAAGTACAAAACATAACAATTTGGT
AAAGGAGATCATTGTATTGGGTCTGTATTATGGCCATGT
ATTTTCAACAAGTTTTTTTTTTTAAATTACTTTTTTAAAGTA
TCATCTGTCTCATTCATGCTAAAAAGCAAGAAAGGC
AAAACAGCCATGTTTTAAATATTGGAGTTTTTACAAGGAGC
ATTGAGGGTCAACCACAAAGAGGAAATGGAAGTAAAAGTGA
AGAACTCTTTCTTCACTGGAGATTCTCCTTCAAAAAGAACT
TCTCTGCTTTACAGTGAAATAGTCTGTACTTAGTTTTCCGC
AGGGGAAGCCACACCCTTGTAACCATGCTTCTCAAACTCT
TAGTGTCGTTCCTGAGGGGCATTCAAAGCCCAAGGGGATAA
ACATGGGCACATTTTCTAGAGGAGAGGGGTAAGAAATATCA
CTGACAAATTTTAATACTAAAAATAGTTATGGAATAAAAATG
TAAATTGCA TGAGTCTTAACGATACAAACATAAGACTTAGA
AGAAATATTGTGTGGACCTGGGGCCTACACCCCAAGACAGAT
ACCTCAGGGGTACATATGCTCTCCTTCTGT TACAGCTACT
TCTAGGGAAAGGTTTCGAGAAGTAGTACCTTAAAGAACATA
TCAGAGACAATTTTTTTTATTTTTTACTATGAACAAGTTAT
CCAAAATTTATTCTGGGCAAAACAGAAAAAAAAGGGAGCA
AATATTAATTTGTAGATGCAATTACTATTTTCTCTTTGTTT
ACTGATTTAACTCTTTGGGTTTAAGATATGGGAAATCTTCC
TCCAGTTTATTCTGTACACCTCCATAAAAAGCTCCATTAAA
GGCTTATTCTGTATGTCTCCAAGGCCTTGACAAATGTAGCC
ATCAACCTTATACAGATACATGCTGTGAGAAAAACATTTG
ACAGTATGCAATTTGCATATACCTGATCTTCCATTCTCTC
TGTGCTTCTAAGATAATCTTCTGGACATTTTTCTTGCTT
TCCTGAGCAAGAGAAAAATTTATTTTAAAAAAACAACCCACA
ACATTTTGTACTTGCTTATTTTTTCAATAGACATGTTCTT
GTGTAGTAATTTAGTTTCACAAGAAAAATACTTTCTACTTT
AGGGAAAAAATGGGGGCAGGGGTAGGAAATTAACCCAAACA
AATGCATGTTCTCATAAACAATACAAAATAAAAATCAAAAC
AACCTTTATTCTGCAGTGAAAAAAAGATAACTTCAAGAA
AACAGTCAATGTAAACATCTGCATAGTTTTCAAAAAGGAAAA
GAATGACTTGCACTTTTTCAAATTAACATTAAGATGTTGT
TTAAAAAGATTCTCCTGATTTTAAAGAGTTTCAATAATGTGAG
AAAAAAGGAAGTAAGCCTGCAAAACATAGTAAAAAATTTAT
CTTTTAAAAAGATATTATTTTTTCTTACTATTGGGGCAAAAG
CCTTTTAAAAACTGGTAATGCTTAAATGGACTTTTCAGGTTAG
TATCAAACTGGAACACAGGAAGGAGAAATTCAAATGTGTTCT
TTAGATACATCAAAACTATACTGAAATGTAAATAGCATTA
TATATTCAACTACAGGATTTAGGAAAAACAATAATTTCTGT
AAGATTAAAAAGGAATTCTCTTGGGAACCATTCATTCAAC

10

20

30

40

50

CTCCTCATTTTTATGAACCTGGGAACCTTGGCAAAAGAGGGTTA
AAGAGACCAAAGGCTACATGACCAACAGCTTATGAAACTA
TTACTTTTGAACCTGTTATACTTTACACATAGTAGTAAGCAAA
AGACAGAATTGTGCAATGAAAGGGGAAACAAAAGGTATTAG
AGTCAAAGGCTCCCAAGAAGAATCCAGGGTCTAAAAGTTT
CTTTATTTGTCTAAGCTTTTAGCTTTTTCATCTATAATGTGG
AGCTACCATTTTCGTACCTTCCACAGTTAATATGAAGATGA
CAGGTATCAGACCAGATGTATTTGTATCTAATAGGGGTAAA
TGCAAAATAAATAACATTTATTGTTTGTATGTTCACTGCAT
ATAATTAAAAAAATAAGATTTTATATGTACCAGAAAAATAAG
CTTTCAACAGATAGGTTTAACATGATTATAAGCTGAAAAA
TCACTTACCTTATGCATCCATATTCTTCTTCTTCCGGATT
TATGTGTTAATCTATCAACACACACTCTATGAAGTGGGAG
GTAGAAACTAAGTTCTGTCTGTGGGAAGTATAATTGTAGT
CCATATGTGCTGCGATCCCCATTCCAGTTTCCATCAAAGA
TTAATGAAACAATAATCACTCCCTTTTTCAGACAAGACA
AAACTTTACATCTATAGCACCACTCTCTGCATTTTCGAAGG
ATTTCTCCATTTAGAGTGTGGTTGGCAAGAAAAAGTTATTT
CTCCATCACTGAGAAGTACCTGTCTGTCTTTGGAGCCCA
AATGTGCTTACTCTAGGACCAAGAATAATTGTCCCAGTAA
G
CAAAAGTAGCTGCTAATAAAGGTGATTTTGCCACTTTAAAGC
AATCTCTGTCTTGGCAACAGCTGGGAGATGGCGGGTGGGCAA
AGAGTCGACATCACTGCATTTCCAACCTGTCACATTTATCCAA
ATGCTCCGGAGATATCTAAACAATGACATATGAAACCAAT
GATTAGGTTTCAGCAATTTAAAGATATCCATCAAAAACCCCA
AATGATTTTAGACATATTTGGTTTGTCTCTTAAGTCAAAG
ATGTGGAATCCTGTATCTCCTATCAGGATAAAGACATTC
AACTAGCACAGTAGGTGCACATTAATAATGTTTGTGATATG
ATCATTTTACAAGACATGGTAACCTTGTTACTTTATATTTCAG
GGCATACATTTAGAAATTCAAAGAAATAAAGCTTAAAAAAGG
GCTTCTTTACACTGATATTAAATGTTACATACTAAAGCTC
ATAGAATAGACCCGCGAGTATTTCCCAAATATCCAGTCCATG
TGCAATTCTAGTATGACTGGAGATTTGGCCCCCTAACCCAT
AGCAACTAAAAAGGAGAAAAAACAGGAAGGGGAAAGGCTCAG
CTAGAGACTGACACTTGTGGGTGGAATTGTGTCCCCCAA
AAGATATGTTCAATTCTAACCCTTGGTGTACGTGAATGT
GACCTTATCTAGAAATAAGTGTAAATCATGTTAAAAATGGGG
TCATACTGGATTAGAGTGGGGCCTAATCCAATAAAGTCTG
TGTTTATAAGGAGAGAGATTTGGAGACACAGAGACAAATG
GTAGACAGCCATGTGAAGACAAAAGGCAGATACTGGATTG
TTGAAACTACAAGGCAAGAAAGGAACACTCAGGATTGCTG
GTAACCAACCAAGAAGCCAGGAAGAGGGCAAGGAAGAGTCTT
CTCTCTTGAAGATCATGCCCTGTCAACACTTTGATTTTCG
GACTTCTAGCTTCTAGAAATTGTGAGAGAATAAATTGCTGT
TGTTTAAAGCCACTCAGTTTGTGGTGCTTTGTTAAGTAAT
CTTAGAAAAAGTAATAACAACCTAACAACAGAAAAATACTTT
AAAGCCGCTAAAAAGGTCAAAAAAAGGAGAGAGAGAGAGAG
CATGGAAATACCACAAGTCTGGAGCCATAACAAGAGAGAGAG
GCAAACAGTCCCTGTATCCTCAGTGAACCTCTCTGGTTATGA

10

20

30

40

50

GAATACTGAAGCCCCGATCCTGATGTTTAAAAACGACATTGA
AGTATCAAGACAAAGATAAAAAATATTTAATATGCTAGCCA
AGAAACCAATACAGCATTTTCATCACTGCAAAGAGAGTTCT
ACACTAAATGGCTAGAAATTTAAAAAGCTTTAGTTATTTAGA
ACACGTAGAAAAACAGAAGGGGCTAAATAGGGGCCCGTTCAAG
CCTTTGAATTTAATGAGAAAAACAGACATGAGGAGAAAGAAC
ATAAACGCTCACATCCAAGACAGAACCAGGGGCTCTTGGT
CCCCCTTGCTCAACTTTGTACATCTTAATCCACATAAACATA
CCACTCTAAAAAGGTACATCCTATGTGATATTAATGTAAA
ACAAATCATTTCTTGCAAATACAGTTATGTGCCATGTAAACG
TTTCAGTCAATGGTAGACTGCATATATGATGGTAGTCCCA
TTAGATTACAATGGACCTGAAAAATATGCTATTGCTTAGT
GACACTGTAAACCATCATAAGGTCTTAGTACTATTTTGCAA
GTTATTTAAAGTATAGCACATACAATTATTACAGTGTACA
ACACTTGATAATAAACTACTACATTTGCTGGTTTATGTATT
CACTATACTATGCCTTTTATTGTATTTTTAGAGTGCCTC
CTTCTACTTTTTTTTTTTTAAAGTTAAATGTAAAAACAGCC
TCAGGCAAGTCCCTTCAGGAGGTATTCAACAGAAAGCACTG
TTATCATAGGTGACAGCTACATGTGTGTTATTGCCCTTAA
AAACCTTCCAGTGGGACAAGATGTGGAGGTGGAAGGCGAGT
GAGGTGGAAGGGAGTGATACTGATGATCCTAATCCTGTCT
ATGCCTAGGTGAAAGTGTGTGTGTTTTAGTTTTTAAACAAA
AACGACTAACAAAGTAAAAAATAATTTAAAAATAGAAAAAT
AGAAAAAAGCTTCTAGAAATAAGGATACAAAGAAAAAATAT
TTTTGTATAGCTATACAATGTATTTGTGTTTCAAGCTAAG
TATTTTAAAGTTAAAAAATAAAGTTTACAAAGTTAA
AAAGTTATAATTTTTTTATTGAAGAAAAACTGTTAAGATAA
ATTTGGTGTAGCTTTCAGCGTACTGTGTTTATAGTCTACAG
TGGTGTACAGTGTTCAGGCCCTTCACATTAATTCACCACT
CACTCACTGACTCACCCAGAGCAACTTCTAGTCCCTGCAAG
CTCCATTTCGTGGTAAGTGGCCTACACAGGTATACCAATTAT
CTTTTATACCATACTTTTACTGTACCTTTTCTCTGTTTG
ATATATTTAGATAAATAATTTACCACTGTGTTACAACTGTC
TATAGTATTCAGTACAGTAACAGTTGTACAGGTTTGTGGC
CTAGGAGCAACAGACTATACCATAACGGCCTAGGTACATAA
AGGCTATACTATCTAGGTTTGTGTAAAGTACACTCTATGAT
GTTTGCATAATGACAAAATCGCCTAATGATGCATTCCTAA
GCAATGTGTGATTGTACTATAATTGAAGACTTGTTATCTA
AGACTGAAAGTAAAAAGAAATTGCAATTTACCTAAGCAAG
TCTAAAACTGTGAAGTCTATTTATAATAATAGCAATACAA
AGCAGCTAATAGGCAAACTATGATATACCTATCTTTGCCA
TATGATTGCTTTGGGAGCTAACATTTGATCTGTAAATGTA
TGACAAAGTAACAATTTTACTTAAAGAAATTTTCATCCACA
TCTTGTCAGAGAGGTTTCAGTCTGATGGAAAGCACTGACTT
CTATTTACAGAGCATTAGATGAGTGCTTTTATCATATTAT
GAGTAGGCATACAGAGCCTGGCAAAACAGTTAACTCTAAG
TATGTACAGAAATGGTTGAACACAACGACAGTTTAAACAC
GTGTATTTGTAAATTTCAAAAAATTCATTTAGGTAATATTTA
CTTTTAAATATGTTGTATCAATTTAATAGTCTTAAGAGAC
AGCACTAGATATAAGCCGTACAGCTTCTTTAAAAATATCCA

10

20

30

40

50

CTGTTT TTAATAACAATGTAAGCAGTCAGTTT TACAATGATC
AAATATAGGAATGTAATCTGAATTGAAATGGTAATGACAC
TACTGCTGTCATAACTAACAACAGCAAACCTGGAGGCCAAC
ATAATGAATTAAAGTTAACATACAACCATAAAAATTTATATTG
CAAACATATTTTTTCTTTTCATTTCTTTT TAGGTTAAAAAGGTG
GATAATCATAAAGGCCAATATTACAACCTCTAATATTTTCATC
ATTAAACTGAAAAATAAAAGTATTTCTCTAAAAACAGAACTGA
ACCCTGGAGCAAAATCTGATTGAATTATAGGGAAACTTTTT
ACCACGTTGTGAAAAATTGAACCTATTATACTGCTAGTTACA
CTCTCACTCCTAACAGAAATAAGAAAAAATAATGGGCCCGG
GCATGGTGGGTCAACACCTGTTATCCCAGCTCTTTGGTAGG
CCGAGGCGAGGTGGATCACCTGAGGTGAGGAGCTCAAGACC
AGCCTGGCCAACATGGTGA AACCCACCTCTACTAAAAAT
ACAAAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGTGGACACCTGTATC
CCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCGAGGAGAATCTCTTGAAAC
CCGGAGGTGGCAGAGGTGCAATGAGCTGAGATGGCGCCA
CTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGAGAGACTCTGCCTCA
AGAAAAAACAACAACAACAACAACAAGAAATAAGAA
AGAAAAATGAAGGACAAAGATCATACTGAATTGCTTAGTTT
TAAATCCTACCAAAAGAAATAGCCTGGGAAATGAAATGTC
ACAGAGAAGTATAATCAGGAGAGCTGTACAATTTATTTTAC
TAATACTTTGAAGTCATCGTCTTTGGTGAGAAAAATCCATA
CATGCAAAATGCAGCTGAAAAAAATCAGCTCAAAAACCAATA
GTTGTTTATGTACCTATCTTTACGTACATGTAGTGCTGTCT
ACTCCAGAGAGTTACCAAAACATTAGCCAGTCTTTTGAGGG
AAGCCAAGATTCAAAATTGAGTGAGACGGTGGCTTGCTCAC
AGGGTTTCATGAGAGGTTTCCCAATACACTTTCTGGAAATA
ATCCCATACATGCAGACATGATTACATTTAATTAACATCTG
CTAAAAACTGTTAGTAGAGTGCTAAGTTTGGAGGTTTTTGCTT
TTTCTTTTAAACGTCTGTTAAAAAAATCAACCATCTCTTCCC
TGATTGGTATTTAGAAAGGTGGTTGGTCCACTGCTATTGT
AGTGAAAAATTCTACAATCATAAAGCCCTCACTTCTTGTTT
TTTAGAGACAGGGTCTCGTTTTGTTCATCCAGGCTGGGAATG
CACTGGCAGGATCATAGCTCTCGGTAACCTTCAAACTCTTG
GGCTCAAAATGACCCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTA
GGACTACAGGTGCACATCACCAACGCCCGGCTAAGTTTTTA
ATTTTTTTGTAGAGACAGGGTCTACGTTGCCCAGGTTGAGC
TTGAACCTCCTGGCTTCAAGTGATCCTCTTGCCCTCCGCCCTC
CCAAAGCTCTGGCATTACAGGTGTAAGCCACCTTCTCCAA
CCTGGCTCTCAATACTTTGTAACCATGCTGTTTATTTTCTC
CCAGCCCAAGAGAGAGCAGGATCCTAAACCGTCCACTTTTC
CACAAACAGGAGCTGCCCAGGACCACTTCAAGGACAGTGAA
CTGTTTACAGTACCAGAAAGTTTCAACAACACTTTCTCAATC
TTCAACATCAGGGGAAGACTGGAAGGTGAAGTTTCATATCAC
TATCTGGCCATTTCTCACAGTTTCCAAGTTTCTCAGACAAT
AGGTAGGCTAACCTAGTCCTCCTGGGAACCTATCTAATTAA
CGTAGAATAGAAACCCGAGGGGCAGACTTGAAAAACAGAAAGT
CCTCCTTGGTTTACTTTGTTTCTCTGAAAGCAAAATTTGTGG
AGTGCCAACATAGCCAAACA AAAATATTTTATCAACTTCAT
A

10

20

30

40

50

A G G T G C T T G T A A T T T T T T C C T G G A G C A G G T A A A T G C T G G C
T T A G T G A A C A A T C T G G A A T G T G G T A A T T A C T C T C G T T C T T
G T T T C A G A T G T A C T A T C A G C A T G T A G C A G T T T C C A A C T G A
T T C A G G G T T T T C C T A A A G T G G C A G G C C T T G G C A G A G G T G G
T G A C A A C A A T G C C C G T G T C A A A T G A C A C C G T A T T T C A A G T
A T T C T G A C T C C A G G T T A T T A A T A T C C C C T A T A T G A T A G T C
T T G T T T C T G T G A T A T T C A C A G A T T A T G T T A A A A G T T T C C C
A A A G T C T G A G A A A A A T C A T A T C T T A A C A G T A T C T T T T T T T
T T T T T G A T C C T T T G T A C A A A A G T A G A A G T A A T G C C A G A C A
G A T T A C G T A C C C T T G T T G T G A A C A A C T G G T G C A T G G C A A C 10
T G T T T G A A T A G A A A T T T A C C A A C T G C C A C A A C C A G G C A A C
T A C T C T C C C A G A G C C T A A C A A T C T C G A T T G C A T C T G A A A G
G G C C A C C C C T C C T G G G A A A G T G C A G G A C C T C C C T C C T G T T
T C T G A A T A C A A A G C C T G G T G G T G T T C A A C G C G G C C A G A T A
G A C C C A A T G A G C A C A C G G A C A T G T A A T C T G T G C A C T T C T T
T A G A C A A C T G A T T A C C A T C A G T C A A G T G A T G C C C A A G T C A
C A A T A G T C A C T T C C T T T A A G C A A G T C T G T G T C A T C T C G G A
G C T G T G A A G C A A C C A G G T C A T G T C C C A C A G A A T G G G G A G C
A C A C C G A C T T G C A T T G C T G C C C T C A T A T G C A A G T C A T C A C
C A C T C T C T A G A A G C T T G G G C T G A A A T T G T G C A G G C G T C T C 20
C A C A C C C C C A T C T C A T C C C G C A T G A T C T C C T C G C C G G C A G
G G A C C G T C T C G G G T T C C T A G C G A A C C C C G A C T T G G T C C G C
A G A A G C C G C G C G C C G C C C A C C C T C C G G C C T T C C C C C A G G C
G A G G C C T C T C A G T A C C C G A G G C T C C C T T T T C T C G A G C C C G
C A G C G G C A G C G C T C C C A G C G G G T C C C C G G G A A G G A G A C A G
C T C G G G T A C T G A G G G C G G G A A A G C A A G G A A G A G G C C A G A T
C C C C A T C C C T T G T C C C T G C G C C G C C G C C G C C G C C G C C G C C
G C C G G G A A G C C C G G G G C C C G G A T G C A G G C A A T T C C A C C A G
T C G C T A G A G G C G A A A G C C C G A C A C C C A G C T T C G G T C A G A G
A A A T G A G A G G G A A A G T A A A A A T G C G T C G A G C T C T G A G G A G 30
A G C C C C C G C T T C T A C C C G C G C C T C T T C C C G G C A G C C G A A C
C C C A A A C A G C C A C C C G C C A G G A T G C C G C C T C C T C A C T C A C
C C A C T C G C C A C C G C C T G C G C C T C C G C C G C C G C G G G C G C A G
G C A C C G C A A C C G C A G C C C C G C C C C G G G C C C G C C C C C G G G C
C C G C C C C G A C C A C G C C C C G G C C C C G G C C C C G G C C C C T A G C
G C G C G A C T C C T G A G T T C C A G A G C T T G C T A C A G G C T G C G G T
T G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C A G G
T C T T T T C T T G T T C A C C C T C A G C G A G T A C T G T G A G A G C A A G
T A G T G G G G A G A G A G G G T G G G A A A A A C A A A A A C A C A C A C C T
C C T A A A C C C A C A C C T G C T C T T G C T A G A C C C C G C C C C C A A A 40
A G A G A A G C A A C C G G G C A G C A G G G A C G G C T G A C A C A C C A A G
C G T C A T C T T T T A C G T G G G C G G A A C T T G T C G C T G T T T G A C G
C A C C T C T C T T T C C T A G C G G G A C A C C G T A G G T T A C G T

配列番号 15

>NG_031977.2 Homo sapiens C9orf72-SMCR8複
合体サブユニット (C9orf72)、9番染色体上のRefSeqGene (LRG_
658)

T T G T A A G T T C T C T G A G G C A T C C C C A G A A G C T G A T G C T G C C
A T G C T T C C T A T A C A G C C T G C A G A A C C A T G A G T C A A T T A A A
C C T C T T T T C T T T G T A A A T T A C C C A G T C T C A A G T A T T T C T T 50

T A T A G C A A T G C A A G A A T G G A C T A A T A C A G A A A A T T G T T A C
T G A G A A G A A G G G C A T T G C T A T A A A G A T A C C T G A A A A T G T A
G A A G T G A C T T T G G A A C C G G C T A A C A G G C A G A A G T T G A A A C
A T T T T A G A G G G C T C A G A A G A A G A C A G A A A G A T G A G A G A A A
G T T T G G A A C T C G C T A G G A A C T T G T T G A G T G G T T G T A A C C A
A A A T A C T G A T A G T G A T A T A G A C A G T G A A G T C C A G G C T G A G
G A G G T C T C A G A T G G A A A T G A G A A A T T T A T T G G G A A T G A G T
A A A G G T C A G G T T T G C T A T G C T T T A G C A A A G A G C T T A G C T G
C A T T G T T C C T C T G T T C T A G G G A T C T G T G A A A T C T T A G A C T
T A A G A A T G A T G A T T T A G G G T A T C T G G C A G A A G A A A T T T C T 10
A A G C A G C A G A G T G T T C A A G A A G T A A C C T A G C T G C T T C T A A
T A G C C T A T G C T C A T A G G C A T G A G C A C A G A A A T G A C C T G A A
A T T G G A A C T T A C A C T T A A A A G G G A A G C A G A G C A T A A A A G T
T T G T A A A T T T T G C A G C C T G G C C A T G T G G T A G T A A A G A A A A
G C T C G T T C T C A G G A G A G G A A G T C A A G C A G G C T G C A T A A A T
T T G C A T A A C T A A A A G G A A G G C A A G G G C T G A T A A C C A A A A C
A A T G G G G A G A A A G A C T C A T A G G A C T A A C A G G C A T T T T T A T T
T T A T T T T A T T T T T A T T T T A T T A T T A T A C T T T A A G T T T
T A G G G T A C A T G T G C A C A A T G T G C A G G T T A G T T G C A T A T G T
A T A C A T G T G C C A T G C T G G T G T G C T G C A C C C A T T A A C T C G T 20
C A T T T A G C A T T A G G T A T A T C T C C T A A T G C T A T C C C T C C C C
C C T C C C C C A C C C C A C A A C A G T C C C C A G A G T G T G A T G T T C C
C C T T C C T G T G T C C A T G T G T T C T C A T T G T T C A A T T C C C A C C
T A T G A G T G A G A A C A T G T G G T G T T T G G T T T T T G A C C T T G C
A A T A G T T T A C T G A G A A T G A C G A T T T C C A A T T T C A T C C A T G
T C C C T A C A A A G G A C A T G A A C T C A T C A T T T T T T A T G G C T G C
A T A G T A T T C C A T G G T G T A T A T G T G C C A C A T T T T C T T A A T C
C A G T C T A T C A C T G T T G G A C A T T T G G G T T G G T T C C A A G T C T
T T G C T A T T G T G A A T A G T G C C A C A A T A A A C A T A G T G T G C A T
G T G T C T T T A T A G C A G C A G G A T T T A T A G T C C T T T G G G T A T A 30
T A C C C A G T G A T G G G A T G G C T G G G T C A A A T G G T A T T T C T A G
T T C T A G A T C C C T G A G G A A T C G C C A C A C T G A C T T C C A C A A T
G G T T G A A C T A G T T T A C A G T C C C A C C A A C A G T G T A A A A G T G
T T C C T A A T A G G C A T T T T T A G G C T T T C A T G G T G G T C C C T C T C
A T C A C A G G C C C C G A G G C C T A G G A G G A C T G A A T C A T T T C C T
G G G C C A G G C C T A G G G C C C C T G C T C C C T C T T A C A G C C T T G G
G A C T C T G C T C C C T G A A T C C C A G C T G C T C A A A G G G G C C C A G
G T A C T G T T A C A G T A G G T A G C T A A T C A G G C A T G A G T G G G G T
A A G A G A G A A G T C C C C A C C A C C C A C C A G G A A T G T C A G G C A A
C C A T C A G A T G A T G G T C A G G C A G T T G T C A T A C T G C C T C T C T 40
A A A A T A G T A A T T G G T T G C A G C C A G C A C C A G G G A G A G G C A A
C T T C T C A A T A G A T A G A A A C A C C T G A A A T T G G T A A C T G G G C
G C T T C C A A T A A G A T C T C A G G A A C T G A G A G A G T G G G C T T A A
C A T G C A C A T T A A G A G G C A A A A T G G T G A A G T A T G A C C T T T G
G G G G C A T T C C A C C G G A A A A G G G A A G A A A G C C T C A G G T A A G
C A T G T A T A C A A C T C C A G T A A A C A C A C T G C A C A C G C T C A C C
T T C C A A G T G C A A G C A G G G C A C C A T G C A T G C G G C A A G C T C A
C C C T T A G G G A A G G A C C A A G G G A A A G G G G C A C A A G A T G T C A
G A A G T A G G C C A G T G T A T A A G A T C C T A G G T T C A A G G T C A A A
C A G G G C A C T T G A C C T C C A A G G T G C C C A C T T G G G C C T C T T C 50

CAAATGTACTTTTCCTTTTCATTTCCTGTTTCTAAAGCTTTTTTA
ATAAACTTTTACTCCTGCTCTGAAACTTTGTCGCAGTCTCT
TTTTCTGCTTATGCTCTTTGGTCAAATTTCTTTCTTCTGA
GGAGGCAAGAATTGAGGTTGCTGCGAGACCCACATGGGATTT
GCAGCTGGTAACCTCAGATAAAGCTTTTCAACCAGTAAGAATAACA
GTTTCAGGCTGCTGCTTTCACAGGGGTGCCAGGCGATAAGCCTT
GGTGGCTTCCATAAAGCTGTGAAGCCGGCGGGCGGCACATAA
TGCAAGAGTTGAGGCTTAAGAAGCTCTGCTTAGATTTTATAG
AGGATGTATGAAAAAGCCTGGGATGTCCAGACAGAAGCCTG
TTACTGGGGGTGGAATCCTCATGGAGAACATCTACTAGGGA
AGCAAGGAGAAAGAAATGTGGGGTTGCGAGCCCCCACAGAGA
GTCCCCCTGGGGGCACTGCCCTAGCAGAGCTATGACAAGACAG
CCACCGTCTCTCCAGACCCCAAGAAATGGTAGATCCACCAACA
ACTTGCACCCCTGCGAGCCTGGAAAAAGCTGCAAGCACTCAAT
GCTAGCCCCATGAGAGCAGCTGTGGGAGATGAACCCCTGGAA
AACCAACAGGGGGTGGTTCTGCCCAAGGGTTTTGGGAGCCCCAC
TCATTGTCATCAGTGTTCCCTGGGTGTGAGTCAAAGGAGAT
TATTTTCAGAGCTTTAACATTTAATGACTGCCCGGGCTGGCT
TTCAGACTTGCAAATGGGGGCCCTATAGCCTCTTTCTTTTGG
CAGATTTCTCCCTTTTCGGAATGGCAGTATCTGCCCAATGC
CTATACCCCCCATTTGTATCTTTGAAGCAATTACCTTGTTTT
TGATTTTACAGGTTTCATAGGTAGAAAGGGACTAGCTTTCGTC
TCAGGTGAGACTTTGGGACTTTTGGACTTTTGAATGAATGCT
GGATCGAGTTAAGACTTTTGGGGAACTGTGTTGGTAAGGGCACG
ACAGTATTTTGCAAATATGAGAAAGGACATTTAGATTTGGGAG
GGGCCAGAGTTGGAATAACATGGTTTGGATCTCTGTCCCC
ACCCAAATCTCATGTTCAACTGTAATCCCCAGTGTTGGAG
GTTGGGCCCTGGTGGGAGGGTGAAGTGGATTATGGGGGTGGCTT
CTAATGGTTTTTGTACAGTCCCCCTCTTGGGTACTATATAGTG
AGTTCTGACAAGATCTAGTTGTTTTAAACGTATGTAGCACCC
TCCCATTTCTCTCTTCCCCCAGTTCTCTGCCATGTGAAGTCT
TGGGGTCTCCCTATGCTTCCATCATGATTTTAAAGTTCCC
TATGGCCTGCCCAAGAGCTGATCCAGCCATGCTTCTTGTA
CAGCCTGCGAAGAACTGTGAGCCATTAAGAACTTTTCTTTATAA
ATTACCCAGTTTTCAGTTATTTCTTTATAGCAGTGTAAGAA
TGGACTAACAACAATTATTAACGCTAGTCTCTCATGTTGTAC
ATTAAATCTCTAGATGTATTTAGACGTAACTGCAACTTTGT
ACCTTACCTTACAATTTTCTTTCCCCCCCCAAGCCCCCAAC
CAAGGGTCTACTCTGTTTTCTATAAATTCAGTTGTTTTTTTA
ATTCCACGTATAAGTGAAAGTACAACCTCAGTGTAGAAACTT
GGTAAATGCTAGCTACTTGTATATAAGCTGTGAGTCAAAAT
AAAAATACAGAGATGAATCTCTAAATTAAGTGATTTATTT
GGGAAGAAAGAAATTGCAATTAGGGGCATACATGTAGATCAG
ATGGTCTTTCGGTATATCCACACAACAAGAAAGGGGGAG
GTTTTGTTAAAAAAGAGAAATGTTACATAGTGCTCTTTGA
GAAATTTCAATTGGCACTATTAAGGATCTGAGGAGCTGGTG
AGTTTCAACTGGTGAGTGATGGTGGTAGATAAAATTAGAG
CTGCAGCAGGTCAATTTTAGCAACTATTAGATAAAACTGGT
CTCAGGTCACAACGGGCGAGTTGCGAGCAGCTGGACTTGGAG
AGAAATTACACTGTGGGAGCAGTGTCATTTGTCCTAAGTG

10

20

30

40

50

TTTTCTACCCCTACCCCCACTATTTTTAGTTGGGTATAAA
AAGAATGACCCAATTTGTATGATCAACTTTTCACAAAGCAT
AGAACAGTAGGAAAAGGGTCTGTTTCTGCAGAAAGGTGTAG
ACGTTGAGAGCCATTTTGTGTATTTATTCTCTCCCTTTCTT
CCTCGGTGAATGATTAAAACGTTCTGTGTGATTTTTTAGTG
ATGAAAAAGATTAAATGCTACTCACTGTAGTAAGTGCCAT
CTCACACTTGCAGATCAAAAGGACACACAGTTTAAAAAACCC
TTTGTTTTTTTTACACATCTGAGTGGTGTAAATGCTACTCA
TCTGTAGTAAGTGGAAATCTATACACCTGCAGACCAAAAGA
CGCAAAGGTTTCAAAAAATCTTTGTGTTTTTTTACACATCAAA
CAGAATGGTACGTTTTTTCAAAAAGTTAAAAAACAACCTC
ATCCACATATTGCAACTAGCAAAAAATGACATTTCCCCAGTG
TGAAAAATCATGCTTGAGAGAATTCTTACATGTAAAGGCCAA
AATTGCGATGACTTTGCAGGGGGACCGTGGGGATTTCCCGCCC
GCAGTGCCCGGAGCTGTCCCTACCAAGGGTTTTGCAGTGGAG
TTTTTGAATGCACCTTAACAGTGTCTTACGGGTAAAAACA
TTTCATCCACCAATTATGTGTGTGAGCGCCCCACTGCCCTACC
AAGCACAAACAACAACCATTTCAAAAACCAAGAAATCGTCTTC
ACTTTCTCCAGATCCAGCAGCCTCCCCCTATTAAAGGTTCGC
ACACGCTATTGCGCCAACGCTCCTCCAGAGCGGGTCTTAA
GATAAAAGAACAGGACAAGTTGCCCCCGCCCCCATTTTCGCTA
GCCTCGTGAGAAAAACGTCAATCGCACATAGAAAAACAGACAG
ACGTAAACCTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGTGCGTCC
AAACAGCGACAAAGTTCCCGCCCCACGTAAAAAGATGACGCTTG
GTGTGTCAGCCGTCCTCTGCTGCCCGGTTGCTTCTCTTTTG
G
GGGCGGGGTCTAGCAAGAGCAGGTGTGGGTTTTAGGAGGTG
TGTGTTTTTTGTTTTTCCCAACCCTCTCTCCCCACTACTTG
TCTCACAGTACTCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAAGACCTGA
TAAAGATTAAACCAGAAAGAAAAACAAGGAGGGAAACAACCGC
AGCCTGTAGCAAGCTCTGGAACCTCAGGAGTCCGCGCGCTAG
GGGCGGGGGCCGGGGCGGGGGCGTGGTCCGGGGCGGGGCCCG
GGGGCGGGGCCCGGGGGCGGGGGCTGCGGTGCGGTGCCCTGCG
CCCGCGGGCGGGCGGAGGCGCAGGCGGTGGCGAGTGGGTGAG
TGAGGAGGCGGCATCCTGGCGGGTGGCTGTTTTGGGGTTTCG
GCTGCCCGGGAAGAGGCGCGGGTAGAAGCGGGGGCTCTCCT
CAGAGCTCGACGCATTTTTTACTTTCCCTCTCATTTCTCTG
ACCGAAGCTGGGTGTCCGGGCTTTCCGCCCTCTAGCGACTGGT
GGAATTGCTGATCCGGGGCCCCCGGGCTTCCCGGCGGCGG
CGGCGGGCGGGCGGGCGGCGCAGGGACAAAGGGATGGGGATCTG
GCCTCTTCTCTTGTCTTTCCCGCCCCCTCAGTACCCGAGCTGTC
TCCTTCCCGGGGACCCGCTGGGAGCGCTGCCGCTGCGGGGC
TCGAGAAAAAGGGAGCCTCGGGTACTGAGAGGCCCTCGCCTG
GGGGAAGGCGGGAGGGTGGGCGGGCGCGCGGGCTTCTGCGGA
CCAAGTCGGGGTTTCGCTAGGAACCCGAGACGGTCCCTGCC
GGCGAGGAGATCATGCGGGATGAGATGGGGGTGTGGAGAC
GCCTGCACAATTTAGCCCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGTAT
GACTTGCATATGAGGGCAGCAATGCAAGTCGGTGTGCTCC
CCATTCTGTGGGACATGACCTGGTTGCTTACAGCTCCGA
GATGACACAGACTTGCTTAAAGGAAGTGACTATTGTGACT

10

20

30

40

50

TGGGCATCACTTGACTGATGGTAATCAGTTGTCTAAAGAA
GTGCACAGATTACATGTCCGTGTGCTCATTTGGGTCTATCT
GGCCGCGTTGAACACCACCAGGCTTTGTATTTCAGAAACAG
GAGGGAGGTCCTGCACTTTCCCAGGAGGGGGTGGCCCTTTTC
AGATGCAATCGAGATTGTTAGGCTCTGGGAGAGTAGTTGTC
CTGGTTGTGGCAGTTGGTAATAATTTCTATTTCAAACAGTTGTC
CATGCACCAGTTGTTTCAACAACAAGGGGTACGTAAATCTGTCT
GGCATTACTTTCTACTTTTGTACAAAAGGATCAAAAAA
AAGATACTGTTAAGATATGATTTTCTCAGACTTTGGGAA
ACTTTTAAACATAATCTGTGAATATCACAGAAACAAGACTA
TCATATAGGGGATATTAATAACCTGGAGTCAGAATACTTG
AAATACGGTGTCATTTGACACGGGGCATTTGTTGTCAACCACC
TCTGCCAAGGCTGCCACTTTAGGAAAACCCTGAATCAGT
TGGAAACTGCTACATGCTGATAGTACATCTGAAACAAGAA
CGAGAGTAATTAACACATTTCCAGATTGTTTCACTAAGCCAG
CATTTACCTGCTCCAGGAAAAAATTACAAGCACCTTTATGA
AGTTGATAAAAATATTTTGTTTGGCTATGTTGGCACTCCAC
AATTTGCTTTTCAGAGAAACAAGTAACAACCAAGGAGGACTT
CTGTTTTTCAAGTCTGCCCTCGGGTTCTATTTCTACGTTAA
TTAGATAGTTCCCAGGAGGACTAGGTTAGCCTACCTATTG
TCTGAGAAACTTGGAACTGTGAGAAATGGCCAGATAGTGA
TATGAACCTTCACCTTCCAGTCTTCCCTGATGTTGAAGATT
GAGAAAGTGTTGTGAACCTTTCTGGTACTGTAAACAGTTCA
CTGTCCTTGAAGTGGTCCTGGGCAGCTCCTGTTGTGGAAA
GTGGACGGTTTTAGGATCCTGCTTCTCTTTGGGCTGGGAGA
AAATAAACAGCATGGTTACAAGTATTTGAGAGCCAGGTTGG
AGAAGGTGGCTTACACCTGTAAATGCCAGAGCTTTGGGAGG
CGGAGGCAAGAGGATCACTTGAAGCCAGGAGTTCAAGCTC
AACCTGGGCAACGTAGACCCCTGTCTCTACAAAAAATTTAAA
AACTTAGCCGGGCGTGGTGATGTGCACCTGTAGTCCTAGC
TACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGGGTCATTTTGAGCCCAAG
AGTTTTGAAGTTACCGAGAGCTATGATCCTGCCAGTGCATT
CCAGCCTGGATGACAAAACGAGACCCTGTCTCTAAAAAAC
AAGAAGTGAGGGCTTTATGATTTGTAGAAATTTTCACTACAA
TAGCAGTGGACCAACCACCTTTCTAAATACCAATCAGGGA
AGAGATGGTTGATTTTTTTAACAGACGTTTTAAAGAAAAAGC
AAAAACCTCAAACTTAGCACTCTACTAACAGTTTTTAGCAGA
TGTTAATTAATGTAATCATGTCTGCATGTATGGGATTATT
TCCAGAAAGTGATTTGGGAAACCTCTCATGAACCCTGTGA
GCAAGCCACCCTCTCACTCAATTTGAATCTTTGGCTTCCCT
CAAAAGACTGGCTAATGTTTGGTAACCTCTCTGGAGTAGAC
AGCACTACATGTACGTAAAGATAGGTACATAAACAACTATT
GGTTTTTGAGCTGATTTTTTTTTCAGCTGCATTTGCATGTATG
GATTTTTTCTCACCAAAAGACGATGACTTCAAGTATTAGTAA
AATAATTGTACAGCTCTCCTGATTATACTTCTCTGTGACA
TTTCAATTTCCCAGGCTATTTCTTTTGGTAGGATTTTAAAC
TAAGCAATTCAGTATGATCTTTGTCTTCAATTTTCTTTCT
TATTTCTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTTTTTCTTGAG
GCAGAGTCTCTCTCTGTCTGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGC
GCCATCTCAGCTCATTTGCAACCCTCTGCCACCCTCCGGGTTTC

10

20

30

40

50

AAGAGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTT
ACAGGTGTCCACCACACACCCGGCTAATTTTTTTGTATTT
TTAGTAGAGGTGGGGTTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTC
TTGAGCTCCTGACCTCAGGTGATCCACCTGCCCTCGGGCCTA
CCAAAGAGCTGGGATAACAGGTGTGACCCACCATGCCCGG
CCCATTTTTTTTTTTCTTATTCTGTTAGGAGGTGAGAGTGT
ACTAGCAGTATAAATAGTTCAATTTTTCAACAACGTGGTAAAA
GTTTCCCTATAAATCAATCAGATTTTGTCTCCAGGGTTTCAG
TTCTGTTTTTAGGAAATACTTTTTATTTTCAGTTTTAATGATG
AAATATTAGAGTTGTAAATATTGCCTTTATGATTTATCCACC
TTTTTTAAACCTAAAAGAATGAAAGAAAAAATATGTTTGC
AATATTTTATGTTTGTATGTTAACTTAATTCATTATGTTG
GCCTCCAGTTTTGCTGTTGTAGTTATGACAGCAGTAGTGT
CATTACCATTTCAATTCAGATTACATTCCTATATTTGATC
ATTGTAAACTGACTGCTTACATTTGTATTTAAAAACAGTGG
TATTTTAAAGAAGCTGTACGGCTTATATCTAGTGCTGTCT
CTTAAGACTATTAAATTTGATACAACATATTTTAAAGTAAA
TATTACCTAAATGAATTTTTTGAAATTACAAATACACGTGT
TAAAACTGTCGTTTGTGTTCAACCATTCTGTACATACTTA
GAGTTAACTGTTTTTGCCAGGCTCTGTATGCCCTACTCATAA
TATGATAAAAAGCACTCATCTAATGCTCTGTAAATAGAAGT
CAGTGCTTTCCATCAGACTGAACCTCTCTTGACAAGATGTG
GATGAAATTTCTTTAAGTAAAAATTTGTTTACTTTGTCTACA
TTTACAGATCAAATGTTAGCTCCCAAAGCAATCATATGGC
AAAGATAGGTATATCATAGTTTGCCTATTAGCTGCTTTGT
ATTGCTATTATTATAAATAGACTTTCACAGTTTTTAGACTTG
CTTAGGTGAAATTTGCAATTTCTTTTTTACTTTTCAGTCTTAG
TAACAAGTCTTCAATTTATAGTACAATCACACATTTGCTTAG
GAATGCATCATTTAGGCGGATTTTGTCTATTATGCAAAACATCA
TAGAGTGTACTTTACACAACCTAGATAGTATAGCCTTTTAT
GTACCTAGGCCCGTATGGTATAGTCTGTTGCTCCTAGGCCA
CAAACCTGTACAACCTGTTACTGTACTGAATACTATAGACA
GTTGTAAACACAGTGGTAAATATTTATCTAAATATATGCAA
ACAGAGAAAAAGGTACAGTAAAAAGTATGGTATAAAAAGATAA
TGGTATACCTGTGTAGGCCACTTACCACGAATGGAGCTTG
CAGGACTAGAAAGTTGCTCTGGGTGAGTCAAGTGAGTGAGTG
GTGAATTAATGTGAAGGCCCTAGAACACTGTACACCACTGT
AGACTATAAACACAGTACGCTGAAGCTACACCAAAATTTAT
CTTAACAGTTTTTTTCTTCAATAAAAAAATTTATAACTTTTTTAA
CTTTGTAAACTTTTTTTAATTTTTTTAACTTTTTTAAATACTTA
GCTTGAAACACAAATACATTTGTATAGCTATACAAAAAATAT
TTTTTCTTTGTATCCTTATTCTAGAAAGCTTTTTTTCTATTT
TCTATTTTTTAAATTTTTTTTTTTTTTACTTTGTAGTCTTTTTTG
TTAAAAACTAAAAACACACACACTTTTCACCTAGGCATAGAC
AGGATTAGGATCATCAGTATCACTCCCTTCCACCTCACTG
CCTTCCACCTCCACATCTTGTCCTCACTGGAAGGTTTTTTAG
GGGCAATAACACACATGTAGCTGTCACCTATGATAACAGT
GCTTTCTGTTGAATACCTCCTGAAGGACTTTGCCCTGAGGCT
GTTTTACATTTAACTTAAAAAAGTAAAGGAGT
GCACTCTAAAAATAACAATAAAAGGCATAGTATAGTGAATA

10

20

30

40

50

C A T A A A C C A G C A A T G T A G T A G T T T A T T A T C A A G T G T T G T A
C A C T G T A A T A A T T G T A T G T G C T A T A C T T T A A A T A A C T T G C
A A A A T A G T A C T A A G A C C T T A T G A T G G T T A C A G T G T C A C T A
A G G C A A T A G C A T A T T T T C A G G T C C A T T G T A A T C T A A T G G G
A
C T A C C A T C A T A T A T G C A G T C T A C C A T T G A C T G A A A C G T T A
C A T G G C A C A T A A C T G T A T T T G C A A G A A T G A T T T T G T T T T A C
A T T A A T A T C A C A T A G G A T G T A C C T T T T T A G A G T G G T A T G T
T T A T G T G G A T T A A G A T G T A C A A G T T G A G C A A G G G G A C C A A
G A G C C C T G G G T T C T G T C T T G G A T G T G A G C G T T T A T G T T C T
T C T C C T C A T G T C T G T T T T C T C A T T A A A T T C A A A G G C T T G A
A C G G G C C C T A T T T A G C C C T T C T G T T T T C T A C G T G T T C T A A
A T A A C T A A A G C T T T T A A A T T C T A G C C A T T T A G T G T A G A A C
T C T C T T T G C A G T G A T G A A A T G C T G T A T T G G T T T C T T G G C T
A G C A T A T T A A A T A T T T T T A T C T T T G T C T T G A T A C T T C A A T
G T C G T T T T A A A C A T C A G G A T C G G G C T T C A G T A T T C T C A T A
A C C A G A G A G T T C A C T G A G G A T A C A G G A C T G T T T G C C C A T T
T T T T G T T A T G G C T C C A G A C T T G T G G T A T T T C C A T G T C T T T
T T T T T T T T T T T T T T T T T T T G A C C T T T T A G C G G C T T T A A A G T
A T T T C T G T T G T T A G G T G T T G T A T T A C T T T T C T A A G A T T A C
T T A A C A A A G C A C C A C A A A C T G A G T G G C T T T A A A C A A C A G C
A A T T T A T T C T C T C A C A A T T C T A G A A G C T A G A A G T C C G A A A
T C A A A G T G T T G A C A G G G G C A T G A T C T T C A A G A G A G A A G A C
T C T T T C C T T G C C T C T T C C T G G C T T C T G G T G G T T A C C A G C A
A T C C T G A G T G T T C C T T T C T T G C C T T G T A G T T T C A A C A A T C
C A G T A T C T G C C T T T T G T C T T C A C A T G G C T G T C T A C C A T T T
G T C T C T G T G T C T C C A A A T C T C T C T C C T T A T A A A C A C A G C A
G T T A T T G G A T T A G G C C C C A C T C T A A T C C A G T A T G A C C C C A
T T T T A A C A T G A T T A C A C T T A T T T C T A G A T A A G G T C A C A T T
C A C G T A C A C C A A A G G G T T A G G A A T T G A A C A T A T C T T T T T G G
G G G A C A C A A T T C A A C C C A C A A G T G T C A G T C T C T A G C T G A G
C C T T T C C C T T C C T G T T T T T C T C C T T T T A G T T G C T A T G G G
T T A G G G G C C A A A T C T C C A G T C A T A C T A G A A T T G C A C A T G G
A C T G G A T A T T T G G G A A T A C T G C G G G T C T A T T C T A T G A G C T
T T A G T A T G T A A C A T T T A A T A T C A G T G T A A A G A A G C C C T T T
T T T A A G T T A T T T C T T T G A A T T T C T A A A T G T A T G C C C T G A A
T A T A A G T A A C A A G T T A C C A T G T C T T G T A A A A T G A T C A T A T
C A A C A A A C A T T T A A T G T G C A C C T A C T G T G C T A G T T G A A T G
T C T T T A T C C T G A T A G G A G A T A A C A G G A T T C C A C A T C T T T G
A C T T A A G A G G A C A A A C C A A A T A T G T C T A A A T C A T T T G G G G
T T T T G A T G G A T A T C T T T A A A T T G C T G A A C C T A A T C A T T G G
T T T C A T A T G T C A T T G T T T A G A T A T C T C C G G A G C A T T T G G A
T A A T G T G A C A G T T G G A A T G C A G T G A T G T C G A C T C T T T G C C
C A C C G C C A T C T C C A G C T G T T G C C A A G A C A G A G A T T G C T T T
A A G T G G C A A A T C A C C T T T A T T A G C A G C T A C T T T T G C T T A C
T G G G A C A A T A T T C T T G G T C C T A G A G T A A G G C A C A T T T G G G
C T C C A A A G A C A G A A C A G G T A C T T C T C A G T G A T G G A G A A A T
A A C T T T T C T T G C C A A C C A C A C T C T A A A T G G A G A A A T C C T T
C G A A A T G C A G A G A G T G G T G C T A T A G A T G T A A A G T T T T T T G
T C T T G T C T G A A A A G G G A G T G A T T A T T G T T T C A T T A A T C T T

10

20

30

40

50

T G A T G G A A A C T G G A A T G G G G A T C G C A G C A C A T A T G G A C T A
T C A A T T A T A C T T C C A C A G A C A G A A C T T A G T T T C T A C C T C C
C A C T T C A T A G A G T G T G T G T T G A T A G A T T A A C A C A T A T A A T
C C G G A A A G G A A G A A T A T G G A T G C A T A A G G T A A G T G A T T T T
T C A G C T T A T T A A T C A T G T T A A C C T A T C T G T T G A A A G C T T A
T T T T C T G G T A C A T A T A A A T C T T A T T T T T T A A T T A T A T G C
A G T G A A C A T C A A A C A A T A A A T G T T A T T T A T T T T G C A T T T A
C C C T A T T A G A T A C A A A T A C A T C T G G T C T G A T A C C T G T C A T
C T T C A T A T T A A C T G T G G A A G G T A C G A A A T G G T A G C T C C A C
A T T A T A G A T G A A A A G C T A A A G C T T A G A C A A A T A A A G A A A C
T T T T A G A C C C T G G A T T C T T C T T G G G A G C C T T T G A C T C T A A
T A C C T T T T G T T T C C C T T T C A T T G C A C A A T T C T G T C T T T T G
C T T A C T A C T A T G T G T A A G T A T A A C A G T T C A A A G T A A T A G T
T T C A T A A A G C T G T T G G T C A T G T A G C C T T T G G T C T C T T T A A C
C T C T T T G C C A A G T T C C C A G G T T C A T A A A A T G A G G A G G T T G
A A T G G A A T G G T T C C C A A G A G A A T T C C T T T T A A T C T T A C A G
A A A T T A T T G T T T T C C T A A A T C C T G T A G T T G A A T A T A T A A T
G C T A T T T A C A T T T C A G T A T A G T T T T G A T G T A T C T A A A G A A
C A C A T T G A A T T C T C C T T C C T G T G T T C C A G T T T G A T A C T A A
C C T G A A A G T C C A T T A A G C A T T A C C A G T T T T A A A A G G C T T T
T G C C C A A T A G T A A G G A A A A A T A A T A T C T T T T A A A A G A A T A
A T T T T T T A C T A T G T T T G C A G G C T T A C T T C C T T T T T T C T C A
C A T T A T G A A A C T C T T A A A A T C A G G A G A A T C T T T T A A A C A A
C A T C A T A A T G T T T A A T T T G A A A A G T G C A A G T C A T T C T T T T
C C T T T T T G A A A C T A T G C A G A T G T T A C A T T G A C T G T T T T C T
G T G A A G T T A T C T T T T T T T C A C T G C A G A A T A A A G G T T G T T T
T G A T T T T A T T T T G T A T T G T T T A T G A G A A C A T G C A T T T G T T
G G G T T A A T T T C C T A C C C C T G C C C C C A T T T T T T C C C T A A A G
T A G A A A G T A T T T T T C T T G T G A A C T A A A T T A C T A C A C A A G A
A C A T G T C T A T T G A A A A A T A A G C A A G T A T C A A A A T G T T G T G
G G T T G T T T T T T T A A A T A A A T T T T C T C T T G C T C A G G A A A G A
C A A G A A A A T G T C C A G A A G A T T A T C T T A G A A G G C A C A G A G A
G A A T G G A A G A T C A G G T A T A T G C A A A T T G C A T A C T G T C A A A
T G T T T T T C T C A C A G C A T G T A T C T G T A T A A G G T T G A T G G C T
A C A T T T G T C A A G G C C T T G G A G A C A T A C G A A T A A G C C T T T A
A T G G A G C T T T T A T G G A G G T G T A C A G A A T A A A C T G G A G G A A
G A T T T C C A T A T C T T A A A C C C A A A G A G T T A A A T C A G T A A A C
A A A G G A A A A T A G T A A T T G C A T C T A C A A A T T A A T A T T T G C T
C C C T T T T T T T T T T C T G T T T G C C C A G A A T A A A T T T T G G A T A A
C T T G T T C A T A G T A A A A A T A A A A A A A A T T G T C T C T G A T A T G
T T C T T T A A G G T A C T A C T T C T C G A A C C T T T C C C T A G A A G T A
G C T G T A A C A G A A G G A G A G C A T A T G T A C C C C T G A G G T A T C T
G T C T G G G G T G T A G G C C C A G G T C C A C A C A A T A T T T C T T C T A
A G T C T T A T G T T G T A T C G T T A A G A C T C A T G C A A T T T A C A T T
T T A T T C C A T A A C T A T T T T A G T A T T A A A A T T T G T C A G T G A T
A T T T C T T A C C C T C T C C T C T A G G A A A A T G T G C C A T G T T T A T
C C C T T G G C T T T G A A T G C C C C T C A G G A A C A G A C A C T A A G A G
T T T G A G A A G C A T G G T T A C A A G G G T G T G G C T T C C C C T G C G G
A A A C T A A G T A C A G A C T A T T T C A C T G T A A A G C A G A G A A G T T
C T T T T G A A G G A G A A T C T C C A G T G A A G A A A G A G T T C T T C A C

10

20

30

40

50

TTTTACTTCCATTTTCCTCTTTGTGGGTGACCCCTCAATGCTC
CTTGTA AAAACTCCAATATTTTAAACATGGCTGTTTTTGCTT
TTCTTTTGCTTCTTTTTTAGCATGAATGAGACAGATGATACT
TTAAAAAAGTAATTAAAAA AAAA AACTTTGTGAAAATACAT
GGCCATAAATACAGAACCCCAATACAATGATCTCCTTTACCA
AATTGTTATGTTTTGTACTTTTTGTAGATAGCTTTTCCAATTTC
AGAGACAGTTATTCTGTGTAAAGGTCTGACTTAACAAGAA
AAGATTTTCCCTTTACCCAAAGAATCCCAGTCTTTATTTGCT
TGGTCAATAAGCAGGGTCCCCAGGAATGGGGTAACCTTTCA
GCACCCCTCTAACCCCACTAGTTATTAGTAGACTAATTAAAGT
AAACTTTATCGCAAGTTGAGGAAACTTTAGAACCACCTAAAA
TTCTGCTTTTTACTGGGATTTTTGTTTTTTTTCAAACCAGAAAC
CTTTACTTTAAGTTGACTACTATTAAATGAATTTTTGGTCTCT
CTTTTTAAGTGCTCTTCTTAAAAATGTTATCTTACTGCTGA
GAAGTTTCAAGTTTGGGAAGTACAAGGAGGAATAGAAACTTT
AAGAGATTTTCTTTT TAGAGCCTCTTCTGTATTTAGCCCTG
TAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTGTTGTGAG
CTTCAGTGAGGCTATTCATTCACCTTATACTGATAATGTCT
GAGATACTGTGAATGAAATACTATGTATGCTTAAACCCTAA
GAGGAAATATTTTCCCAA AATTAATCTTCCCGAAAAGGAG
GAGTTGCCTTTTGAATTGAGTTCTTGCAAATCTCACAAACGA
CTTTATTTTTGAACAATACTGTTTGGGGATGATGCATTAGT
TTGAAACAACCTTCAGTTGTAGCTGTCACTGATAAAAATTG
CTTCACAGGGGAAGGAAATTTAACACGGGATCTAGTCAATTAT
TCTTGTTAGATTGAATGTGTGAATTTGTAAATTGTAAACAGG
CATGATAATTATTACTTTAAAAA ACTAAAAACAGTGAAATAG
TTAGTTGTGGAGGTTACTAAAGGATGGTTTTTTTTTTTAAAT
AAAACTTTCAGCATTAATGCAAATGGGCGATATGGCTTAGGA
TAAAACTTCCAGAAAGTAGCATCACATTTAAATTTCTCAAGC
AACTTAATAATAATG GGGGCTCTGAAAAA ACTGGTTAAGGTTA
CTCCAAAAAATGGCCCTGGGTCTGACAAAGATTCTAACTTA
AAGATGCTTATGAAGACTTTGAGTAA AATCATTTTCATAAA
ATAAGTGAGGAAAAACA ACTAGTATTAAATTCATCTTAAAT
T
AATGTATGATTTTAAAAAATATGTTT TAGCTAAAAAATGCATA
GTCATTTTGACAATTTTCATTTATATCTCAAAAAAATTTACTT
AACCAAGTTGGTCACAAAACTGATGAGACTGGTGGTGGTA
GTGAATAAATGAGGGGACCATCCATATTTGAGACACTTTAC
ATTTGTGATGTGTTATACTGAATTTTTCAGTTTGTATTCTAT
AGACTACAAATTTCAA AATTAACAATTTCAAGATGTAATAA
GTAGTAATATCTTGAAATAGCTCTAAAGGGGAATTTTTCTG
TTTTATTGATTTCTTAAAAATATATGTGCTGATTTTGTATTG
CATTTGGGTAGATTATACTTTTTATGAGTATGGAGGTTAGG
TATTGATTC AAGTTTTTCTTTACCTATTTGGTAAGGATTTTC
AAAGTCTTTTTTGTGCTTGGTTTTCTCATTTTTTAAATATG
AAATATATTGATGACCTTTAACAA AATTTTTTTTTATCTCAA
ATTTTAAAGGAGATCTTTTCTAAAAGAGGCGATGATGACTT
AATCATTTGCATGTAACAGTA AACGATAAACCAATGATTC
ATACTCTCTAAAGAATAAAAGTGAGCTTTAGGGCCGGGCA
TGGTCAGAAATTTGACACCAACCTGGCCAAACATGGCGAAA

10

20

30

40

50

CCCCGTCCTCTACTAAAAATACAAAAATCAGCCGGGGCATGG
TGGCGGCACCTATAGTCCCAGCTACTTTGGGAGGATGAGAC
AGGAGAGTCACTTTGAACCTGGGAGGAGAGGTTTGCAGTGAG
CTGAGATCACGCCATTGCACTCCAGCCTGAGCAATGAAAG
CAAAACTCCATCTCAAAAAAAGAAAGAAAGAAAT
AAAAGTGAGCTTTTGGATTGTCATATAAATCCTTTAGACATG
TAGTAGACTTTGTTTGTACTGTGTTTGAACAAATTTACGAA
GTATTTTTCATCAAAGAATGTTATTGTTTGTATGTTATTTTTT
ATTTTTTTATTGCCCAGCTTCTCTCATATTACGTGATTTTTC
TTCACCTTCATGTCACCTTTATTGTGTCAGGGTTCAGAGTATTA
TTCCAAATGCTTACTGGAGAAGTGATTCTCTGTAAATGGAACCT
GCTTTTCATCTATGAAATCACACAGTGTTCTCTGAAGAAATA
GATGTAAGTTTTAAATGAGAGCAATTATACACTTTATGAGT
TTTTTTGGGGTTATAGTATTATTATGTATATTATAATTATT
CTAATTTTTAATAGTAAGGACTTTTGTCTATACATACTATTCA
CATACAGTATTAGCCACTTTAGCAAATAAGCACACACAAAA
ATCCTGGATTTTTATGGCAAACAGAGGCATTTTTTTGATCAG
TGATGACAAAATTAAATTTCATTTTGTTTATTTCATTACTT
TTATAATTCTCTAAAGTGAGGAGGATCCCAGCTCTTATAGG
AGCAATTATAATTATAATGTAGTGTCCTTTTGAACAACAACT
GTGTGCCAAAGTAGTAACCATTAATGGAAGTTTACTTTGTA
GTCACAAATTTAGTTTCTCTTAATCATTTGTGAGGACGTT
TTGAATCACACACTATGAGTGTTAAGAGATACCTTTAGGA
AACTATTCTTTGTTGTTTTCTGATTTTGTCTATTTAGGTTAG
TCTCCTGATTCTGACAGCTCAGAAAGAGGAAGTTGTTCTTG
TAAAAAATTGTTTAAACCTGCTTGACCAGCTTTTCACATTTGT
TCTTCTGAAGTTTTATGGTAGTGACACAGAGATTGTTTTTTTG
GGGAGTCTTGATTCTCGGAAATGAAGGCAGTGTTGTTATAT
TGAATCCAGACTTCCGAAACCTTGATATATTAAAGTGTTA
TTTCAACACTATGTTACAGCCAGACTAATTTTTTTTATTTT
TTGATGCATTTTATAGATAGCTGATACAGTACTCAATGATGA
TGATATTGGTGACAGCTGTCTATGAAGGCCTTTCTTCTCAAG
TAAGAATTTTTCTTTTCATAAAAGCTGGATGAAGCAGATA
CCATCTTATGCTCACCTATGACAAGATTTGGAAGAAAGAA
AATAACAGACTGTCTACTTTAGATTGTTCTAGGGACATTAC
GTATTTTGAACCTGTTGCTTAAATTTGTGTTATTTTTTCACTC
ATTATATTTCTATATATATTTTGGTGTTATTCCATTTGCTA
TTTAAAGAAACCGAGTTTCCATCCCAGACAAGAAATCATG
GCCCTTTGCTTGATTCTGGTTTCTTTGTTTTTACTTCTCATTT
AAAGCTAACAGAAATCCTTTTCATATTAAAGTTGTACTGTAGA
TGAACTTAAAGTTATTTAGGCGTAGAACAAAATTATTCTATA
TTTATACTGATCTTTTTTCCATCCAGCAGTGGAGTTTAGTA
CTTAAAGAGTTTGTGCCCTTAAACCAGACTCCCTGGATTAA
TGCTGTGTACCCGTGGGCAAGGTGCCTGAATTCTCTATAC
ACCTATTTCTCTCATCTGTAAAAATGGCAATAATAGTAATAG
TACCTAATGTGTAGGGTTGTTATAAGCATTTGAGTAAGATA
AATAATATAAAGCACTTAGAACAGTGCCCTGGAACATAAAA
ACACTTAATAATAGCTCATAGCTAACATTTCTCTATTTACA
TTTCTTCTAGAAATAGCCAGTATTTGTTGAGTGCCCTACAT
GTTAGTTCTCTTTACTAGTTGCTTTACATGTATTATCTTAT

10

20

30

40

50

ATTCTGTTTTTAAAGTTTCTTTCACAGTTACAGATTTTTCATG
AAATTTTACTTTTAAATAAAAGAGAAAGTAAAGATATAAGT
ATTCACCTTTTATGTTTCACAGTCTTTTCTTTTAGGCTCATG
ATGGAGTATCAGAGGCATGAGTGTTGTTTAAACCTAAGAGCC
TTAATGGCTTGAATCAGAAGCAGCTTTAGTCTCTGTATCTGT
TCAGTGTCAGCCTTTTCATACATCATTTTAAATCCCATTTTG
ACTTTAAGTAAGTCACTTAATCTCTCTACATGTCAATTTTC
TTCAGCTATATAAATGATGGTATTTTCAATAAATAAATACAT
TAATTAATGATATTATACTGACTAATTGGGGCTGTTTTTAA
GGCTCAATAAGAAAAATTTCTGTGAAGGTCTCTAGAAAAAT
GTAGGTTTCTATACAAATAAAAGATAACATTGTGCTTATA
GCTTCGGTGTTTTATCATATAAAGCTATTCTGTAGTTATTTG
AAGAGCTCACCTACTTTTTTTTTTGTTTTTTAGTTTTGTTAAAT
TGTTTTATAGGCAATGTTTTTAAATCTGTTTTTCTTTAACTT
ACAGTGCCATCAGCTCACACTTTGCAAAACCTGTGGCTGTTC
CGTTGTAGTAGGTAGCAGTGACAGAGAAAGTAAATAAGGTA
GTTTTATTTTTATAATCTAGCAAATGATTTTGAAGCTCTTTAAGA
CTGATGATATATCATGGATTGTTCATTTAAATGGTAGGTTG
CAATTAATAATGATCTAGTAGTATAAGGAGGGCAATGTAATC
TCATCAAATTTGCTAAGACACCTTTGTGGCAACAGTGAGTTT
GAAATAAACTGAGTAAGAATCATTTATCAGTTTTATTTTGA
TAGCTCGGAATAACAGTGTCAGTAGTGATAAATGGTTTT
TGAGAAATATAATTAAATCAGATATATAAAAAAAATTAATCTC
TTCTATTTTCCCAATGTTATCTTTAACAATACTGAAAGATAG
TCATGTACTTTTGGTAGTAGTTCCCAAAGAAATGTTATTTTG
TTTTATTATCTTTGATTTTCAATTTGTCTTTCGCTTTTCTCTAA
ATCTGTCCCTTTCTAGGGAGCTATTGGGATTAAAGTGGTTCAT
TGATTATTATACTTTATTTCAGTAATGTTTTCTGACCCCTTTTC
CTTCAGTGCTACTTTGAGTTAATTAAGGATTAAATGAACAGT
TACATTTTCCAAGCATTAGCTAATAAACTAAAGGATTTTTCG
ACTTTTCTTCACTGACCATTAGTTAGAAAGAGTTTCAGAGA
TAAGTATGTGTATCTTTCAATTTTCAGCAAACCTAATTTTTT
TAAAAAAAGTTTTACATAGGAATAATGTTGGAAATGATAC
TTTTACAAAGATATTTCATAATTTTTTTTTTTTGTAAATCAGCTAC
TTTTGTATATTTACATGAGCCTTAATTTTATATTTCTCATAT
AACCATTTTATGAGAGCTTAGGTATACCTGTGTTCATTTATTT
GCATCTACGAACCTAGTGACCTTATTTCTTTCTGTTACCTCA
AACAGGTGGCTTTTCCATCTGTGATCTCCAAAGCCTTAGGTT
TGCACAGAGTGACTGCCGAGCTGCTTTTATGAAGGGAGAAAA
GGCTCCATAGTTGGAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACA
TTTTTTCCCATCCTCCATCCTCTTTGAGGGAGAAATAGCTTAC
CTTTTATCTTTGTTTTTAAATTTGAGAAAGAAAGTTGCCACCCAC
TCTAGGTTTGAATAACCACTCCTTTAACAATAAATACTGTGGA
TATGGTTTTGAATTTCAAGATAGTTACATGCCCTTTTTTATTT
TTCCTAATAGAGCTGTAGGTCAAATAATTATTAGAAATCAGA
TTTTCTAAATCCCACCCAATGACCTGCTTATTTTAAATCAA
ATTCAATAATTAAATTTCTCTTTCTTTTTTGGAGGATCTGGACA
TTCCTTTGATATTTCTTACAACGAATTTTCATGTGTAGACCC
ACTAAACAGAAAGCTATAAAAGTTGCATGGTCAAATAAGTCT
TGAGAAAGTCTGCAGATGATATAATTTCACCTGAAGAGTCA

10

20

30

40

50

CAGTATGTAGCCAAATGTTAAAGGTTTTTGAGATGCCATAC
AGTAAATTTACCAAGCATTTTCTAAATTTATTTGACCACA
GAATCCCTATTTTAAAGCAACAACCTGTTACATCCCATGGAT
TCCAGGTGACTAAAGAATACTTATTTCTTAGGATATGTTTT
TATTTGATAATAACAATTAAATTTTCAGATATCTTTTCATAA
GCAAATCAGTGGTCTTTTTTACTTTCATGTTTTTAATGCTAAA
ATATTTTCTTTTTATAGATAGTCAAGAACATTTATGCCCTTTTT
CTGACTCCAGCAGAGAGAGAAAATGCTCCAGGTTATGTGAAG
CAGAATCATCATTTAAATATGAGTCAAGGGCTCTTTGTACA
AGGCCTGCTAAAGGTATAGTTTTCTAGTTATCACAAAGTGAA
ACCACTTTTTCTAAAATCATTTTTTGAGACTCTTTATAGACA
AATCTTAAATATTAGCATTTTAATGTATCTCATATTGACAT
G
CCCAGAGACTGACTTTCCTTTACACAGTTCTGCACATAGAC
TATATGTCTTATGGATTTATAGTTAGTATCATCAGTGAAA
CACCATAGAATAACCCTTTGTGTTCAGGTTGGGTCCCTGTT
CCTACATGTCTAGCCTCAGGACTTTTTTTTTTTTAAACACA
TGCTTAAATCAGGTTGCACATCAAAAATAAGATCATTTCT
TTTTAACTAAATAGATTTGAATTTTATTTGAAAAAAATTT
TAAACATCTTTAAGAAGCTTATAGGATTTAAGCAATTCCT
ATGTATGTGTACTAAAATATATATATTTCTATATATAATA
TATATTAGAAAAAAATTTGTATTTTTTCTTTTATTTGAGTCT
ACTGTCAAGGAGCAAAACAGAGAAATGTAAATTAGCAATT
ATTTATAATACTTTAAAGGGGAAGAAAGTTGTTTACCCTTGTT
GAATCTATTATTGTTATTTTCAATTATAGTCCCAAGACGTG
AAGAAATAGCTTTCCTAATGGTTATGTGATTGTCTCATAG
TGACTACTTTCTTGAGGATGTAGCCACGGCAAAATGAAAT
AAAAAAATTTAAAAAATTTGTTGCAAAATACAAGTTATATTAG
GCTTTTTGTGCATTTTTTCAATAATGTGTGCTGCTATGAACCTCAG
AATGATAGTATTTTAAATATAGAAACTAGTTAAAGGGAACG
TAGTTTTCTATTTGAGTTATACATATCTGTAAATTAGAACT
TCTCCTGTTAAAGGCATAATAAAGTGCTTAATACTTTTTGT
TTCCTCAGCACCCCTCTCATTTAATTATATAATTTTAGTTTC
TGAAAGGGACCTATACCAGATGCCTAGAGGAAATTTCAAA
ACTATGATCTAATGAAAAAATATTTAATAGTTCTCCATGC
AAATACAAATCATATAGTTTTTCCAGAAATAACCTTTGACA
TTATACAAAGATGATTATCACAGCATTTATAATAGTAAAAA
AATGGAAATAGCCTCTTTCTTCTGTTCGTTCATAGCACACA
GTGCCTCATACGCAGTAGGTTATTATTACATGGTAACCTGG
CTACCCCAACTGATTAGGAAAGAAAGTAAATTTGTTTTATA
AAAAATACATACTCATTTGAGGTGCATAGAAATAATTAAAGAAA
TTAAAAGACACTTGTAATTTTGAATCCAGTGAAATACCCAC
TGTTAATAATTTTGGTATATCTCTTTCTAGTCTTTTTTTTCCC
TTTTTGCAATGTATTTTCTTTTAAAGACTCCCACCCCTGGA
TCATCTCTGCATGTTCTAATCTGCTTTTTTTCACAGCAGAT
TCTAAGCCTCTTTGAATATCAACACAAACTTCAACAACTT
CATCTATAGATGCCAAATAATAAATTCATTTTTTATTTACT
TAACCACTTCCCTTTGGATGCTTAGGTCATTTCTGATGTTTT
GCTATTGAAACCAATGCTATACTGAACACTTCTGTCACTA
AAACTTTGCACACACTCATGAATAGCTTCTTAGGATAAAT

TTTTAGAGATGGATTTTGCTAAATCAGAGACCATTTTTTTAA
AATTAAAAACAATTATTCATATCGTTTGGCATGTAAAGAC
AGTAAATTTTCTTTTATTTTGACAGGATTCAACTGGGAAG
CTTTGTGCTGCCCTTTCGGGCAAGTCATGTATGCTCCATAT
CCCACCAACACACATAGATGTGGATGTCAATACTGTGAAGC
AGATGCCACCCCTGTCATGAACATATTTATAATCAGCGTAG
ATACATGAGATCCGAGGCTGACAGCCCTTCTGGAGAGCCACT
TCAGAAGAAGACATGGCTCAGGATACGATCATCTACACTG
ACGAAAGCTTTACTCCTGATTTGTACGTAATGCTCTGCCCT
GCTGGTACTGTAGTCAAGCAATATGAAATTGTGTCTTTTA
CGAATAAAAAACAACAGAAAGTTGCATTTAAAAAGAAAGA
AATATTACCAGCAGAAATTATGCTTGAAGAAACATTTAATC
AAGCATTTTTTTCTTAAATGTTCTTCTTTTTTCCATACAAT
TGTGTTTACCCTAAAAATAGGTAAGATTAAACCCTTAAAGTA
AATATTTTAACTATTTGTTTAATAAATATATATTGAGCTCC
TAGGCACCTGTTCTAGGTACCGGGCTTAATAGTGGCCAACC
AGACAGCCCCAGCCCCAGCCCCCTACATTTGTGTATAGTCTA
TTATGTAACAGTTATTGAATGGACTTATTAAACAAAACCAA
AGAAAGTAATTCTAAGTCTTTTTTTTTCTTGACATATGAATA
TAAAATACAGCAAAAACCTGTTAAAAATATATTAAATGGAACAT
TTTTTTTACTTTGCATTTTATATTGTTATTCACTTCTTATT
TTTTTTTTTAAAAAAGCCTGAACAGTAATTTCAAAAGG
AAAAGTAATGATAATTAAATTGTTGAGCATGGACCCCAACTT
GAAAAAATAATGATGATGATAAATCTATAATCCTAAAAAC
CCTAAGTAACACTTAAAAAGATGTTCTGAAATCAGGAAAAA
GAATTATAGTATACTTTTGTGTTTCTCTTTTATCAGTTGA
AAAAAGGCAACAGTAGCTCATGCTGTAAAGAACAGAGCTTT
GGGAGTGCAAGGCAGGCGGATCACTTGAGGGCCAGGAGTTTC
CAGACCAGCCTGGGCAACATAGTGAAACCCCATCTCTACA
AAAAATAAAAAAAGAATTATTGGAATGTGTTTCTGTGTGCC
TGTAATCCTAGCTATTCCGAAAGCTGAGGGCAGGAGGATCT
TTTGAGGCCCAGGAGTTTGAGGGTTACAGGGAGTTATGATGT
GCCAGTGTACTCCAGCCTGGGGGAACACCGAGACTCTGTCT
TATTTTAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATGCTTGCAATAATGCC
TGGCACATAGAAGGTAACAGTAAGTGTTAACTGTAAATAAC
CCAGGTCTAAGTGTTGTAAGGCAATAGAAAAAATTGGGGCAA
ATAAGCCTGACCTATGTATCTACAGAATCAGTTTGTAGCTT
AGGTAACAGACCTGTGGAGCACCCAGTAATTACACAGTAAG
TGTTAAACCAAAAGCATAGAATAAGGAATATCTTGTTCAGG
GACCCCCAGCCTTATACATCTCAAGGTGCAGAAAGATGAC
TTAATATAGGACCCATTTTTTTCTAGTTCTCCAGAGTTTTT
TATTGGTTCTTGAGAAAGTAGTAGGGGAATGTTTTTAGAAA
ATGAATTGGTCCAACCTGAAATTACATGTCTAGTAAGTTTTT
ATATATTGGTAATAATTTTAGTAGACATGTAGAAGTTTTCTA
ATTAATCTGTGCCCTTGAAACATTTTCTTTTTTCTTAAGT
GCTTAGTATTTTTTTCCGTTTTTTGATTGGTTACTTGGGAG
CTTTTTTTGAGGAAATTTAGTGAACCTGCAGAAATGGGGTTTGC
AACCATTTGGTATTTTTTTGTTTTTTTGTAGAGGATGTAT
GTGTATTTTAAACATTTCTTAAATCATTTTTTAGCCAGCTATG
TTTGTTTTTGCTGATTTGACAAACTACAGTTAGACAGCTAT

10

20

30

40

50

TCTCATTTTGTGCTGATCATGACAAAATAATATCCTGAATTT
TTAAATTTTGCATCCAGCTCTAAATTTTCTAAACATAAAA
TTGTCCAAAAAATAGTATTTTTCAGCCACTAGATTGTGTGT
TAAGTCTATTGTACACAGAGTCAATTTTACTTTTAAAGTATAT
GTTTTTTACATGTTAATTATGTTTTGTTATTTTTTAATTTTAA
CTTTTTTAAAAATAATTCCAGTCACTGCCAATACATGAAAAA
TTGGTCACTGGAATTTTTTTTTTTGACTTTTATTTTAGGTT
CATGTGTACATGTGTCAGGTGTGTTATACAGGTAAATTGCG
TGTCATGAGGGTTTGGTGTACAGGTGATTTTCATTACCCAG
GTAATAAGCATAGTACCCAATAGGTAGTTTTTTTTGATCCTC
ACCTTTCTCCCACCTCTCAAGTAGGCCCTGGTGTGCTGTT
TCCTTTCTTTGTGTCCATGTATACTCAGTGTTTAGCTCCCA
CTTAGAAGTGAGAACATGCGGTAGTTGGTTTTCTGTTCTCT
GGATTAGTTCACTTAGGATAATGACCTCTAGCTCCATCTG
GTTTTTTATGGCTGCATAGTATTTCCATGGTGTATATGTATC
ACATTTTCTTTATCCAGTCTACCATTGATAGGCCATTTAGG
TTGATTCCCTGTCTTTGTTATCATGAATAGTGCTGTGATG
AACATACACATGCATGTGTCTTTATGGTAGAAAAAATTTGT
ATTCCTTTAGGTACATATAGAATAATGGGGTTGCTAGGGT
GAATGGTAGTTCTATTTTTCAGTTATTTTGAGAAATCTTCAA
ACTGCTTTTTCATAAATAGCTAAACTAATTTACAGTCCCGCC
AGCAGTGTATAAGTGTTCCCTTTTCTCCACAACCTTGCCA
ACATCTGTGATTTTTTTTGACTTTTTTAATAATAGCCATTCT
AGAGAATTGATTTTGCAATTCTCTATTAGTGATATTAAGCA
TTTTTTTCATATGCTTTTTTAGCTGTCTGTATATATTCTTCT
GAAAAAATTTTTCATGTCCTTTGCCCCAGTTTGTAGTGTTGG
GGTTGTTTTTTTGCTTGTTAATTAGTTTTTAAGTTCTCTTCCA
GATTCGTGCATATCCCTTTGTTGGATACATGGTTTGCAGAT
ATTTTTTCTCCCATTGTGTAGGTGTCTTTTACTCTGTTGA
TAGTTTTCTTTTGCCATGCAGGAGCTCGTTAGGTCCCATTT
GTGTTTTGTTTTTTGTTGTCAGTTGCTTTTGGCGTCTTCA
TAAATCTGTGTCAGGGGCTATGTCCAGAATGGTATTTTCC
TAGGTTGTCTTCCAGGGTTTTTTACAATTTTAGATTTTACG
TTTATGTCTTTAATCCATCTTGAGTTGATTTTTTGATATATG
GCACAAGGAAGGGGTCCAGTTTCACTCCAATTCTCTATGGC
TAGCAATTATCCCAGCACCATTTATTGAATACGGAGTCTCT
TTCCCCATTGCTTGTTTTTTTGTCAACTTTGTTGAAGATCA
GATGGTTGTAAGTGTTGTTGGCTTTATTTCTTGCTCTCTAT
TCTCCATTGGTCTATGTGTCTGTTTTTTATAACAGTACCTCT
GCTGTTTCAGGTTCCTATAGCCTTTTATAGTATAAAAATCGGCT
AATGTGATGCCTCCAGCTTTGTTCTTTTTTGCTTAGGATTG
C
TTTGGCTATTTTGGGCTCCTTTTTTGGGTCCATATTAATTTT
AAAACAGTTTTTTTTCTGGTTTTTGTGAAGGATATCATTGGTA
GTTTATAGGAATAGCATTTGAATCTGTAGATTGCTTTGGGC
AGTATGGCCATTTTAAACAATATTAATTCTTCTCTATCTATG
AATATGGAATGTTTTTCCATGTGTTTGTGTCATCTCTTTTA
TACCTGATGTATAAAGAAAAAGCTGGTATTATTCTCTACTCA
ATCTGTTCCAAAAAATTTGAGGAGGAGGAACCTCTTCCCTAA
TGAGGCCAGCATCATTTCTGATACCAAAACCTGGGCAGAGAC

10

20

30

40

50

ACAAACAGAAAAAAGAAAAACTTTCAGGCCAATATCCTTTGATG
AATATAGATGCAAAAAATCCTCAACAAAAATACTAGCAAAACC
AAATCCAGCAGCACATCAAAAAAGCTGATCTACTTTTGATCA
AGTAGGCTTTATCCCTGGGATGCAAGGTTGGTTCAACATA
CACAAATCAATAAGTGTGATTTCATCACATAAAACAGAGCTA
AAAAACA AAAAACCACAAGATTATCTCAATAGGTAGAGAAAAA
GGTTGTCAATAAAAATTTAACATCCTCCATGTTAAAAAACCT
TCAGTAGGTCAGGTGTAGTGACTCACACCTGTAATCCCAG
CACTTTGGGAGGCCCAAGGCGGGGCATATCTCTTAAGCCCCAG
GAGTTCAAGACGAGGCCTAGGCGAGCATGGTGAAACCCCCATC
TCTACAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AATTAGCTTGGGTATGG
TGACATGCACCTATAGTCCCAGCTATTTCAGGAGGTTTGAGG
TGGGAGGATTGTTTTGAGCCCGGGAGGCGAGAGGTTGGCAGC
GAGCTGAGATCATGCCACCGCACTCCAGCCTGGGGCAACGG
AGTGAGACCCTGTCTCAAAAAAAGAAAAAATCACAAACAATC
CTAAACA AACTAGGCGATTGAAGGAACATGCCTCAAAAAA
TAAGAACCATCTATGACAGACC CATAGCCAATATCTTTACC
AAATGGGCAAAAGCTGGAAGTATTCTCCTTGAGAACCGTA
ACAAGACAAGGATGTCCACTCTCACCACTCCTTTTTCAGCA
TAGTTCTGGAAGTCCTAGCCAGAGCAATCAGGAAGAGAGAA
AGAAAGAAAGACATTCAGATAGGAAGAGAAAGAAAGTCAAAC
TATTTCTGTTTG CAGGCAGTATAATTCTGTACCTAGAAAA
TCTCATAGTCTCTGCCCAGAAACTCCTAAATCTGTTAAAA
ATTTTCAGCAAAAGTTTTTGGCATTTCTCTATACTCCAACACCT
TCCAAGGTGAGAGCAAAAATCAAGAACACAGTCCCATTTCAC
AATAGCCGCAAAACGAATAAAAATACCTAGGAATCCAGCTA
ACCAGGGAGGTTGAAAGATCTCTATGAGAAATTACAAAAACAC
TGCTGAAAGAAATCAGAGATGACACAACA AATGGGAAATG
TTCTTTTTTTTAAACACCTTTGCTTTTATCTAATTCACTTATGAT
GAAGATACTCATTCAGTGGAACAGGTATAATAAGTCCACT
CGATTAAATATAAGCCTTATTCTCTTTTCCAGAGCCCCAAGA
AGGGGCACTATCAGTGCC CAGTCAATAATGACGAAATGCT
AATATTTTTTCCCTTTTACGGTTTCTTTCTTCTGTAGTGTG
GTACACTCGTTTTCTTAAGATAAGGAAAACTTTGAACCTACCTT
CCTGTTTTGCTTCTACACATACCCATTCTCTTTTTTTTGGCA
CTCTGGTCAAGGTATAGGATGATCCCTACCACTTTTCAGTTA
AAAACTCCTCCTCTTACTAAATGTTCTCTTACCCCTCTGGC
CTGAGTAGAACCTAGGGAAAAATGGAAAGAGAAAAAGATGAA
AGGGAGGTTGGGGCCTGGGAAAGGGAAATAAGTAGTCTGTTT
GTTTGTGTGTTTGGCTTTAGCACCTGCTATATCCTAGGTGC
TGTGTTAGGCACACATTTATTTTAAAGTGGCCATTATATTAC
TACTACTCACTCTGGTTCGTTTGCCAAGGTAGGTAGTACTTT
CTTGGA TAGTTGGTTTCATGTTACTTTACAGATGGTGGGCTT
GTTGAGGCAAAACCCAGTGGATAATCATCGGAGTGTGTTCT
CTAATCTCACTCAAATTTTTCTTCACATTTTTTTGGTTTGT
TTTTGGTTTTTTGATGGTAGTGGCTTATTTTTTTGTTGCTGGTT
TGTTTTTTTGTTTTTTTTTTGGAGATGGCAAGAAATTGGTAGTT
TTATTTATTAATTGCCTAAGGGTCTCTACTTTTTTTTAAAA
GATGAGAGTAGTA AAAATAGATTGATAGATACATACATACC
CTTACTGGGGACTGCTTATATTCTTTAGAGAAAAAATTAC

10

20

30

40

50

A T A T T A G C C T G A C A A A C A C C A G T A A A A T G T A A A T A T A T C C
T T G A G T A A A T A A A T G A A T G T A T A T T T T G T G T C T C C A A A T A
T A T A T A T C T A T A T T C T T A C A A A T G T G T T T A T A T G T A A T A T
C A A T T T A T A A G A A C T T A A A A T G T T G G C T C A A G T G A G G G A T
T G T G G A A G G T A G C A T T A T A T G G C C A T T T T C A A C A T T T T G A A C
T T T T T T C T T T T C T T C A T T T T C T T C T T T T C T T C A G G A A T A T
T T T T C A A G A T G T C T T A C A C A G A G A C A C T C T A G T G A A A G C C
T T C C T G G A T C A G G T A A A T G T T G A A C T T G A G A T T G T C A G A G
T G A A T G A T A T G A C A T G T T T T C T T T T T A A T A T A T C C T A C A
A T G C C T G T T C T A T A T A T T T A T A T T C C C C T G G A T C A T G C C C
C A G A G T T C T G C T C A G C A A T T G C A G T T A A G T T A G T T A C A C T
A C A G T T C T C A G A A G A G T C T G T G A G G G C A T G T C A A G T G C A T
C A T T A C A T T G G T T G C C T C T T G T C C T A G A T T T A T G C T T C G G
G A A T T C A G A C C T T T G T T T A C A A T A T A A T A A A T A T T A T T G C
T A T C T T T T A A A G A T A T A A T A A T A A G A T A T A A A G T T G A C C A
C A A C T A C T G T T T T T T G A A A C A T A G A A T T C C T G G T T T A C A T
G T A T C A A A G T G A A A T C T G A C T T A G C T T T T A C A G A T A T A A T
A T A T A C A T A T A T A T A T C C T G C A A T G C T T G T A C T A T A T A T G
T A G T A C A A G T A T A T A T A T A T G T T T G T G T G T G T A T A T A T A T
A T A G T A C G A G C A T A T A T A C A T A T T A C C A G C A T T G T A G G A T
A T A T A T A T G T T T A T A T A T T A A A A A A A A G T T A T A A A C T T A A
A A C C C T A T T A T G T T A T G T A G A G T A T A T G T T A T A T A T G A T A
T G T A A A A T A T A T A A C A T A T A C T C T A T G A T A G A G T G T A A T A
T A T T T T T T A T A T A T A T T T T T A A C A T T T T A T A A A A T G A T A G A A
T T A A G A A T T G A G T C C T A A T C T G T T T T A T T A G G T G C T T T T T
G T A G T G T C T G G T C T T T C T A A A G T G T C T A A A T G A T T T T T T C C
T T T T G A C T T A T T A A T G G G G A A G A G C C T G T A T A T T A A C A A T
T A A G A G T G C A G C A T T C C A T A C G T C A A A C A A C A A A C A T T T T
A A T T C A A G C A T T A A C C T A T A A C A A A G T A A G T T T T T T T T T T
T T T T T G A G A A A G G G A G G T T G T T T A T T T G C C T G A A A T G A C T
C A A A A A T A T T T T T T G A A A C A T A G T G T A C T T A T T T A A A T A A C
A T C T T T A T T G T T T C A T T C T T T T A A A A A A T A T C T A C T T A A T
T A C A C A G T T G A A G G A A A T C G T A G A T T A T A T G G A A C T T A T T
T C T T A A T A T A T T A C A G T T T G T T A T A A T A A C A T T C T G G G G A
T C A G G C C A G G A A A C T G T G T C A T A G A T A A A G C T T T G A A A T A
A T G A G A T C C T T A T G T T T A C T A G A A A T T T T G G A T T G A G A T C
T A T G A G G T C T G T G A C A T A T T G C G A A G T T C A A G G A A A A T T C
G T A G G C C T G G A A T T T C A T G C T T C T C A A G C T G A C A T A A A A T
C C C T C C C A C T C T C C A C C T C A T C A T A T G C A C A C A T T C T A C T
C C T A C C C A C C C A C T C C A C C C C C T G C A A A A G T A C A G G T A T A
T G A A T G T C T C A A A A C C A T A G G C T C A T C T T C T A G G A G C T T C
A A T G T T A T T T G A A G A T T T G G G C A G A A A A A A T T A A G T A A T A
C G A A A T A A C T T A T G T A T G A G T T T T A A A A G T G A A G T A A A C A
T G G A T G T A T T C T G A A G T A G A A T G C A A A A T T T G A A T G C A T T
T T T A A A G A T A A A T T A G A A A A C T T C T A A A A A C T G T C A G A T T
G T C T G G G C C T G G T G G C T T A T G C C T G T A A T C C C A G C A C T T T
G G G A G T C C G A G G T G G G T G G A T C A C A A G G T C A G G A G A T C G A
G A C C A T C C T G C C A A C A T G G T G A A A C C C C G T C T C T A C T A A G
T A T A C A A A A A T T A G C T G G G C G T G G C A G C G T G T G C C T G T A A
T C C C A G C T A C C T G G G A G G C T G A G G C A G G A G A A T C G C T T G A

10

20

30

40

50

A C C C A G G A G G T G T A G G T T G C A G T G A G T C A A G A T C G C G C C A
C T G C A C T T T A G C C T G G T G A C A G A G C T A G A C T C C G T C T C A A
A A A A A A A A A A A A A T A T C A G A T T G T T C C T A C A C C T A G T G C T
T C T A T A C C A C A C T C C T G T T A G G G G G C A T C A G T G G A A A T G G
T T A A G G A G A T G T T T A G T G T G T A T T G T C T G C C A A G C A C T G T
C A A C A C T G T C A T A G A A A C T T C T G T A C G A G T A G A A T G T G A G
C A A A T T A T G T G T T G A A A T G G T T C C T C T C C C T G C A G G T C T T
T C A G C T G A A A C C T G G C T T A T C T C T C A G A A G T A C T T T C C T T
G C A C A G T T T C T A C T T G T C C T T C A C A G A A A A G C C T T G A C A C
T A A T A A A A T A T A T A G A A G A C G A T A C G T G A G T A A A A C T C C T
A C A C G G A A G A A A A A C C T T T G T A C A T T G T T T T T T G T T T T G
T T T C C T T T G T A C A T T T T C T A T A T C A T A A T T T T T G C G C T T C
T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T C C A T T A T T T T T A G G
C A G A A G G G A A A A A A G C C C T T T A A A T C T C T T C G G A A C C T G A
A G A T A G A C C T T G A T T T A A C A G C A G A G G G C G A T C T T A A C A T
A A T A A T G G C T C T G G C T G A G A A A A T T A A A C C A G G C C T A C A C
T C T T T T A T C T T T G G A A G A C C T T T C T A C A C T A G T G T G C A A G
A A C G A G A T G T T C T A A T G A C T T T T T A A A T G T G T A A C T T A A T
A A G C C T A T T C C A T C A C A A T C A T G A T C G C T G G T A A A G T A G C
T C A G T G G T G T G G G G A A A C G T T C C C C T G G A T C A T A C T C C A G
A
A T T C T G C T C T C A G C A A T T G C A G T T A A G T A A G T T A C A C T A C
A G T T C T C A C A A G A G C C T G T G A G G G G A T G T C A G G T G C A T C A
T T A C A T T G G G T G T C T C T T T T C C T A G A T T T A T G C T T T T G G G
A T A C A G A C C T A T G T T T A C A A T A T A A T A A A T A T T A T T G C T A
T C T T T T A A A G A T A T A A T A A T A G G A T G T A A A C T T G A C C A C A
A C T A C T G T T T T T T T G A A A T A C A T G A T T C A T G G T T T A C A T G
T G T C A A G G T G A A A T C T G A G T T G G C T T T T A C A G A T A G T T G A
C T T T C T A T C T T T T G G C A T T C T T T G G T G T G T A G A A T T A C T G
T A A T A C T T C T G C A A T C A A C T G A A A A C T A G A G C C T T T A A A T
G A T T T C A A T T C C A C A G A A A G A A A G T G A G C T T G A A C A T A G G
A T G A G C T T T A G A A A G A A A A T T G A T C A A G C A G A T G T T T A A T
T G G A A T T G A T T A T T A G A T C C T A C T T T G T G G A T T T A G T C C C
T G G G A T T C A G T C T G T A G A A A T G T C T A A T A G T T C T C T A T A G
T C C T T G T T C C T G G T G A A C C A C A G T T A G G G T G T T T T G T T T A
T T T T A T T G T T C T T G C T A T T G T T G A T A T T C T A T G T A G T T G A
G C T C T G T A A A A G G A A A T T G T A T T T T A T G T T T T A G T A A T T G
T T G C C A A C T T T T T A A A T T A A T T T T C A T T A T T T T T G A G C C A
A A T T G A A A T G T G C A C C T C C T G T G C C T T T T T T C T C C T T A G A
A A A T C T A A T T A C T T G G A A C A A G T T C A G A T T T C A C T G G T C A
G T C A T T T T C A T C T T G T T T T C T T C T T G C T A A G T C T T A C C A T
G T A C C T G C T T T G G C A A T C A T T G C A A C T C T G A G A T T A T A A A
A T G C C T T A G A G A A T A T A C T A A C T A A T A A G A T C T T T T T T T C
A G A A A C A G A A A A T A G T T C C T T G A G T A C T T C C T T C T T G C A T
T T C T G C C T A T G T T T T T G A A G T T G T T G C T G T T T G C C T G C A A
T A G G C T A T A A G G A A T A G C A G G A G A A A T T T T A C T G A A G T G C
T G T T T T C C T A G G T G C T A C T T T G G C A G A G C T A A G T T A T C T T
T T G T T T T C T T A A T G C G T T T G G A C C A T T T T T G C T G G C T A T A A
A A T A A C T G A T T A A T A T A A T T C T A A C A C A A T G T T G A C A T T G
T A G T T A C A C A A A C A C A A A T A A A T A T T T T A T T T A A A A T T C T

10

20

30

40

50

GGAAGTAATATAAAAAGGGGAAAATATATTTTATAAGAAAAGGG
ATAAAGGTAATAGAGCCCTTCTGCCCCCCCACCACCAAAAT
TTACACAACAATAATGACATGTTTCGAATGTGAAAGGTCATA
ATAGCTTTTCCCATCATGAATCAGAAAGATGTGGACAGCTT
GATGTTTTTAGACAACCACTGAACCTAGATGACTGTTGTACT
GTAGCTCAGTCATTTAAAAAATATATAAATACTACCTTGT
AGTGTCCCATACTGTGTTTTTTTACATGGTAGATTCTTATT
TAAGTGCTAACTGGTTATTTTTCTTTGGCTGGTTTATTGTA
CTGTTATACAGAATGTAAGTTGTACAGTGAAATAAGTTAT
TAAAGCATGTGTATAAACATTTGTTATATATCTTTTTCTCTAA
ATGGAGAAATTTTGAATAAAAATATATTTTGAATAATTTTGCCTC
TTTCAGTTGTTCATTCAGAAAAAAATACTATGATATTTGA
AGACTGATCAGCTTCTGTTCAGCTGACAGTCATGCTGGAT
CTAAACTTTTTTTTAAATAATTTTGTCTTTTCAAAGAAA
AAATATTTTAAAGAAGCTTTTATAATATAATCTTATGTTAAA
AAAACCTTTCTGCTTAACCTCTCTGGATTTCATTTTGTATTT
TCAAATTTATATATTTAATATTTTCAAATGTAAAATACTATTT
AGATAAATTTGTTTTTAAACATTTCTTATTTATTAATAATTA
ATATAACCTAAACTGAAGTTATTCATCCCAGGTATCTAAT
ACATGTATCCAAAGTAATAAATCCAAAGGAATCTGAACACTT
TCATCTGCAAAGCTAGGAATAGGTTTGTACATTTTCACTCC
AAGAAAAAGTTTTTTTTTTGAAAAATAGAAATAGTTGGGATGA
GAGGTTTCTTTAAAGAAGACTAACTGATCACATTACTAT
GATTCTCAAAGAAGAAACCAAAACTTTCATATAATACTATA
AAGTAATAATATAAAATAGTTTCCTTCTATAGTATATTTCTAT
AATGCTACAGTTTAAACAGATCACTCTTATATAATACTAT
TTTGATTTTGTATGTAGAATTGCACAAATTGATATTTCTCC
TATGATCTGCAGGGTATAGCTTAAAGTAACAAAAACAGTC
AACCACTCCATTTAACACACAGTAACACTATGGGACTAG
TTTTATTACTTCCATTTTACAAATGAGGAAACTAAAGCTT
AAAGATGTGTAATACACCGCCCAAGGTCACACAGCTGGTA
AAGGTGGATTTTCATCCCAGACAGTTACAGTCATTGCCATG
GGCACAGCTCCTAACTTAGTAACCTCATGTAACCTGGTACT
CAGTGTAGCTGAATTTGAAAGGAGAGTAAGGAAGCAGGTTT
TACAGGTCTACTTTGCCTATTTAGAGCCCGAGTGTTGAATC
CCTGCTGTGCTGCTTTGGAGAAGTTACTTAACTTATGCAAG
GTTTCATTTTGTAAATATTTGGAAATGGAGTGATAATACGTA
CTTCACCAAGAGGATTTAATGAGACCTTATACGATCCTTAG
TTCAGTACCTGACTAGTGCTTTCATAAATGCTTTTTTCTATCC
AATCTGACAATCTCCAGCTTGTAAATTGGGGGCATTTAGAAC
ATTTAATATGATTTATTGGCATGGGTAAAGCTGTCAAT
CTTGCTGTTTTTCTATTTGTTCCTTTTGTTCCTTACT
TTTGGAATTTTTTTTATTCTACTATGTCCTTTTCTATTGTCTT
ATTAACCTATACTCTTTGATTTATTTTAGTTGGTTGTTTTAG
GGTTATACCTCTTTCTAATTTACCAGTTTATAACCAGTTT
ATATACTACTTTGACATATAGCTTAAAGAACTTACTGTTGT
TGTCTTTTTTGCTGTTATGGTCTTAAACGTTTTTTATTTCTAC
AAACATTTATAAACTCCACACTTTATTGTTTTTTTAAATTTTA
CTTATACAGTCAATTTATCTTTTAAAGATATTTTAAATATAA
ACATTTCAAACACCCCAATTTAAAGTCAAGAGATTGTTAAT

10

20

30

40

50

A C C A C A T G A T C T C A C T T A C A C A C A G A A T T G A A A A A C T T G G
A A C T C A T A G A A G C A G A G A G T A A A A A C A T G G T T A C C A G G T G
C T G G G G A G A G G C G G T G G G C T G G G G A G A T G T T G G T C A A A G T
T A G A C A G G A G G A A T A A G T T C A A G A G A T C T A T T G T A C A A C T
T A T T C A G T T A G A T A G G A G G A A T A A G C T A A A G A T C A A G A G A
T C T A T T G T A C A A T G T G A C T A T A A C C A A C A A C A T A T A T T G T
A C A C T T G A A A A T T G C T A A C A G T A T C T T T T A A G T G T T C T C T
C T A C A A A T A A A T A T G T G A G G T A A T G T A T A T A T T A A T T A A C
T G T A G T C A T T T C A C A A T G T A T A C T T A T T T C A A A A C A T C A T
A T T G T A T G C T A T A A A T A T A T A C A A C T T T T A T T T T T C A A T T
T T A G A A A T G T C C T T A A A A A A T C A G A T T T T C A G A T C A G A T A
A A A A A G C A A G A C C C A A C T A T A T G C T G C C A A C A G G A A A C A C
A C C T T A A A A A T A A A G G A C G A A C A A A C A G A T T A A A A G T A A A
A G G A T G G A G A A A A G A T A C A T C A T A T T G G T A A T T A G A A G A A
A A C T G G A G T G A C A A T A T G A A A C A A A A T A G A T T T C A G A G C A
A A G A A T A T T A C C A G G G G T A A A A A T G A T C A T T T T A T A A T G A
T A A A A G A G T C A G T T C A G C A A A A G G A T A T A A C A G T C C T A A A
T G T T T T T T C A C C T C A T A G C T G T G T C A A A A T A G A T G A A G C A
A A A A C T G A T A G A A C T G T A A G A A G T A G A C A A G T C C A C A A T T
A T G T T T G G A G A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T G T C G C C C A G
G C T G G A G T G C A G T G G C A G G A T C T C A G C T C A C T G C A A G C T C
C G C C T C C C A G G T T C A C G C C A T T C T C C T G C T T C A G C C T C C C
C A G T A G C T G G G A C T A C A G G C G G C C A C C A C C A C G C C T G G C T
A A T T T T T T T T G T A T T T T T A G T A G A G A C G G G G T T T C A C C G T G
T T A G C C A G G A T G G T C T C G A T C T C C T G A C C T C G T G A T C T G C
C T G C C T C G G C C T C C C A A A G T G C T G G G A T T A C A G G C A T G A G
C C A C T G C A C G C A G C C T G G A G A T T T T A A T A T C C T T T C A A T G
T T T A G T A G A A C A A G A A T A C A C A A A A T C A G T A A G G A T A T A G
A A G A T T A G A A C A A G A C T A T C A A A C A A T T T G A C T T A A A T G A
C A T T T G T A G A G C A C A G C A G T C C C C A A C A A C A A T A A A T C A C
A C A T T C T T T C C A A G A G T A C A T G A A A C A T G T A C C A A G A T A G
A C C G T A T T T T G A G C C A T G A A A C A A A T C T T G A T A A A T T T A A
A A G G A T T C A A G T C A T A G A A A A T A T G T T C T C T G A C C A C A A T
G G A A T T A A A T T A T T A A C C A A T A A C A A A T A T C T G G G A A A A C
C T C A A A A A C T T G G A C A C C A G C G C T T T T A A A A G A C T A A A T A
A T T T C T A A A T T A T C T G T G T T G G G G G G A A A A G A G A A A T G G A
T T A G A G A G C A A A A A G G G T A T C A G A G T G C T G T G G T A C G A T T
T T T A T G A A G A G T G G A A C A G A A T C T G C C T T T G G C G T T T C C C
C A C T A C A G C C C A T T C T T C A C A T T G A T A A C A G C A T G A T C C T
T C T A A A A T T A A A T C T A A C G A T C A C T T C T G C T T A A T G G C T C
T C C A A C A C T T A C A G A A T T A G G T C C A A A A T T C T A G C A C A G T
T T C T G T T C A T C T T T C T A A C C T T T C T T C C C A C A G G T C T A G C
T A G T A C G T A T T T C T T T T A T T G C A T T T A T T A C A C T A T T C C T
T T G C T T A T C T A T C T C C C C A C C T A G G C T A A A G A A C A A G A T T
C T T G T C T T T T T C A T T T T T G T G T C T C A G T G C C T A G C A T G G T
G C C A G G C A C A C A G C A T G C T T C C A G T A A A T G T T A G C T G G A T
G G A T G T A A T G A G T A T A T T A A A T A T T A A T T T A T T T G T T T T T
C C C C A A A A A G A A T T A T T T C C T G C A A A T C A A G G A A A T T G C T
T T C T T T A T A T A A T C A A A A A C T T A T T T T C C C A G A A G A T T C T
T

10

20

30

40

50

50

A T C T T G T C T A T G C A C C A G C T T A T T C C C A A C T G C C T G G C A C
G T A A T G C A T T T A T T A A A T A T A T A T T G A A T T G A T T A C C C T A
C T T G G G G C T C T T G T T T G C T T C T A C A C T T A C A G T T C T A G C A
T A G C A C T T A A C T C A T T A T C A T G C A T C A T T A T T A T G G G T T T
G T T T T G T C T C C C A T T A G A C T G T G A G C T C C A C A A G G C T G T G
T C C T T G T C T T A T A C A T C A T T G T A T T T C C A G C T T C C A A C A T
A G T G C T T G C C A T G A C A C A G G A A G T C A G T A A G C T C T G A A T G
A A T G A A T A G T A T C T A C A T A C C A T T A A T C T G A G G T T T A A A G
T T T C C C C A A A T T C T G A A G C A A G G G G A T T T A C G G A C T T C C C
T G A C A A T T T T T G G A T G T C A T C C C A A T G A T A C C A C T A A C A T
T T T A A G G G A C A G C T T G C A T A T A T A C A T T T T T C T G G A T G G C
A G T T T T T T T T C C C A C A G G C T T C A T C A G A T A T T T C T C C A T A
G C C T T C C T C A G A T T C T C A A A G G G G T C T C T G A T T C C C C C A A
A A G A T A A G A A A C T G T C A T A A A A A A T T A T T T C T A A A T A T C A
A T T G T T A A A T A A A A T G T T T G C A A A G C A G C C T G A T G A A T C A
T T T C A G G C C A C T T G A C C C C G A T G A G T T A G A G A G T T T G T G C
T C T G C A A T C T G A C T G C T T C C A G C A G T C T C A C T G C T G C T G G
A C T G T G G C A C T T C C A A T T G G C A G C A G G G C A A G T T T C T T C T
G G A T G A A T A T T C T G T C A T A G G G G T C C C C C T T C C A C A C A T A
C C T G T A G G A G C A G T T T G A A A C T C A T A T G C A T G G T C T T C C T
G G T T C T A G G C A C A T G A G T C A T T T A A G C T G C T G G A G C C A G G
A C C A G C T A G T A T G C T A G C C C G G C A T T C A G A A A G T T A A A A T
T T G G G G T C A A A A C T G A G A A C C T T C T T T G A T C C A C C T T G G C
C A G A C A T T T T T C T C T G G C T T C C A T T A A T A G C C T C A A C A T T T
T T T T T T T T T C T G G C C T A G A C C C A C A C A G G C A A G A G A C C A G
A G C T T C T C T A A G G A G C T A A G G G A A A G C A C A T T T T A A A A A T
A A C T T G A G C A A A T G A A T T C A T C T G G C A A A A G C A A C C C C A C
T A C G T A A A A T A A A C C T T T T T A G T T T C G C A A T A G C A G T T C C
T G A A A A T G T A A A C A A C C T C A G G G T C T A C A T G C A C T G A A T C
A T T T G C T G A A C A G A A A G T C C C T G G T C C A A A T T C T G C A A G A
A T A A A C A C C T T A C A A A A C T A G G G G T C A A T G A C C T T C A T A T
G G G A A C A A G G A G G G T G T G G G G G G C A G C A A C C C A C C C T G A G
G A C A A T G A G A A A G T C T T G A G A C T T G A T A T T C A A A A T G C T G
G C T T T C T A A A C C A A A A A C T G G C A T G A G T G G A G G G A G A A G G
G G A G G G T G G G C A C A G T C T A T G C C T C A G G C T C T T G C T C A G A
C C C T A C C A G G C C C C T G C C T T C C C T A G G G A A A G C G A G A G T C
T A C T C A C T G T C A T G A A G C C A G A G G A A G G C C C T G C A G G T T T
C A C T G T G T G T T C T G T T G A C A A G A T G A T G G T T C C A T T G A A A
C T G T A A T A A C A T A C T T G G C C A A C T A A G C C C A T A C G A T C G T
A G T A A C T T T G T A C C C A G T C C T A G C T T T T C A A A C A T A A T G A
T A A T A T G T T C T T T C T A A T G T G G C C C A T A C T G T T C T A A T G A
A C T T A T G C T G A G T T T T T C T G A G T A C T A G A A T A A T A T T C G C
C A T A A A T A A T A G A T A T A A T T A T T C T C A T T T A A T A T T T G C G
T A G C T C T T C T T T A A A G C A G A A A G T A T T T T C T C A T T C C T T A
C T A G A A C C T T T C T G T G T G A G G A G C A C T G A G C T A G A A C C C A
T A T C T T A G A A T G G T C A G A A T T T G G A G A A A T T C A G G G A A A A
G G C A C T G G A C T C A T T T T T A A A G A C T A G A A A A T G C A A C C T C
C A G A A A A A G A T T C A A G A G T T T T T T A C T C C C A G A G A T G T A G
G A A A G A T T G G A G T A A A T C T T A A T A T T A T A T T T C A G G T A A A
C A A A G G A T C A C T G T C A A A A T A G C A G C A T T T A T T G A G T A A T

10

20

30

40

50

GGCTGTGTGCCAGGTACTTTACAGTTTTCACATTTTAACCCCT
CATAATAACCTTGTAAAGTGGATATCCCCCTCAGTACATGA
TGAGAACACTGAAGCTTAGGTTAAATGATTGTCCAAATCG
GACAATCATTTTCAA AATCTCCCCCTTTTCTCCTTTTC
TTATCTGCAAGGCAGATTGCCCTTTTCCCTTTTCAGTGAAAC
TTGTGCATGACCACATGACTCTCTTTGGCCAATGAAACAT
GAACAAGCAGCGTTTATCACTTTTCAGATGGAAGGGCTTTGC
ATGAGCTTTGCTCTCTTTTCACTCTGCCACAGTGGCCACT
AACATTTCCAGATAGTGGCGCTCTGCAAGGCTAGGTCCTATA
GTGGGAGCTATGGGCAGAGCCCCCTTTCCCACCCCCATCA
AGATGTGCATGCTGCATAAGCCATGCATTAAATCTTTGCAG
TTTTTAAGCCACTAAGTTTTTGGAGTTATATTAAATCATTAAT
CATGGTTCTCAAGAGAAACAGAGTGGGGGAGTGGTATTCA
TTATGGGAATTGGCTTACATGATTATGGAAGCTGAGTAGT
CCCCCAGTCTGCTGTTTTTGGAGCTGGAGA AACTAGAGGAGC
CAGTGGTATAAATTCAGCCCCAAGCCTGAAGGGCCTGAGAAAT
GGGATGGGGGAATTGGGAGGGGTGGGTGTGCTAGGGTAGGA
TAAGTCCTGAAGTTCAAAGGCCAGCCAGAAAGGTGGATGTT
TCAGCACCCAGAAAGAGAGAGCA AATTCGCTTTTCTTCTGCC
TTTTTTGTCCTCTCTGGGCCCTCAATGGATTGGATGATGCC
CTCCCACATTTGGTAAGGGGTGGATCTTCTATACTCAGTCTG
CTAATTTCTTCCAGAAACATCTTTCACAGACACATCCAGAA
ATAATGTTTTTACCAGCTATCTCGGTATCCCTTAGCCCTAGT
CCATATTTTAAAAAATTAATGATCACAAAGCAGTTGTTTTGTTT
CCACAGCAAAACCTGGGTGACAGACCAAGTGACCCAGATG
ACTAGAATTTGACCTTCTTTTGTGTTGCCCACACCATACTCT
GAACTAACATGCTGTGCTGCCTTCCAAGTGGAGAATGATG
GCTAAGTATCTTCTACCTAATTTGAGTCAACAGAAAAAAA
A
AAAAAGGTTATTAACTGCAAGTGACAAAGAAATTGTGATTCCC
CAGGGGGCAGATCAAGACTGATAGATAAGAGAAAGTGAGGA
ACATCTGGGGGAATGTCCATTGAAAAATTTACTCAGAAGAGA
AGAAATAATTAAATAATAATATGATATATTGAATTATAAT
AAATAATATTTTTGATGTATTTTCTTCCAGGCATGTTTAAAG
TTATAGACTTTGAGTATATTTTCTCAAAGGGGGTTCTATG
TAAGAGACTATTTCTTAATATAGTTTCTTAGCTTGGAAATTG
CTCTTGCTGGTTTTAAGCTGAGCTTATTTTATTACAGACTT
CACAAACAATAACGTTTTTCTTCACTAGTCAGTACACAAGA
TGGTCTTTCATTTCCAGTTTTGGAATCCCACACTATCAGAGC
CTGAGACAAGGACTAGTATGCAGTTAGTTTGTGTTGGGAGG
TGATTTCCAGGAAGTGGAATGAGAGATCAGTCAGCCTGCA
ACACGAAGGAGGAAAGTCAATATAAGGATGAATTTGGCA
ATTGGCCGTTTTCATGCAACTGGGGCTAAATTTTGTCTTGGC
TCTCTAAGAAATGTAAAGAAATGCCTCCCGTAATTTGCTCAC
CTCAAGTATTTATTATTGCTCTCATGCTCCATTGGTTG
TCCATGAGAACTTTAGCCCTCCCTCGCTGCAGCACAGACA
CTGTGCTTTCTCCTAGGCTGAGCAAGCTCCTGCATCTGTG
GAAACCGTCCCGGGGCAGATAGTGAAATAATGACTGCTGC
GTGCTTGAGATCTGGGAAAGAGGCCACATCATAAAGTGAC
TGAAATCAGAGATGTGTCAAGAGATGTGACACAGGGGCATC

10

20

30

40

50

T G A G G T G T C T A C T G C A C C A G C T A T A A C T C C C T A A A C G C T A
A T C T C A G T T C T T A C A G A G G G G A T G G A T G C A A G G G A A C A G T
C A T G A T T G A G A G C A C C G A A G A A G C T C T G T A T G A A C C T T A G
G C A A G T T T C C T A A T C T C C A A A A T G A A G G T A A T A A T A C C C A
C C A T C C A A G A T C T T C G G G A G G A A T A G A T G A A C T A A T G T A T
G T G A A A A T G T C C A G C A C A G G T C C T A A C C C A T A G T A G G T G C
T C A C C A A A T G T T A G T T C C C T G C C C T C C A C G T T G T G T G T A T
C C G G A G C T G C A C T A G A T G C T G A G G C A A A T G G T C T C A A A T G
T A C T T T A A C A C T T A A T G A C T G A G A T T T T T T C T G A G C T G C C
T A C A G G T T A T T G A C T A T A T T C A T T A T T A A T A A T A A T A T A T
A T G G C C A C T T C A G G C A A C T G G G G C T A A A T T T T G C T T G G C T
C T C T A A G A A A T G T A A A G A A T G C C T C C T G T A A T T G C T C A C C
T C A A G T A T T T A T T C A T T G G C T C T C G T G C T T T A T T G G T T G T
C C C T G A G G A C T T T A G C C C T C T C T C A C T G C A G C A C A G A C A C
T G T G C T T T C T C C T A G T T T C T G T G G C A A G T G A C A G G A G C C C
A C C T C A A A C T A A A G C A A A A G G G A C T T C A T T G G C T C T T G T A
G C T A G G A A T T C C A G G G T T G G C A C T G G C T T T G G G C A C T A C T
G G A T G C A G G A A T T C A A A C A A T G T C T T C A A C T C T T T C T T T T
G G T G T T T C T C T C A G C T G T G C T T C T C T T G T C G T T T C T T T T T
C C C A T T T T A C A G A T A A G T T C A T C C G T A A C T G A G A G A G G T G
A A A A G G G G A T G G C T G C A G A G A A C T C T G G C T T A T A T C A T C C
T T G C T T G C T G A C C T C A A G G T C C A T G T A T A A A T T C T C A G A G
A A G A A G C C C T C T G G T T G G T G A T G C T T G G A A C A T G C C C T G G
A G G G T G G G C C C C T T G A A G T G G A G C T T G C T G G A A C C A C A T G
G G C T G G A G C A A G G C G C T A G G G C C A G A A G A G A G A G G T A G G C
A G G G C T G C T G G C C A G G C A C T C T T C A C C A A G A C A A G G C A A G
A G G A G G G G C A T G A T T G A G G C A G T G A T A C A G A A A G C A G A C A
G T A G A G G T C G T G G C A A G T G T G C C G T T A C T T G C T A C C T G T G
G T T G A T G G G A G A G T C A C A C C A C A T T T A G G A G G A G A G A A T C
C A T T T G C C A C T T C T G A C A A T G C C A C A A G A A T C A C A T A T T T
C A T C C A G A G G T T G A A T T T G G C C C A T G C T G A G C T T T A A A A T
A C A G A G C T G T C T T G G A A C A A T G G C T C A G T A C A T T C A T T T G
G T G T C C A A C A A A G C C T G C C T C T G T T G C C T T C C C T C T C T C T
G T G T G C C C T T C A A G A T C T T C A T T G T G C T T T G G G G A G A G A A
A G A G A A A A T G T C A T A T C A G G G T A G C T C A C C C C A T G T G T C C
T G G A C T C A G G A A A A G A G T A T C T T A T C A C C T T A C T C T T T T G
T T A T T A T A A A A A A T A A A G T T G A A C G T C T T C A A A T A A A A T A
A A G A A G T A T A G A A A A A A T T T T A A A T T A A C C T G T T A T G A T T
C T A C C T A G A G A A C C A T T G T C A A C A T C T T G G T A T A T G T A C T
T C C A G A T A C T T T C C T A T G A A T A T A T A C A T T G T A G A T T T T T
T A A T A T T A A A A G G C T A T C A T G C T G C T T T G T A T A C A G G C T T
T C T T T A C T G A T A T G T A A T A T A A T A C A C A G A C A A A T A T A C A
A A T C C T A A G C C A T C A A C T C A T T G A A T T T T T A T T C A T T G T T
T T T A A T A C C T G C A T T G T G T T C C A T T G T T A G G C T A T G T C A C
A A C A T A T T T A A T T A A G C C C C T A T T G A T G A A T A T T A A T T T A
C T C T A T T T G C C A G T T C A T T C C A G T C C A A C A T T T A T T G A G T
G T C T A C T T A C G G G C C A G G C A C T C T T G T A T T C A T C A A G A T C
A C C A C A T T A T C T G T A T C A G T T A T T T A T T G C C A C A A T A A A A
C T G C A T A A C A A A T C A C T C C A A A A T G T A G C A C C T T A A A A C T
A C A A C T A C T T A T T A T T T C T C A A G A G T C A A T G G G T C A G C T G

10

20

30

40

50

AGCAGTTCTGCCGATAGGGGGTCAAGGTCAACACATTTTCAA
CTAGACTACTTTGTAAAAAAGAATGAGTGTCCTGGGGTAGGGTG
TGTTCTTCTAAAAATAAAAACAAGGAATGAGGAAATTTGCAG
GTAGGATAAGAGGGGGTGGTTTGGCAACCCAAACCCCAACAAA
GGCAGACAAATTTTAAAGGAACATAATGCCAGACTCCTAT
GTCATCATCCAAGTAGATGCAGTGAAGTATAACCTGGGGGC
GTAGTAGGGTAGGAGTGGGGAGAGCAGAGGAGAAGGAAGG
GAGATTGCTTTTTCATCACTTTTGGATTCCCTAATAACAGA
CATGACTGCCAGTATTAATAATTTAACAAAGGATATCTGAT
CATTAATTTTTCCTGTATAAGTCACTGGTGATCTTCAACAT
CTCTCCCTCCCTTTCCTCCCTTTCCTTCCCTCCCAACCTCCT
TCCTTTCCTTCTTTTCCTCTTTTTCCTTTTCAACTTCTTTTCT
CGTTTTCCTTTTTCCTTTTCTTTTCTCTTCTCCCTTTTCTGT
CACTCTGGGCGTATGTAGTAGTGTAATAAAGGTTGACAGAG
AAATCAAATATAACAGGAGCAGGGCCCTGAGAAAAGCACCC
TGGCATCCTGTAGGCAAAACCATTTGTTTCTAAAAAGAGGGA
CTGAGAGATTGAGGAGCTCAGGACATTTGCCAAATGAACAA
GGCAAAGCACATTTATTTCAGTACCACAAACAGGAAAACGG
CCTTTCCAAATAAAGTACCTATAAAACAGCCTTTTTCACAA
GAGTACCGTAATTACTGGCCAAACAGCAACCAATGAAAAACA
ACTCCCAAAACAAAGAAATATTTCTGGATTAAAAAGCCATGA
GATCTGGATTCTAACAAAGCTGTGCTCCTCAAACTACAAGT
ACAAAATCTGGCTCTAAACTAACCAAGCTATGAGCCTCAAA
CTGATGACTGGCATGTTTGGGGTCTCCATCTCCTTCTTTGGG
GGTTGGGGTCTTAGAGACCCTTTTTCACGCGCCTGATTCTC
TTACTAGTGTTGTATGCTTTTCCTTTTGAAGTTCTCATGCTGA
CCGTCTGAGCAGGAGTGAGAAAGCAATTTCAAAGGAAAACA
TCGTTTATCATCTGCTGAAAGAAACCAAAAAGAAACACAGG
AAAAACA AAAAGACAAAGGAAGGGAAATGAAAATGTAAATTCA
TTTTTATTAAAAAGAAAGAAATTTATTCTTCTGGGACACTGGAT
AGAAACCTTAATGAGTTACCTAGCTATCATAAATCCTCTA
ACAGAGAAGAGAAGAGAAGAAAGAAACAAAGACGGAAAGAGGGC
AGGATAAAAGAAAGAAAGAAAGGAAGGGGAAAAATGAAGGAA
GGAAGTTATCTATTTCATTTCTACAGAGACTCTGCTGAGCA
GTAGACAAGAAAGACTTGGGAAAAAATTTAACTGAAACTTTT
CCAAAAATCTTTTTCAGAGG

配列番号 16

配列番号 15 の逆相補体

CCTCTGAAAAGATTTTGTGGAAAAGTTTTCAGTTAAATTTT
CCCAAGTCTTCTTGTCTACTGCTCAGCAGAGTCTCTGTAG
AAATGAATAGATAACTTCCCTTCCCTTCAATTTTCCCTTCCCT
TTTTTCTTTCTTTTATCCTGCCCTCTTCCGTCCTTTGTTTC
TTTCTCTTCTCTTCTCTGTTAGAGGATTTATGATAGCTAG
GTAACCTCATTAAGGTTTCTATCCAGTGTCCTCAGAAAGAAATA
ATTCTTCTTTTAAATAAAATGAATTACATTTTCAATTCCTT
TTCCTTGTCTTTTGTGTTTCTGTTGTTCTTTTGGTTTCT
TTCAGCAGATGATAAACGATGTTTTCCTTTGAAATTGCTT
CTCACTCCTGCTCAGACGGTCAGCATGAGAAAGTCAAAAGG
AAAGCATACACACTAGTAAGAGAATCAGGGCGTGGAAGAAG
GGTCTCTAAGACCCCAACCCCCCAAGAAAGGAGATGGAGACC

10

20

30

40

50

CAAACATGCCAGTCAATCAGTTTGTAGGGCTCATAGCTTTGTTA
GTTTAGAGCCAGATTTTGTACTTTGTAGTTTGTAGGGAGCACAA
GCTTGTAGAAATCCAGATCTCATGGCTTTTAAATCCAGAAA
TATTTCTTTGTTTGGGAGTTGTTTTCATTGTTGCTGTTG
GCCAGTAATTACGGTACTCTTGTGAAAAGGGCTGTTTTATA
GGTCAGTTATTTGGAAAGGGCCGTTTTCCGTTTTGTTTGGTA
CTGAATAAATGTGCTTGCCTTGTTCATTTGGCAATGTCCT
GAGCTCCTCAATCTCTCAGTCCCTTCTTTTAGAAAACAATG
GTTTGCCTACAGGATGCCAGGTGCTTTTCTCAGGGGCCCTG
CTCCTGTTATATTTGATTTCTCTGTCAACCTTTTTTACACT
ACTACATACGCCCCAGAGTGAACAGAAAAAAGGGAGAAAGAGA
AAGAAAGCAAAAGGAACGAGAAAAAGGAAGTTGAAGCAAA
AAGAGGAAAGAAAGGAAGGAAGGGAGGGGTGGGAGGGAAGGAA
GGGAGGAAGGGAGGGAGAGATGTTGAAGATCACCCAGTGAC
TTATACAGGAATAATTAATGATCAGATATCCTTTGTTAAAT
TTTAATACTGGCAGTCAATGTCTGTATTAGGGGAATCCAAA
AGTGATGAAAAGCAATCTCCCTTCTCTTCTCTCTGCTCTC
CCCCTCCTACCCCTACTACGCCCCAGGTTATACTTCACTG
CATCTACTTTGGATGATGACATAGGAGTCTGGCATTATGTT
TCCTTAAAAATTTGTCTGCTTTTGTGGGGTTTTGGTTGCCA
ACCACCCCTCTTATCCTACCTGCAATTTCTCTCATTCCTTG
TTTTTATTTTTTAGAAGAACACACCTACCCAGACACTCATTC
TTTTTTTACAAGTAGTCTAGTTGAATGTGTTGACCTTGAC
CCCTATCGGCAGAACTGCTCAGCTGACCCATTGACTCTTG
AGAAATAATAAGTAGTTGTAGTTTAAAGGTGCTACATTTT
GGAGTGATTTGTTATGCAAGTTTATTTGTGGCAATAAATAA
CTGATACAGATAATGTGGTGATCTTGATGAATACAAGAGT
GCCCTGGCCCGTAAGTAGACACTCAATAAATGTTGGACTGG
AATGAACCTGGCAAAATAGAGTAATAATTAATATTCATCAATAG
GGGCTTAATTAATAATATGTTGTGACATAGCCTAACCAATGGA
ACACAATGCAGGTATTAAAAACAATGAATAAAAAATTCAAT
GAGTTGATGGCTTAGGATTTGTATATTTGTCTGTGTATTA
TATTACATATCAGTAAGAAAGCCCTGTATACAAAGCAGCA
TGATAGCCTTTTAAATATTAAAAAAATCTACAAATGTATATAT
TCATAGGAAAGTATCTGGAAGTACATATACCAAGATGTTG
ACAAATGGTTCTCTAGGTAGAAATCATAAACAGGTTAATTTAA
AATTTTTTTCTATACTTCTTTATTTTTATTTGAAGACGTTCA
ACTTTATTTTTTTATAATAACAAAAGAGTAAGGTGATAAGA
TACTCTTTTCTCTGAGTCCAGGACACATGGGGGTGAGCTACC
CTGATATGACATTTTCTCTTTCTCTCTCCCCAAAGCACAAATG
AAGATCTTGAAGGGCACACAGAGAGAGGGGAAGGCAACAGA
GGCAGGCTTTGTTGGACACCAAAATGAATGTACTGAGCCAT
TGTTCCAAGACAGCTCTGTATTTTAAAGCTCAGCATGGGC
CAAATTCAACCTCTGGATGAAATATGTGATTCCTTGTTGGCA
TTGTCAGAAGTGGCAAAATGGATTCTCTCTCTCTAAATGTG
GTGTGACTCTCCCATCAACACAGGTAGCAAGTAACGGCA
CACTTGCCACGACCTCTACTGTCTGCTTTCTGTATCACTG
CCTCAATCATGCCCCCTCCTCTTGCCTTGTCTTGGTGAAAGA
GTGCCTGGCCAGCAGCCCTGCCTACCTCTCTCTTCTGGCC
CTAGCGCCTTGCTCCAGCCCATGTGGTTCCAGCAAGCTCC

10

20

30

40

50

ACTTCAAGGGGGCCCCACCCCTCCAGGGGCATGTTTCCAAGCATC
ACCAACCAGAGGGGCTTCTTCTCTGAGAAATTTATACATGGA
CCTTGAGGTCAGCAAGCAAGGATGATATAAGCCAGAGTTTC
TCTGCAGCCATCCCCCTTTTCA CCTCTCTCAGTTACGGGATG
AACTTATCTGTAAAATGGGAAAAAGAAACGACAAAGAGAAAG
CACAGCTGAGAGAAACACCAAAAAGAAAGAGTTTGAAGACAT
TGTTTGAATTTCCTGCATCCAGTAGTGCCCAAGCCAGTGCG
CAACCCTGGAATTTCCTAGCTACAAGAGCCCAATGAAGTCCC
TTTTTGCTTTAGTTTGAAGGTGGGGCTCCTGTCACTTGCCACA
GAAACTAGGAGAAAGGCACAGTGTCCTGTGTGCTGCAAGTGAGAG
AGGGCTAAAGTCCCTCAGGGACAACCAATAAAGCACGAGAG
CCAATGAATAAATACTTTGAGGTTGAGCAATTTACAGGAGGGCA
TTCTTTTACATTTCTTAGAGAGCCAAAGCAAAAATTTAGCCCC
AGTTG CCTGAAGTGGCCATATATATTTATTTAATAATGA
ATATAGTCAATAACCTGTAGGCGAGCTCAGAAAAAAATCTCA
GTCATTAAAGTGTTAAAGTACATTTGAGACCATTTTGCCCTCA
GCATCTAGTGCGAGCTCCGGATACACACAACGTGGAGGGGCA
GGGAACATAACATTTGGTGAGCACCTACTATGGGGTTAGGAC
CTGTGCTGGACATTTTTCACATACATTTAGTTTCATCTATTCC
TCCCGAAGATCTTGGATGGTGGGTATTTATTTACCTTCATTTT
TGGAGATTAGGAAACTTTGCCCTAAGGTTTCATACAGAGCTTC
TTCGGTGCTCTCAATCATGACTGTTTCCCTTG CATCCATCC
CCTCTGTAAGA AACTGAGATTAGCGTTTTAGGGAGTTATAGC
TGGTGCAGTAGACACCTCAGATGCCCTGTGTGCACATCTCT
TGACACATCTCTGATTTTCAGTGCACTTATGATGTGGCCTC
TTTCCCAGATCTCAAGCACGCGAGCAGTCATTTATTTCACTA
TCTGCCCCCGGGACGGTTTTCCACAGATGCAGGAGCTTGCTC
AGCCTAGGAGAAAGGCACAGTGTCCTGTGTGCTGCAGCGAGGGA
GGGCTAAAGTTCTCATGGACAACCAATGGAGCATGAGAGC
CAATGAATAAATACTTTGAGGTTGAGCAATTTACGGGGAGGGCAT
TCTTTTACATTTCTTAGAGAGGCCAAAGCAAAAATTTAGCCCCA
GTTGCATGA AACGGCCAATTGCCAAATTCATCCTTATATT
GACTTTTCTCTCCTTCGTGTTGCAGGGCTGACTGATCTCTCA
TTC CCACTTCTCTGGAATCACCTCCCAAACA AACTTA ACTGC
ATACTAGTCCCTTGTCCTCAGGCTCTGTAGTAGTGTTGGGATTCC
AAACTTGGA AATGAAGACCATCTTGTGTACTGACTAGTGAA
GGAAAACGTTATTGTTGTGAAGTCTGTATAATAAATAAGCT
CAGCTTAAACCAGCAAGAGCAATTTCCAAGCTAGGGAAC TAT
ATTAAGAAATAGTCTCTTACATAGAACCCCTTTTGAGAAA
ATATACTCAAAGTCTATAACTTTAAACATGCCCTGGGAAGGAA
ATACATCAA AATATTTATTTATTAATTTCAATATATCATTA
TTATTATATTAAATTATTCTTCTCTTCTGTAGTTAAATTTTCA
ATGGACATTTCCCCAGATGTTTCTCTCACTTCTCTTATCTATC
AGTCTTGATCTGCCCCCTGGGGGAATCACAAATTCCTTGTCAC
TGCAGTTAATAACCTTTTTTTTTTTTTTCTGTGACTCAA
TTAGGTAGAAAGATACTTAGCCATCATTTCTCCACTTGGAAG
GCAGCACAGCATGTTAGTTTCAGAGTATGGTGTTGGGGCAACA
AAAGAAAGGTCAAATTTCTAGTCACTCTGGGTCACTTGGTCTG
TCACCCAGGTTTTTGCTGTGGAAACAACAACCTGCTTGTTGA
TCATTAAATTTTTTAAATATGGACTAGGCTAAGGGATACCGA

10

20

30

40

50

G A T A G C T G G T A A A A C A T T A T T T C T G G A T G T G T C T G T G A A G
A T G T T T C T G G A A G A A A T T A G C A G A C T G A G T A T A G A A G A T C
C A C C C T T A C C A A T G T G G G A G G G C A T C A T C C A A T C C A T T G A
G G G C C C A G A G A G G A C A A A A A G G C A G A A G A A A A G C G A A T T T
G C T C T C T C T T C T G G T G C T G A A A C A T C C A C C T T C T G G C T G G
C C T T T G A A C T T C A G G A C T T A T C C T A C C C T A G C A C A C C C A C
C C T C C C A A T T C C C C C A T C C C A T T T C T C A G G C C T T C A G G C T
T G G G C T G A A T T A T A C C A C T G G C T C C T C T A G T T C T C C A G C T
C A A A A A C A G C A G A C T G G G G G A C T A C T C A G C T T C C A T A A T C
A T G T A A G C C A A T T C C C A T A A T G A A T A C C A C T C C C C C A C T C
T G T T T C T C T T G A G A A C C A T G A T T A A T G A T T A A T A T A A C T C
C A A A A C T T A G T G G C T T A A A A C T G C A A A G A T T A A T G C A T G G
C T T A T G C A G C A T G C A C A T C T T G A T G G G G G T G G G A A A G G G G
G C T C T G C C C A T A G C T C C C A C T A T A G G A C C T A G C C T G C A G A
G C G C C A C T A T C T G G A A T G T T A G T G G C C A C T G T G G C A G A G T
G A A A A G G A G G C A A A G C T C A T G C A A A G C C T T C C A T C T G A A A
G
T G A T A A A C G C T G C T T G T T C A T G T T T C A T T G G C C A A A G A G A
G T C A T G T G G T C A T G C A C A A G T T T C A C T G A A A G G G A A A G G G
C A A T C T G C C T T G C A G A T A A G A A A G G A G A A A A A A A G G G G G A
G A T T T T G A A A A T G A T T G T C C G A T T T G G A C A A T C A T T T A A C
C T A A G C T T C A G T G T T C T C A T C A T G T A C T G A G G G G A T A T C C
A C T T T A C A A G G T T A T T A T G A G G G T T A A A T G T G A A A C T G T A
A A G T A C C T G G C A C A C A G C C A T T A C T C A A T A A A T G C T G C T A
T T T T G A C A G T G A T C C T T T G T T T A C C T G A A A T A T A A T A T T A
A G A T T T A C T C C A A T C T T T C C T A C A T C T C T G G G A G T A A A A A
A C T C T T G A A T C T T T T T C T G G A G G T T G C A T T T T C T A G T C T T
T A A A A A T G A G T C C A G T G C C T T T T C C C T G A A T T T C T C C A A A
T T C T G A C C A T T C T A A G A T A T G G G T T C T A G C T C A G T G C T C C
T C A C A C A G A A A G G T T C T A G T A A G G A A T G A G A A A A T A C T T T
C T G C T T T A A A G A A G A G C T A C G C A A A T A T T A A A T G A G A A T A
A T T A T A T C T A T T A T T T A T G G C G A A T A T T A T T C T A G T A C T C
A G A A A A A C T C A G C A T A A G T T C A T T A G A A C A G T A T G G G C C A
C A T T A G A A A G A A C A T A T T A T C A T T A T G T T T G A A A A G C T A G
G A C T G G G T A C A A A G T T A C T A C G A T C G T A T G G G C T T A G T T G
G C C A A G T A T G T T A T T A C A G T T T C A A T G G A A C C A T C A T C T T
G T C A A C A G A A C A C A C A G T G A A A C C T G C A G G G C C T T C C T C T
G G C T T C A T G A C A G T G A G T A G A C T C T C G C T T T C C C T A G G G A
A G G C A G G G G C C T G G T A G G G T C T G A G C A A G A G C C T G A G G C A
T A G A C T G T G C C C A C C C T C C C C T T C T C C C T C C A C T C A T G C C
A G T T T T T G G T T T A G A A A G C C A G C A T T T T G A A T A T C A A G T C
T C A A G A C T T T C T C A T T G T C C T C A G G G T G G G T T G C T G C C C C
C C A C A C C C T C C T T G T T C C C A T A T G A A G G T C A T T G A C C C C T
A G T T T T G T A A G G T G T T T A T T C T T G C A G A A T T T G G A C C A G G
G A C T T T C T G T T C A G C A A A T G A T T C A G T G C A T G T A G A C C C T
G A G G T T G T T T A C A T T T T C A G G A A C T G C T A T T G C G A A A C T A
A A A A G G T T T A T T T T A C G T A G T G G G G T T G C T T T T G C C A G A T
G A A T T C A T T T G C T C A A G T T A T T T T T A A A A T G T G C T T T C C C
T T A G C T C C T T A G A G A A G C T C T G G T C T C T T G C C T G T G T G G G
T C T A G G C C A G A A A A A A A A A A A A T G T T G A G G C T A T T A A T G G

10

20

30

40

50

AAGCCAGAGAAAAATGTCTGGCCCAAGGTGGATCAAAGAAGG
TTCTCAGTTTTTGACCCCAAAATTTTAACCTTTCTGAATGCCG
GGCTAGCATACTAGCTGGTCCTGGCTCCAGCAGCTTTAAAT
GACTCATGTGCCCTAGAACCAGGAAGACCATGCATATGAGT
TTCAAACCTGCTCCTACAGGTATGTGTGGAAAGGGGGACCCC
TATGACAGAATAATTCATCCAGAAGAAACTTTGCCCTGCTGC
CAATTGGAAGTGCCACAGTCCAGCAGCAGTGAGACTGCTG
GAAGCAGTCAGATTGCGAGAGCACAAACTCTCTAACTCATC
GGGGTCAAAGTGGCCTGAAATGATTCATCAGGGCTGCTTTG
AAACATTTTTATTTAAACAATTGATATTTTAGAAATAATTTTT
TATGACAGTTTTCTTTATCTTTTGGGGGAATCAGAGACCCCT
TTGAGAATCTGAGGAAGGCTATGGAGAAATATCTGATGAA
GCCTGTGGGAAAAAAACTGCCATCCAGAAAAAATGTATAT
ATGCAAGCTGTCCCTTAAAAATGTTAGTGGTATCATTTGGGA
TGACATCCAAAAAATTGTCAGGGGAAGTCCGTAAATCCCTTT
GCTTCAGAAATTTGGGGAAACTTTAAACCTCAGATTAAATGG
TATGTAGATACTATTTCATTCATTCAGAGCTTTACTGACTTC
CTGTGTTCATGGCAAGCACTATGTTGGGAAGCTGGAAATACA
ATGATGTATAAGACAAGGACACAGCCTTGTGGAGCTCACA
GTCTAATGGGAGACAAAAACAACCCATAATAATGATGCAT
GATAATGAGTTAAGTGCTATGCTAGAACTGTAAAGTGTA
AGCAAAACAAGAGCCCCAAGTAGGGTAATCAATTCAATATA
TATTTAATAAATGCATTTACGTGCCAGGCAGTTGGGGAATAA
GCTGGTGCATAGACAAGATCCCTATCCCATGGAGCCTTAA
GTCTGGAATACTCTCAACTAAAAAGTTAGAGGAGGGGGCTG
GAAGAACATGATGCCCACCTAAGGTGAATCCTAAGTAAG
TTCACCCAGGTGAAGTGGGTAAAGCGTATTGCGAGGTAGTGG
GAGCAACACGCACACAGGCCCAGTAACAGCAAGGTGAGTC
AGGGGAAACTACAAATAGTTTCATCAGGGCTCTCCATGAAG
GCAGGAGCAGTGAGAGACAAGGGGTGGAGAGGTGTGCTGGG
GGCAGATCCCCAAGGCTCCTGTGCTTTCACCATGGATTGTG
GGTTGAAGGTTGTCAATGAGGGCTTTTTTTTTTTTGGAGCG
GAGTCTCACTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCGAGTGGCGCA
ATCTCGGCTCACTGCAAGCTCTGCTCCCGGGTTTACGCC
ATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGCGACTACAGG
CACCCGCCACCAACGCCCTGGCTAATTTCTTTGTATTTTTTAGT
ACAGATGGGGTTTTCACTGTGTTAGTCAACGATGGTCTCAAT
CTCTTGACCTCGTGATCCACCTGCTCGGCCCTCCCAAGT
GCTGGGATTACAGGCATGAGCCACCAACGTCCTCGGCCCTCAAT
GAGGGCTTTTTTAAGGCAAGTCAGGAGTTTCTCTATTAGAAA
GATCACTCTACCATAAATGGAGAAAAATTTGGGCAAGGGGA
GGGGATGGCTAGTGGGTGAAATCATGGAGACTAGAAAGGAA
GGAAGCTGTTGAATTAATCTAGACAAGAAATGATAAGGTC
CTAATAGTGGCAGTGGAGATGGAGTAAGGTGGACGATGGG
AAAAATGGGATGAGGCCCTCTGGAGAGCAGCTCACAGGCAAT
TTTTTTTTTTCATTCCTACAAATGACATTTGCTACGGCAAC
ACACTCTGCCACATGCAATGAGGTAGTGACTGGCTCAAGC
TAAGGAAATAATCTTGTACTGACGTGGTATCACCGGGAA
TCATGGCTGTATAACTGTAGTTTTCATAAATTTTGGGA
ACTCTACATTTAATTGCTTAATGGTGATGATGATTATGAC

10

20

30

40

50

A G G A A T A A T A C T G A T A A T A G C T G C A A C C C A A T T T T A T T G G
A C A C T T A T T C T G T G C T A G T T A C T G T T C C A A G C A T T C T G A A
T T T A C T A A C C C A C T T A A T C T T C A A G T G A C T C T A T C G G G T A
G G T T C T A T T C T T A C T C T T A A A G A A T A G A T G A G G A C A C T G A
G G C A G C A C A G A C A G G T T T A A T A C C T T G T C T A A G G T C A C A C
A G C T A G G A A G T G A G A A A A T A A G G A T C T G A G C C T T G G A A A T
C T G G T T C T A G G A C G C A A A C T T C C A A A A A T T C T C C T A T C A A
T T T A C A A T G A C A A A C A T A A A T T A T G G T C T T T C T C C A T A A A
A C T C A A T T T G A G C A C T A A A A C T G A C T T T T T A C C A T T T T G T T
A T G A A C A T T C T G A A C A A T C A C A A T A A A A A G T A G T G C G G A G
A C A C T A T T C A A G T C T C T A A A A A C A T C T T A G G A G T G G T A C A
T G A A G C A A A A T G C T G G G T G T G A G T G T T T T T G C A G A T T C A G
G C T C C A A A G A A C A A A A A A G C A G A A A A A C A A A C A A T G G T G
T T T T T A A A C A A T G A A T G T T G T T T T C C T T T A G C C A T A A G G G
A A T T T T A A A A C T T G A C A A A C T C A T T C A G C T T T C A A A G C A T
T C C A C A T T C C C C A C C C A C A A G C A A A T G C C A G A A G G T G C C A
G T T T G A G C C A A C T C A G C T C A G G A A T G A C T T T C T A A A T A C T
G G A T C A G A T T T C T T G A A T G T C C G C G C T C C A C A G A T G G A T A
C T T A C T A T T G T C C T A A T T G G T C T G A T G A A A A G T A C T T A G C
A A T T T A T C A A G C A A T T A A T T T A A C A A A A A C A T T T C A G C A A
G A G A T G A G A T G G T G T G G C A C A A A T G C A G A A A C A G A A A T T T
G A A A A G A T T C A A A T G T A T T A C T T C A A A A A G A T T G A A A A A T
T G C T G C C T A A A A T C T T T G A A A C T T T A G A G C T A G G T T G T G C
A T A G G C T T A A T T T T T A A T G A A G A A T C T T C T G G G A A A A T A A
G T T T T T G A T T A T A T A A A G A A A G C A A T T T C C T T G A T T T G C A
G G A A A T A A T T C T T T T T G G G G A A A A A C A A A T A A A T T A A T A T
T T A A T A T A C T C A T T A C A T C C A T C C A G C T A A C A T T T A C T G G
A A G C A T G C T G T G T G C C T G G C A C C A T G C T A G G C A C T G A G A C
A C A A A A A T G A A A A A G A C A A G A A T C T T G T T C T T T A G C C T A G
G T G G G G A G A T A G A T A A G C A A A G G A A T A G T G T A A T A A A T G C
A A T A A A A G A A A T A C G T A C T A G C T A G A C C T G T G G G A A G A A A
G G T T A G A A A G A T G A A C A G A A A C T G T G C T A G A A T T T T G G A C
C T A A T T C T G T A A G T G T T G G A G A G C C A T T A A G C A G A A G T G A
T C G T T A G A T T T A A T T T T A G A A G G A T C A T G C T G T T A T C A A T
G T G A A G A A T G G G C T G T A G T G G G G A A A C G C C A A A G G C A G A T
T C T G T T C C A C T C T T C A T A A A A A T C G T A C C A C A G C A C T C T G
A T A C C C T T T T T G C T C T C T A A T C C A T T T C T C T T T T C C C C C C
A A C A C A G A T A A T T T A G A A A T T A T T T A G T C T T T T A A A A G C G
C T G G T G T C C A A G T T T T T G A G G T T T T C C C A G A T A T T T G T T A
T T G G T T A A T A A T T T A A T T C C A T T G T G G T C A G A G A A C A T A T
T T T C T A T G A C T T G A A T C C T T T T A A A T T T A T C A A G A T T T G T
T T C A T G G C T C A A A A T A C G G T C T A T C T T G G T A C A T G T T T C A
T G T A C T C T T G G A A A G A A T G T G T G A T T T A T T G T T G T T G G G G
A C T G C T G T G C T C T A C A A A T G T C A T T T A A G T C A A A T T G T T T
G A T A G T C T T G T T C T A A T C T T C T A T A T C C T T A C T G A T T T T G
T
G T A T T C T T G T T C T A C T A A A C A T T G A A A G G A T A T T A A A A T C
T C C A G G C T G C G T G C A G T G G C T C A T G C C T G T A A T C C C A G C A
C T T T G G G A G G C C G A G G C A G G C A G A T C A C G A G G T C A G G A G A
T C G A G A C C A T C C T G G C T A A C A C G G T G A A A C C C C G T C T C T A

10

20

30

40

50

CTAAAAATACAAAAAAATTTAGCCAGGCCGTGGTGGTGGCCG
CCTGTAGTCCCAGCTACTGGGGAGGCCCTGAAGCAGGAGGAAT
GGCGTGAACCTGGGAGGCGGAGCTTGCAGTGAGCTGAGAT
CCTGCCACTGCACTCCAGCCCTGGGGCGACAAAAA
AAAAAAATCTCCAAACATAATTGTGGACTTTGTCTACTTTC
TTACAGTTTCTATCAGTTTTTTGCTTTCATCTATTTTGTACACA
GCTATGAGGTGA AAAAACATTTAGGACTGTTATATCCTTT
TGCTGAACCTGACTCTTTTATCATTTATAAAATGATCATTTT
TACCCCTGGTAATATTCTTTGCTCTGAAATCTATTTTGT
TCATATTTGTCACTCCAGTTTTTCTTCTAATTACCAATATGA
TGTATCTTTTCTCCATCCTTTTACTTTTAAATCTGTTTGT
CGTCCTTTATTTTTTAAGGTGTGTTTCTCTGTTGGCAGCATA
TAGTTGGGTCTTGCTTTTTTTATCTGATCTGAAAATCTGAT
TTTTTAAAGGACATTTCTAAAAATTTGAAAAATAAAGTTGT
TATATTTATAGCATACAATATGATGTTTTTGAAATAAGTAT
ACATTTGTGA AATGACTACAGTTAATTAAATATATACATTAC
CTCACATATTTTATTTGTAGAGAGAAACACTTAAAGATACT
GTTAGCAATTTTCAAGTGTACAATATATGTTGTTGGTTAT
AGTCACATTTGTACAATAGATCTCTTGTCTTTAGCTTATT
CCTCCTATCTAACTGAATAAGTTGTACAATAGATCTCTTG
AACTTATTCCTCCTGTCTAACTTTGACCAACATCTCCCCA
GCCCACCGCCTCTCCCCAGCACCTGGTAACCATGTTTTTA
CTCTCTGCTTCTATGAGTTCCAAGTTTTTCAATTCTGTGT
GTAAGTGAGATCATGTGGTATTTAAACAATCTCTGACTTTTA
ATTGGGGTGTTTTTTGAATGTTTTATATTTTAAATATCTTTTAA
AGATAAATTGACTGTATAAGTAAAAATTTAAAAAACAAATAAG
TGTGGAGTTTTATAATGTTTTGTAGAAATAAAAAACGTTAAGA
CCATAACAGCAAAAAAGACAACAACAGTAAGTTTTCTTAAGC
TATATGTCAAGTAGTATATAAACTGGTTATAAACTGGTAA
ATTAGAAAGAGGTATAACCCTAAACAACCACTAAAAATAA
ATCAAAGAGTATAGTTAATAAGACAATAGAAAAGACATAG
TAGAATAAAAAAAATCCAAAAGTAAGGAGAAAAACAAAAAGA
ACAAATAGAAAACAGCAAGATGACAGCTTTAACTTACCAT
GCCAATAATCATATTTAAATGTTCTAAATGCCCCCAATTACA
AGCTGGAGATTGTTCAGATTGGATGAAAAAGCATTTTATGAA
GCACTAGTCAAGGTACTGAACCTAAGGATCGTATAAGGTCTC
ATTAAATCCTCTGGTGAAGTACGTATTATCACTCCATTTTC
CAATATTTACAAAAATGAACCTTGCATAGGTTAAGTAACCTT
CTCCAAGCAGCACAGCAGGGATTACACACTCGGGCTCTGAA
TAGTGCAAGTAGACCTGTAAAACCTGCTTCTCTTACTCTCC
TTTCAATTCAGCTACACTGAGTACCAGTTACATGGAGTTA
CTAAGTTAGGAGCTGTGCCCATGGCAATGACTGTAACTGT
CTGGGATGA AATCCACCTTTACCAGCTGTGTGACCTTGGG
CGGTGTATTACACATCTTTTAAAGCTTTAGTTTTCTCATTTG
TAAAAATGGAAGTAATAAAACTAGTCCCATAGTGTTACTGT
GTGTTAAATGGAGGTGGTTGACTGTTTTTTGTTACTTTAAG
CTATACCCTGCAGATCATAGGAGAAATATCAATTTGTGCA
ATTCTACATCAAAATCAAAATAGTATTTATATAAGAGTGAT
CTGTTTTAAACTGTAGCATTTATAGAAATATACTATAGAAGG
AACTATTTTTATATTTACTTTATAGTATTTATATGAAGTTTT

10

20

30

40

50

GGTTTCTTCTTTTGAGAAATCATAGTAATGTGATCAGTTAGT
CTTCTTTTAAAGAAACCTCTCATCCCAACTATTCTATTTT
CAAAAAAAACTTTTTCTTGGAGTGAAAATGTCAAACCTA
TTCCTAGCTTTGCGAGATGAAAGTGTTTCAGATTCCCTTGGAT
TTTTACTTTGGATACATGTATTAGATACCTGGGATGAATA
ACTTCAGTTTLAGGTTATATTAAATATTATAATAATAAGAAT
GTTTAAAAACAATTTATCTAAATAGTATTTTACATTTTGA
ATATTAAATATATAATTTTGAAAAATCAAAATGAAATCCAGA
GAGTTAAGCAGAAAGTTTTTTTAAACATAAGATTATATTAT
AAAGCTTCTTTAAATATTTTTTTCTTTGAAAAGACAAAATT
AATTTTAAAAAAAGTTTLAGATCCAGCATGACTGTCAGCTG
AACAGAAAGCTGATCAGTCTTCAAATATCATAGTATTTTTT
TCTGAATGAACAACCTGAAAGAGGCAAAAATTTCAAATATAT
TTTATTTCAAAATTTCTCCATTTAGGAGAAAAGATATATAAC
AATGTTTACACATGCTTTAATAAATTTATTTTCACTGTACAA
CTTACATTTCTGTATAACAGTACAATAAACCAGCCAAAGAA
AATAACCAGTTAGCAGTTAATAATAAGAAATCTACCATGTAAA
AAACACAGTATGGGACACTACAAGGTAGTATTTATATATT
TTTTAAATGACTGAGCTACAGTACAACAGTCACTAGTTTC
AGTGGTTGTCTAAAACATCAAGCTGTCCACATCTTTCTGA
TTCATGATGGGAAAGCTATTATGACCTTTTACATTTCGAAC
ATGTCATTTTGTGTGTAAATTTGGTGGGTGGGGGGCAGA
AGGGCTCTATTACCTTTATCCCTTTCTTATAAATATATTT
TCCCTTTTATATTACTTTCCAGAAATTTTAAATAAATAATT
ATTTGTGTTTGTGTAACTACAATGTCAACATTTGTGTTAGA
ATTATATTAAATCAGTTATTTTATAGCCAGCAAAATGGTCC
AAACGCATTAAAGAAAACAAGATAAATTTAGCTCTGCCAA
AGTAGCACCTAGGAAAACAGCACTTCAGTAAAATTTCTCC
TGCTATTTCTTTATAGCCTATTGCGAGGCAAAACAGCAACAC
TTCAAAAACATAGGCGAGAAATGCAAGAAAGGAAGTACTCAA
GGAACCTATTTTCTGTTTCTGAAAAAAAGATCTTATTAGTT
AGTATATTCTCTAAGGCATTTTATAATCTCAGAGTTGCAA
TGATTGCCAAAGCAGGTACATGGTAAGACTTAGCAAGAAAG
AAAAACAAGATGAAAATGACTGACCAGTGAAATCTGAACCTT
GTTCCAAGTAATTAGATTTTCTAAGGAGAAAAAAGGCGACA
GGAGGTGCACATTTCAATTTGGCTCAAAAAATAATGAAAAT
TAATTTAAAAAGTTGGCAACAATTTACTAAAAACATAAATA
CAATTTCTTTTACAGAGCTCAACTACATAGAAATATCAAC
AATAGCAAGAACAAATAAATAAACAACACCCTAACTGT
GGTTCACCAGGAACAAGGACTATAGAGAACTATTAGACAT
TTCTACAGACTGAATCCAGGGACTAAATCCACAAAGTAG
GATCTAATAATCAATTTCCAATTAAACATCTGCTTGATCAA
TTTTCTTTCTAAAGCTCATCCTATGTTCAGGCTCACTTTTC
TTTCTGTGGAAATTGAAATCATTTTAAAGGCTCTAGTTTTTC
GTTGATTGCGAGAAAGTATTACAGTAATTCTACACACCAAAG
AATGCCAAAAGATAGAAAGTCAACTATCTGTAAAAGCCAA
CTCAGATTTTCACTTTGACACATGTAAACCATGAATCATGT
ATTTCAAAAAAACAGTAGTTGTGGTCAAGTTTACATCCTA
TTATTATATCTTTTAAAGATAGCAATAATATTTATTATAT
TGTAACAATAGGTCTGTATCCCAAAAGCATAAATCTAGGA

10

20

30

40

50

AAAGAGACACCCAATGTAAATGATGCACCTGACATCCCCCTC
ACAGGCTCTTGTGAGAACTGTAGTGTAACCTTACTTAACCTG
CAATTGCTGAGAGCAGAATTCTGGAGTATGATCCAGGGGA
ACGTTTCCCCACACCACTGAGCTACTTTACCAGCGATCAT
GATTGTGATGGAATAGGCTTATTAAGTTACACATTTAAAA
AGTCATTAGAACATCTCGTTCTTGCACACTAGTGTAGAAA
GGTCTTCCAAGATAAAAGAGTGTAGGCTTGGTTTAAATTT
TCTCAGCCAGAGCCATTATTATGTTAAGATCGCCCTCTGC
TGTTAAATCAAGGTCTATCTTCAGGTTCCGAAGAGATTTA
AAGGGCTTTTTTTCCTTCTGCTTAAAAATAATGGAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACGCAAAAAATTATGATA
TAGAAAAATGTACAAAGGAACAACAAAAACAAATAATGTA
CAAAGGTTTTTCTTCCGTGTAGGAGTTTTTACTCACGTATC
GTCTTCTATATATTTTATTAGTGTCAGGCTTTTTCTGTGA
AGGACAAGTAGAAACTGTGCAAGGAAGTACTTCTGAGAG
ATAAGCCAGGTTTTCAGCTGAAAGACCTGCAGGGAGAGGAA
CCATTTCAACACATAATTTGCTCACATTTCTACTCGTACAG
AAGTTTCTATGACAGTGTTGACAGTGCTTGGCAGACAATA
CACACTAAACATCTCCTTAACCATTTTCCACTGATGCCCCC
TAACAGGAGTGTTGGTATAGAAAGCACTAGGTGTAGGAACAA
TCTGATATTTTTTTTTTTTTTTTGTAGACGGAGTCTAGCTCT
GTCACCAGGCTAAAGTGCAAGTGCGCGATCTTGACTCACT
GCAACCTACACCTCCTGGGTTCAGCGATTCTCCTGCCCTC
AGCCTCCCAGGTAGCTGGGATTACAGGCACACGCTGCCAC
G
CCCAGCTAATTTTTTGTATACTTTAGTAGAGACGGGGTTTCA
CCATGTTGGCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTTGTGAT
CCACCCACCTCGGACTCCCAAAGTGCTGGGGATTACAGGCA
TAAGCCACCAAGGCCCAAGACAATCTGACAGTTTTTTAGAAAGT
TTTCTAATTTATCTTTAAAAAATGCATTTCAAATTTTTTGCA
CTACTTTCAGAAATACATCCATGTTTACTTCACTTTTAAAAAC
TCATACATAAGTTATTTTCGTATTACTTTAATTTTTTTCTGCC
CAAATCTTCAAATAACATTTGAAGCTCCTAGAAAGATGAGCC
TATGGTTTTTGTAGACATTCATATACCTGTACTTTTGCAGGG
GGTGGAGTGGGTGGGTAGGAGTAGAAATGTGTGCATATGAT
GAGGTGGAGAGTGGGAGGGGATTTTATGTGAGCTTGAGAAAG
CATGAAATTCCAGGCCCTACGAATTTTCTTGAACCTTCGCA
ATATGTCACAGACCTCATAGATCTCAATCCAAAAATTTCTA
GTAAACATAAGGATCTCATTTATTTCAAAGCTTTATCTATG
ACACAGTTTTCTTGGCCTGATCCCCAGAAATGTTATTATAAC
AAACTGTAAATATATTTAAGAAATAAGTTCCATATAATCTAC
GATTTCTTCAACTGTGTAATTAAGTAGATATTTTTTTTAA
AGAAATGAAACAATAAAGATGTTATTTAAATAAGTACACTA
TGTTTTCAAAAAATATTTTTTGTAGTCAATTTAGGCAAAATAAC
AACCTCCCTTTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTTACTTGTT
ATAGGTTAATGCTTGAATTAATAATGTTTGTGTTTGTGACGT
ATGGAATGCTGCACTCTTAATTTGTTAATAATACAGGCTCTT
CCCCATTAATAAGTCAAAAGGAATAATCATTTAGACACTT
TAGAAAGACCAGACACTACAAAAAGCACCTAATAAAACAG
ATTAGGACTCAATTCTTAATTCTATCATTTTATAAATGTT

10

20

30

40

50

AAAATATATATAAAAAAATATATTACACTCTATCATAGAGT
ATATGTTATATATTTTACATATCATATATAACATATACTC
TACATAACATAAATAGGGTTTTTAAGTTTTATAACTTTTTTTT
AATATATAAACATATATATATATCCTACAATGCTGGTAATAT
GTATATATGCTCGTACTATATATATATATACACACACAAACA
TATATATATACTTTGTACTACATATATAGTACAAGCATTTGC
AGGATATATATATGTATATATTTATATCTGTAAAAGCTAAG
TCAGATTTTCACTTTTGATACATGTAAACCAGGAATTCTATG
TTTCAAAAAAACAGTAGTTGTGGTCAACTTTATATCTTATT
ATTATATCTTTTAAAAAGATAGCAATAATATTTTATTATATTG
TAAACAAAGGTCTGAATTCCCGAAGCATAAATCTAGGACA
AGAGGCAACCAATGTAAATGATGCACCTTGACATGCCCTCAC
AGACTCTTCTGAGAACTGTAGTGTAACTAACTTAACTGCA
ATTGCTGAGCAGAACTCTGGGGGCATGATCCAGGGGGAATAT
AAATATATAGAACAGGCATTTGTAGGATATATTTAAAAAAGA
AAACATGTGCATATCATTTCACTCTGACAATCTCAAGTTTCAA
CATTTACCTGATCCAGGAAGGCCTTTCACTAGAGTGTCCTCT
GTGTAAGACATCTTGAAAAATATTTCTGAAAGAAAAGAA
AAATGAAGAAAAGAAAAGAAAGTTCAAATGTTGAAATGGCCA
TATAATGCTACCTTCCACAATCCCTCACTTGAGCCAACAT
TTTAAGTTCTTATAAATTGATATTACATATAAACACATTT
GTAAGAATATAGATATATATATTTTGGAGACACAAAATATA
CATTCATTTATTTACTCAAGGATATATTTTACATTTTACTG
GTGTTTGTGTCAGGCTAATATGTAAATTTTTTTCTCTAAAGAA
ATAAGCAGTCCCCAGTAAGGGGTATGTATGTATCTATCAAT
CTATTTTACTACTCTCATCTTTTAAAAAAAGTAGAGACCC
TTAGGCAATTATAATAAATAAAACTACCAATTCTTGCCATCT
CAAAAAAAACAAAAAAACAAACCAGCAACAAAAAATAAGCC
ACTACCATCAAAAAACCAAAACCAAAACCAAAAAAATGTGAAGA
AAAAATTTGAGTGAGATTAGAGAACACACTCCGATGATTAT
CCACTGGGTTTTGCCTCAACAAGCCCACTCTGTAAAGTAA
CATGAACCAACTATCCAAGAAAGTACTACCTACCTTTGGCA
ACGACCAGAGTGAGTAGTAGTAATATAATGGCCACTTAAA
ATAATGTGTGCTAACACAGCACCTAGGATATAGCAGGTG
CTAAAGCAAACACACAAACAAACAGGACTACTTATTCCCT
TCCCAGGCCCCACCTCCCTTTTCATCTTTTTTCTCTTCCATT
TTCCCTAGGTTCTACTCAGGCCAGAGGGGTAAGAGAACATT
TAGTAAGAGGAGGAGTTTTTAACTGAAAGTGGTAGGGATC
ATCCTATACCTGACCAGAGTGGCAAAAAAAGAGAAATGGGT
ATGTGTAGAAGCAAACAGGAAGGTAGTTTCAAGTTTCTCTTA
TCTTAAGAAACGAGTGTACCACACTACAGAAGAAAGAAAC
CGTAAAGGGGAAAAAATATTAGCATTTTCGTCAATTATTGACT
GGGCACTGATAGTGCCTCTTCTTGGGCTCTGGAAAGAGAA
TAAGGCTTATATTTAATCGAGTGGACTTATTATACCTGTT
CCACTGAATGAGTATCTTTCATCATAAAGTGAATTAGATAAA
GCAAGGTGTTAAAAAAGAACATTTCCATTTGTTTGTGTCA
TCTCTGATTTCTTTCAGCAGTGTTTTGTAAATTCTCATAGA
GATCTTTTCACTCTCCCTGGTTAGCTGGATTCTCTAGGTATTT
TATTCGTTTTTGCGGCTATTGTGAATGGGACTGTGTTCTTG
ATTTTGCTCTCACTTTTGGAAAGGTGTTGGAGTATAGAGAA

10

20

30

40

50

G C C A A A A C T T T G C T G A A A T T T T T A A C A G A T T T A G G A G T T T
C T G G G C A G A G A C T A T G A G A T T T T C T A G G T A C A G A A T T A T A
C T G C C T G C A A A C A G A A A T A G T T T G A C T T C T T C T C T T C C T A
T C T G A A T G T C T T T C T T T C T T T C T C T T T C C T G A T T G C T C T G
G C T A G G A C T T C C A G A A C T A T G C T G A A A A G G A G T G G T G A G A
G T G G A C A T C C T T G T C T T G T T A C G G T T C T C A A G G A G A A T A C
T T C C A G C T T T T G C C C A T T T G G T A A G A T A T T G G C T A T G G G T
C T G T C A T A G A T G G T T C T T A T T T T T T T G A G G C A T G T T C C T T
C A A T G C C T A G T T T G T T T A G G A T T G T T T G T G A T T T T T C T T T
T T T G A G A C A G G G T C T C A C T C C G T T G C C C A G G C T G G A G T G C
G G T G G C A T G A T C T C A G C T C G C T G C C A A C C T C T G C C T C C C G
G G C T C A A A C A A T C C T C C C A C C T C A A C C T C C T G A A T A G C T G
G G A C T A T A G G T G C A T G T C A C C A T A C C A A G C T A A T T T T T T T
T T T T T T T T T T T T T T G T A G A G A T G G G G T T T C A C C A T G C T G C
C T A G G C T C G T C T T G A A C T C C T G G G C T T A A G A G A T A T G C C C
G C C T T G G C C T C C C A A A G T G C T G G G A T T A C A G G T G T G A G T C
A C T A C A C C T G A C C T A C T G A A G G T T T T T A A C A T G G A G G A T G
T T A A A T T T T A T T G A C A A C C T T T T C T C T A C C T A T T G A G A T A
A T C T T G T G G T T T T T G T T T T A G C T C T G T T T A T G T G A T G A A
T C A C A C T T A T T G A T T T G T G T A T G T T G A A C C A A C C T T G C A T
C C C A G G G A T A A A G C C T A C T T G A T C A A A G T A G A T C A G C T T T
T T G A T G T G C T G C T G G A T T T G G T T T G C T A G T A T T T T G T T G A
G G A T T T T T G C A T C T A T A T T C A T C A A G G A T A T T G G C C T G A A
G T T T T C T T T T T T C T G T T G T G T C T C T G C C A G G T T T T G G T A T
C A G A A T G A T G C T G G C C T C A T T A G G G A A G A G T T C C T C C T C C
T C A A T T T T T T G G A A C A G A T T G A G T A G G A A T A A T A C C A G C T
T T T C T T T A T A C A T C A G G T A T A A A G A G A T G A C A C A A A C A C A
T G G A A A A A C A T T C C A T A T T C A T A G A T A G G A A G A A T T A A T A
T T G T T A A A A T G G C C A T A C T G C C C A A A G C A A T C T A C A G A T T
C A A T G C T A T T C C T A T A A A C T A C C A A T G A T A T C C T T C A C A A
A A C C A G A A A A A A C T G T T T T A A A A T T A A T A T G G A C C C A A A A
A G G A G C C C A A A T A G C C A A A G C A A T C C T A A G C A A A A A G A A C
A A A G C T G G A G G C A T C A C A T T A G C C G A T T T T A T A C T A A A A G
G C T A T A G G A A C C T G A A C A G C A G G G T A C T G T T A T A A A A A C A
G A C A C A T A G A C C A A T G G A G A A T A G A G A G C C A A G A A A T A A A
G C C A C A C A C T T A C A A C C A T C T G A T C T T C A A C A A A G T T G A C
A A A A A C A A G C A A T G G G G A A A G G A C T C C G T A T T C A A T A A A
T G G T G C T G G G A T A A T T G C T A G C C A T A G G A A T T G G A G T G A A
A C T G G A C C C C T T C C T T G T G C C A T A T A C A A A A A T C A A C T C A
A G A T G G A T T A A A G A C A T A A A C G T A A A A T C T A A A A T T G T A A
A A A C C C T G G A A G A C A A C C T A G G A A A T A C C A T T C T G G A C A T
A G G C C C T G G C A C A G A T T T T A T G A T G A A G A C G C C A A A A G C A
A C T G C A A C A A A A A C A A A C A C A A A T G G G A C C T A A C G A G C T C
C T G C A T G G C A A A A G A A A C T A T C A A C A G A G T A A A A G A C A A C
C T A C A C A A T G G G A G A A A A A T A T C T G C A A A C C A T G T A T C C A
A C A A A G G G A T A T G C A G A A T C T G G A A G G A A C T T A A A A C T A A
T T A A C A A G C A A A A A A C A A C C C A C C C C A C T A C A A A C T G G G C
A A A G G A C A T G A A A A T T T T T C A G A A G A A T A T A T A C A G A C A G
C T A A A A A G C A T A T G A A A A A A T G C T T A A T A T C A C T A A T A G A
G A A T T G C A A A T C A A T T C T C T A G G A A T G G C T A T T A T T A A A A

10

20

30

40

50

AGTCAAAAAATCACAGATGTTGGCAAGGTTGTGGAGAAAA
GGGAACACTTATACACTGCTGGCGGGACTGTAAATTAGTT
TAGCTATTATGAAAAGCAGTTTGAAGATTTCTCAAATAAC
T
GAAAAATAGAACTACCATTTCAACCCTAGCAACCCCATTTATTC
TATATGTACCTAAAGGAATACAAATTTTCTACCATAAAG
ACACATGCGATGTGTATGTTTCATCACAGCAGCTATTTCATGAT
AACAAAGACAGGGGAATCAACCTAAATGCCTATCAATGGTA
GACTGGATAAAGAAAAATGTGATACATATACACCATGGGAAT
ACTATGCGAGCCATAAAAAACCAGATGGAGCTAGAGGTCATT
ATCCTAAGTGAACTAATCCAGGAACAGAAAAACCAACTACC
GCATGTTTCTCACTTCTAAGTGGGAGCTAAACACTGAGTAT
ACATGGACACAAAGAAAGGAACAGCAACACCAGGGGCTTAC
TTGAGGGTGGGAGAAAGGGTGAGGATCAAAAAAACTACCTAT
TGGGTACTATGCTTTATTACCTGGGTAAATGAAATCACCTGT
ACACCAAAACCCTCATGACACGCAATTTACCTGTATAACAC
ACCTGCGACATGTACACATGAACCTAAATAAAGTCAAAAA
AAAAAATTCCAGTGACCAATTTTTCATGTATTGGCAGTGA
CTGGAATTATTTTAAAAAGTTAAAAATTAAAAATAACAAAC
ATAATTAAACATGTAAAAACATATACTTAAAAAGTAAAAATGA
CTCTGTGACAATAGACTTAACACACAATCTAGTGGCTGAA
AATACTATTTTTTTGGACAATTTTATGTTTAGAAAAATTTAG
AGCTGGATGCAAAATTTAAAAAATTCAGGATATTATTTTGT
CATGATCAGCAAAATGAGAAATAGCTGTCTAACTGTAGTTT
GTCAAATCAGCAAAACAAACATAGCTGGCTAAAAAATGATT
AAGAAATGTTAAAAATACACATACATCCTCTAAAAAAACAAA
ACAAAAAATACCAAAATGGTTGCAAAACCCATTCTGCAGTTCA
CTAAATTTCTCAAAAAAAGCTCCCAAGTAACCAATCAAAAA
AACGGAAAAAAATACTAAGCAGCTTTAGGAAAAAAAGAAAAATG
TTTCAAGGCACAGATTAAATTAGAAAACTTCTACATGTCTA
CTAAAAATTTACCAATATATAAAAACTTACTGACATGTAAAT
TTCAGTTGGACCAATTCATTTTCTAAAAACATTCCTCTACT
ACTTTCTCAAGAACCAATAAAAACTCTGGAGAACTAGGAA
AAAAATGGGTCCTATATTTAAGTCATCTTTCTGCACCTTGAG
ATGTATAAGGCTGGGGGGTCCCTTGAAACAAGATATTCTCTAT
TCTATGCTTTTGGTTAACACTTACTGTGTAAATTACTGGTG
CTCCACAGGTCTGTTACCTAAGCTCAAACTGATTCTGTAG
ATACATAGGTGAGGCTTATTTGCCCAATTTTCTATTGCT
CTTACACACTTAGACCTGGGTATTATACAGTTAAACACTTAC
TGTTACCTTCTATGTGCCAGGCATTATTGCAAGCATTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAAGACAGAGTCTCGGTGTTCCC
CAGGCTGGAGTACACTGGGCACATCATAACTCCCTGTAAACC
TCAAACTCCTGGGCTCAAAAGATCCTCCTGCCCTCAGCTTT
CGGAATAGCTAGGATTACAGGCACACAGAAACACATTTCCA
ATAATTCTTTTTTTATTTTTTTGTAGAGATGGGGTTTCACTA
TGTGCCCCAGGCTGGTCTGGAACCTCCTGGCCTCAAGTGAT
CCGCCCTGCCCTTGCACTCCCAAAAGCTCTGTTCCTTACAGGCA
TGAGCTACTGTGCCCTTTTTTTCAACTGATAAAAGAGAAACA
CAAAAGTATACTATAATTCTTTTCTCTGATTTTCAGAACATC
TTTTAAGTGTTTACTTAGGGTTTTTAGGATTATAGATTTAT

10

20

30

40

50

CATCATCATTTTTTTTTTCAAGTTGGGTCCATGCTCAACA
ATTAATTATCATTTACTTTTTCTTTTTGAATTTACTGTTTCAG
GCTTTTTTTTTTTTAAAAAAATAAGAAAGTGAATAACAATA
TAAATGCAAAGTAAAAAAATGTTCCATTAAATATATTTTA
ACAGTTTTTGTGTATTTTATATTTTCATATGTCAAGAAAAAA
AAGACTTAGAATTACTTCTTTGGTTTTTGTTAATAAGTCCA
TTCAATAACTGTTACATAATAGACTATACACAATGTAGGG
GCTGGGGGCTGGGGGCTGTCTGGTTGGCCACTATTAAGCCCG
GTACCTAGAACAGTGCCTAGGAGCTCAATATATATTTTATT
AAACAAATAGTTAAATATTTTACTTTTAAGGGTTAATCTTAC
CTATTTTATAGGGTAAACACAATTGTATGGAAAAAGAAAGAAC
ATTTAAGAAAAAAATGCTTGATTAAATGTTTTCTTCAAGCA
TAATTCTGCTGGTAATATTTCTTTCTTTTTTAAATGCAACT
TCTGTTTTTGTTTTTTATTCTGTAAGACACAATTTTCATATT
GCTTGACTACAGTACCAGCAGGCGAGAGCATTACGTACAAA
TCAGGAGTAAAGCTTTCTGTCAGTGTAGATGATCGTATCCT
GAGCCATGTCTTCTTCTGAAAGTGGCTCTCCAGAAAGGCTGT
CAGCTCGGATCTCATGTATCTACGCTGATTATAAATATGT
TCATGACAGGGTGGCATCTGCTTCAACAGTATTGACATCCA
CATCTATGTGTGTGGTGGGATATGGAGCATACATGACTTG
CCGGAAAGGCGAGCACAAAGCTTCCAGTTGAATCCTGTCAA
AATAAAAGGAAAAATTTACTGTCTTACATGCCAAACGATAT
GAATAATTGTTTTTTTAAATTTTAAAAAATGGTCTCTGATTT
AGCAAATCCATCTCTTAAAAATTTATCCTAAGAAAGCTATT
ATGAGTGTGTGCAAAGTTTTAGTGCAGAAAGTGTTCAGTA
TAGCATTGGTTTTCAATAGCAAACATCAGAAATGACCCTAAG
CATCCAAAGGAAGTGGTTAAGTAAATAAAAAATGAATTTAT
TATTTGGCATCTATAGATGAAGTTGTTGAAGTTTGTGTGTG
ATATTTCAAAGAGGCTTAGAATCTGCTGTGAAAAAAGCAGA
TTAGAACATGCAGAGATGATCCAGTGGGGGGTGGGAGTCTT
AAAGAAAAATACATGCAAAGGGGAAAAAAGACTAGAAAGA
GATATACCAAATATTAACAGTGGGTATTTCACTGGATTCAA
AATTACAAGTGTCTTTTAAATTTCTTAATTTCTATGCAC
CTCAATGAGTATGTATTTTTTATAAAACAAATTTTACTTCTT
TCCTAATCAGTTGGGGGTAGCCAGTTACCATGTATAATAA
CCTACTGCGTATGAGGCGACTGTGCTATGAACAGAACAGAA
GAAAGAGGCTATTTTCCATTTTTTTTACTATTATAATGCTGT
GATAATCATCTTTGTATAATGTCAAAGGTATTTTCTGGAA
AACTATATGATTTGTATTTTGCATGGAGAACTATTTAAATAT
TTTTTTCATTAGATCATAGTTTTTGAATTTTCTCTAGGCAT
CTGGTATAGGTCCCTTTTCAGAACTAAAAATTAATAATTA
ATGAGAGGGTGTGTGAGGAAACAAAGTATTAAGCACTTTA
TTATGCCCTTTAACAAGGAGAAAGTTCTAATTTACAGATATGT
ATAACTCAAATAGAAACTACGTTTTCTTTTAACTAGTTTTCT
ATATTTTAAATACTATCATTTCTGAGTTTCATAGCAGCACATT
ATTGAAAAATGCACAAAGCCTAATATAACTTTGTATTTTGCA
ACAATTTTTTAAATTTTTTTTATTTTCATTTTGCCGTGGCTAC
ATCCTCAAGAAAGTAGTCACTATGAGACAATCACATAACC
ATTAGGAAAGCTATTTCTTTCACGTCCTTGGGACTATAATTG
AAATAACAATAATAGATTCAACAAGGTGAACAACCTTTCTT

10

20

30

40

50

CCCTTTTAAGTATTATATAAATAAATTGCTAATTTTACATTTCTC
TGTTTTTGCTCCTTGACAGTAGACTCAAATAAAAAGAAAAAT
ACAATTTTTTTTCTAATATATATTATATATAGAAATATATA
TATTTTAGTACACATACATAGGAATTGCTTAAATCCTATA
AGCTTCTTAAAGATGTTTAAAAATTTTTTTTCAATAAAAATT
CAAATCTATTTAGTTAAAAAAGAAATGATCTTATTTTTTGAT
GTGCAACCTGATTTAAGCATGTGTTAAAAAAAGGTC
CTGAGGCTAGACATGTAGGAACAGGGACCCACCTGGAACA
CAAAGGGTATTCTATGGTGTTTCACTGATGATACTAACTA
TAAATCCATAAGACATATAGTCTATGTGCGAGAACTGTGTA
AAGGAAGTCAGTCTCTGGGCATGTCAATATGAGATACATT
AAATGCTAATATTTAAGATTTGTCTATAAAGAGTCTCAAA
AATGATTTTAGAAAAAGTGGTTTCACTTGTTGATAACTAGAA
ACTATACCTTTAGCAGGCCCTTGTAACAAAGAGCCCTGACTC
ATATTTTAAATGATGATTCTGCTTTCACATAACCTGGAGCAT
TTTCTCTCTGCTGGAGTCAAGAAAAAGGCATAATGTTCTGA
CTATCTATAAAAAGAAAAATATTTTAGCATTA AAAACATGAAG
TAAAAAGACCACTGATTTGCTTATGAAAGATATCTGAAAT
TTTAATTGTTATTATCAATAAAAACATATCCTAAGAAATAA
GTATTTCTTTAGTCACTGGAATCCATGGGATGTAACAGTT
GTTGCTTAAAAATAGGGATTCTGTGGTCAAATAAATTTAGA
AAATGCTTGGTAAATTTACTGTATGGCATCTCAAAAACCTT
TAACATTTGGCTACATACTGTGACTCTTTCAGGTGAATTTAT
ATCATCTGCGAGACTTTCTCAGACTTATTTTGACCATGCAAC
TTTTATAGCTTCTGTTTTAGTGGGTCTACACATGAAATTCG
TTGTAAGAAATATCAAAGAATGTCCAGATCCTCCAAAAAG
AAGAGAATTAAATTATTGAATTTGATTTAAAAATAAGCAGGT
CATTGGGTGGGATTTAGAAATCTGATTTCTAATAATATTTG
ACCTACAGCTCTATTTAGGA AAAAATAAAAAAGGCATGTAAC
ATCTTGAAATTTCAAACCATATCCACAGTTATTATGTTAAA
GGAGTG GTTTTTCAACCTAGAGTGGTGGCAACTTCTTTCTC
AAATTTAAAAACAAGATAAAAAGGTAAGCTATTCTCCCTCAAG
A
GGATGGAGGATGGGAAAAAATGTTTAAAAA AAAAAA AAAAA
ACACTCCAACCTATGGAGCCTTTCTCCCTTTCATAAAGCAGC
TCGGCAGTCACTCTGTGCAACCTAAGGCCTTTGGAGATCAC
AGATGGAAAGCCACCTGTTTGAGGTAACAGAAAGGAATAAG
GTCACCTAGTTCTGTAGATGCAATATAATGACACAGGTATAC
TAAGCTCTCATAAATGGTTATATGAGAAATATAAATTTAAG
GCTCATGTAAATATACAAAGTAGCTGATTACAAAAA AAAAA
TTATGAATATCTTTGTAAAGTATCATTTTCCAACATATTTCT
CTATGTAAAACTTTTTTTTAAAAAATTAGGTTTGTCTGAAAT
TGAAAGATACACATACTTATCTCTGAACCTCTTTCTAACTA
ATGGTCAAGTGAAGAAAAAGTGCAAAAATCCTTTAGTTTATTA
GCTAATGCTTGGAAATGTAACTGTTCATTAAATCCTTAATT
AACTCAAGTAGCACTGAAGGAAGGGTCAGAAACATTTACT
GAATAAAGTATAATAATCAATGACCACCTTAATCCCAATAG
CTCCCTAGAAAGGGACAGATTTAGAAAGGAAGCGAAGACAA
TGAAATCAAGATGAATAAACAAATAACATTTCTTTGGGAAC
TACTACCAAAAAGTACATGACTATCTTTCAGATTTGTTAAG

10

20

30

40

50

ATAACATTGGGA AATAGAAAGAGTAATTTT TTTTATATATC
TGATTTTAAATATATTCTCAA AACCATTTATACACTACTGA
CACTGGTATTTCCGAGCTATCAA AATAAACTGATAAATGA
TTCTTACTCAGTTTATTTCAA AACTCACTGTTGCCACAAGG
TGTCTTAGCAATTTGATGAGATTACATTTGCCCTCCTTATAC
TACTAGATCATTTTAAATTGCAACCTACCATTTTAAATGACA
ATCCATGATATATCATCAGTCTTAAAGAGTCAAATCATTT
GCTAGATTATAAAATAAACTACCTTATTTACTTTCTCTGC
ACTGCTACCTACTACAACGGAACAGCCACAGGTTTGCAG
TGTGAGCTGATGGCACTGTAAAGTTAAAGAAAACAGATTAA
AAACATTGCCCTATAAAAACAATTTAACAAACTAAAAACA
AAAAAGTAGGTGAGCTCTTCAAATAACTCAGAAATAGCTTT
ATATGATAAACACCGAAGCTATAAGCACAAATGTTATCTTT
TATTTGTATAGGAACCTACATTTTCTAGAGACCTTTTACA
GAAATTTTCTTATTGAGCCTTAA AACAGCCCAATTAGTCA
GTATAATATCATTTTAATTAAATGTATTTATTTATTGAATA
CCATCATTTTATAGCTGAAGAAATTTGACATGTAGAGAGAT
TAAGTGACTTACTTAAAGTCAAATGGGATTTAAAAATGATG
TATGAAAGGCTGACACTGAACAGATACAGGACTAAAGTG
TTCTGATTCAAGCCATTAAAGGCTCTTAGGTTAAACACACT
CATGCCCTCTGATACTCCATCATGAGCCTAAAGGAAAAGAC
TGTGAACATAAAAAGTGAATACTTTTATACTTTTACTTCTCT
TTTATTTAAAAGTAAAATTTTCATGAAAATCTGTAACTGTGA
AGAAAACTTTAAAACAGAAATATAAGATAATACATGTAAAGC
AACTAGTAAAGGAACATAACATGTAGGCACCTCAACAAATAC
TGGCTATTTCTAGAAAGAAATGTAAATAGGAAATGTTAGCT
ATGAGCTATTTATTAAGTGTTT TTTATGTTCCAGGCACCTGTT
CTAAGTGCTTTTATATTATTTATCTTACTCAATGCTTATAA
CAACCCCTACACATTTAGGTACTATTTACTATTTGCCATTT
TACAGATGAGGAAATAGGTGTATAGAGAAATTCAGGCGACCT
TGCCCAACGGGTACACAGCATTAATCCAGGGAGTCTGGTTT
AAGGGCACAAACTCTTAAGTACTAAACTCCACTGCTGGAT
GGAAAAAGATCAGTATAAATATGAATAATTTTGTTCACG
CCTAAATAA ACTTTAAGTTTCATCTACAGTACAACCTTAATATG
AAAGGATTCTGTTAGCTTTTAATGAGAAAGTAAAACAAGAAA
CCAGAAATCAAGCAAGGGGGCCATGATTTCTTGTCTGGGATG
GAAACTCGGTTTCTTTAAATAGCAAATGGAATAACACCAA
ATATATATAGAAATATAATGAGTGAAAAATAACACAAATT
TAAGCAACAGTTCAAATACGTAAATGTCCCTAGAAACAATCT
AAGTAGACAGTCTGTTATTTTCTTTCTTCCAAATCTTGTC
ATAGGTGAGCATAAAGATGGTATCTGCTTCATCCAGCTTTT
ATGAAAAGAAAAATTTCTTACTTTGAGAAAGAACCTTCATG
ACAGCTGTCACCAATATCATCATCATTTGAGTACTGTATCA
GCTATCTAAAATGCATCAAAAAATAAAAAAATTAGTCTGG
CTGTAAACATAGTGTTGAAATAACACTTTTAAATATACAAGT
TTTCGGAAGTCTGGATTCAATATAACACACACTGCCCTTCATT
TCCGAGAAATCAAGACTCCCCAAAAACAATCTCTGTGCAC
TACCATAAACTTTCAGAAAGAACAAATGTGAAAGCTGGTCAA
GCAGGTTAAACAATTTTTTACAAGAACAACTTCTCTCTCTG
AGCTGTCAGAAATCAGGAGACTAACCTAAATGACAAAAATCA

10

20

30

40

50

G A A A A C A A C A A G A A T A G T T T C C T A A A G G T A T C T C T T A A C A
C T C A T A G T G T G T G A T T C A A A A C G T C C T C A A C A A A T G A T T A
A G G A A A C T A A A T T T G T G A C T A C A A G T A A A C T T C C A T T A A T
G G T T A C T A C T T T G G C A C A C A G T T T T G T T T C A A A A G A C A C T
A C A T T A A A T A T T A A T T G C T C C T A T A A G A G C T G G G A T C C T C
C C A C T T T T A G G A A T T A T A A A A G T A A T G A A A T A A A C A A A A T
G A A T T T A A T T T T G T C A T C A C T G A T C A A A A A T G C C T C T G T T
T T G C C A T A A A A T C C A G G A T T T T G T G T G T G C T T A T T T G C T A
A A G T G G C T A A T A C T G T A T G T G A A T A G T A T G T A T G A C A A A G
T C C T T A C T A T T A A A A T T A G A A T A T T A A T A A T A T A C A T A A T
A A T A C T A T A A C C C C A A A A A A C T C A T A A A G T G T A T A A T T G C
T C T C A T T T A A A C T T A C A T C T A T T T C T T C A G G A A C A C T G T G
T G A T T T C A T A G A T G A A A G C A G T T C C A T T A C A G G A A T C A C T
T C T C C A G T A A G C A T T G G A A T A A T A C T C T G A C C C T G C A C A A
T A A A G T G A C A T G A A G T G A A G A A A A T C A C G T A A T A T G A G A G
A A G C T G G G C A A T A A A A A A T A A A A A T A A C A T C A A A C A A T A A
C A T T C T T T G A T G A A A A T A C T T C G T A A T T T G T T C A A A C A C A
G T A T C A A A C A A G T C T A C T A C A T G T C T A A A G G A T T T A T A T G
C A A T C C A A A G C T C A C T T T T A T T C T T T C T T T T C T T T T T T T T
T T T T T G A G A T G G A G T T T T G C T T T C A T T G C T C A G G C T G G A G
T G C A A T G G C G T G A T C T C A G C T C A C T G C A A C C T C T C C T C C C
A G G T T C A A G T G A C T C T C C T G T C T C A T C C T C C C A A G T A G C T
G G G A C T A T A G G T G C C G C C A C C A T G C C C G G C T G A T T T T T G T
A T T T T T A G T A G A G A C G G G G T T T C G C C A T G T T G G C C A G G T T
G G T G T C A A A T T T C T G A C C A T G C C C G G C C C T A A A G C T C A C T
T T T A T T C T T T A G A G A G T A T G G A A T C A T T G G T T T A T C G T T T
A C T G T T A C A T G C A A T G A T T A A G T C A T C A T G C C T C T T T T A G
A A A A G A T C T C C T T T A A A A T T T G A G A T A A A A A A A A T T T G T T
A A A G G T C A T C A A T A T A T T T C A T A T T T A A A A A T G A G G A A A A
C C A A G C A C A A A A A G A C T T T G A A A T C C T T A C C A A A T A G G T A
A G G A A A A C T T G A A T C A A T A C C T A A C C T C C A T A C T C A T A A A
A G T A T A A T C T A C C C A A A T G C A A A T C A A A A T C A G C A C A T A T
A T T T T A A G A A T C A A T A A A A C A G A A A A A T T C C C T T T A G A G C
T A T T T C A A G A T A T T A C T A C T T A T T A C A T C T T G A A A T T G T A
A T T T T G A A A T T T G T A G T C T A T A G A A T C A A A C T G A A A A T T C
A G T A T A A C A C A T C A C A A A T G T A A A G T G T C T C A A A T A T G G A
T G G T C C C T C A T T T A T T C A C T A C C A C C A C C A G T C T C A T C A G
T T T T G T G A C C A A C T T G G T T A A G T A A A T T T T T T G A G A T A T A
A A T G A A A T T G T C A A A T G A C T A T G C A T T T T T A G C T A A A C A T
A T T T T T T A A A T C A T A C A T T A T T T A A G A T G A A T T T A A T A C T
A G T T G T T T T T C C T C A C T T A T T T T A T G A A A T G A T T T T A C T C
A A A G T C T T C A T A A G C A T C T T T A A G T T A G A A T C T T T G T C A G
A C C C A G G G C C A T T T T T G G A G T A A C C T T A A C C A G T T T T T C A
G A G C C C C A T A T T A T T A A G T T G C T T G A G A A T T T A A A T G T G A
T G C T A C T T C T G G A A G T T T T A T C C T A A G C C A T A T G C C C A T T
T G C A T A A T G C T G A A A G T T T T A T T T A A A A A A A A C C A T C C T
T T A G T A A C C T C C A C A A C T A A C T A T T C A C T G T T T T T A G T T T
T T A A A G T A A T A A T T A T C A T G C C T G T T T A C A A T T A C A A T T C
A C A C A T T C A A T C T A A C A A G A A T A A T G A C T A G A T C C G T G T T
A A A T T T C C T T C C C T G T G A A G C A A T T T T A T C A G A T G A C A G C

10

20

30

40

50

T A C A A A C T G A A G T T G T T T C A A A C T A A T G C A T C A T C C C C A A A
C A G T A T T G T T C A A A A T A A A G T C G T T G T G A G A T T T G C A A G A
A C T C A A T C A A A A G G C A A C T C C T C C T T T T C G G G A A G A A T A A
T T T T G G G A A A A T A T T T C C T C T T A G G T T T A A G C A T A C A T A G
T A T T T C A T T C A C A G T A T C T C A G A C A T T A T C A G T A T A A G T G
A A T G A A T A G C C T C A C T G A A G C T C A A C A A C A C C A A A A A A A A
A A A A A A A A A A A A A A A T C C T A C A G G G C T A A A T A C A G A A G A G
G C T C T A A A A G A A A A T C T C T T A A G T T T C T A T T C C T C C T T G T
A C T T C C C A A A C T T G A A C T T C T C A G C A G T A A G A T A A C A T T T
T T A A G A A G A G C A C T T A A A A G A G A G A C C A A A A T T C A T T A A T
A G T A G T C A A C T T A A G T A A A G G T T T C T G G T T T G A A A A A C A
A
A A T C C C A G T A A A A G C A G A A T T T T A G T T G G T T C T A A G T T T C
C T C A A C T T G C G A T A A G T T T A C T T A A T T A G T C T A C T A A T A A
C T A G T G G G T T A G A G G G T G C T G A A A G T T A C C C C A T T C C T G G
G G A C C C T G C T T A T T G A C C A G C A A A T A A G G A C T G G G A T T C T
T T G G G T A A A G G G A A A T C T T T T C T T G T T A A G T C A G A C C T T T
A C A C A G A A T A A C T G T C T C T G A A T T G G A A A G C T A T C T A C A A
A A G T A C A A A C A T A A C A A T T T G G T A A A G G A G A T C A T T G T A T
T G G G T T C T G T A T T A T G G C C A T G T A T T T T C A C A A G T T T T T T
T T T T T A A T T A C T T T T T T A A A G T A T C A T C T G T C T C A T T C A T
G C T A A A A A G A A G C A A A G A A A G G C A A A A C A G C C A T G T T T A A
A A T A T T G G A G T T T T A C A A G G A G C A T T G A G G G T C A C C C A C A
A G A G G A A A T G G A A G T A A A A G T G A A G A A C T C T T T C T T C A C T
G G A G A T T C T C C T T C A A A A G A A C T T C T C T G C T T T A C A G T G A
A A T A G T C T G T A C T T A G T T T C C G C A G G G G A A G C C A C A C C C T
T G T A A C C A T G C T T C T C A A A C T C T T A G T G T C T G T T C C T G A G
G G G C A T T C A A A G C C A A G G G A T A A A C A T G G C A C A T T T T T C C T
A G A G G A G A G G G T A A G A A A T A T C A C T G A C A A A T T T T A A T A C
T A A A A T A G T T A T G G A A T A A A A T G T A A A T T G C A T G A G T C T T
A A C G A T A C A A C A T A A G A C T T A G A A G A A A T A T T G T G T G G A C
C T G G G C C T A C A C C C C A G A C A G A T A C C T C A G G G G T A C A T A T
G C T C T C C T T C T G T T A C A G C T A C T T C T A G G G A A A G G T T C G A
G A A G T A G T A C C T T A A A G A A C A T A T C A G A G A C A A T T T T T T T
T A T T T T T A C T A T G A A C A A G T T A T C C A A A A T T T A T T C T G G G
C A A A C A G A A A A A A A A A G G G A G C A A A T A T T A A T T T G T A G A T
G C A A T T A C T A T T T T C C T T T G T T T A C T G A T T T A A C T C T T T G
G G T T T A A G A T A T G G A A A T C T T C C T C C A G T T T A T T C T G T A C
A C C T C C A T A A A A G C T C C A T T A A A G G C T T A T T C G T A T G T C T
C C A A G G C C T T G A C A A A T G T A G C C A T C A A C C T T A T A C A G A T
A C A T G C T G T G A G A A A A A C A T T T G A C A G T A T G C A A T T T G C A
T A T A C C T G A T C T T C C A T T C T C T C T G T G C C T T C T A A G A T A A
T C T T C T G G A C A T T T T T C T T G T C T T T C C T G A G C A A G A G A A A A
T T T A T T T A A A A A A A C A A C C C A C A A C A T T T T G A T A C T T G C T
T A T T T T T C A A T A G A C A T G T T C T T G T G T A G T A A T T T A G T T C
A C A A G A A A A A T A C T T T C T A C T T T A G G G A A A A A A T G G G G G C
A G G G G T A G G A A A T T A A C C C A A C A A A T G C A T G T T C T C A T A A
A C A A T A C A A A A T A A A A T C A A A A C A A C C T T T A T T C T G C A G T
G A A A A A A A G A T A A C T T C A C A G A A A A C A G T C A A T G T A A C A T
C T G C A T A G T T T C A A A A A G G A A A A G A A T G A C T T G C A C T T T T

10

20

30

40

50

C A A A T T A A A C A T T A T G A T G T T G T T T A A A A G A T T C T C C T G A
T T T T A A G A G T T T C A T A A T G T G A G A A A A A G G A A G T A A G C C
T G C A A A C A T A G T A A A A A A T T A T T C T T T T A A A A G A T A T T A T
T T T T C C T T A C T A T T G G G C A A A A G C C T T T T A A A A C T G G T A A
T G C T T A A T G G A C T T T C A G G T T A G T A T C A A A C T G G A A C A C A
G G A A G G A G A A T T C A A T G T G T T C T T T A G A T A C A T C A A A A C T
A T A C T G A A A T G T A A A T A G C A T T A T A T A T T C A A C T A C A G G A
T T T A G G A A A A C A A T A A T T T C T G T A A G A T T A A A A G G A A T T C
T C T T G G G A A C C A T T C C A T T C A A C C T C C T C A T T T T A T G A A C
C T G G G A A C T T G G C A A A G A G G T T A A A G A G A C C A A A G G C T A C
A T G A C C A A C A G C T T A T G A A A C T A T T A C T T T G A A C T G T T A T
A C T T A C A C A T A G T A G T A A G C A A A A G A C A G A A T T G T G C A A T
G A A A G G G A A A C A A A A G G T A T T A G A G T C A A A G G C T C C C A A G
A A G A A T C C A G G G T C T A A A A G T T T C T T T A T T T G T C T A A G C T
T T A G C T T T T C A T C T A T A A T G T G G A G C T A C C A T T T T C G T A C C
T T C C A C A G T T A A T A T G A A G A T G A C A G G T A T C A G A C C A G A T
G T A T T T G T A T C T A A T A G G G T A A A T G C A A A A T A A A T A A C A T
T T A T T G T T T G A T G T T C A C T G C A T A T A A T T A A A A A A A T A A G
A T T T A T A T G T A C C A G A A A A T A A G C T T T C A A C A G A T A G G T T
A A C A T G A T T A A T A A G C T G A A A A A T C A C T T A C C T T A T G C A T
C C A T A T T C T T C C T T T C C G G A T T A T A T G T G T T A A T C T A T C A
A C A C A C A C T C T A T G A A G T G G G A G G T A G A A A C T A A G T T C T G
T C T G T G G A A G T A T A A T T G A T A G T C C A T A T G T G C T G C G A T C
C C C A T T C C A G T T T C C A T C A A A G A T T A A T G A A A C A A T A A T C
A C T C C C T T T T C A G A C A A G A C A A A A A A C T T T A C A T C T A T A G
C A C C A C T C T C T G C A T T T C G A A G G A T T T C T C C A T T T A G A G T
G T G G T T G G C A A G A A A A G T T A T T T C T C C A T C A C T G A G A A G T
A C C T G T T C T G T C T T T G G A G C C C A A A T G T G C C T T A C T C T A G
G A C C A A G A A T A T T G T C C C A G T A A G C A A A A G T A G C T G C T A A
T A A A G G T G A T T T G C C A C T T A A A G C A A T C T C T G T C T T G G C A
A C A G C T G G A G A T G G C G G T G G G C A A A G A G T C G A C A T C A C T G
C A T T C C A A C T G T C A C A T T A T C C A A A T G C T C C G G A G A T A T C
T A A A C A A T G A C A T A T G A A A C C A A T G A T T A G G T T C A G C A A T
T T A A A G A T A T C C A T C A A A A C C C C A A A T G A T T T A G A C A T A T
T T G G T T T G T C C T C T T A A G T C A A A G A T G T G G A A T C C T G T T A
T C T C C T A T C A G G A T A A A G A C A T T C A A C T A G C A C A G T A G G T
G C A C A T T A A A T G T T T G T T G A T A T G A T C A T T T T A C A A G A C A
T G G T A A C T T G T T A C T T A T A T T C A G G G C A T A C A T T T A G A A A
T T C A A A G A A A T A A C T T A A A A A A G G G C T T C T T T A C A C T G A T
A T T A A A T G T T A C A T A C T A A A G C T C A T A G A A T A G A C C C G C A
G T A T T C C C A A A T A T C C A G T C C A T G T G C A A T T C T A G T A T G A
C T G G A G A T T T G G C C C C T A A C C C A T A G C A A C T A A A A A G G A G
A A A A A C A G G A A G G G A A A G G C T C A G C T A G A G A C T G A C A C T T
G T G G G T T G A A T T G T G T C C C C C A A A A A G A T A T G T T C A A T T C
C T A A C C C T T G G T G T A C G T G A A T G T G A C C T T A T C T A G A A A T
A A G T G T A A T C A T G T T A A A A T G G G G T C A T A C T G G A T T A G A G
T G G G G C C T A A T C C A A T A A C T G C T G T G T T T A T A A G G A G A G A
G A T T T G G A G A C A C A G A G A C A A A T G G T A G A C A G C C A T G T G A
A G A C A A A A G G C A G A T A C T G G A T T G T T G A A A C T A C A A G G C A
A G A A A G G A A C A C T C A G G A T T G C T G G T A A C C A C C A G A A G C C

10

20

30

40

50

A G G A A G A G G C A A G G A A A G A G T C T T C T C T C T T G A A G A T C A T
G C C C C T G T C A A C A C T T T T G A T T T C G G A C T T C T A G C T T C T A G
A A T T G T G A G A G A A T A A A T T G C T G T T G T T T A A A G C C A C T C A
G T T T G T G G T G C T T T G T T A A G T A A T C T T A G A A A A G T A A T A C
A A C A C C T A A C A A C A G A A A T A C T T T A A A G C C G C T A A A A G G T
C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A G A C A T G G A A A T A C C A C A A
G T C T G G A G C C A T A A C A A A A A A T G G G C A A A C A G T C C T G T A T
C C T C A G T G A A C T C T C T G G T T A T G A G A A T A C T G A A G C C C G A
T C C T G A T G T T T A A A A C G A C A T T G A A G T A T C A A G A C A A A G A
T A A A A A T A T T T A A T A T G C T A G C C A A G A A A C C A A T A C A G C A
T T T C A T C A C T G C A A A G A G A G T T C T A C A C T A A A T G G C T A G A
A T T T A A A A G C T T T A G T T A T T T A G A A C A C G T A G A A A A C A G A
A G G G C T A A A T A G G G C C C G T T C A A G C C T T T G A A T T T A A T G A
G A A A A C A G A C A T G A G G A G A A G A A C A T A A A C G C T C A C A T C C
A A G A C A G A A C C C A G G G C T C T T G G T C C C C T T G C T C A A C T T G
T A C A T C T T A A T C C A C A T A A A C A T A C C A C T C T A A A A A G G T A
C A T C C T A T G T G A T A T T A A T G T A A A A C A A A T C A T T C T T G C A
A A T A C A G T T A T G T G C C A T G T A A C G T T T C A G T C A A T G G T A G
A C T G C A T A T A T G A T G G T A G T C C C A T T A G A T T A C A A T G G A C
C T G A A A A T A T G C T A T T G C C T T A G T G A C A C T G T A A C C A T C A
T A A G G T C T T A G T A C T A T T T T G C A A G T T A T T T A A A G T A T A G
C A C A T A C A A T T A T T A C A G T G T A C A A C A C T T G A T A A T A A A C
T A C T A C A T T G C T G G T T T A T G T A T T C A C T A T A C T A T G C C T T
T T A T T G T T A T T T T A G A G T G C A C T C C T T C T A C T T T T T T T T T
T T T T A A G T T A A A T G T A A A A C A G C C T C A G G C A A G T C C T T C A
G G A G G T A T T C A A C A G A A A G C A C T G T T A T C A T A G G T G A C A G
C T A C A T G T G T G T T A T T G C C C C T A A A A A C C T T C C A G T G G G A
C A A G A T G T G G A G G T G G A A G G C A G T G A G G T G G A A G G G A G T G
A T A C T G A T G A T C C T A A T C C T G T C T A T G C C T A G G T G A A A G T
G T G T G T G T T T T A G T T T T T A A C A A A A A C G A C T A A C A A G T A A
A A A A A A A A A T T T A A A A T A G A A A A T A G A A A A A A G C T T C T A G
A A T A A G G A T A C A A A G A A A A A A T A T T T T T G T A T A G C T A T A C
A A T G T A T T T G T G T T T C A A G C T A A G T A T T T T A A A A G T T A A A
A A A T T A A A A A G T T T A C A A A G T T A A A A A G T T A T A A T T T T T T
A T T G A A G A A A A A C T G T T A A G A T A A A T T T G G T G T A G C T T C A
G C G T A C T G T G T T T A T A G T C T A C A G T G G T G T A C A G T G T T C T
A G G C C T T C A C A T T A A T T C A C C A C T C A C T C A C T G A C T C A C C
C A G A G C A A C T T C T A G T C C T G C A A G C T C C A T T C G T G G T A A G
T G G C C T A C A C A G G T A T A C C A T T A T C T T T T A T A C C A T A C T T
T T A C T G T A C C T T T T C T C T G T T T G C A T A T A T T T A G A T A A A T
A
T T T A C C A C T G T G T T A C A A C T G T C T A T A G T A T T C A G T A C A G
T A A C A G T T T G T A C A G G T T T G T G G C C T A G G A G C A A C A G A C T A
T A C C A T A C G G C C T A G G T A C A T A A A G G C T A T A C T A T C T A G G
T T T G T G T A A G T A C A C T C T A T G A T G T T T G C A T A A T G A C A A A
A T C G C C T A A T G A T G C A T T C C T A A G C A A T G T G T G A T T G T A C
T A T A A T T G A A G A C T T G T T A T C T A A G A C T G A A A G T A A A A A G
A A T T G C A A T T T C A C C T A A G C A A G T C T A A A A C T G T G A A G T C
T A T T T A T A A T A A T A G C A A T A C A A A G C A G C T A A T A G G C A A A
C T A T G A T A T A C C T A T C T T T G C C A T A T G A T T G C T T T G G G A G

10

20

30

40

50

CTAACATTTTGATCTGTAAATGTATGACAAAGTAAACAATT
TTACTTAAAGAATTTTCATCCACATCTTGTCAGAGAGTTTC
AGTCTGATGGAAAGCACTGACTTCTATTTACAGAGCATTA
GATGAGTGCTTTTATCATATTTATGAGTAGGCGATACAGAGC
CTGGCAAACAGTTAACTCTAAGTATGTACAGAAATGGTT
GAACACAACGACAGTTTTTAACACGTTGTATTTGTAAATTTCA
AAAATTTCAATTTAGGTAAATATTTACTTTTAAATATGTTGT
TCAATTTTAATAGTCTTAAGAGACAGCACTAGATATAAGCC
GTACAGCTTCTTTTAAATATCCACTGTTTTTAAATACAATG
TAAGCAGTCAGTTTACAATGATCAAATATAGGAATGTAAAT
CTGAATTGAAATGGTAATGACACTACTGCTGTCATAACTA
ACAACAGCAAACCTGGAGGGCCAACATAATGAATTAAGTTAA
CATACAACCATAAAAATTTATATTGCAAACATATTTTTTCTTT
CATTCTTTTTAGGTTAAAAAAGGTGGATAATCATAAAGGCCAA
TATTACAACCTCTAATATTTTCATCATTTAAACTGAAAAATAAA
AGTATTTTCCTAAAACAGAACTGAACCCTGGAGCAAATACT
GATTGAATTATAGGGAAACTTTTACCACGTTGTGAAAAATT
GAACTATTATACTGCTAGTTACACTCTCACTCCTAACAGAA
ATAAGAAAAAATAATGGGGCCGGGGCATGGTTGGGTCAACACC
TGTTATCCCAGCTCTTTTGGTAGGGCCGAGGGCAGGTGGATCA
CCTGAGGTCAGGAGCTCAAGACCAGCCTGGGCCAACATGGT
GAAACCCCACTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGG
TGTGGTGGTGGACACCTGTAAATCCCAGCTACTCGGGGAGGGC
TGAGGGCAGGAGAAATCTCTTGAACCCGGAGGTGGCAGAGGT
TGCAATGAGCTGAGATGGCGGCCACTGCCTCCAGCCTGGGG
CGACAGAGAGAGACTCTGCCTCAAGAAAAAACAACAACAAA
CAACAACAACAACAAGAAATAAGAAAGAAAAATGAAGGACAAA
GATCATACTGAATTGCTTAGTTTTAAATCCTACCAAAAGA
AATAGCCTGGGAAATGAATGTCAACAGAGAAAGTATAATCA
GGAGAGCTGTACAATTTATTTTACTAATACTTGAAGTCATC
GTCTTTTGGTGAGAAAAATCCATACATGCAAATGCAGCTGA
AAAAAATCAGCTCAAAAACCAATAGTTGTTTTATGTACCTAT
CTTACGTACATGTAGTGCTGTCTACTCCAGAGAGTTACCA
AACATTAGGCCAGTCTTTTGGAGGGGAAGCCAAAGATTCAAAT
GAGTGAGACGGTGGCTTGTCTCACAGGGTTTCATGAGAGGGTT
TCCCAATACACTTTTCTGGAAATAATCCCATACATGCAGAC
ATGATTACATTTAATTAACATCTGCTAAAACCTGTTAGTAGA
GTGCTAAGTTTTGAGGTTTTTGTCTTTTCTTTTAAACGTCGT
TAAAAAATCAACCCTCTCTTCCCTGATTGGTATTTTAGAAA
GGTGGTTGGTCCACTGCTATTGTAGTGAAAAATTCTACAAT
CATAAAGCCCTCACTTCTTGTTTTTTTAGAGACAGGGTCTC
GTTTTGTCACTCCAGGCTGGAAATGCCTGGCAGGATCATAG
CTCTCGGTAACTTCAAACCTCTTGGGGCTCAAATGACCCCTCC
TGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTAGGACTACAGGTGCACAT
CACCAACGCCCGGGCTAAGTTTTTTAATTTTTTTGTAGAGACAG
GGTCTACGTTGCCCAGGTTGAGCTTGAACCTCCTGGCTTCA
AGTGATCCTCTTGCCTCCGCCCTCCCAAGCTCTGGGCATTA
CAGGTGTAAGCCACCTTCTCCAACCTGGGCTCTCAATACTT
GTAACCATGCTGTTTTATTTTCTCCCAAGCCCAAGAGAAAGC
AGGATCCTAAACCGTCCACTTTCCACAACAGGAGCTGCC

10

20

30

40

50

A G G A C C A C T T C A A G G A C A G T G A A C T G T T T A C A G T A C C A G A
A A G T T C A C A A C A C T T T C T C A A T C T T C A A C A T C A G G G G A A G A
C T G G A A G G T G A A G T T C A T A T C A C T A T C T G G C C A T T T T C T C A
C A G T T C C A A G T T T C T C A G A C A A T A G G T A G G C T A A C C T A G T
C C T C C T G G G A A C T A T C T A A T T A A C G T A G A A T A G A A C C C G A
G G G C A G A C T T G A A A A A C A G A A G T C C T C C T T G G T T T A C T T T
G T T T C T C T G A A A G C A A A T T G T G G A G T G C C A A C A T A G C C A A
A C A A A A T A T T T T A T C A A C T T C A T A A G G T G C T T G T A A T T T T
T T C C T G G A G C A G G T A A A T G C T G G C T T A G T G A A C A A T C T G G
A A T G T G G T A A T T A C T C T C G T T C T T G T T T C A G A T G T A C T A T
C A G C A T G T A G C A G T T T C C A A C T G A T T C A G G G T T T T C C T A A
A G T G G C A G G C C T T G G C A G A G G T G G T G A C A A C A A T G C C C G T
G T C A A A T G A C A C C G T A T T T C A A G T A T T C T G A C T C C A G G T T
A T T A A T A T C C C C T A T A T G A T A G T C T T G T T T C T G T G A T A T T
C A C A G A T T A T G T T A A A A G T T T C C C A A A G T C T G A G A A A A A T
C A T A T C T T A A C A G T A T C T T T T T T T T T T T G A T C C T T T G T A
C A A A A G T A G A A G T A A T G C C A G A C A G A T T A C G T A C C C T T G T
T G T G A A C A A C T G G T G C A T G G C A A C T G T T T G A A T A G A A A T T
T A C C A A C T G C C A C A A C C A G G C A A C T A C T C T C C C A G A G C C T
A A C A A T C T C G A T T G C A T C T G A A A G G G C C A C C C C T C C T G G G
A A A G T G C A G G A C C T C C C T C C T G T T T C T G A A T A C A A A G C C T
G G T G G T G T T C A A C G C G G C C A G A T A G A C C C A A T G A G C A C A C
G G A C A T G T A A T C T G T G C A C T T C T T T A G A C A A C T G A T T A C C
A T C A G T C A A G T G A T G C C C A A G T C A C A A T A G T C A C T T C C T T
T A A G C A A G T C T G T G T C A T C T C G G A G C T G T G A A G C A A C C A G
G T C A T G T C C C A C A G A A T G G G G A G C A C A C C G A C T T G C A T T G
C T G C C C T C A T A T G C A A G T C A T C A C C A C T C T C T A G A A G C T T
G G G C T G A A A T T G T G C A G G C G T C T C C A C A C C C C C A T C T C A T
C C C G C A T G A T C T C C T C G C C G G C A G G G A C C G T C T C G G G T T C
C T A G C G A A C C C C G A C T T G G T C C G C A G A A G C C G C G C G C C G C
C C A C C C T C C G G C C T T C C C C C A G G C G A G G C C T C T C A G T A C C
C G A G G C T C C C T T T T C T C G A G C C C G C A G C G G C A G C G C T C C C
A G C G G G T C C C C G G G A A G G A G A C A G C T C G G G T A C T G A G G G C
G G G A A A G C A A G G A A G A G G C C A G A T C C C C A T C C C T T G T C C C
T G C G C C G C C G C C G C C G C C G C C G C C G G G A A G C C C G G G G
C C C G G A T G C A G G C A A T T C C A C C A G T C G C T A G A G G C G A A A G
C C C G A C A C C C A G C T T C G G T C A G A G A A A T G A G A G G G A A A G T
A A A A A T G C G T C G A G C T C T G A G G A G A G C C C C C G C T T C T A C C
C G C G C C T C T T C C C G G C A G C C G A A C C C C A A A C A G C C A C C C G
C C A G G A T G C C G C C T C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C C T
G C G C C T C C G C C G C C G C G G G C G C A G G C A C C G C A A C C G C A G C
C C C G C C C C G G G C C C G C C C C C G G G C C C G C C C C G A C C A C G C C
C C G G C C C C G G C C C C G G C C C C T A G C G C G C G A C T C C T G A G T T
C C A G A G C T T G C T A C A G G C T G C G G T T G T T T C C C T C C T T G T T
T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T G T T C A C C
C T C A G C G A G T A C T G T G A G A G C A A G T A G T G G G G A G A G A G G G
T G G G A A A A A C A A A A A C A C A C A C C T C C T A A A C C C A C A C C T G
C T C T T G C T A G A C C C C G C C C C C A A A A G A G A A G C A A C C G G G C
A G C A G G G A C G G C T G A C A C A C C A A G C G T C A T C T T T T A C G T G
G G C G G A A C T T G T C G C T G T T T G A C G C A C C T C T C T T T C C T A G

10

20

30

40

50

C G G G A C A C C G T A G G T T A C G T C T G T C T G T T T T C T A T G T G C G
A T G A C G T T T T C T C A C G A G G C T A G C G A A A T G G G G C G G G G C A
A C T T G T C C T G T T C T T T T A T C T T A A G A C C C G C T C T G G A G G A
G C G T T G G C G C A A T A G C G T G T G C G A A C C T T A A T A G G G G G A G G
C T G C T G G A T C T G G A G A A A G T G A A G A C G A T T T C G T G G T T T T
G A A T G G T T T T G T T T G T G C T T G G T A G G C A G T G G G C G C T C A A
C A C A T A A A T T G G T G G A T G A A A T T T T G T T T T T A C C G T A A G A C
A C T G T T A A G T G C A T T C A A A A C T C C A C T G C A A A C C C T G G T A
G G G G A C A G C T C C G G C A C T G C G G G C G G G A A T C C C A C G G T C C
C C T G C A A A G T C A T C G C A A T T T T G C C T T T A C A T G T A A G A A T
T C T C T C A A G C A T G A T T T T C A C A C T G G G G A A T G T C A T T T T T
G C T A G T T G C A A T A T G T G G A T G A G T T G T T T T T T T T A A C T T
T T G A A A A A C G T A C C A T T C T G T T T G A T G T G T A A A A A C A C A
A A G A T T T T T G A A A C C T T G C G T C T T T T G G T C T G C A G G T G T A
T A G A T T C C A C T T A C T A C A G A T G A G T A G C A T T T A C A C C A C T
C A G A T G T G T A A A A A A C A A A G G T T T T T T A A A C T G T G T G C C
T T T T G A T C T G C A A G T G T G A G A T G G C A C T T A C T A C A G T G A G
T A G C A T T T A A T C T T T T T C A T C A C T A A A A A T C A C A C A G A A C
G T T T T A A T C A T T C A C C G A G G A A G A A A G G G A G G A A T A A A T A
C
A C A A A A T G G C T C T C A A C G T C T A C A C C T T C T G C A G A A A C A G
A C C C T T T T C C T A C T G T T C T A T G C T T T G T G A A A G T T G A T C A
T A C A A A T T G G G T C A T T C T T T T A T A C C C A A C T A A A A T A G T
G G G G G T A G G G G G T A G A A A A G C A C T T A G G A C A A A T G A C A C T
G C T C C C A C A G T G T A A T T C T C T C C A A G T C C A G C T G C T G C A A
C T G C C C G T T G T G A C C T G A G A C C A G T T T T A T C T A A T A G T T G
C T A A A A T G A C C T G C T G C A G C T C T A A T T T T A T C T A C C A C C A
T C A C T C A C C A G T T G A A A C T C A C C A G C T C C T C A G A T C C T T A
A T A G T G C C A A T G A A T T T T C T C A A A G A G C A C T A T G T A A C A T
T T C T C T T T T T T A A C A A A A C C T C C C C C T T T T C T T T G T T G T G
T G G A T A T A C C G A A G A C C A T C T G A T C T A C A T G T A T G C C C T A
A T T G C A A T T C T T T C T T C C C A A A T A A A T C A C T T A A T T T A G A
G A T T C A T C T C T G T A T T T T T A T T T T G A C T G A C A G C T T A T A A
C A A G T A G C T A G C A T T T A C C A A A G T T T C T A C A C T G A G T T G T A
C T T C A C T T A T A C G T G G A A T T A A A A A C A A C T G A A T T T A T A
G A A A C A G A G T A G A C C C T T G G T T G G G G G G C T T G G G G G G A A A
G A A A A T T G T A G G G T A G G G T A C A A A G T T G C A G T T A C G T C T A
A T A C A T C T A G A G A T T T A A T G T A C A A C A T G A G G A C T A G C G T
T A A T A A T T G T G T T A G T C C A T T C T T A C A C T G C T A T A A A G A A
A T A A C T G A A A C T G G G T A A T T T A T A A A G A A A A G T T T A A T G G
C T C A C A G T T C T G C A G G C T G T A C A A G A A G C A T G G C T G G A T C
A G C T T C T G G G C A G G C C A T A G G G A A C T T A A A A T C A T G A T G G
A A G G C A T A G G G A G A C C C C A G A C T T C A C A T G G C A G G A A C T G
G G G G A A G A G A G A A A T G G G A G G T G C T A C A T A C G T T T A A A C A
A C T A G A T C T T G T C A G A A C T C A C T A T A T A G T A C C A A G A G G G
G A C T G T A C A A A A C C A T T A G A A G C C A C C C C A T A A T C C A C T C
A C C T C C C A C C A G G C C C A A C C T C C A A C A C T G G G G A T T A C A G
T T G A A C A T G A G A T T T G G G T G G G G A C A G A G A T C C A A A C C A T
G T T A T T C C A A C T C T G G C C C C T C C C A A A T C T A A T G T C C T T C
T C A T A T T G C A A A A T A C T G T C G T G C C T T A C C A A C A G T T C C C

10

20

30

40

50

CAAAGTCTTAACCTCGATCCAGCATTCATTCAAAAGTCCAA
AGTCCCAAGTCTCACCTGAGACGAAGCTAGTCCCTTCTAC
CTATGAACCTGTAAAATCAAAAACAAGGTAATTGCTTCAA
AGATACAATGGGGGTATAGGCATTTGGGCAGATACTGCCAT
TCCGAAAGGGAGAAATCTGCCAAAAGAAAGAGGGCTATAGG
GCCCCATTGCAAGTCTGAAAGCCAGCCGGGGCAGTCATTAA
ATGTTAAAGCTCTGAAATAATCTCCTTTGACTCACACCCA
GGGAACACTGATGCAATGAGTGGGCTCCCAAAACCTTGGG
CAGAACCAACCCCTGTGGTTTTCCAGGGTTTCATCTCCCA
GCTGCTCTCATGGGCTAGCATTTGAGTGCTTGCAGCTTTTC
CAGGCTGCGAGGGGTGCAAGTTGTTGGTGGATCTACCATTTCT
GGGGTCTGGAGGACGGTGGCTGTCTTGTCTATAGCTCTGCT
AGGCAGTGCCCCAGGGGACTCTCTGTGGGGGGCTGCAACCC
CACATTTCTTCTCCTTGCTTCCCTAGTAGATGTTCTCCAT
GAGGATTTCCACCCCAAGTAACAGGCTTCTGTCTGGACATCC
AGGCTTTTTTTCATACATCCTCTAAAATCTAGGCAGAGCTTC
TTAAGCCTCAACTCTTGCAATTATGTGCGCCCGCCGGCTTC
ACAGCTTATGGAAGCCACCAAGGCTTATGCCCTGGGCACCCCT
GTGAAGCAGCAGCCTGAACCTGTATTCTTACTGGTGAAAGT
TATCTGAGTTACCAGCTGCAAAATCCATGTGGGTCTGCAGC
AACCTCAATTCTTGCCCTCCTCAGAAGAAAGAAATTTGACCA
AGAGGCATAAGGCAGAAAAAGAGACTGCGACAAGTTTTCAG
AGCAGGAGTAAGAGTTTATTTAAAAAGCTTTAGAACAGGAA
TGAAAGGAAAGTACATTTGGAAGAGGGCCCAAGTGGGGCACC
TTGGAGGTCAAGTGCCCTGTTTGACCTTGAAACCTAGGATC
TTATACACTGGCCTACTTCTGACATCTTGTGCCCCCTTTCC
CTTGGTCCCTTCCCTAAGGGTGAGCTTGGCCGCATGCATGGT
GCCCTGCTTGCACCTTGGAAAGGTGAGCGTGTGCAGTGTTGT
TACTGGAGTTGTATACATGCTTACCTGAGGCTTTCTTCCC
TTTTCCGGTGGAATGCCCCCAAGGTCATACTTCACCATT
TTGCCCTCTTAATGTGCATGTTAAGCCCACTCTCTCAGTTC
CTGAGATCTTATTGGAAGCGCCAGTTACCAATTTCAGGT
GTTTCTATCTATTGAGAAGTTGCCCTCTCCCTGGTGCTGGC
TGCAACCAATTACTATTTTATAGAGAGGCAGTATGACAACCTG
CCTGACCATCATCTGATGGTTGCTTGACATTCCTGGTGGG
TGGTGGGGACTTCTCTCTTACCCCACTCATGCCCTGATTAG
CTACCTACTGTAACAGTACCTGGGGCCCTTTGAGCAGCTG
GGATTCAGGGAGCAGAGTCCCAAGGCTGTAAGAGGGGAGCA
GGGGGCCCTAGGCGCTGGCCCAAGGAATGATTCAGTCCCTCCT
AGGCTCTCGGGGCGCTGTGATGAGAGGGGACCACCATGAAAGC
CTAAAATGCCCTATTAGGAACACTTTTACACTGTTTGGTG
ACTGTAAACTAGTTCAACCATTTGTGGAAGTCAAGTGTTGGCG
ATTCCTCAGGGATCTAGAACTAGAAATACCATTTTGACCCA
GCCATCCCATCACTGGGTATATACCCAAAGGACTATAAAT
CCTGCTGCTATAAAGACACATGCACACTATGTTTTATTGTG
GCACTATTCAACAATAGCAAAGACTTGGAAACCAACCCCAAAT
GTCCAACAGTGATAGACTGGATTAAAGAAAAATGTGGGCACAT
ATACACCATGGAATACTATGCAGCCATAAAAAAATGATGAG
TTCATGTCCTTTGTAGGGACATGGATGAAATTTGGAAATCG
TCATTTCTCAGTAAACTATTGCAAGGTCAAAAAAACCAACA

10

20

30

40

50

CCACATGTTCTCACTCATAGGTGGGAATTGAACAATGAGAA
ACACATGGACACAGGAAGGGGGAACATCACACTCTGGGGGAC
TGTGTGGGGGTGGGGGAGGGGGGAGGGGATAGCATTAGGAG
ATATACCTAATGCTAAATGACGAGTTAATGGGGTGACAGCAC
ACCAGCATGGCACATGTATACATATGCAACTAACCTGCAC
ATTGTGCACATGTACCCTAAAACCTTAAAGTATAATAATAA
TAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATGCCTGTTAGTCTCT
ATGAGTCTTTCTCCCCATTGTTTTTGGTTATCAGCCCTTGC
CTTCCTTTTATGTAATTTATGCAAGCCTGCTTGTACT
TCCTCTCCTGAGAACGAGCTTTTCTTTACTACCACATGGC
CAGGCTGCAAAATTTACAAAACCTTTTATGCTCTGCTTCCCT
TTTAAGTGTAAGTTCCAATTTTCAGGTCAATTTCTGTGCTCA
TGCCTATGAGCATAGGCTATTAGAAGCAGCTAGGTTACTT
CTTGAACACTCTGCTGCTTAGAAAATTTCTTCTGCCAGATA
CCCTAAATCATCATTTCTTAAGTCTAAGATTTTCACAGATCC
CTAGAACAGAGGAACAATGCAGCTAAGCTCTTTGCTAAAG
CATAGCAAACCTGACCTTTACTCATTTCCCAATAAATTTCT
CATTTCCATCTGAGACCTCCTCAGCCTGGACTTCACTGTC
TATATCACTATCAGTATTTTGGTTACAACCCTCAACAAG
TTCCTAGCGAGTTCCAACCTTTCTCTCATCTTTCTGTCTT
CTTCTGAGCCCTCTAAAATGTTTTCAACTTCTGCCCTGTTAG
CCGGTTCCAAGTCACTTCTACATTTTTCAGGTATCTTTAT
AGCAATGCCCTTCTTCTCAGTAACAATTTTCTGTATTAGT
CCATTTCTTGCAATTGCTATAAAGAAATACTTTGAGACTGGGT
AATTTACAAAGAAAAGAGGTTTAAATTGACTCATGGTTCTG
CAGGCTGTATAGGAAGCATGGCAGCATCAGCTTCTGGGGA
TGCCTCAGAGAACTTACAA

>NG_031977.2の配列番号17ヌクレオチド3127~5607

GAGTTGGAATAACATGGTTTGGATCTCTGTCCCCACCCAA
ATCTCATGTTCAACTGTAAATCCCCAGTGTTGGAGGTTGGG
CCTGGTGAGGAGGTGAGTGGATTATGGGGTGCGTTCTAATG
GTTTTGTACAGTCCCCCTCTTGGTACTATATAGTGAGTTCT
GACAAGATCTAGTTGTTTAAACGTATGTAGCACCTCCCAT
TTCTCTCTTCCCCCAGTTCTCTGCCATGTGAAGTCTGGGGT
CTCCCTATGCCTTCCATCATGATTTTAAAGTTCCCTATGGC
CTGCCCAGAAAGCTGATCCAGCCCATGCTTCTTGTACAGCCT
GCAGAACTGTGAGCCATTAAACTTTTCTTTATAAATTACC
CAGTTTTCAGTTATTTCTTTATAGCAGTGTAAGAAATGGACT
AACACAATTATTAAACGCTAGTCTCATGTGTACATTAAA
TCTCTAGATGTATTAGACGTAACTGCAACTTTGTACCCCTA
CCCTACAATTTTCTTTCCCCCAGCCCCCAACCAAGGG
TCTACTCTGTTTCTATAAATTCAGTTGTTTTTTAATTCCA
CGTATAAGTGAAGTACAACCTCAGTGTAAGAACTTGGTAAA
TGCTAGCTACTTGTATTAAAGCTGTCAGTCAAAAATAAAAAAT
ACAGAGATGAATCTCTAAATTAAGTGATTTATTGGGGAAG
AAAGAAATTGCAATTAGGGCATACATGTAGATCAGATGGTC
TTCGGTATATCCACACAACAAGAAAAGGGGGAGGTTTTTG
TTAAAAAAGAGAAATGTTACATAGTGCTCTTTGAGAAAAAT
TCATTTGGCACTATTAAAGGATCTGAGGAGCTGGTGAGTTTC
AACTGGTGAGTGATGGTGGTAGATAAAAATTAGAGCTGCAG

10

20

30

40

50

C A G G T C A T T T T T A G C A A C T A T T A G A T A A A A C T G G T C T C A G G
T C A C A A C G G G C A G T T G C A G C A G C T G G A C T T G G A G A G A A T T
A C A C T G T G G G A G C A G T G T C A T T T G T C C T A A G T G C T T T T C T
A C C C C C T A C C C C C A C T A T T T T A G T T G G G T A T A A A A A G A A T
G A C C C A A T T T T G T A T G A T C A A C T T T C A C A A A G C A T A G A A C A
G T A G G A A A A G G G T C T G T T T C T G C A G A A G G T G T A G A C G T T G
A G A G C C A T T T T T G T G T A T T T A T T C C T C C C T T T C T T C C T C G G
T G A A T G A T T A A A A C G T T C T G T G T G A T T T T T A G T G A T G A A A
A A G A T T A A A T G C T A C T C A C T G T A G T A A G T G C C A T C T C A C A
C T T G C A G A T C A A A A G G C A C A C A G T T T A A A A A A C C T T T G T T 10
T T T T T A C A C A T C T G A G T G G T G T A A A T G C T A C T C A T C T G T A
G T A A G T G G A A T C T A T A C A C C T G C A G A C C A A A A G A C G C A A G
G T T T C A A A A A T C T T T G T G T T T T T A C A C A T C A A A C A G A A T
G G T A C G T T T T T C A A A A G T T A A A A A A A A C A A C T C A T C C A C
A T A T T G C A A C T A G C A A A A A T G A C A T T C C C C A G T G T G A A A A
T C A T G C T T G A G A G A A T T C T T A C A T G T A A A G G C A A A A T T G C
G A T G A C T T T G C A G G G G A C C G T G G G A T T C C C G C C C G C A G T G
C C G G A G C T G T C C C C T A C C A G G G T T T G C A G T G G A G T T T T G A
A T G C A C T T A A C A G T G T C T T A C G G T A A A A A C A A A A T T T C A T 20
C C A C C A A T T A T G T G T T G A G C G C C C A C T G C C T A C C A A G C A C
A A A C A A A A C C A T T C A A A A C C A C G A A A T C G T C T T C A C T T T C
T C C A G A T C C A G C A G C C T C C C C T A T T A A G G T T C G C A C A C G C
T A T T G C G C C A A C G C T C C T C C A G A G C G G G T C T T A A G A T A A A
A G A A C A G G A C A A G T T G C C C C G C C C C A T T T C G C T A G C C T C G
T G A G A A A A C G T C A T C G C A C A T A G A A A A C A G A C A G A C G T A A
C C T A C G G T G T C C C G C T A G G A A A G A G A G G T G C G T C A A A C A G
C G A C A A G T T C C G C C C A C G T A A A A G A T G A C G C T T G G T G T G T
C A G C C G T C C C T G C T G C C C G G T T G C T T C T C T T T T G G G G G C G
G G G T C T A G C A A G A G C A G G T G T G G G T T T A G G A G G T G T G T G T 30
T T T T G T T T T T C C C A C C C T C T C T C C C C A C T A C T T G C T C T C A
C A G T A C T C G C T G A G G G T G A A C A A G A A A A G A C C T G A T A A A G
A T T A A C C A G A A G A A A A C A A G G A G G G A A A C A A C C G C A G C C T
G T A G C A A G C T C T G G A A C T C A G G A G T C G C G C G C T A G G G G C C
G G G G C C G G G G C C G G G G C G T G G T C G G G G C G G G C C C G G G G G C
G G G C C C G G G G C G G G G C T G C G G T T G C G G T G C C T G C G C C C G C
G G C G G C G G A G G C G C A G G C G G T G G C G A G T G G G T G A G T G A G G
A G G C G G C A T C C T G G C G G G T G G C T G T T T G G G G T T C G G C T G C
C G G G A A G A G G C G C G G G T A G A A G C G G G G G C T C T C C T C A G A G
C T C G A C G C A T T T T T A C T T T C C C T C T C A T T T C T C T G A C C G A 40
A G C T G G G T G T C G G G C T T T C G C C T C T A G C G A C T G G T G G A A T
T

> 配列番号 17 の配列番号 18 逆相補体 (hg38__dna range=chr9:2
7573260-27575740)

A A T T C C A C C A G T C G C T A G A G G C G A A A G C C C G A C A C C C A G C
T T C G G T C A G A G A A A T G A G A G G G A A A G T A A A A A T G C G T C G A
G C T C T G A G G A G A G C C C C G C T T C T A C C C G C G C C T C T T C C C
G G C A G C C G A A C C C C A A A C A G C C A C C C G C C A G G A T G C C G C C
T C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C C T G C G C C T C C G C C G C
C G C G G G C G C A G G C A C C G C A A C C G C A G C C C C G C C C C G G G C C
C G C C C C C G G G C C C G C C C C G A C C A C G C C C C G G C C C C G G C C C 50

C G G C C C C T A G C G C G C G A C T C C T G A G T T C C A G A G C T T G C T A
C A G G C T G C G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A
T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T G T T C A C C C T C A G C G A G T A C T
G T G A G A G C A A G T A G T G G G G A G A G A G G G T G G G A A A A A C A A A
A A C A C A C A C C T C C T A A A C C C A C A C C T G C T C T T G C T A G A C C
C C G C C C C C A A A A G A G A A G C A A C C G G G C A G C A G G G A C G G C T
G A C A C A C C A A G C G T C A T C T T T T A C G T G G G C G G A A C T T G T C
G C T G T T T G A C G C A C C T C T C T T T C C T A G C G G G A C A C C G T A G
G T T A C G T C T G T C T G T T T T C T A T G T G C G A T G A C G T T T T C T C
A C G A G G C T A G C G A A A T G G G G C G G G G C A A C T T G T C C T G T T C
T T T T A T C T T A A G A C C C G C T C T G G A G G A G C G T T G G C G C A A T
A G C G T G T G C G A A C C T T A A T A G G G G A G G C T G C T G G A T C T G G
A G A A A G T G A A G A C G A T T T C G T G G T T T T G A A T G G T T T T G T T
T G T G C T T G G T A G G C A G T G G G C G C T C A A C A C A T A A T T G G T G
G A T G A A A T T T T G T T T T T A C C G T A A G A C A C T G T T A A G T G C A
T T C A A A A C T C C A C T G C A A A C C C T G G T A G G G G A C A G C T C C G
G C A C T G C G G G C G G G A A T C C C A C G G T C C C C T G C A A A G T C A T
C G C A A T T T T G C C T T T A C A T G T A A G A A T T C T C T C A A G C A T G
A T T T T C A C A C T G G G G A A T G T C A T T T T T G C T A G T T G C A A T A
T G T G G A T G A G T T G T T T T T T T T T A A C T T T T G A A A A A C G T A C
C A T T C T G T T T G A T G T G T A A A A A A C A C A A A G A T T T T T G A A A
C C T T G C G T C T T T T G G T C T G C A G G T G T A T A G A T T C C A C T T A
C T A C A G A T G A G T A G C A T T T A C A C C A C T C A G A T G T G T A A A A
A A A C A A A G G T T T T T T A A A C T G T G T G C C T T T T G A T C T G C A A
G T G T G A G A T G G C A C T T A C T A C A G T G A G T A G C A T T T A A T C T
T T T T C A T C A C T A A A A A T C A C A C A G A A C G T T T T A A T C A T T C
A C C G A G G A A G A A A G G G A G G A A T A A A T A C A C A A A A T G G C T C
T C A A C G T C T A C A C C T T C T G C A G A A A C A G A C C C T T T T C C T A
C T G T T C T A T G C T T T G T G A A A G T T G A T C A T A C A A A T T G G G T
C A T T C T T T T T A T A C C C A A C T A A A A T A G T G G G G G T A G G G G G
T A G A A A A G C A C T T A G G A C A A A T G A C A C T G C T C C C A C A G T G
T A A T T C T C T C C A A G T C C A G C T G C T G C A A C T G C C C G T T G T G
A C C T G A G A C C A G T T T T A T C T A A T A G T T G C T A A A A T G A C C T
G C T G C A G C T C T A A T T T T A T C T A C C A C C A T C A C T C A C C A G T
T G A A A C T C A C C A G C T C C T C A G A T C C T T A A T A G T G C C A A T G
A A T T T T C T C A A A G A G C A C T A T G T A A C A T T T T C T C T T T T T A
A C A A A A C C T C C C C C T T T T C T T T G T T G T G T G G A T A T A C C G A
A G A C C A T C T G A T C T A C A T G T A T G C C C T A A T T G C A A T T C T T
T C T T C C C A A A T A A A T C A C T T A A T T T A G A G A T T C A T C T C T G
T A T T T T T A T T T T G A C T G A C A G C T T A T A A C A A G T A G C T A G C
A T T T A C C A A G T T T C T A C A C T G A G T T G T A C T T C A C T T A T A C
G T G G A A T T A A A A A A C A A C T G A A T T T A T A G A A A C A G A G T A G
A C C C T T G G T T G G G G G G C T T G G G G G G A A A G A A A A T T G T A G G
G T A G G G T A C A A A G T T G C A G T T A C G T C T A A T A C A T C T A G A G
A T T T A A T G T A C A A C A T G A G G A C T A G C G T T A A T A A T T G T G T
T A G T C C A T T C T T A C A C T G C T A T A A A G A A A T A A C T G A A A C T
G G G T A A T T T A T A A A G A A A A G T T T A A T G G C T C A C A G T T C T G
C A G G C T G T A C A A G A A G C A T G G C T G G A T C A G C T T C T G G G C A
G G C C A T A G G G A A C T T A A A A T C A T G A T G G A A G G C A T A G G G A
G A C C C C A G A C T T C A C A T G G C A G G A A C T G G G G G A A G A G A G A

10

20

30

40

50

A A T G G G A G G T G C T A C A T A C G T T T A A A C A A C T A G A T C T T G T
C A G A A C T C A C T A T A T A G T A C C A A G A G G G G A C T G T A C A A A A
C C A T T A G A A G C C A C C C C A T A A T C C A C T C A C C T C C C A C C A G
G C C C A A C C T C C A A C A C T G G G G A T T A C A G T T G A A C A T G A G A
T T T G G G T G G G G A C A G A G A T C C A A A C C A T G T T A T T C C A A C T
C

> N G _ 0 3 1 9 7 7 . 2 の配列番号 1 9 ヌクレオチド 5 1 2 7 ~ 5 6 0 7

G G G T C T A G C A A G A G C A G G T G T G G G T T T A G G A G G T G T G T G T
T T T T G T T T T T C C C A C C C T C T C T C C C C A C T A C T T G C T C T C A
C A G T A C T C G C T G A G G G T G A A C A A G A A A A G A C C T G A T A A A G
A T T A A C C A G A A G A A A A C A A G G A G G G A A A C A A C C G C A G C C T
G T A G C A A G C T C T G G A A C T C A G G A G T C G C G C G C T A G G G G C C
G G G G C C G G G G C C G G G G C G T G G T C G G G G C G G G C C C G G G G G C
G G G C C C G G G G C G G G G C T G C G G T T G C G G T G C C T G C G C C C G C
G G C G G C G G A G G C G C A G G C G G T G G C G A G T G G G T G A G T G A G G
A G G C G G C A T C C T G G C G G G T G G C T G T T T G G G G T T C G G C T G C
C G G G A A G A G G C G C G G G T A G A A G C G G G G G C T C T C C T C A G A G
C T C G A C G C A T T T T T A C T T T C C C T C T C A T T T C T C T G A C C G A
A G C T G G G T G T C G G G C T T T C G C C T C T A G C G A C T G G T G G A A T
T

> 配列番号 1 9 の配列番号 2 0 逆相補体 (h g 3 8 _ d n a r a n g e = c h r 9 : 2
7 5 7 3 2 6 0 - 2 7 5 7 3 7 4 0)

A A T T C C A C C A G T C G C T A G A G G C G A A A G C C C G A C A C C C A G C
T T C G G T C A G A G A A A T G A G A G G G A A A G T A A A A A T G C G T C G A
G C T C T G A G G A G A G C C C C G C T T C T A C C C G C G C C T C T T C C C
G G C A G C C G A A C C C C A A A C A G C C A C C C G C C A G G A T G C C G C C
T C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C C T G C G C C T C C G C C G C
C G C G G G C G C A G G C A C C G C A A C C G C A G C C C C G C C C C G G G C C
C G C C C C C G G G C C C G C C C C G A C C A C G C C C C G G C C C C G G C C C
C G G C C C C T A G C G C G C G A C T C C T G A G T T C C A G A G C T T G C T A
C A G G C T G C G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A
T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T G T T C A C C C T C A G C G A G T A C T
G T G A G A G C A A G T A G T G G G G A G A G A G G G T G G G A A A A A C A A A
A A C A C A C A C C T C C T A A A C C C A C A C C T G C T C T T G C T A G A C C
C

配列番号 2 1

C A G C T T C G G T C A G A G A A A T G A G A G G G A A A G T A A A A A T G C G
T C G A G C T C T

配列番号 2 2

C G C G A C T C C T G A G T T C C A G A G C T T G C T A C A G G C

配列番号 2 3

A G G C T G C G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T

配列番号 2 4

G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C
A G G T C T T T T C T T G T T C A C C C T C A G C G A G T A C T G T G A G A G

配列番号 2 5

C T C A G C G A G T A C T G T G A G A G C A A G

配列番号 2 6

A C C T C C T A A A C C C A C A C C T G C T C T T G C T A G A C C

配列番号 2 7

C A G C T T C G G T C A G A G A A A T G A G A G G G A A A G T A A A A A T G C G
T C G A G C T C

配列番号 2 8

C G C G A C T C C T G A G T T C C A G A G C T T

配列番号 2 9

G A C T C C T G A G T T C C A G A G C T T G C T A C A G G C

配列番号 3 0

G G C T G C G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T

配列番号 3 1

G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C
A G G T C T T T T C T T G T T C A C C C T C A G C G A G T A C T G T G A G A G

10

配列番号 3 2

C A G C T T C G G T C A G A G A A A T G A G A G G G A A A G T A A A A A T G C G
T C G A G C

配列番号 3 3

A C T C C T G A G T T C C A G A G C T T G C T A C A G

配列番号 3 4 C T G C G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T

配列番号 3 5

G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A T C T T T

配列番号 3 6

T T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T G T T C A C
C C T C A G C G A G

20

配列番号 3 7

G A G A G G G A A A G T A A A A A T G C G T C G 配列番号 3 8

G G T T G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A T C T T T

配列番号 3 9

T T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T G T T C A C
C C T C A G C G

配列番号 4 0

G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A T C T T T

30

配列番号 4 1

T T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T G T T C A C
C C T C A G C

配列番号 4 2

G T T T C C C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T

配列番号 4 3

C T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A T C T T T

配列番号 4 4

T T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T G T T C A C
C C

40

配列番号 4 5

T C C T T G T T T T C T T C T G G T T A A T C T T T

配列番号 4 6

T T T C T T C T G G T T A A T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T

配列番号 4 7

A T C T T T A T C A G G T C T T T T C T T G T T C A C C C

配列番号 5 1

T G C G T C A A A C A G C G A C A A G T T C C G C

配列番号 5 2

G C C C A C G T A A A A G A T G A C G C T T G G T G T G T C

50

配列番号 5 3

C T T G C T C T C A C A G T A C T C G C T G A G G G

配列番号 5 4

T C G C T G A G G G T G A A C A A G A A A A G A C C T G A T A A A G A T T A A C
C A G A A G A A A A C A A G G A G G

配列番号 5 5

T T A C T T T C C C T C T C A T T T T C T C T G A C C G

配列番号 5 6

T C C C T C T C A T T T T C T C T G A C C G A A G C T

配列番号 5 7

G G A G A C G C C T G C A C A A T T T C A G C C C A A G C T T C T A G A G A G T

配列番号 5 8

C A G C C C A A G C T T C T A G A G A G T G G T G A T G A C T T G C

配列番号 5 9

T A G A G A G T G G T G A T G A C T T G C A T A T G A G G

配列番号 6 0

C T G T G G G A C A T G A C C T G G T T G C T T

配列番号 6 1

G G A C A T G A C C T G G T T G C T T C A C A G C T C C 配列番号 6 2

C C T G G T T G C T T C A C A G C T C C G A G A T G A C A C A G A C T T G C T T
A A A G G A A G T G A

配列番号 6 3

T G C G T C A A A C A G C G A C A A G T T C C G C

配列番号 6 4

C C C A C G T A A A A G A T G A C G C T T G G T G T

配列番号 6 5

G T A A A A G A T G A C G C T T G G T G T G T C

配列番号 6 6

C T T G C T C T C A C A G T A C T C G C T G A G G G

配列番号 6 7

T C G C T G A G G G T G A A C A A G A A A A G A C C T G A T A A A G A T T A A C
C A G A A G A A A A C A A G G A G G

配列番号 6 8

T T A C T T T C C C T C T C A T T T T C T C T G A C C G

配列番号 6 9

T C C C T C T C A T T T T C T C T G A C C G A A G C

配列番号 7 0

C G C C T G C A C A A T T T C A G C C C A A G C T T C T A G A G A G T

配列番号 7 1

C C A A G C T T C T A G A G A G T G G T G A T G A

配列番号 7 2

T A G A G A G T G G T G A T G A C T T G C A T A T G

配列番号 7 3

G G A C A T G A C C T G G T T G C T T C A C A G C T C C

配列番号 7 4

C T C C G A G A T G A C A C A G A C T T G C T T

配列番号 7 5

G A G A T G A C A C A G A C T T G C T T A A A G G A A

配列番号 7 6

G C G T C A A A C A G C G A C A A G T T C C G C

10

20

30

40

50

配列番号 7 7

G T A A A A G A T G A C G C T T G G T G T G T C

配列番号 7 8

T G A A C A A G A A A A G A C C T G A T A A A G A T T A A C C A G A A G A A A A
C A A G G A G G

配列番号 7 9

T T A C T T T C C C T C T C A T T T C T C T G A C

配列番号 8 0

C C A A G C T T C T A G A G A G T G G T G A T G

配列番号 8 1

A T G A C C T G G T T G C T T C A C A G C T C C

配列番号 8 2

C T C C G A G A T G A C A C A G A C T T G C T T 配列番号 8 3

G A G A T G A C A C A G A C T T G C T T A A A G G A

配列番号 8 4

G C G T C A A A C A G C G A C A A G T T C C G C

配列番号 8 5

T G A A C A A G A A A A G A C C T G A T A A A G A T T A A C C A G A A G A A A A
C A A G G A G G

配列番号 8 6

T T A C T T T C C C T C T C A T T T C T C T G A

配列番号 8 7

A T G A C C T G G T T G C T T C A C A G C T C C

配列番号 8 8

C T C C G A G A T G A C A C A G A C T T G C T T

配列番号 8 9

G A G A T G A C A C A G A C T T G C T T A A A G G A

配列番号 9 0

A G A A A A G A C C T G A T A A A G A T T A A C

配列番号 9 1

A A G A C C T G A T A A A G A T T A A C C A G A

配列番号 9 2

T T A C T T T C C C T C T C A T T T C T C T G A

配列番号 9 3

C T C C G A G A T G A C A C A G A C T T G C T T

配列番号 9 4

> h g 3 8 _ _ d n a

g t t t a a a c T C C C C C A G G C G A G G C C T C T C A G T A C C C G A G G C
T C C C T T T T C T C G A G C C C G C A G C G G C A G C G C T C C C A G C G G G
T C C C C G G G A A G G A G A C A G C T C G G G T A C T G A G G G C G G G A A A
G C A A G G A A G A G G C C A G A T C C C C A T C C C T T G T C C C T G C G C C
G C C G C C G C C G C C G C C G C C G C C G G G A A G C C C G G G G C C C G G A
T G C A G G C A A T T C C A C C A G T C G C T A G A G G C G A A A G C C C G A C
A C C C A G C T T C G G T C A G A G A A A T G A G A G G G A A A G T A A A A A T
G C G T C G A G C T C T G A G G A G A G C C C C C G C T T C T A C C C G C G C C
T C T T C C C G G C A G C C G A A C C C C A A A C A G C C A C C C G C C A G G A
T G C C G C C T C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C C T G C G C C T
C C G C C G C C G C G G G C G C A G G C A C C G C A A C C G C A G C C C C G C C
C C G G G C C C G C C C C C G G G C C C G C C C C G A C C A C G C C C C G G C C
C C G G C C C C G G C C C C T A G C G C G C G A C T C C T G A G T T C C A G A G

10

20

30

40

50

CTTGCTACAGGCTGCGGTTTGTTCCTCCTTGTTCCTTCCTTC
TGGTTAATCTTTATCAGGTCCTTTTCTTGTTCACCCCTCAGC
GAGTACTGTGAGAGCAAGTAGTGGGGAGAGAGGGGTGGGAA
AAACAAAAACACACACCTCCTAAACCCACACCTGCTCTTG
CTAGACCCGCGGGCCGC

配列番号 100

GGGGCC

【図面】

【図 1】

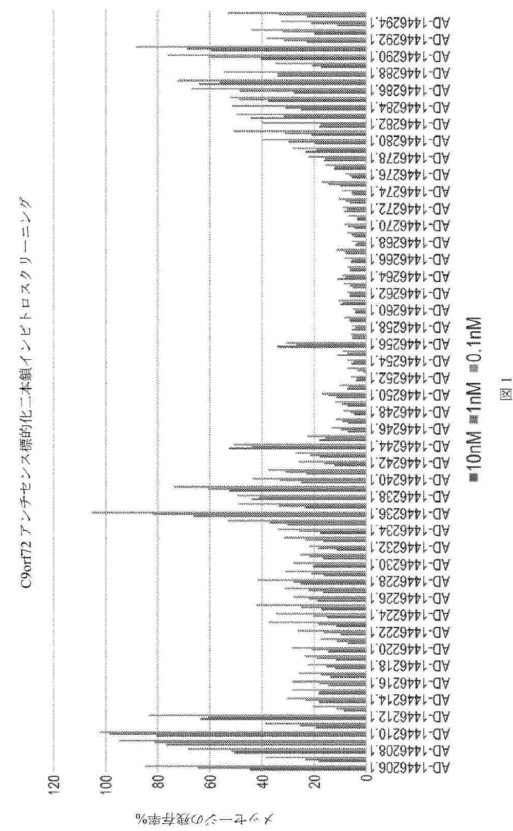


図 1

【図 2】

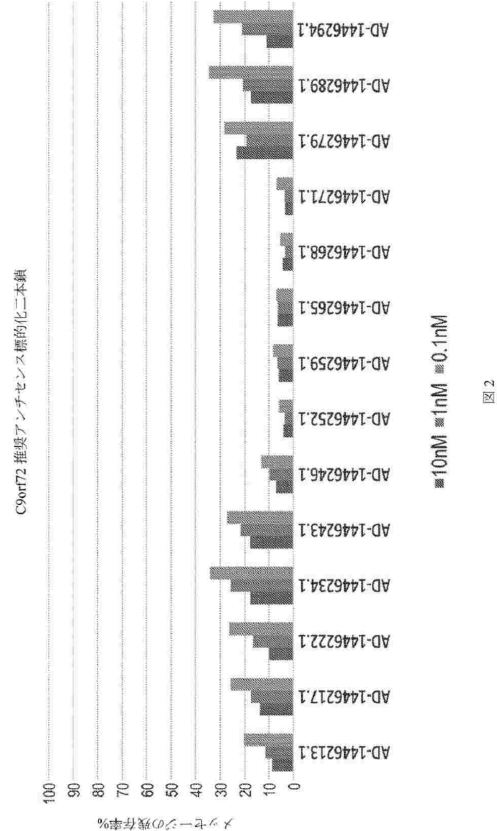


図 2

10

20

30

40

50

【図 3】

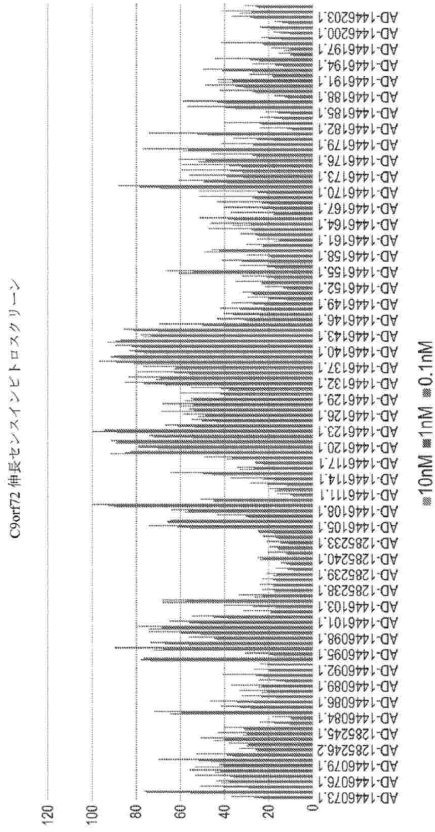


図 3

【図 4】

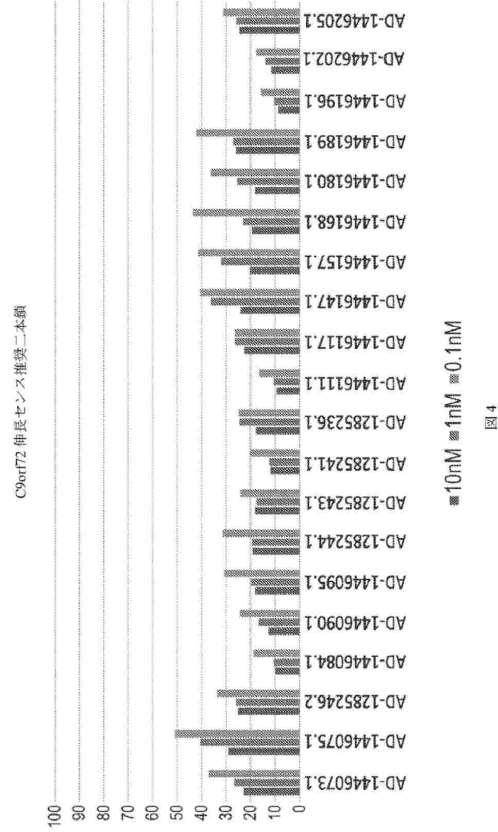


図 4

【図 5 A】

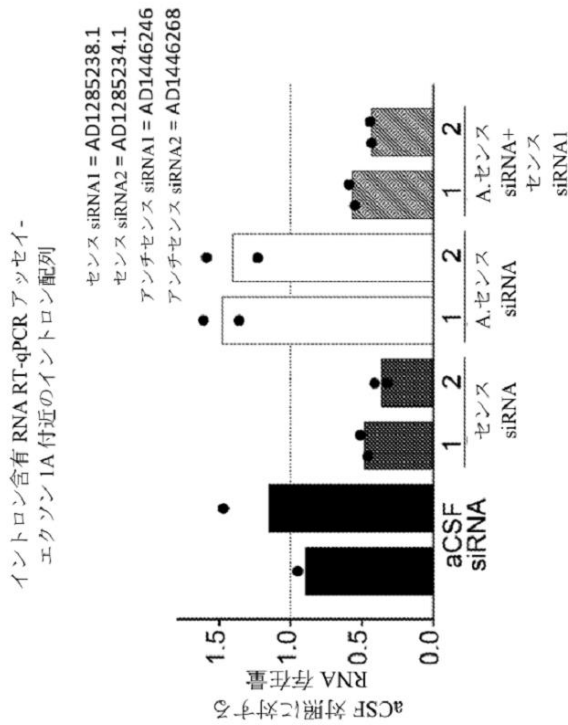


図 5A

【図 5 B】

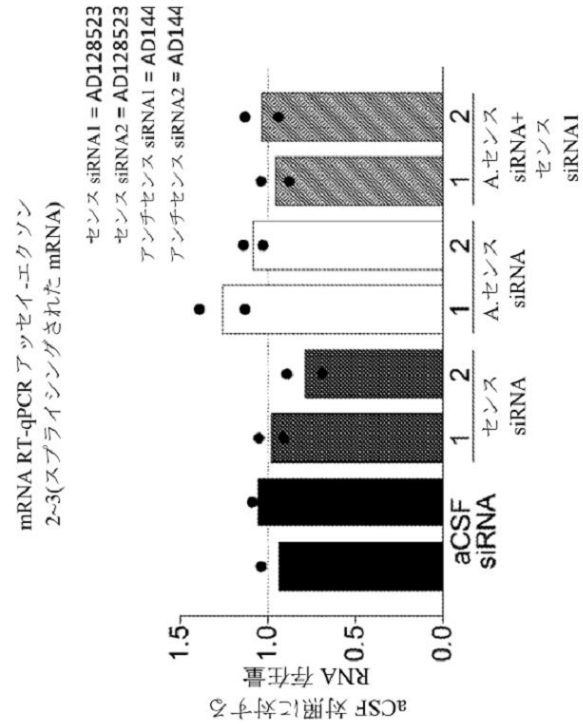


図 5B

10

20

30

40

50

【図 6 A】

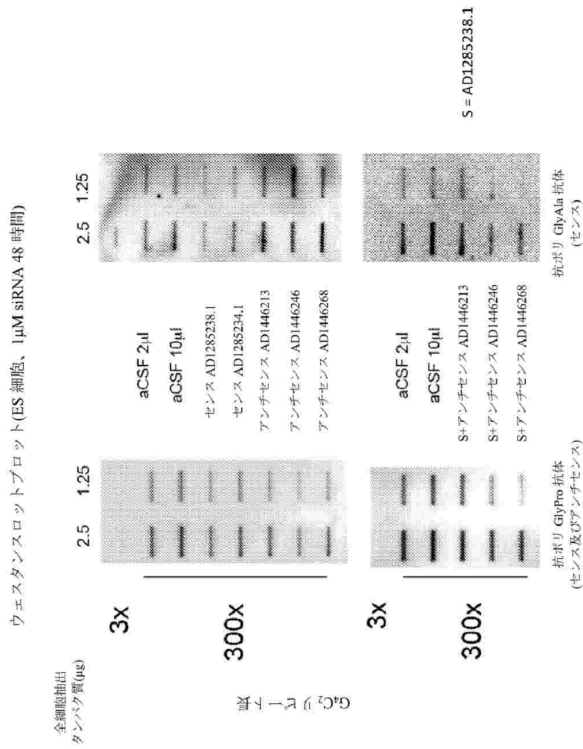


図 6A

【図 6 B】

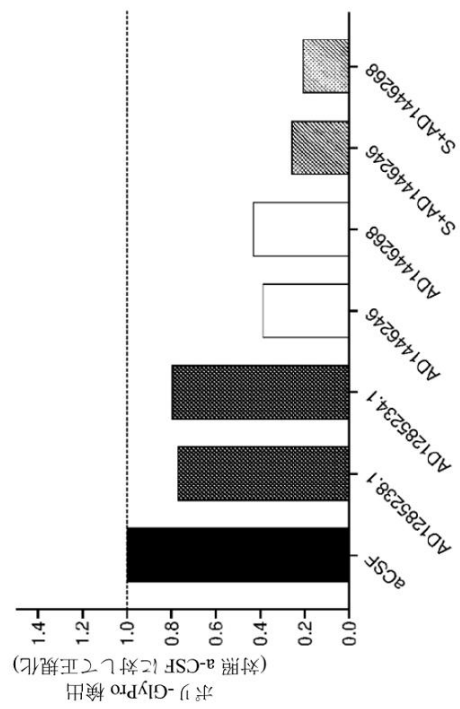


図 6B

【図 6 C】

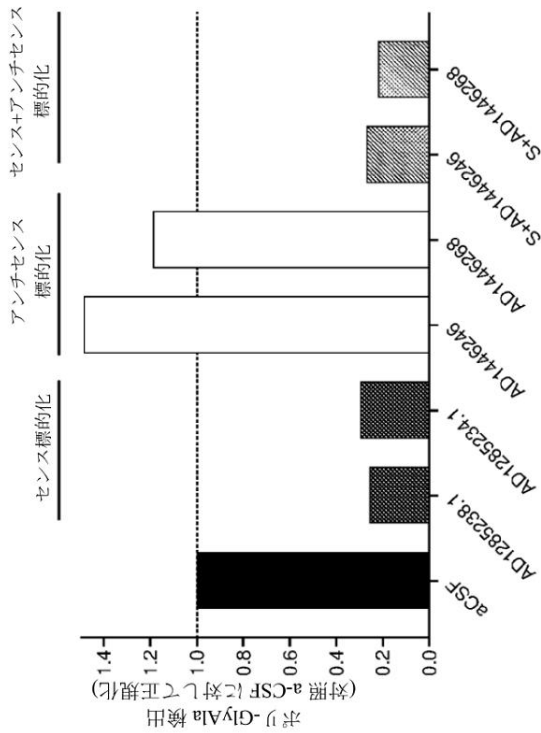


図 6C

【図 7】

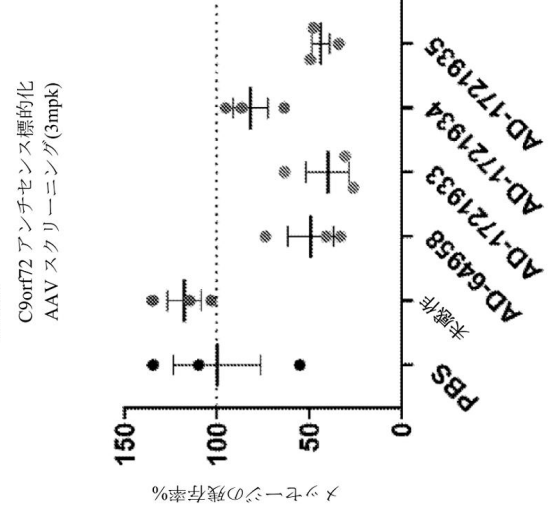


図 7

10

20

30

40

50

【図 8】

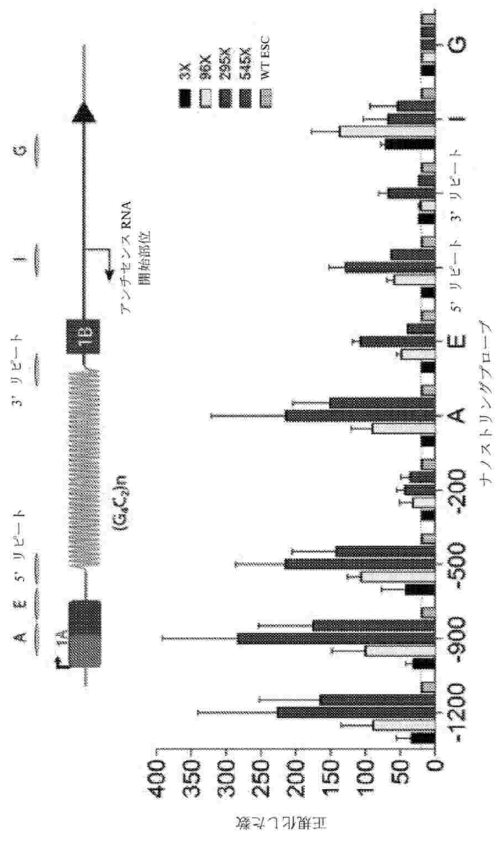


図 8

【配列表】

2024521907000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/031519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. **C12N15/113 A61K31/713 A61P25/28**
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/205605 A2 (UNIV MASSACHUSETTS [US]) 8 October 2020 (2020-10-08) paragraphs [0009] - [0013], [0093] - [0095], [0140], [0141], [0195], [0196], [0201] - [0203], [0208] - [0211]; claims 1-20, 27, 30, 42, 46, 57; figures 2, 3, 22; examples 1, 2; tables 1, 2 paragraphs [0273], [0354], [0430] - [0432], [0439], [0479] -----	1-6, 15, 17-90, 170-200
A	WO 2021/081236 A1 (APPLIED GENETIC TECH CORPORATION [US]) 29 April 2021 (2021-04-29) page 32 - page 36; claims 5-16, 26, 27, 38, 44; example 3 ----- -/-	1-6, 15, 17-90, 170-200

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 October 2022

Date of mailing of the international search report

19/12/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/031519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/079291 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS INC [US]; UNIV TEXAS [US]) 11 May 2017 (2017-05-11) page 34; examples 1-4 -----	1-6,15, 17-90, 170-200
A	HU JIAXIN ET AL: "Engineering Duplex RNAs for Challenging Targets: Recognition of GGGGCC/CCCCGG Repeats at the ALS/FTD C9orf72 Locus", CHEMISTRY & BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 22, no. 11, 12 November 2015 (2015-11-12), pages 1505-1511, XP029306633, ISSN: 1074-5521, DOI: 10.1016/J.CHEMBIOL.2015.09.016 figure 1; table 1 -----	1-6,15, 17-90, 170-200
A	WO 2019/032607 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD [SG]; DODART JEAN COSME [US] ET AL.) 14 February 2019 (2019-02-14) WV-3698; page 225 - page 226; claims 1-13,52,55,56,60; examples 3,4,9 -----	1-6,15, 17-90, 170-200
A	WO 2019/217459 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]) 14 November 2019 (2019-11-14) paragraphs [0040] - [0046], [0333] - [0382], [0558] - [0563], [0514], [0515]; claims 1-31,38,47-52 -----	1-6,15, 17-90, 170-200
A	WO 2020/227395 A2 (UNIV MASSACHUSETTS [US]; BROWN ROBERT [US]; TRAN HELENE [US]) 12 November 2020 (2020-11-12) page 15 - page 16; claims 1,49,50,89,90; example 6 -----	1-6,15, 17-90, 170-200
A	ANDREW G.L. DOUGLAS: "Non-coding RNA in C9orf72-related amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A perfect storm of dysfunction", NON-CODING RNA RESEARCH, vol. 3, no. 4, 10 September 2018 (2018-09-10), pages 178-187, XP055730876, ISSN: 2468-0540, DOI: 10.1016/j.ncrna.2018.09.001 figure 2 ----- -/--	1-6,15, 17-90, 170-200

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/031519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAYL KEITH ET AL: "Disease Mechanisms and Therapeutic Approaches in C9orf72 ALS-FTD", BIOMEDICINES, vol. 9, no. 6, 25 May 2021 (2021-05-25), page 601, XP055962130, DOI: 10.3390/biomedicines9060601 page 5 - page 6; figure 1 -----	1-6, 15, 17-90, 170-200

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/031519

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/031519**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-6, 15, 17-90, 170-200(all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2022 /031519

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6, 15, 17-90, 170-200 (all partially)

A double stranded ribonucleic acid (dsRNA) agent for reducing the level of a C9orf72 antisense RNA transcript, wherein the dsRNA agent comprises a sense strand and an antisense strand forming a double stranded region, wherein the sense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 17, and the antisense strand comprises a nucleotide sequence comprising at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the corresponding portion of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 18; and wherein the sense strand, the antisense strand, or both the sense strand and the antisense strand comprises at least one modified nucleotide, wherein the sense strand is the first sense strand of the sense strands in Table 2, i. e. ccgaggcuccuuucucgaa.

2-30. claims: 1-6, 15, 17-90, 170-200 (all partially)

A double stranded ribonucleic acid (dsRNA) agent for reducing the level of a C9orf72 antisense RNA transcript, wherein the dsRNA agent comprises a sense strand and an antisense strand forming a double stranded region, wherein the sense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 17, and the antisense strand comprises a nucleotide sequence comprising at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the corresponding portion of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 18; and wherein the sense strand, the antisense strand, or both the sense strand and the antisense strand comprises at least one modified nucleotide, wherein in each separate invention the sense strand is one of the sense strands in Tables 2, 3, 10A, 10C, 11 and 12.

31-60. claims: 7-14, 16-90, 170-200 (all partially)

A double stranded ribonucleic acid (dsRNA) agent for reducing the level of a C9orf72 sense RNA transcript, wherein the dsRNA agent comprises a sense strand and an antisense strand forming a double stranded region, wherein in each separate invention the antisense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from one of the antisense nucleotide sequences in any one of Tables 5, 6, 10B, and 10D; and wherein the sense strand, the antisense strand, or both the sense strand and the antisense strand comprises at least one modified nucleotide.

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2022 /031519

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

61. claims: 91-169(completely); 170-200(partially)

A composition comprising two or more double stranded ribonucleic acid (dsRNA) agents for inhibiting expression of C9orf72, wherein each dsRNA agent independently comprises a sense strand and an antisense strand forming a double stranded region, wherein a first dsRNA agent targeting the antisense strand of C9orf72 is selected from the dsRNA agents recited in claim 91 and wherein a second dsRNA agent targeting the sense strand of C9orf72 is selected from the dsRNA agents recited in claim 91.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/031519

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020205605 A2	08-10-2020	AU 2020252020 A1	11-11-2021
		CA 3133784 A1	08-10-2020
		EP 3946374 A2	09-02-2022
		JP 2022528487 A	13-06-2022
		US 2020385737 A1	10-12-2020
		WO 2020205605 A2	08-10-2020
WO 2021081236 A1	29-04-2021	AU 2020370291 A1	12-05-2022
		CA 3158518 A1	29-04-2021
		EP 4048794 A1	31-08-2022
		IL 292384 A	01-06-2022
		US 2021147873 A1	20-05-2021
		WO 2021081236 A1	29-04-2021
WO 2017079291 A1	11-05-2017	US 2018318330 A1	08-11-2018
		WO 2017079291 A1	11-05-2017
WO 2019032607 A1	14-02-2019	AR 112779 A1	11-12-2019
		AU 2018316159 A1	06-02-2020
		CA 3072076 A1	14-02-2019
		CN 110996968 A	10-04-2020
		CN 111032057 A	17-04-2020
		EP 3664815 A1	17-06-2020
		EP 3664816 A1	17-06-2020
		JP 2020534253 A	26-11-2020
		JP 2020534254 A	26-11-2020
		KR 20200035301 A	02-04-2020
		SG 11202000274R A	27-02-2020
		TW 201920672 A	01-06-2019
		US 2020362337 A1	19-11-2020
		US 2021032620 A1	04-02-2021
		WO 2019032607 A1	14-02-2019
		WO 2019032612 A1	14-02-2019
WO 2019217459 A1	14-11-2019	AU 2019266207 A1	17-12-2020
		BR 112020022546 A2	02-02-2021
		CA 3098623 A1	14-11-2019
		CN 112400018 A	23-02-2021
		EP 3790970 A1	17-03-2021
		JP 2021522810 A	02-09-2021
		KR 20210018267 A	17-02-2021
		SG 11202010910Q A	30-12-2020
		TW 202016301 A	01-05-2020
		US 2022125823 A1	28-04-2022
		WO 2019217459 A1	14-11-2019
WO 2020227395 A2	12-11-2020	CN 114072501 A	18-02-2022
		EP 3966328 A2	16-03-2022
		US 2020385723 A1	10-12-2020
		WO 2020227395 A2	12-11-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード (参考)

A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 K	31/712 (2006.01)	A 6 1 K	31/712
A 6 1 K	31/7125 (2006.01)	A 6 1 K	31/7125
A 6 1 K	31/7115 (2006.01)	A 6 1 K	31/7115

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B R I J

2. L A B R A S O L

3. P Y T H O N

ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 番

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ダン, ラン ティ ホアン

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート
6 7 5、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア

(72)発明者 マキニンチ, ジェイムズ ディ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート
6 7 5、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア

(72)発明者 グエン, トゥエン エム

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート
6 7 5、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア

(72)発明者 シャルマーカニング、アールティ

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード
7 7 7、リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 フレンドウェイ, デイビッド

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード
7 7 7、リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 サベッジ, プリタニー

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード
7 7 7、リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 BA01 CA23 CA44

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 NA14 ZA02
ZA15 ZA94