

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-525611
(P2024-525611A)

(43)公表日 令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/11 (2006.01) C 1 2 N 15/11 Z Z N A 4 B 0 6 5

C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10 4 H 0 4 5

C 1 2 N 5/077(2010.01) C 1 2 N 5/077

C 0 7 K 16/28 (2006.01) C 0 7 K 16/28

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全173頁)

(21)出願番号	特願2024-500479(P2024-500479)	(71)出願人	521048956
(86)(22)出願日	令和4年7月8日(2022.7.8)		ダイン セラピューティクス, インコーポレーテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年3月11日(2024.3.11)		DYNE THERAPEUTICS, INC.
(86)国際出願番号	PCT/US2022/073527		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02451、ウォルサム、トラペロ ロード 1560
(87)国際公開番号	WO2023/283613		1560 Trapelo Road, Waltham, MA 02451, United States of America
(87)国際公開日	令和5年1月12日(2023.1.12)	(74)代理人	110003971
(31)優先権主張番号	63/219,999		弁理士法人葛和国際特許事務所
(32)優先日	令和3年7月9日(2021.7.9)	(72)発明者	デジャルダン, コディ, エー.
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く
(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		

(54)【発明の名称】 筋標的化複合体およびジストロフィンパチーを処置するためのその使用

(57)【要約】

本開示の側面は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体に関する。いくつかの態様において、筋標的化剤は、筋細胞上の内在化する細胞表面受容体へ特異的に結合する。いくつかの態様において、分子ペイロードは、機能性ジストロフィンタンパク質の発現または活性を促進する。いくつかの態様において、分子ペイロードは、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチド、例として、変異DMD対立遺伝子から発現されるmRNAにおいてエクソンスキッピングを引き起こすオリゴヌクレオチドである。

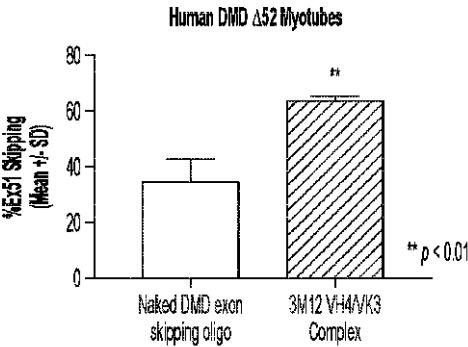


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DMDプレ-mRNAにおいてエクソン55のスキッピングを誘導するように構成されたオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体1(TfR1)抗体を含む複合体であって、オリゴヌクレオチドが、配列番号160~779のいずれか1つの少なくとも8個の連続するヌクレオチドと相補的である相補性領域を含む、複合体。

【請求項 2】

抗TfR1抗体が、

(i) 配列番号33の重鎖相補性決定領域1(CDR-H1)、配列番号34の重鎖相補性決定領域2(CDR-H2)、配列番号35の重鎖相補性決定領域3(CDR-H3)、配列番号36の軽鎖相補性決定領域1(CDR-L1)、配列番号37の軽鎖相補性決定領域2(CDR-L2)および配列番号32の軽鎖相補性決定領域3(CDR-L3);

10

(ii) 配列番号7のCDR-H1、配列番号8のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

(iii) 配列番号7のCDR-H1、配列番号20のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

(iv) 配列番号7のCDR-H1、配列番号24のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

(v) 配列番号51のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3;

20

(vi) 配列番号64のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3;または

(vii) 配列番号67のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3

を含む、請求項1に記載の複合体。

【請求項 3】

抗TfR1抗体が、

(i) 配列番号76と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH);および/または配列番号75と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL);

(ii) 配列番号69と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

30

(iii) 配列番号71と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(iv) 配列番号72と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(v) 配列番号73と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号74と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(vi) 配列番号73と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号75と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(vii) 配列番号76と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号74と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

40

(viii) 配列番号77と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号78と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(ix) 配列番号79と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号80と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;または

(x) 配列番号77と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号80と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL、

を含む、請求項1または請求項2に記載の複合体。

【請求項 4】

抗TfR1抗体が、

50

(i) 配列番号76のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号75のアミノ酸配列を含むVL;
 (ii) 配列番号69のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;
 (iii) 配列番号71のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;
 (iv) 配列番号72のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;
 (v) 配列番号73のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号74のアミノ酸配列を含むVL;
 (vi) 配列番号73のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号75のアミノ酸配列を含むVL;
 (vii) 配列番号76のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号74のアミノ酸配列を含むV

L;

(viii) 配列番号77のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号78のアミノ酸配列を含むV

L;

(ix) 配列番号79のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号80のアミノ酸配列を含むVL;
 ;または

(x) 配列番号77のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号80のアミノ酸配列を含むVL、
 を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項5】

抗TfR1抗体が、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、scFv、Fv、または完全長IgGである、請求項1から4のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項6】

抗TfR1抗体がFabフラグメントである、請求項5に記載の複合体。

【請求項7】

抗TfR1抗体が、

(i) 配列番号101と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列
 番号90と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ii) 配列番号97と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列
 番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iii) 配列番号98と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列
 番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iv) 配列番号99と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列
 番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(v) 配列番号100と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列
 番号89と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vi) 配列番号100と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配
 列番号90と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vii) 配列番号101と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配
 列番号89と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(viii) 配列番号102と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または
 配列番号93と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ix) 配列番号103と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配
 列番号95と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;または

(x) 配列番号102と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配
 列番号95と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖、

を含む、請求項6に記載の複合体。

【請求項8】

抗TfR1抗体が、

(i) 配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号90のアミノ酸配列を含む
 軽鎖;

(ii) 配列番号97のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽
 鎖;

(iii) 配列番号98のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む
 軽鎖;

10

20

30

40

50

- (iv) 配列番号99のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖;
- (v) 配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖;
- (vi) 配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖;
- (vii) 配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖;
- (viii) 配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖;
- (ix) 配列番号103のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖;または
- (x) 配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖、
- を含む、請求項6または請求項7に記載の複合体。

10

【請求項9】

抗TfR1抗体が、トランスフェリン受容体1のトランスフェリン結合部位に特異的に結合せず、かつ/または抗TfR1抗体がトランスフェリン受容体1に対するトランスフェリンの結合を阻害しない、請求項1から8のいずれか一項に記載の複合体。

20

【請求項10】

オリゴヌクレオチドが、DMDプレ-mRNAのスプライシング特徴の少なくとも4個の連続するヌクレオチドに対する相補性領域を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項11】

スプライシング特徴が、DMDプレ-mRNAのエクソン55中のエクソンスプライシングエンハンサー(ESE)であり、任意にESEが配列番号2031~2061のいずれか1つの配列を含む、請求項10に記載の複合体。

【請求項12】

スプライシング特徴が、分岐点、スプライスドナー部位またはスプライスアクセプター部位であり、任意にスプライシング特徴が、DMDプレ-mRNAのエクソン54とイントロン54との接合部に跨って、イントロン54の中に、イントロン54とエクソン55との接合部に跨って、エクソン55とイントロン55との接合部に跨って、イントロン55の中に、またはイントロン55とエクソン56との接合部に跨って存在しており、さらに任意にスプライシング特徴が、配列番号2028~2030、2062、および2063のいずれか1つの配列を含む、請求項10に記載の複合体。

30

【請求項13】

オリゴヌクレオチドが、配列番号160~779のいずれか1つに相補的な配列を含むか、または配列番号780~2019のいずれか1つの配列を含み、ここで各チミン塩基(T)が、独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置き換えられていてもよく、各Uが、独立しておよび任意にTで置き換えられていてもよい、請求項1から9のいずれか一項に記載の複合体。

40

【請求項14】

オリゴヌクレオチドが、配列番号1400、1402~1406、1408、1409、1413、1418~1420、1483~1491、1493、1495、1496、1502~1506、1508、1510~1512、1514、1522~1524、1529~1531、1534、1535、1559、1583、1587、1591、1596、1597、1598、1604、1606、1607、1638、1641、1693~1695、1702、1703、1766、1813、1988、および1995のいずれか1つの配列を含み、ここで各チミン塩基(T)が、独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置き換えられていてもよく、各Uが、独立しておよび任意にTで置き換えられていてもよい、請求項1から9のいずれか一項に記載の複合体。

50

【請求項 15】

オリゴヌクレオチドが、1つ以上のホスホロジアミダートモルホリノを含み、任意にオリゴヌクレオチドがホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)である、請求項1から14のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 16】

抗TfR1抗体が、切断可能なリンカーを介してオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結されており、任意に切断可能なリンカーがバリン-シトルリン配列を含む、請求項1から15のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 17】

抗TfR1抗体が、抗体のリジン残基またはシステイン残基への抱合を介してオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結されている、請求項1から16のいずれか一項に記載の複合体。

10

【請求項 18】

DMDを標的とするオリゴヌクレオチドであって、配列番号160~779のいずれか1つに対する相補性領域を含み、任意に相補性領域が、配列番号160~779のいずれか1つと相補的な少なくとも15個の連続するヌクレオシドを含む、前記オリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

オリゴヌクレオチドが配列番号780~2019のいずれか1つの少なくとも15個の連続するヌクレオシドを含み、任意にオリゴヌクレオチドが配列番号780~2019のいずれか1つの配列を含み、各チミン塩基(T)が独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置換されていてもよく、各Uが独立しておよび任意にTで置換されていてもよい、請求項18に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 20】

細胞にオリゴヌクレオチドを送達する方法であって、細胞を請求項1から17のいずれか一項に記載の複合体または請求項18もしくは請求項19に記載のオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、前記方法。

【請求項 21】

細胞におけるジストロフィンタンパク質の発現または活性を促進する方法であって、細胞へのオリゴヌクレオチドの内在化を促進するのに有効な量で、請求項1から17のいずれか一項に記載の複合体または請求項18もしくは請求項19に記載のオリゴヌクレオチドを細胞と接触させることを含む、任意に細胞が筋細胞である、前記方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、2021年7月9日に出願された「MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING DYSTROPHINOPATHIES」と題する米国仮出願第63/219999号に対する35 U.S.C. § 119(e)の下での優先権を主張する。

【0002】

40

発明の分野

本出願は、分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)を細胞へ送達するための標的化複合体、およびそれらの使用、特に疾患の処置に関する使用に関する。

【0003】

電子配列表の参照

電子配列表(D082470065W000-SEQ-COB.xml、サイズ:2,801,833バイト、作成日2022年7月7日)の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

50

ジストロフィノパチーは、ジストロフィンをコードする遺伝子の突然変異に起因する一群の異なる神経筋疾患である。ジストロフィノパチーとしては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、およびX連鎖拡張型心筋症が挙げられる。ジストロフィンをコードするDMD遺伝子(「DMD」)は、79個のエクソンおよび約260万個の全塩基対を含む大きな遺伝子である。エキソニックフレームシフト、欠失、置換および重複突然変異などのDMDの多数の突然変異は、機能性ジストロフィンの発現を減少させることができ、ジストロフィノパチーをもたらす。ヒトDMDのエクソンを標的とするいくつかの薬剤が、米国食品医薬品局(FDA)によって承認されており、そのような薬剤としては、カシメルセン、ビルトラルセン、ゴロジルセンおよびエテプリルセンが挙げられる。

10

【発明の概要】

【0005】

発明の概要

いくつかの側面によると、本開示は、筋細胞を、分子ペイロードをそれらの細胞へ送達することを目的として標的化する複合体、ならびにその中で使用することができる分子ペイロードを提供する。いくつかの態様において、本明細書で提供される複合体は、機能性ジストロフィタンパク質の発現または活性を増加または回復させる分子ペイロードを送達するのに特に有用である。いくつかの態様において、複合体は、DMDエクソン55のスキッピングを促進することなどによって、インフレームのエクソンスキッピング機構または終止コドンの抑制を介して機能性ジストロフィタンパク質の発現を促進するオリゴヌクレオチドベースの分子ペイロードを含む。いくつかの態様において、本明細書で提供される分子ペイロードは、DMDエクソン55のスキッピングなどのDMD配列におけるエクソンスキッピングを容易にするために有用である。したがって、いくつかの態様において、本明細書で提供される複合体は、分子ペイロードを筋細胞へ送達することを目的として、筋細胞の表面上の受容体へ特異的に結合する筋標的化剤(例として、筋標的化抗体)を含む。いくつかの態様において、複合体は、受容体に媒介される内在化を介して細胞中へ取り入れられ、その後、分子ペイロードは細胞内部に放出されて機能を果たし得る。例えば、オリゴヌクレオチドを送達するように操作された複合体は、オリゴヌクレオチドが筋細胞における機能性ジストロフィタンパク質の発現を(例として、DMDエクソン55のスキッピングを容易にするなどによる、エクソンスキッピング機構を介して)促進することができるようにオリゴヌクレオチドを放出し得る。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、複合体のオリゴヌクレオチドと筋標的化剤とを接続する共有結合性リンカーのエンドソーム切断によって放出される。本明細書で提供される複合体および分子ペイロードは、エクソン55のスキッピングに適した変異DMD遺伝子などの変異DMD遺伝子を有する対象を処置するために使用することができる。

20

30

【0006】

いくつかの側面によると、DMDプレ-mRNAにおいてエクソン55のスキッピングを誘導するように構成されたオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体1(TfR1)抗体を含む複合体が本明細書において提供され、ここで、オリゴヌクレオチドは、配列番号160~779のいずれか1つの少なくとも8個の連続するヌクレオチドと相補的である相補性領域を含む。

40

【0007】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、

(i) 配列番号33の重鎖相補性決定領域1(CDR-H1)、配列番号34の重鎖相補性決定領域2(CDR-H2)、配列番号35の重鎖相補性決定領域3(CDR-H3)、配列番号36の軽鎖相補性決定領域1(CDR-L1)、配列番号37の軽鎖相補性決定領域2(CDR-L2)および配列番号32の軽鎖相補性決定領域3(CDR-L3);

(ii) 配列番号7のCDR-H1、配列番号8のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

(iii) 配列番号7のCDR-H1、配列番号20のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番

50

号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

(iv)配列番号7のCDR-H1、配列番号24のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

(v)配列番号51のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3;

(vi)配列番号64のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3;または

(vii)配列番号67のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3

を含む。

10

【0008】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、

(i)配列番号76と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH);および/または配列番号75と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL);

(ii)配列番号69と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(iii)配列番号71と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(iv)配列番号72と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

20

(v)配列番号73と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号74と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(vi)配列番号73と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号75と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(vii)配列番号76と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号74と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(viii)配列番号77と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号78と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(ix)配列番号79と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号80と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;または

30

(x)配列番号77と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号80と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL、

を含む。

【0009】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、

(i)配列番号76のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号75のアミノ酸配列を含むVL;

(ii)配列番号69のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;

(iii)配列番号71のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;

(iv)配列番号72のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;

(v)配列番号73のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号74のアミノ酸配列を含むVL;

40

(vi)配列番号73のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号75のアミノ酸配列を含むVL;

(vii)配列番号76のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号74のアミノ酸配列を含むVL;

(viii)配列番号77のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号78のアミノ酸配列を含むVL;

(ix)配列番号79のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号80のアミノ酸配列を含むVL;または

(x)配列番号77のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号80のアミノ酸配列を含むVL、

を含む。

【0010】

50

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、scFv、Fvフラグメント、または完全長IgGであってもよい。

【0011】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、Fabフラグメントである。

【0012】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、

(i) 配列番号101と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号90と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ii) 配列番号97と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iii) 配列番号98と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iv) 配列番号99と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(v) 配列番号100と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号89と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vi) 配列番号100と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号90と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vii) 配列番号101と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号89と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(viii) 配列番号102と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号93と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ix) 配列番号103と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号95と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;または

(x) 配列番号102と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号95と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖、

を含む。

【0013】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、

(i) 配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ii) 配列番号97のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iii) 配列番号98のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iv) 配列番号99のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(v) 配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vi) 配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vii) 配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(viii) 配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ix) 配列番号103のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖;または

(x) 配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖、

を含む。

【0014】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、トランスフェリン受容体1のトランスフェリン結合部位に特異的に結合せず、かつ/または抗TfR1抗体は、トランスフェリン受容体1へのトランスフェリンの結合を阻害しない。

【0015】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DMDプレ-mRNAのスプライシング特徴の少なくとも4個の連続するヌクレオチドに対する相補性領域を含む。

【0016】

いくつかの態様において、スプライシング特徴は、DMDプレ-mRNAのエクソン55中のエクソンスプライシングエンハンサー(ESE)であり、任意に、ESEは配列番号2031~2061のいずれか一つの配列を含む。

10

【0017】

いくつかの態様において、スプライシング特徴は、分岐点、スプライスドナー部位またはスプライスアクセプター部位であり、任意に、スプライシング特徴は、DMDプレ-mRNAのエクソン54とイントロン54との接合部に跨って、イントロン54の中に、イントロン54とエクソン55との接合部に跨って、エクソン55とイントロン55の接合部に跨って、イントロン55の中に、またはイントロン55とエクソン56との接合部に跨って存在しており、さらに任意に、スプライシング特徴は、配列番号2028~2030、2062、および2063のいずれか1つの配列を含む。

20

【0018】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号160~779のいずれか1つに相補的な配列を含むか、または配列番号780~2019のいずれか1つの配列を含み、ここで各チミン塩基(T)は、独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置き換えられていてもよく、各Uは、独立しておよび任意にTで置き換えられていてもよい。

【0019】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1400、1402~1406、1408、1409、1413、1418~1420、1483~1491、1493、1495、1496、1502~1506、1508、1510~1512、1514、1522~1524、1529~1531、1534、1535、1559、1583、1587、1591、1596、1597、1598、1604、1606、1607、1638、1641、1693~1695、1702、1703、1766、1813、1988、および1995のいずれか1つの配列を含み、ここで各チミン塩基(T)は、独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置き換えられてもよく、各Uは、独立しておよび任意にTで置き換えられてもよい。

30

【0020】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のホスホロジアミダートモルホリノを含み、任意に、オリゴヌクレオチドはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)である。

【0021】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、切断可能なリンカーを介してオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結されており、任意に、切断可能なリンカーは、バリン-シトルリン配列を含む。

40

【0022】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、抗体のリジン残基またはシステイン残基への抱合を介してオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結される。

【0023】

いくつかの側面によると、DMDを標的とするオリゴヌクレオチドが本明細書で提供され、ここで、オリゴヌクレオチドは、配列番号160~779のいずれか1つに対する相補性領域を含み、任意に、相補性領域は、配列番号160~779のいずれか1つと相補的な少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む。

【0024】

50

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号780~2019のいずれか1つの少なくとも15個の連続するヌクレオシドを含み、任意に、オリゴヌクレオチドは、配列番号780~2019のいずれか1つの配列を含み、ここで各チミン塩基(T)は、独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置換されていてもよく、各Uは、独立しておよび任意にTで置換されていてもよい。

【0025】

いくつかの側面によると、オリゴヌクレオチドを細胞に送達する方法が本明細書で提供され、本方法は、細胞を本明細書に開示される複合体または本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドと接触させることを含む。

【0026】

いくつかの側面によると、細胞におけるジストロフィンタンパク質の発現または活性を促進する方法が本明細書で提供され、本方法は、細胞を、細胞へのオリゴヌクレオチドの内在化を促進するのに有効な量で本明細書に開示される複合体または本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、任意に、細胞は筋細胞である。

【0027】

いくつかの態様において、細胞は、エクソン55のスキッピングに適したDMD遺伝子を含む。

【0028】

いくつかの態様において、ジストロフィンタンパク質は、切断型ジストロフィンタンパク質である。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1は、DMDエクソンスキッピングオリゴヌクレオチドへ抱合された抗TfR1 Fab(3M12 VH4/Vκ3)を含有する抱合体が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の筋管において、ネイキッドDMDエクソンスキッピングオリゴと比較してエクソンスキッピングが増進したことを示すデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

発明の詳細な説明

本開示の側面は、ある分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド、ペプチド、小分子)が筋細胞に有益な効果を有し得るものの、かかる細胞を効果的に標的化することは困難であることが証明されているという認識に関する。したがって、本明細書に記載のとおり、本開示は、かかる課題を克服するために、分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体を提供する。いくつかの態様において、複合体は、ジストロフィンタンパク質(例として、切断型ジストロフィンタンパク質)またはDMD(例として、変異DMD対立遺伝子)の発現または活性を調節する(例として、促進する)分子ペイロードを送達するために特に有用である。いくつかの態様において、本明細書で提供される複合体は、インフレームのエクソンスキッピングおよび/または未成熟終止コドンの抑制を促進するなどによって、ジストロフィンタンパク質またはDMDの発現および活性を促進するオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、複合体は、エクソン55のスキッピングを誘導するオリゴヌクレオチドなどの、DMD RNA(例として、プレ-mRNA)のエクソン(単数または複数)のスキッピングを誘導するオリゴヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様において、ジストロフィンタンパク質またはDMDの正常な発現および活性を促進する1つ以上のタンパク質を発現する合成核酸ペイロード(例として、DNAまたはRNAペイロード)を使用することができる。

【0031】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、Xp21上に位置するDMD遺伝子における1つ以上の変異によって引き起こされるX連鎖性筋障害である。ジストロフィンタンパク質は、典型的には、筋肉腫においてジストロフィン関連糖タンパク質複合体(DGC)を形成し、これは、筋肉腫構造を細胞外マトリックスに連結し、収縮誘発性損傷から筋肉腫を保護する

10

20

30

40

50

。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者には、ジストロフィンタンパク質は一般に存在せず、典型的には、筋線維は機械的な過剰緊張のために損傷する。DMD遺伝子の突然変異は、翻訳リーディングフレームが失われているか維持されているかに応じて、2つのタイプの筋ジストロフィーである、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびベッカー型筋ジストロフィーに関連する。ベッカー型筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの臨床的に軽度の形態であり、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに類似した特徴を特徴とする。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチド(例として、本明細書で提供される複合体を使用して送達されるオリゴヌクレオチド)によって誘導されるエクソンスキッピングを使用して、変異DMD対立遺伝子のリーディングフレームを回復させ、筋機能を改善するのに十分に機能的な切断型ジストロフィンタンパク質の産生をもたらすことができる。いくつかの態様において、そのようなエクソンスキッピングは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー表現型をより軽度のベッカー型筋ジストロフィー表現型に変換する。

10

【0032】

定義された用語の説明を含む本開示のさらなる態様は、以下に提供される。

【0033】

I. 定義

投与する(施す)こと:本明細書で使用される場合、用語「投与する(施す)こと」または「投与(施し)」は、生理学的におよび/または(例として、および)薬理学的に有用なやり方で対象へ複合体を提供すること(例として、対象における疾病を処置すること)を意味する。

20

【0034】

およそ:本明細書で使用される場合、用語「およそ」または「約」は、目的の1つ以上の値へ適用されるとき、規定された参照値と類似の値を指す。ある態様において、用語「およそ」または「約」は、別様に述べられない限りまたは文脈から明らかでない限り(かかる数字が実行可能な値の100%を超える場合を除く)、規定された参照値のプラスマイナス(超または未満)の15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはこれ未満に収まる広範な値を指す。

【0035】

抗体:本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは少なくとも1つの抗原決定基、例として、抗原へ特異的に結合するパラトープを包含するポリペプチドを指す。いくつかの態様において、抗体は、完全長の抗体である。いくつかの態様において、抗体は、キメラ抗体である。いくつかの態様において、抗体は、ヒト化抗体である。ただし、いくつかの態様において、抗体は、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、またはscFvフラグメントである。いくつかの態様において、抗体は、ラクダ科の動物の抗体に由来するナノボディ、またはサメ抗体に由来するナノボディである。いくつかの態様において、抗体は、二重特異性抗体である。いくつかの態様において、抗体は、ヒト生殖細胞系配列を有するフレームワークを含む。別の態様において、抗体は、IgG、IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG2C、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgM、およびIgEの定常領域からなる群から選択される重鎖定常領域を含む。いくつかの態様において、抗体は、重(H)鎖可変領域(本明細書ではVHと略される)、および/または(例として、および)、軽(L)鎖可変領域(本明細書ではVLと略される)を含む。いくつかの態様において、抗体は、定常領域、例としてFc領域を含む。免疫グロブリン定常領域は、重鎖または軽鎖定常領域を指す。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常領域アミノ酸配列およびそれらの機能的バリエーションは知られている。重鎖に関し、いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体の重鎖は、アルファ(α)、デルタ(Δ)、イプシロン(ϵ)、ガンマ(γ)、またはミュー(μ)重鎖であり得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体の重鎖は、ヒトのアルファ(α)、デルタ(Δ)、イプシロン(ϵ)、ガンマ(γ)、またはミュー(μ)重鎖を含み得る。具体的な態様において、本明細書に記載の抗体は、ヒトのガンマ1 CH1ドメイン、CH2ドメイン、および/または(例として、および)、CH3ドメインを含む。いくつかの態様にお

30

40

50

いて、VHドメインのアミノ酸配列は、ヒトガンマ(γ)重鎖定常領域のアミノ酸配列、例えば当該技術分野において知られているいずれの配列も含む。ヒト定常領域配列の非限定例は当該技術分野において記載されており、例として、米国特許第5,693,780号および上記のKabat E A et al.,(1991)を参照されたい。いくつかの態様において、VHドメインは、本明細書で提供される可変鎖定常領域のいずれかと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗体は修飾されている(例として、グリコシル化、リン酸化、SUMO化、および/または(例として、および)、メチル化を介して修飾されている)。いくつかの態様において、抗体は、1個以上の糖または炭水化物分子へ抱合されたグリコシル化抗体である。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、N-グリコシル化、O-グリコシル化、C-グリコシル化、グリπιエーション(GPIアンカー付着)、および/または(例として、および)、ホスホグリコシル化を介して、抗体へ抱合されている。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、またはグリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、分枝オリゴ糖類または分枝グリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、マンノース単位、グルコース単位、N-アセチルグルコサミン単位、N-アセチルガラクトサミン単位、ガラクトース単位、フコース単位、またはホスホ脂質単位を包含する。いくつかの態様において、抗体は、リンカーポリペプチドまたは免疫グロブリン定常領域へ連結された本開示の1個以上の抗原結合性フラグメントを含むポリペプチドを含む構築物である。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合によって結び合わされた2個以上のアミノ酸残基を含み、1つ以上の抗原結合部と連結させるために使用される。リンカーポリペプチドの例は報告されている(例として、Holliger,P., et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.,et al.(1994)Structure 2:1121-1123を参照されたい)。またさらに、抗体は、1以上の他のタンパク質またはペプチドと、抗体もしくは抗体部分との共有結合または非共有結合の結び付きによって形成される、より大きな免疫接着分子の一部であってもよい。かかる免疫接着分子の例は、四量体scFv分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov,S.M.,et al.(1995)Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101)、ならびに二価のビオチン化されたscFv分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチド、およびC末端ポリヒスチジンタグの使用(Kipriyanov,S.M.,et al.(1994)Mol.Immunol.31:1047-1058)を包含する。

10

20

30

【0036】

分岐点:本明細書で使用される場合、「分岐点」または「分岐部位」という用語は、プレ-mRNAのmRNAへのスプライシング(すなわち、プレ-mRNAからイントロンを除去すること)に關与する遺伝子またはプレ-mRNAのイントロン内の核酸配列モチーフを指し、スプライシング特徴と呼ぶことができる。分岐点は、典型的には、イントロンの3'末端から18から40個目のヌクレオチドに位置し、アデニンを含有するが、それ以外の点では配列の制約は比較的ない。分岐点の一般的な配列モチーフは、YNYRAY、YTRAC、およびYNYTRAYであり、ここでYはピリミジンであり、Nは任意のヌクレオチドであり、Rは任意のプリンであり、Aはアデニンである。スプライシングの間、プレ-mRNAはイントロンの5'末端で切断され、次いで、5'末端および分岐点からそれぞれグアニンとアデニンとの間のエステル交換結合を介して下流の分岐点領域に結合し、ループ状ラリアート構造を形成する。

40

【0037】

CDR:本明細書で使用される場合、用語「CDR」は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。典型的な抗体分子は、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、これらは通常、抗原結合に關与する。VHおよびVL領域は、「フレームワーク領域」(「FR」)として知られるより保存された領域が散在する、「相補性決定領域」(「CDR」)としても知られる超可変領域にさらに細分することができる。各VHおよびVLは、典型的には、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序、FR1、CDR1、FR2、CDR2、F

50

R3、CDR3、FR4で配置された3つのCDRおよび4つのFRで構成される。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、当技術分野で公知の方法論を使用して、例えば、Kabat定義、IMGT定義、Chothia定義、AbM定義、および/または(例として、および)接触定義によって正確に同定され得、これらはすべて当技術分野で周知である。例として、Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; IMGT (登録商標), the international ImMuNoGeneTics information system (登録商標) www.imgt.org, Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 27: 209-212 (1999); Ruiz, M. et al., Nucleic Acids Res., 28: 219-221 (2000); Lefranc, M.-P., Nucleic Acids Res., 29: 207-209 (2001); Lefranc, M.-P., Nucleic Acids Res., 31: 307-310 (2003); Lefranc, M.-P. et al., In Silico Biol., 5, 0006 (2004) [Epub], 5: 45-60 (2005); Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 33: D593-597 (2005); Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 37: D1006-1012 (2009); Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 43: D413-422 (2015); Chothia et al., (1989) Nature 342: 877; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917, Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273: 927-948; および Almagro, J. Mol. Recognit. 17: 132-143 (2004) を参照されたい。bioinf.org.uk/abs も参照されたい。本明細書で使用される場合、CDRは、当技術分野で公知の任意の方法によって定義されるCDRを指し得る。同じCDRを有する2つの抗体は、同じ方法、例えば、IMGT定義によって決定される場合、2つの抗体がそのCDRの同じアミノ酸配列を有することを意味する。

10

20

【0038】

重鎖および軽鎖の可変領域の各々において3つのCDRがあり、これらは可変領域の各々につきCDR1、CDR2、およびCDR3と指定される。用語「CDRセット」は、本明細書に使用されるとき、抗原に結合することが可能な単一の可変領域に生じる3つのCDRの一群を指す。これらのCDRの厳密な境界は、種々の系に従い異なって定義されている。Kabat (Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (国立衛生研究所, Bethesda, Md. (1987) および (1991)) によって記載される系は、抗体のいずれの可変領域へも適用可能な一義的な残基ナンバリング系を提供するのみならず、3つのCDRを定義する正確な残基境界をも提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと称されることもある。CDRの下位部 (Sub-portions) は、L1、L2、およびL3、またはH1、H2、およびH3と指定されることがあり、ここで「L」および「H」は夫々、軽鎖および重鎖領域を指定する。これらの領域は、Kabat CDRと重複する境界を有するChothia CDRと称されることもある。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界は、Padlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) および MacCallum (J Mol Biol 262 (5): 732-45 (1996)) によって記載されている。さらに他のCDR境界定義は、上の系の1つに厳重に従わなくてもよいが、それでもなおKabat CDRと重複することがあり、具体的な残基もしくは残基の群またはCDR全体でさえも抗原結合に有意に影響を及ぼすものではないという予測あるいは実験的知見を踏まえ、それらは短縮または伸長されてもよい。本明細書で使用される方法は、これらの系のいずれかに従って定義されたCDRを利用してもよい。CDR定義系の例が表1に示される。

30

40

【表 1】

表 1. CDR 定義

	IMGT ¹	Kabat ²	Chothia ³
CDR-H1	27-38	31-35	26-32
CDR-H2	56-65	50-65	53-55
CDR-H3	105-116/117	95-102	96-101
CDR-L1	27-38	24-34	26-32
CDR-L2	56-65	50-56	50-52
CDR-L3	105-116/117	89-97	91-96

¹ IMGT(登録商標), the international ImMunoGeneTics information system(登録商標), imgt.org, Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 27:209-212 (1999)

² Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242

³ Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))

10

【0039】

CDR接合(-grafted)抗体:用語「CDR接合抗体」は、マウス重鎖および軽鎖可変領域を有するがマウスCDRの1つ以上(例として、CDR3)がヒトCDR配列に置き換えられている抗体などの、ある種からの重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、そのVHおよび/または(例として、および)VLのCDR領域の1つ以上の配列が別の種のCDR配列に置き換えられている抗体を指す。

20

【0040】

キメラ抗体:用語「キメラ抗体」は、ヒト定常領域へ連結されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体などの、ある種からの重鎖および軽鎖可変領域配列と別の種からの定常領域配列を含む抗体を指す。

【0041】

相補的:本明細書で使用される場合、用語「相補的」は、2つのヌクレオシド間または2組のヌクレシド間の正確な対形成のための能力を指す。とりわけ、相補的は、2ヌクレオシド間または2組のヌクレオシド間に結合をもたらす水素結合対形成の程度を特徴付ける用語である。例えば、ある位置のオリゴヌクレオチドの塩基が、対応する位置の標的核酸(例として、mRNA)の塩基と水素結合することが可能である場合、そのとき塩基は、その位置にて互いに相補的であると見なされる。塩基対合は、標準的なWatson-Crick塩基対合と非Watson-Crick塩基対合(例として、Wobble塩基対合およびHoogsteen塩基対合)との両方を包含してもよい。例えば、いくつかの態様において、相補的な塩基対合として、アデノシン型塩基(A)は、チミジン型塩基(T)またはウラシル型塩基(U)に相補的であり、シトシン型塩基(C)は、グアノシン型塩基(G)に相補的であり、3-ニトロピロールまたは5-ニトロインドールなどのユニバーサル塩基は、いずれのA、C、U、またはTとハイブリダイズし得る。イノシン(I)はまた、当該技術分野においてユニバーサル塩基であるとも見なされており、いずれのA、C、U、またはTに相補的であると見なされる。

30

40

【0042】

保存アミノ酸置換:本明細書で使用される場合、「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸置換がなされたタンパク質の相対的な電荷またはサイズの特徴を変更しないアミノ酸置換を指す。バリエーションは、当業者に知られているポリペプチド配列を変更するための方法に従って調製され得、例えば、かかる方法をまとめた参考文献、例として、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012、または Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York から見出される。アミノ酸の保存的置換は、以下の群:(a) M、I、L、V;(b) F、Y、W;(c) K、R、H;(d) A、G;(e) S、T;(f) Q、N;および(g) E、D内の

50

アミノ酸に対してなされる置換を包含する。

【0043】

共有結合的に連結された:本明細書で使用される場合、用語「共有結合的に連結された」は、少なくとも1個の共有結合を介して一緒に連結されている2個以上の分子の特徴を指す。いくつかの態様において、2個の分子は一緒に、分子間リンカーとして働く単結合(例として、ジスルフィド結合またはジスルフィド架橋)によって共有結合的に連結され得る。しかしながら、いくつかの態様において、複数の共有結合を通して2個以上の分子を一緒に結び合わせるリンカーとして働く分子を介して、2個以上の分子は一緒に、共有結合的に連結され得る。いくつかの態様において、リンカーは、切断可能なリンカーであってもよい。しかしながら、いくつかの態様において、リンカーは、切断不能なリンカーであってもよい。

10

【0044】

交差反応すること:本明細書で使用される場合、および標的化剤(例として、抗体)の文脈において、用語「交差反応すること」は、同様のタイプまたはクラスの1種より多くの抗原(例として、複数のホモログ、パラログ、もしくはオルソログの抗原)へ、同様の親和性または結合活性で特異的に結合することが可能な剤の特性を指す。例えば、いくつかの態様において、同様のタイプまたはクラスのヒトおよび霊長目の非ヒト動物の抗原(例として、ヒトトランスフェリン受容体および霊長目の非ヒト動物のトランスフェリン受容体)に対して交差反応する抗体は、ヒト抗原および霊長目の非ヒト動物の抗原へ、同様の親和性または結合活性で結合することが可能である。いくつかの態様において、抗体は、同様のタイプまたはクラスのヒト抗原および齧歯類動物抗原に対して交差反応する。いくつかの態様において、抗体は、同様のタイプまたはクラスの齧歯類動物の抗原および霊長目の非ヒト動物の抗原に対して交差反応する。いくつかの態様において、抗体は、同様のタイプまたはクラスのヒト抗原、霊長目の非ヒト動物の抗原、および齧歯類動物の抗原に対して交差反応する。

20

【0045】

DMD:本明細書で使用される場合、「DMD」という用語は、筋細胞、特に筋線維の内部細胞骨格と細胞外マトリックスを架橋するジストロフィン-糖タンパク質複合体の重要な成分である、ジストロフィンタンパク質をコードする遺伝子を指す。DMDにおける欠失、重複および点変異は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィーまたは心筋症などのジストロフィノパチーを引き起こし得る。代替的なプロモーター使用および代替的なスプライシングは、この遺伝子について多数の異なる転写変異体およびタンパク質アイソフォームをもたらす。いくつかの態様において、ジストロフィン遺伝子(DMDまたはDMD遺伝子)は、ヒト(遺伝子ID:1756)、非ヒト霊長類(例として、遺伝子ID:465559)、または齧歯類遺伝子(例として、遺伝子ID:13405、遺伝子ID:24907)であり得る。さらに、異なるタンパク質アイソフォームをコードする複数のヒト転写バリエーション(例として、GenBank RefSeqアクセッション番号NM_000109.3、NM_004006.2、NM_004009.3、NM_004010.3、およびNM_004011.3で注釈が付けられている)がキャラクタライズされている。

30

【0046】

DMD対立遺伝子:本明細書で使用される場合、用語「DMD対立遺伝子」は、DMD遺伝子の代替形態(例として、野生型または変異型)のいずれか1つを指す。いくつかの態様において、DMD対立遺伝子は、その正常および典型的な機能を保持するジストロフィンをコードし得る。いくつかの態様において、DMD対立遺伝子は、筋ジストロフィーをもたらす1つ以上の突然変異を含み得る。デュシェンヌ型筋ジストロフィーをもたらす一般的な突然変異には、ジストロフィン対立遺伝子に存在する79個のエクソン、例として、エクソン8、エクソン23、エクソン41、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55のうちの1つ以上のフレームシフト、欠失、置換および重複突然変異が含まれる。DMD変異のさらなる例は、例えば、Flanigan KM et al., Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopat

40

50

hy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. Hum Mutat. 2009 Dec; 30(12): 1657-66に開示されており、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0047】

ジストロフィノパチー: 本明細書で使用される場合、「ジストロフィノパチー」という用語は、1つ以上の変異DMD対立遺伝子に起因する筋疾患を指す。ジストロフィノパチーとしては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、およびDMD関連拡張型心筋症(DCM)などの状態のスペクトラム(軽度から重度の範囲)が挙げられる。いくつかの態様において、スペクトラムの一端で、ジストロフィノパチーは、クレアチンホスホキナーゼ(CK)の血清濃度の無症候性増加および/または(例として、および)ミオグロビン尿症を伴う筋痙攣と表現型的に関連する。いくつかの態様において、スペクトラムの他端で、ジストロフィノパチーは、骨格筋が主に罹患している場合にはデュシェンヌ型またはベッカー型筋ジストロフィーとして、心臓が主に罹患している場合にはDMD関連拡張型心筋症(DCM)として一般に分類される進行性筋疾患と表現型的に関連する。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの症状としては、筋肉の喪失または変性、筋機能の低下、舌およびふくらはぎの筋肉の偽肥大、神経学的異常のより高いリスク、および寿命の短縮が挙げられる。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM) Entry#310200に関連付けられている。ベッカー型筋ジストロフィーは、OMIM Entry#300376に関連付けられている。拡張型心筋症は、OMIM Entry#302045に関連付けられている。

10

20

【0048】

エクソンスプライシングエンハンサー(ESE): 本明細書で使用される場合、「エクソンスプライシングエンハンサー」または「ESE」という用語は、例として、参照により本明細書に組み込まれるBlencowe et al., Trends Biochem Sci 25, 106-10. (2000)に記載されているように、mRNAへのプレ-mRNAのスプライシングを指示または増強する遺伝子、プレ-mRNA、またはmRNAのエクソン内の核酸配列モチーフを指す。ESEはスプライシング特徴と呼ばれる場合がある。ESEは、例えば、遺伝子転写物から1つ以上のイントロンおよび/または1つ以上のエクソンを除去するためにスプライシングを指示または増強し得る。ESEモチーフは、典型的には、6~8個の核酸塩基長である。SRタンパク質(例として、遺伝子SRSF1、SRSF2、SRSF3、SRSF4、SRSF5、SRSF6、SRSF7、SRSF8、SRSF9、SRSF10、SRSF11、SRSF12、TRA2AまたはTRA2Bによってコードされるタンパク質)は、それらのRNA認識モチーフ領域を介してESEに結合してスプライシングを促進する。ESEモチーフは、参照により本明細書に組み込まれる、Cartegni et al., Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 13, 3568-3571に記載されているものなどの、いくつかの方法によって同定することができる。

30

【0049】

フレームワーク: 本明細書で使用される場合、用語「フレームワーク」または「フレームワーク配列」は、CDRを差し引いた可変領域の残りの配列を指す。CDR配列の厳密な定義が種々の系によって決定され得ることから、フレームワーク配列の意味は、相応に異なる解釈に依存する。6つのCDR(軽鎖のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3、ならびに重鎖のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3)もまた、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を各鎖上の4つの下位領域(FR1、FR2、FR3、およびFR4)に分け、ここでCDR1はFR1とFR2との間に、CDR2はFR2とFR3との間に、CDR3はFR3とFR4との間に位置付けられる。具体的な下位領域をFR1、FR2、FR3、またはFR4と特定することなく、フレームワーク領域が他によって言及されるとき、天然に存在する単一の免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わせられたFR(複数)を表す。本明細書に使用されるとき、FRは4つの下位領域のうち1つを表し、FR(複数)はフレームワーク領域を含有する4つの下位領域のうち2つ以上を表す。ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、当該技術分野において知られている。一態様において、当該技術分野において知られているアクセプター配列は、本明細書に開示の抗体に使用されていてもよい。

40

50

【0050】

ヒト抗体:用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用される場合、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を包含することが意図される。本開示のヒト抗体は、例えば、CDR、とりわけCDR3において、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例として、*in vitro*でのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によってか、または*in vivo*での体細胞変異によって導入された変異)を包含していてもよい。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、本明細書に使用されるとき、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上へ接合された抗体を包含することは意図されない。

【0051】

ヒト化抗体:用語「ヒト化抗体」は、非ヒト種(例として、マウス)からの重鎖および軽鎖の可変領域配列を含むが、VH配列および/または(例として、および)VL配列の少なくとも一部がより「ヒト様」に、すなわち、ヒト生殖細胞系可変配列とより同様なものに変更された抗体を指す。ヒト化抗体のあるタイプは、ヒトCDR配列が非ヒトVHおよびVL配列上へ導入されて対応する非ヒトCDR配列と置き換えられたCDR接合抗体である。一態様において、ヒト化された抗TfR1抗体および抗原結合部分が提供される。かかる抗体は、既存のハイブリドーマ技術、これに続く*in vitro*の遺伝子工学を使用するヒト化(Kasayanらの国際公開第2005/123126号に開示されたものなど)を使用してマウス抗TfR1モノクローナル抗体を得ることによって生成され得る。

【0052】

内在化する細胞表面受容体:本明細書で使用される場合、用語「内在化する細胞表面受容体」は、例として、外部刺激(例として、受容体に結合するリガンド)の際、細胞によって内在化される細胞表面受容体を指す。いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、エンドサイトーシスによって内在化される。いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、クラスリン媒介エンドサイトーシスによって内在化される。しかしながら、いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、クラスリンに依存しない経路、例えば、食作用、マクロピノサイトーシス、カベオラ-およびラフト-媒介取り込み、またはクラスリンに依存しない構成的エンドサイトーシスなどによって内在化される。いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、および/または(例として、および)、細胞外ドメインを含み、これらは任意にさらにリガンド結合ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞表面受容体は、リガンド結合後に細胞によって内在化されるようになる。いくつかの態様において、リガンドは、筋標的化剤または筋標的化抗体であってもよい。いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、トランスフェリン受容体である。

【0053】

単離された抗体:「単離された抗体」は、本明細書で使用される場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体が実質的にない抗体を指すことが意図される(例として、トランスフェリン受容体に特異的に結合する単離された抗体は、トランスフェリン受容体以外の抗原に特異的に結合する抗体が実質的にない)。しかしながら、トランスフェリン受容体複合体に特異的に結合する単離された抗体は、他の種からのトランスフェリン受容体分子などの他の抗原への交差反応性を有していてもよい。その上、単離された抗体は、他の細胞の材料および/または(例として、および)化学物質が実質的になくてもよい。

【0054】

Kabatナンバリング:用語「Kabatナンバリング」、「Kabat定義」、および「Kabat標識化」は、本明細書では互換的に使用される。これらの用語は、当該技術分野において認識されているが、抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基より可変(すなわち、超可変)であるアミノ酸残基をナンバリングする系を指す(Kabat et al.(1971)Ann.NY Acad.Sci.190:382-391および、Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)

。重鎖可変領域において、超可変領域は、CDR1につきアミノ酸位置31～35、CDR2につきアミノ酸位置50～65、およびCDR3につきアミノ酸位置95～102に及ぶ。軽鎖可変領域において、超可変領域は、CDR1につきアミノ酸位置24～34、CDR2につきアミノ酸位置50～56、およびCDR3につきアミノ酸位置89～97に及ぶ。

【0055】

分子ペイロード:本明細書で使用される場合、用語「分子ペイロード」は、生物学的結果(biological outcome)をモジュレートするよう機能する分子または種を指す。いくつかの態様において、分子ペイロードは、筋標的化剤へ連結されているか、または別様に結び付けられている。いくつかの態様において、分子ペイロードは、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、またはオリゴヌクレオチドである。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DNA配列の転写をモジュレートするよう、タンパク質の発現をモジュレートするよう、またはタンパク質の活性をモジュレートするよう機能する。いくつかの態様において、分子ペイロードは、標的遺伝子に対する相補性領域を有する鎖を含むオリゴヌクレオチドである。

10

【0056】

筋標的化剤:本明細書で使用される場合、用語「筋標的化剤」は、筋細胞上に発現されている抗原へ特異的に結合する分子を指す。筋細胞中または筋細胞上の抗原は、膜タンパク質、例えば、内在性膜タンパク質または表在性膜タンパク質であってもよい。典型的には、筋標的化剤は、筋細胞中への筋標的化剤(および結び付けられたいずれかの分子ペイロード)の内在化を容易にさせる筋細胞上の抗原へ特異的に結合する。いくつかの態様において、筋標的化剤は、筋肉上の内在化する細胞表面受容体へ特異的に結合し、受容体媒介内在化を通して筋細胞中へ内在化されることが可能である。いくつかの態様において、筋標的化剤は、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸(例として、アプタマー)、または抗体である。いくつかの態様において、筋標的化剤は、分子ペイロードへ連結されている。

20

【0057】

筋標的化抗体:本明細書で使用される場合、用語「筋標的化抗体」は、筋細胞中または筋細胞上に見出される抗原へ特異的に結合する抗体である筋標的化剤を指す。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、筋細胞中への筋標的化抗体(および結び付けられたいずれかの分子ペイロード)の内在化を容易にする筋細胞上の抗原へ特異的に結合する。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、筋細胞上に存在する、内在化する細胞表面受容体へ特異的に結合する。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、トランスフェリン受容体へ特異的に結合する抗体である。

30

【0058】

オリゴヌクレオチド:本明細書で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、最大で200ヌクレオチド長のオリゴマーの核酸化合物を指す。オリゴヌクレオチドの例は、これらに限定されないが、RNAiオリゴヌクレオチド(例として、siRNA、shRNA)、マイクロRNA、ギャップマー、mixmer、ホスホロジアミダート、モルホリノ、ペプチド核酸、アプタマー、ガイド核酸(例として、Cas9ガイドRNA)等々を包含する。オリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であってもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾ヌクレオシド(例として、2'-O-メチル糖修飾、プリンまたはピリミジン修飾)を含んでいてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾ヌクレオシド間連結を含んでいてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、RpまたはSpの立体化学配置にあってもよい1個以上のホスホロチオアート連結を含んでいてもよい。

40

【0059】

組換え抗体:用語「組換えヒト抗体」は、本明細書に使用されるとき、組換え手段によって調製、発現、創出、もしくは単離されたすべてのヒト抗体、例えば、宿主細胞中へトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体(本開示により詳細に記載される)、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体(Hoogenboom H.R.,(1997)TIB Tech.15:62-70;Azzazy H.,and Highsmith W.E.,(2

50

002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) Bio Techniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378)、ヒト免疫グロブリン遺伝子トランスジェニック動物(例として、マウス)から単離された抗体(例として、Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370を参照されたい)、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列とのスプライシングを伴ういずれかの他の手段によって調製、発現、創出、もしくは単離された抗体を包含することが意図される。かかる組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。ただし、ある態様において、かかる組換えヒト抗体は、in vitroでの変異誘発(または、ヒトIg配列トランスジェニック動物が使用されるとき、in vivoでの体細胞変異誘発)へ供され、よって、組換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系のVH配列およびVL配列に由来しかつこれに関するとはいえ、in vivoでのヒト抗体の生殖細胞系列レパートリー内には天然に存在しないだろう配列である。本開示の一態様は、当該技術分野において周知である技法を使用して、例えば、これらに限定されないが、ヒトIgファージライブラリ(例えば、Jermutusらの国際公開第2005/007699号に開示されたもの)を使用する技法を使用して生成され得るヒトトランスフェリン受容体に結合することが可能な完全ヒト抗体を提供する。

10

【0060】

20

相補性領域:本明細書で使用される場合、用語「相補性領域」は、2つのヌクレオチド配列が生理学的な条件下(例として、細胞中)で相互にアニーリングすることが可能であるような、同族の(cognate)ヌクレオチド配列(例として、標的核酸のヌクレオチド配列)に十分に相補的であるヌクレオチド配列(例として、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列)を指す。いくつかの態様において、相補性領域は、標的核酸の同族のヌクレオチド配列に完全に相補的である。しかしながら、いくつかの態様において、相補性のある領域は、標的核酸の同族のヌクレオチド配列に部分的に相補的(例として、少なくとも80%、90%、95%、または99%相補性)である。いくつかの態様において、相補性のある領域は、標的核酸の同族のヌクレオチド配列と比較して1個、2個、3個、または4個のミスマッチを含有する。

30

【0061】

特異的に結合する:本明細書で使用される場合、用語「特異的に結合する」は、結合アッセイまたは他の結合に関する文脈(binding context)において、分子が、適切な対照から結合パートナーを区別するために使用され得る親和性または結合活性の程度での、分子の、結合パートナーへの結合能を指す。抗体に関し、用語「特異的に結合する」は、親和性または結合活性の程度で(例として、本明細書に記載のとおり、抗原への結合を通してある細胞(例として、筋細胞)への優先的な標的化を許容する程度で)、適切な参照抗原、または抗体が他の抗原から特定の抗原を区別するために使用され得る抗原と比較して、抗体が特定の抗原に結合する能力を指す。いくつかの態様において、抗体が標的へ結合する際少なくとも約 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、またはこれ未満の K_D を有する場合、抗体は標的へ特異的に結合する。いくつかの態様において、抗体が、トランスフェリン受容体、例として、トランスフェリン受容体の先端ドメインのエピトープへ特異的に結合する。

40

【0062】

スプライスアクセプター部位:本明細書で使用される場合、「スプライスアクセプター部位」または「スプライスアクセプター」という用語は、プレ-mRNAのmRNAへのスプライシング(すなわち、プレ-mRNAからイントロンを除去すること)に関与する遺伝子またはプレ-mRNAのイントロンの3'末端またはイントロン/エクソン接合部に跨る核酸配列モチーフを指し、スプライシング特徴と呼ぶことができる。スプライスアクセプター部位は、イントロンの3'末端に末端AG配列を含み、これは通常、ピリミジンが多い領域(C

50

/U)が先行する(5'方向)。スプライスアクセプター部位の上流は分岐点である。分岐点とスプライスドナー部位との間のエステル交換反応によるラリアートループ中間体構造の形成は、5'エクソンの3'-OHを放出し、これはその後3'エクソンの第1のヌクレオチドと反応し、それによってエクソンを結合し、イントロンラリアートを放出する。スプライスアクセプター部位のイントロンの3'末端のAG配列は、これらのヌクレオチドの1つを変化させるとスプライシングの阻害をもたらすので、適切なスプライシングにとって重要であることが知られている。まれに、代替のスプライスアクセプター部位は、イントロンの3'末端に、より一般的なAGではなくACを有する。一般的なスプライスアクセプター部位モチーフは、[Yリッチ領域]-NCAGGまたはY_xNYAGGの配列またはそれに類似する配列を有し、ここでYはピリミジンを表し、Nは任意のヌクレオチドを表し、xは4から20の数である。切断部位は、切除されたイントロンの3'末端ヌクレオチドを表すAGに続く。

10

【0063】

スプライスドナー部位:本明細書で使用される場合、「スプライスドナー部位」または「スプライスドナー」という用語は、プレ-mRNAのmRNAへのスプライシング(すなわち、プレ-mRNAからイントロンを除去すること)に関与する遺伝子またはプレ-mRNAのイントロンの5'末端またはエクソン/イントロン接合部に跨る核酸配列モチーフを指し、スプライシング特徴と呼ぶことができる。スプライスドナー部位は、より大きく、ほとんど拘束されていない配列内に、イントロンの5'末端に末端GU配列を含む。スプライシング中、分岐点内のヌクレオチドの2'-OHは、スプライスドナー部位内のイントロンの5'Gに対する求核攻撃を介してエステル交換反応を開始する。これにより、Gはプレ-mRNAから切断され、代わりに分岐点ヌクレオチドに結合し、ループラリアート構造を形成する。上流エクソンの3'ヌクレオチドはその後スプライスアクセプター部位に結合し、エクソンを結合し、イントロンを切除する。典型的なスプライスドナー部位は、GGGURAGUまたはAGGURNGの配列またはこれに類似する配列を有し、ここでRはプリンを表し、Nは任意のヌクレオチドを表す。切断部位は、切除されたイントロンの5'末端ヌクレオチドを表す第1のGU(すなわち、GG/GURAGUまたはAG/GURNG)に先行する。

20

【0064】

対象:本明細書で使用される場合、用語「対象」は、哺乳動物を指す。いくつかの態様において、対象は、霊長目の非ヒト動物または齧歯類動物である。いくつかの態様において、対象は、ヒトである。いくつかの態様において、対象は、疾患を有するかまたは疾患を有すると疑われるペイシエント、例として、ヒト患者である。いくつかの態様において、対象は、変異したDMD遺伝子配列、例として、DMD遺伝子配列のエクソンにおける変異に起因する疾患を有するかまたは有すると疑われるヒト患者である。いくつかの態様において、対象は、ジストロフィノパチー、例として、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する。いくつかの態様において、対象は、エクソン55のスキッピングに適したDMD遺伝子の突然変異を有する患者である。

30

【0065】

トランスフェリン受容体:本明細書に使用されるとき、用語「トランスフェリン受容体」(またTFR、CD71、p90、またはTFR1としても知られている)は、エンドサイトーシスによる鉄取り込みを促進するためのトランスフェリンへ結合する、内在化する細胞表面受容体を指す。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体は、ヒト(NCBI Gene ID 7037)、霊長目の非ヒト動物(例として、NCBI Gene ID 711568もしくはNCBI Gene ID 102136007)、または齧歯類の動物(例として、NCBI Gene ID 22042)を起源としていてもよい。加えて、受容体の種々のアイソフォームをコードした複数のヒト転写産物バリエーションが(例として、GenBank RefSeq受託番号:NP_001121620.1、NP_003225.2、NP_001300894.1、およびNP_001300895.1の注釈付きのもの)特徴付けられている。

40

【0066】

2'修飾ヌクレオシド:本明細書で使用される場合、用語「2'修飾ヌクレオシド」および

50

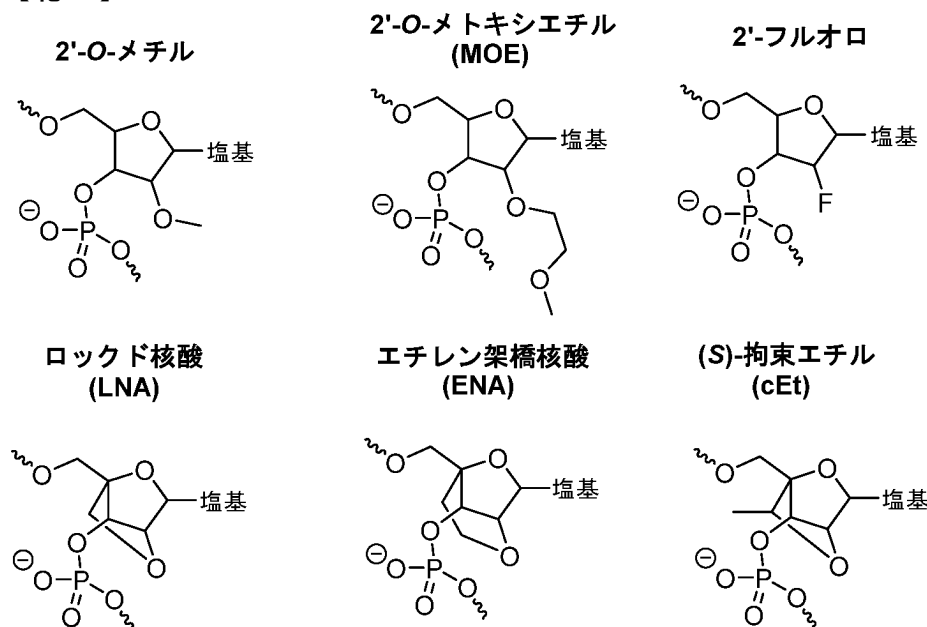
「2'修飾リボヌクレオシド」は互換的に使用され、2'位にて修飾された糖部分を有するヌクレオシドを指す。いくつかの態様において、2'修飾ヌクレオシドは、2'-4'二環式ヌクレオシドであり、ここで糖の2'および4'位は架橋されている(例として、メチレン、エチレン、または(S)-拘束エチル架橋による)。いくつかの態様において、2'修飾ヌクレオシドは非二環式2'修飾ヌクレオシドであり、例として、ここで糖部分の2'位は置換されている。2'修飾ヌクレオシドの非限定例は、以下:2'デオキシ、2'-フルオロ(2'-F)、2'-O-メチル(2'-O-Me)、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)、ロックド核酸(LNA、メチレン架橋核酸)、エチレン架橋核酸(ENA)、および(S)-拘束エチル架橋核酸(cEt)を包含する。いくつかの態様において、本明細書に記載の2'修飾ヌクレオシドは高親和性修飾ヌクレオシドであり、2'修飾ヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドは、未修飾のオリゴヌクレオチドと比べて標的配列に対する増大した親和性を有する。2'修飾ヌクレオシドの構造の例は、下に提供される:

【化1】

10

20

30



これらの例はリン酸基を用いて示されているが、任意のヌクレオシド間結合が2'修飾ヌクレオシド間で企図される。

【0067】

II. 複合体

本明細書で提供されるのは、標的化剤、例として、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗体を含む複合体である。いくつかの態様において、複合体は、オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された筋標的化抗体を含む。複合体は、単一の抗原部位に特異的に結合する抗体、または同じ抗原上もしくは異なる抗原上に存在していてもよい少なくとも2つの抗原部位へ結合する抗体を含んでもよい。

40

【0068】

複合体は、少なくとも1つの遺伝子、タンパク質、および/または(例として、および)、核酸の活性あるいは機能をモジュレートするために使用されてもよい。いくつかの態様において、複合体の中に存在する分子ペイロードは、遺伝子、タンパク質、および/または(例として、および)、核酸のモジュレーションを担う。分子ペイロードは、細胞中の遺伝子、タンパク質、および/または(例として、および)、核酸の活性あるいは機能をモジュレートすることが可能な、小分子、タンパク質、核酸、オリゴヌクレオチド、あるいはいずれの分子実体であってもよい。

【0069】

50

いくつかの態様において、複合体は、例として、変異DMD対立遺伝子からコードされる転写物において、分子ペイロード、例として、DMDを標的としてエクソンスキッピングを促進するアンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された筋標的化剤、例として、抗トランスフェリン受容体抗体を含む。いくつかの態様において、複合体は、DMDプレ-mRNAを標的とし、DMDプレ-mRNA中のエクソン55のスキッピングを促進する。

【0070】

A.筋標的化剤

本開示のいくつかの側面は、筋標的化剤、例として、分子ペイロードを筋細胞へ送達するための筋標的化剤を提供する。いくつかの態様において、かかる筋標的化剤は、例として、筋細胞上の抗原への特異的な結合を介して、筋細胞に結合すること、および結び付けられた分子ペイロードを筋細胞へ送達することが可能である。いくつかの態様において、分子ペイロードは、筋標的化剤へ結合されて(例として、共有結合的に結合されて)おり、筋標的化剤が筋細胞上の抗原へ結合した際、例として、エンドサイトーシスを介して、筋細胞中へ内在化される。当然のことながら、様々なタイプの筋標的化剤が本開示に従って使用されてもよく、いずれの筋標的(例として、筋肉表面タンパク質)も本明細書に記載のいずれかのタイプの筋標的化剤によって標的化され得る。例えば、筋標的化剤は、小分子、核酸(例として、DNAまたはRNA)、ペプチド(例として、抗体)、脂質(例として、マイクロベシクル)、または糖部(例として、多糖類)を含んでいてもよく、またはこれらからなっているもよい。例示の筋標的化剤は本明細書さらに詳細に記載されているが、しかしながら、当然のことながら、本明細書で提供される例示の筋標的化剤が限定されることを意図していない。

【0071】

本開示のいくつかの側面は、骨格筋、平滑筋、または心筋などの筋肉上の抗原へ特異的に結合する筋標的化剤を提供する。いくつかの態様において、本明細書で提供される筋標的化剤のいずれも、骨格筋細胞、平滑筋細胞、および/または(例として、および)、心筋細胞上の抗原に結合する(例として、特異的に結合する)。

【0072】

筋肉特異的細胞表面認識要素(例として、細胞膜タンパク質)との相互作用によって、組織局在化と筋細胞への選択的取り込みとの両方が達成され得る。いくつかの態様において、筋肉の取り込みトランスポーターの基質である分子は、分子ペイロードを筋組織中へ送達するのに有用である。筋肉表面認識要素への結合、これに続くエンドサイトーシスは、抗体などの巨大分子さえも筋細胞へ侵入できるようにし得る。別の例として、トランスフェリンまたは抗TfR1抗体へ抱合された分子ペイロードは、トランスフェリン受容体への結合を介し筋細胞によって取り入れられ得、次いで、例としてクラスリン媒介エンドサイトーシスを介して取り込まれ得る。

【0073】

筋標的化剤の使用は、他の組織において効果に関連する毒性を低減しつつ、筋肉中の分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)を濃縮するのに有用な場合がある。いくつかの態様において、筋標的化剤は、対象内の別の細胞型と比較して、筋細胞中の結合された分子ペイロードを濃縮させる。いくつかの態様において、筋標的化剤は、筋細胞(例として、骨格筋細胞、平滑筋細胞、または心筋細胞)中の結合された分子ペイロードを、非筋細胞(例として、肝臓細胞、神経細胞、血液細胞、または脂肪細胞)中の量より少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、または100倍多い量に濃縮する。いくつかの態様において、筋標的化剤へ結合された場合の分子ペイロードの対象における毒性は、これが対象へ送達されたとき、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、または95%低減される。

【0074】

いくつかの態様において、筋肉選択性を獲得するために、筋肉認識要素(例として、筋細胞抗原)が必要とされ得る。一例として、筋標的化剤は、筋肉特異的取り込みトランスポーターの基質である小分子であってもよい。別の例として、筋標的化剤は、トランスポーター媒介エンドサイトーシスを介して筋細胞へ侵入する抗体であってもよい。別の例として、筋標的化剤は、筋細胞上の細胞表面受容体へ結合するリガンドであってもよい。当然のことながら、トランスポーターをベースとしたアプローチが細胞侵入への直通路を提供するのに対し、受容体をベースとした標的化が所望の作用部位に達するために刺激されたエンドサイトーシスを伴うこともある。

【0075】

i.筋標的抗体

いくつかの態様において、筋標的化剤は抗体である。一般に、それらの標的抗原に対する抗体の高い特異性は、筋細胞(例として、骨格筋細胞、平滑筋細胞、および/または(例として、および)、心筋細胞)を選択的に標的化する可能性をもたらす。この特異性はまた、オフターゲット毒性(off-target toxicity)を限定することもある。筋細胞の表面抗原を標的化することが可能な抗体の例は報告されており、かつ本開示の範囲内にある。例えば、筋細胞の表面を標的化する抗体は、Arahata K.,et al.「Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide」Nature 1988;333:861-3;Song K.S.,et al.「Expression of caveolin-3 in skeletal,cardiac,and smooth muscle cells.Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins」J Biol Chem 1996;271:15160-5;およびWeisbart R.H.et al.,「Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of a monoclonal antibody that binds myosin IIb」Mol Immunol.2003 Mar,39(13):78309に記載されており、こ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。

【0076】

a.抗トランスフェリン受容体(TfR)抗体

本開示のいくつかの側面は、トランスフェリン受容体、例として、抗トランスフェリン受容体抗体へ結合する剤は筋細胞を標的化することが可能であるという認識に基づく。トランスフェリン受容体は、細胞膜を越えてトランスフェリンを輸送し細胞内鉄レベルの調節およびホメオスタシスに加わる内在化する細胞表面受容体である。本開示のいくつかの側面は、トランスフェリン受容体に結合することが可能なトランスフェリン受容体結合タンパク質を提供する。したがって、本開示の側面は、トランスフェリン受容体に結合する結合タンパク質(例として、抗体)を提供する。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体へ結合する結合タンパク質は、結合されたいずれの分子ペイロードと共に、筋細胞中へ内在化される。本明細書で使用される場合、トランスフェリン受容体に結合する抗体は、トランスフェリン受容体抗体、抗トランスフェリン受容体抗体、または抗TfR1抗体と互換的に称されることもある。トランスフェリン受容体へ結合する、例として特異的に結合する抗体は、トランスフェリン受容体へ結合した際、例として受容体媒介エンドサイトーシスを通して、細胞中へ内在化されてもよい。

【0077】

当然のことながら、抗TfR1抗体が、知られている数種の方法論、例として、ファージディスプレイを使用するライブラリ設計を使用して、産生、合成、および/または(例として、および)、誘導体化され得る。例示の方法論は当該技術分野において特徴付けられており、参照により組み込まれる(Diez,P.et al.「High-throughput phage-display screening in array format」,Enzyme and microbial technology,2015,79,34-41.;Christoph M.H.and Stanley,J.R.「Antibody Phage Display:Technique and Applications」J Invest Dermatol.2014,134:2.;Engleman,Edgar(E d.)「Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies.」1985,Springer)。他の態様において、抗TfR1抗体はこれまでにキャラクタライズされているかまたは開示さ

れている。トランスフェリン受容体へ特異的に結合する抗体は当該技術分野において知られている(例として、米国特許第4,364,934号、1979年12月4日出願、「Monoclonal antibody to a human early thymocyte antigen and methods for preparing same」、米国特許第8,409,573号、2006年6月14日出願、「Anti-CD71 monoclonal antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells」、米国特許第9,708,406号、2014年5月20日出願、「Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use」;米国特許第9,611,323号、2014年12月19日出願、「Low affinity blood brain barrier receptor antibodies and uses thereof」、国際公開第2015/098989号、2014年12月24日出願、「Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier」、Schneider C. et al. 「Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9.」 J Biol Chem. 1982, 257:14,8516-8522.、Lee et al. 「Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse」 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292:1048-1052を参照されたい)。

10

【0078】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、高い特異性および親和性でトランスフェリン受容体に結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、トランスフェリン受容体のいずれかの細胞外エピトープまたは抗体に対して暴露されるようになるエピトープに特異的に結合する。いくつかの態様において、本明細書で提供される抗TfR1抗体はヒト、霊長目の非ヒト動物、マウス、ラットなどからのトランスフェリン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、本明細書で提供される抗TfR1抗体はヒトトランスフェリン受容体に結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号105~108に提供されるような、ヒトまたは非ヒト霊長類トランスフェリン受容体のアミノ酸セグメントに結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、トランスフェリン受容体の先端ドメインにはない、配列番号105に示されるヒトトランスフェリン受容体のアミノ酸90~96に対応するアミノ酸セグメントに結合する。

20

【0079】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体(例として、以下の表2の抗TfRクローン8)は、TfR1のエピトープに結合し、エピトープは、配列番号105のアミノ酸214~241および/またはアミノ酸354~381の残基を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号105のアミノ酸214~241およびアミノ酸354~381の残基を含むエピトープに結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号105に示されるヒトTfR1の残基Y222、T227、K231、H234、T367、S368、S370、T376、およびS378のうちの1つ以上を含むエピトープに結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号105に示されるヒトTfR1の残基Y222、T227、K231、H234、T367、S368、S370、T376およびS378を含むエピトープに結合する。

30

【0080】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体(例として、以下の表2の3M12およびそのバリエーション)は、配列番号105のアミノ酸258~291および/またはアミノ酸358~381の残基を含むTfR1のエピトープに結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体(例として、以下の表2の3M12およびそのバリエーション)は、配列番号105のアミノ酸258~291およびアミノ酸358~381の残基を含むエピトープに結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体(例として、以下の表2の3M12およびそのバリエーション)は、配列番号105に示されるヒトTfR1の残基K261、S273、Y282、T362、S368、S370、およびK371の1つ以上を含むエピトープに結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体(例として、以下の表2の3M12およびそのバリエーション)は、配列番号105に示されるヒトTfR1の残基K261

40

50

、S273、Y282、T362、S368、S370、およびK371を含むエピトープに結合する。

【0081】

NCBI配列NP_003225.2(トランスフェリン受容体タンパク質1アイソフォーム1、*homo sapiens*)に対応する、ヒトトランスフェリン受容体アミノ酸配列の例は、以下のとおりである：

MMDQARSAFSNLFGGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKAN
VTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGE
DFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYPREAGSQKDENLALYVEN
QFREFKLSKVWRDQH FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAAT
VTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMD
QTKFPIVNAELSSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA
EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEP
DHYVVVG AQRDAWGPGA AKSGVGTALLKLAQMFS DMVLKDG FQPSRSIIFASWSA
GDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQN
VKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTT
MDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLN
QYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVE
YHFLSPYVSPKESPF RHVFWGSGSHTLPALLENLKL RKQNNGAFNETLFRNQLALAT
WTIQGAANALSGDVWDIDNEF(配列番号105)

10

【0082】

NCBI配列NP_001244232.1(トランスフェリン受容体タンパク質1、*Macaca mulatta*)に対応する、霊長目の非ヒト動物トランスフェリン受容体アミノ酸配列の例は、以下のとおりである：

MMDQARSAFSNLFGGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDEEENTDNNTKPNG
TKPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEED
FPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQ
FREFKLSKVWRDQH FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVT
GKLVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTK
FPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKL
FGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHY
VVVG AQRDAWGPGA AKSSVGTALLKLAQMFS DMVLKDG FQPSRSIIFASWSAGDF
GSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKH
PVTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDT
YKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLT HDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYR
ADVKE MGSLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFRNAEK RDKFVMKKLNDRVMRVEYYF
LSPYVSPKESPF RHVFWGSGSHTLSALLES LKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTI
QGAANALSGDVWDIDNEF

20

30

(配列番号106)

【0083】

NCBI配列XP_005545315.1(トランスフェリン受容体タンパク質1、*Macaca fascicularis*)に対応する、霊長目の非ヒト動物トランスフェリン受容体アミノ酸配列の例は、以下のとおりである：

MMDQARSAFSNLFGGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDEEENTDNNTKAN
GTKPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIEN
QFREFKLSKVWRDQH FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAAT
VTGKLVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQ
TKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAE
KLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPD
HYVVVG AQRDAWGPGA AKSSVGTALLKLAQMFS DMVLKDG FQPSRSIIFASWSAG

40

50

DFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDV
KHPVTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTM
DTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNDYERYNSQLLLFLRDLNQ
YRADVKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDVRMRVE
YYFLSPYVSPKESPFRHVFVWGSGSHTLSALLESLKLRRQNNSAFNETLFRNQLALAT
WTIQGAANALSGDVWDIDNEF(配列番号107)

【0084】

NCBI配列NP_001344227.1(トランスフェリン受容体タンパク質1、*mus musculus*)に対応する、マウストランスフェリン受容体アミノ酸配列の例は、以下のとおりである:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAADDEENADNNMKAS
VRKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLG YCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETM
ETEDVPTSSRLYWADLKTLLSEKLNSIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYI
ENQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPT
EVSGKLVHANFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMD
KNKFPVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSPSSGLPNIPVQTISRAA
AEKLF GKMEGSCPARWNIDSSCKLELSQNNVKNV LKERRILNIFGVIKGYEEP
DRYVVVG AQRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFS DMISKDGF RPSRSIIFASWTA
GDFGAVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVVLGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQD
VKHPVDGKSLYRDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTR
LDTYEALTQKVPQLNQMVRTAAEVAGQLIKLTHDVELNDYEMYSKLLSFMKDL
NQFKTDIRD MGLSLQWLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNR FVMREINDRIMKV
EYHFLSPYVSPRESPFRHIFWGS GSHTLSALVENLKL RQKNITAFNETLFRNQLALAT
WTIQGVANALSGDIWNIDNEF

(配列番号108)

【0085】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、以下のように受容体のアミノ酸セグメントに結合し:

FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGKLVHANFGTKKDF
EDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHA
HLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSPSSGLPNIPVQTISRAAAEKLF GNMEGDCPSDWK
TDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKE(配列番号109)トランスフェリン受容体とトランスフェリンおよび/または(例として、および)ヒト血色素症タンパク質(HFEとしても知られる)との間の結合相互作用を阻害しない。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1受容体抗体は、配列番号109のエピトープには結合しない。

【0086】

適切な方法論は、例として、組換えDNAプロトコルの使用を通じて、抗体、抗体フラグメント、もしくは抗原結合剤を得るか、および/または(例として、および)、産生するために使用されてもよい。いくつかの態様において、抗体はまた、ハイブリドーマの生成を通して産生されてよい(例として、Kohler, G and Milstein, C. 「Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity」 *Nature*, 1975, 256:495-497を参照されたい)。関心のある抗原は、いずれの型または実体の、例として、組換え型もしくは天然に存在する型または実体の免疫原として使用されてもよい。ハイブリドーマは、標準的な方法、例としてELISAスクリーニングを使用してスクリーニングされることで、具体的な抗原を標的化する抗体を産生する少なくとも1個のハイブリドーマが見出される。抗体はまた、抗体を発現するタンパク質発現ライブラリ(例として、ファージディスプレイライブラリ)のスクリーニングを通して産生されてよい。ファージディスプレイライブラリ設計はまた、いくつかの態様において使用されてもよい(例として、米国特許第5,223,409号、1991年3月1日出願、「Directed evolution of novel binding proteins」、国際公開第1992/18619号、1992年4月10日

10

20

30

40

50

出願、「Heterodimeric receptor libraries using phagemids」、国際公開第1991/17271号、1991年5月1日出願、「Recombinant library screening methods」、国際公開第1992/20791号、1992年5月15日出願、「Methods for producing members of specific binding pairs」、および国際公開第1992/15679号、1992年2月28日出願、「Improved epitope displaying phage」を参照されたい)。いくつかの態様において、関心のある抗原は、非ヒト動物、例として、齧歯類の動物またはヤギを免疫するために使用されてもよい。いくつかの態様において、次いで抗体が非ヒト動物から得られたら、任意に数多の方法論を使用し、例として、組換えDNA技法を使用し、修飾してもよい。抗体産生および方法論の追加の例も当該技術分野において知られている(例として、Harlow et al.「Antibodies:A Laboratory Manual」,Cold Spring Harbor Laboratory,1988を参照されたい)。

10

【0087】

いくつかの態様において、抗体は修飾されている(例として、グリコシル化、リン酸化、SUMO化、および/または(例として、および)、メチル化を介して修飾されている)。いくつかの態様において、抗体は、1個以上の糖または炭水化物分子へ抱合されたグリコシル化抗体である。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、N-グリコシル化、O-グリコシル化、C-グリコシル化、グリπιエーション(GPIアンカー付着)、および/または(例として、および)、ホスホグリコシル化を介して、抗体へ抱合されている。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、またはグリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、分枝オリゴ糖類または分枝グリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、マンノース単位、グルコース単位、N-アセチルグルコサミン単位、N-アセチルガラクトサミン単位、ガラクトース単位、フコース単位、またはホスホ脂質単位を包含する。いくつかの態様において、糖分子は、約1~10個、約1~5個、約5~10個、約1~4個、約1~3個、または約2個存在する。いくつかの態様において、グリコシル化抗体は、全体的にまたは部分的にグリコシル化されている。いくつかの態様において、抗体は、化学反応によって、または酵素的な手段によってグリコシル化されている。いくつかの態様において、抗体は、in vitroでまたは細胞(任意にN-またはO-グリコシル化経路中の酵素(例として、グリコシルトランスフェラーゼ)を欠乏していてもよい)内部でグリコシル化される。いくつかの態様において、抗体は、「Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof」と題する2014年5月1日に公開された国際公開第2014065661号に記載されるような糖または炭水化物分子で官能化されている。

20

30

【0088】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、表2~7のうちのいずれか1つから選択される抗TfR1抗体のいずれか1つのVLDメインおよび/または(例として、および)VHドメインを含み、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、またはIgY免疫グロブリン分子、いずれかのクラス(例として、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)、またはいずれかのサブクラス(例として、IgG2aおよびIgG2b)の免疫グロブリン分子の定常領域のアミノ酸配列を含む定常領域を含む。ヒト定常領域の非限定例は当該技術分野において記載されており、例として、上述のKabat E A et al.,(1991)を参照されたい。

40

【0089】

いくつかの態様において、トランスフェリン受容体に結合する薬剤、例として抗TfR1抗体は、筋細胞を標的化することができ、および/または(例として、および)血液脳関門を通過する薬剤の輸送を媒介する。トランスフェリン受容体は、細胞膜を越えてトランスフェリンを輸送し細胞内鉄レベルの調節およびホメオスタシスに加わる内在化する細胞表面受容体である。本開示のいくつかの側面は、トランスフェリン受容体に結合することが可能なトランスフェリン受容体結合タンパク質を提供する。トランスフェリン受容体へ結合する、例として特異的に結合する抗体は、トランスフェリン受容体へ結合した際、例として受容体媒介エンドサイトーシスを通して、細胞中へ内在化されてもよい。

50

【0090】

いくつかの態様では、トランスフェリン受容体に高い特異性および親和性で結合するヒト化抗体が本明細書で提供される。いくつかの態様において、本明細書に記載のヒト化抗TfR1抗体は、トランスフェリン受容体のいずれかの細胞外エピトープ、または抗体に対して暴露されるようになるエピトープに特異的に結合する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるヒト化抗TfR1抗体はヒト、霊長目の非ヒト動物、マウス、ラットなどからのトランスフェリン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるヒト化抗TfR1抗体はヒトトランスフェリン受容体に結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載のヒト化抗TfR1抗体は、配列番号105～108に提供されるような、ヒトまたは非ヒト霊長類トランスフェリン受容体のアミノ酸セグメントに結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載のヒト化抗TfR1抗体は、トランスフェリン受容体の先端ドメインにはない、配列番号105に示されるヒトトランスフェリン受容体のアミノ酸90～96に対応するアミノ酸セグメントに結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載のヒト化抗TfR1抗体は、TfR1に結合するが、TfR2には結合しない。

【0091】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、少なくとも約 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、またはより小さい結合親和性(例として、Kdによって指し示される)をもってTfR1(例として、ヒトまたは霊長目の非ヒト動物TfR1)に特異的に結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体はサブナノモル範囲のKDをもってTfR1に結合する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体はトランスフェリン受容体1(TfR1)に選択的に結合するが、トランスフェリン受容体2(TfR2)には結合しない。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体はヒトTfR1およびカニクイTfR1に結合するが(例として、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、またはより小さいKdをもって)、マウスTfR1には結合しない。抗TfR1抗体の親和性および結合動態は、限定するものではないが、バイオセンサ技術(例として、OCTETまたはBIACORE)などの任意の好適な方法を使用して試験され得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれか1つの結合は、TfR1へのトランスフェリン結合と競合も阻害もしない。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれか1つの結合は、TfR1に対するHFE-ベータ2-ミクログロブリン結合と競合も阻害もしない。

【0092】

抗TfR1抗体の非限定的な例は表2に示される。

【表2-1】

表2. 抗TfR1抗体の例

Ab	系番号	IMGT	Kabat	Chothia
3-A4	CDR-H1	GFNIKDDY (配列番号 1)	DDYMY (配列番号 7)	GFNIKDD (配列番号 12)
	CDR-H2	IDPENGDT (配列番号 2)	WIDPENGDT EYASKFQD (配列番号 8)	ENG (配列番号 13)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (配列番号 3)	WLRRGLDY (配列番号 9)	LRRGLD (配列番号 14)
	CDR-L1	KSLHLSNGYTY (配列番号 4)	RSSKSLHLSNGYTYLF (配列番号 10)	SKSLHLSNGYTY (配列番号 15)
	CDR-L2	RMS (配列番号 5)	RMSNLAS (配列番号 11)	RMS (配列番号 5)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

Ab	系番号	IMGT	Kabat	Chothia
	CDR-L3	MQHLEYPFT (配列番号 6)	MQHLEYPFT (配列番号 6)	HLEYPF (配列番号 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSTVTS S (配列番号 17)		
	VL	DIVMTQAAPSPVTPGESVSISCRSSKSLLSNGYTYLFWFLQRPQSPQLLIYRMSNLA SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (配列番号 18)		
3-A4 N54T*	CDR-H1	GFNIKDDY (配列番号 1)	DDYMY (配列番号 7)	GFNIKDD (配列番号 12)
	CDR-H2	IDPETGDT (配列番号 19)	WIDPETGDT EYASKFQD (配列番号 20)	ETG (配列番号 21)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (配列番号 3)	WLRRGLDY (配列番号 9)	LRRGLD (配列番号 14)
	CDR-L1	KSLLSNGYTY (配列番号 4)	RSSKSLLSNGYTYLF (配列番号 10)	SKSLLSNGYTY (配列番号 15)
	CDR-L2	RMS (配列番号 5)	RMSNLAS (配列番号 11)	RMS (配列番号 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (配列番号 6)	MQHLEYPFT (配列番号 6)	HLEYPF (配列番号 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGLEWIGWIDPETGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSTVTS S (配列番号 22)		
	VL	DIVMTQAAPSPVTPGESVSISCRSSKSLLSNGYTYLFWFLQRPQSPQLLIYRMSNLA SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (配列番号 18)		
3-A4 N54S*	CDR-H1	GFNIKDDY (配列番号 1)	DDYMY (配列番号 7)	GFNIKDD (配列番号 12)
	CDR-H2	IDPESGDT (配列番号 23)	WIDPESGDT EYASKFQD (配列番号 24)	ESG (配列番号 25)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (配列番号 3)	WLRRGLDY (配列番号 9)	LRRGLD (配列番号 14)
	CDR-L1	KSLLSNGYTY (配列番号 4)	RSSKSLLSNGYTYLF (配列番号 10)	SKSLLSNGYTY (配列番号 15)
	CDR-L2	RMS (配列番号 5)	RMSNLAS (配列番号 11)	RMS (配列番号 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (配列番号 6)	MQHLEYPFT (配列番号 6)	HLEYPF (配列番号 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGLEWIGWIDPESGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSTVTS S (配列番号 26)		
	VL	DIVMTQAAPSPVTPGESVSISCRSSKSLLSNGYTYLFWFLQRPQSPQLLIYRMSNLA SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (配列番号 18)		
3-M12	CDR-H1	GYSITSGYY (配列番号 27)	SGYYWN (配列番号 33)	GYSITSGY (配列番号 38)
	CDR-H2	ITFDGAN (配列番号 28)	YITFDGANNYNPSLKN (配列番号 34)	FDG (配列番号 39)
	CDR-H3	TRSSYDYDVL DY (配列番号 29)	SSYDYDVL DY (配列番号 35)	SYDYDVL D (配列番号 40)
	CDR-L1	QDISNF (配列番号 30)	RASQDISNFLN (配列番号 36)	SQDISNF (配列番号 41)
	CDR-L2	YTS (配列番号 31)	YTSRLHS (配列番号 37)	YTS (配列番号 31)
	CDR-L3	QQGHTLPYT (配列番号 32)	QQGHTLPYT (配列番号 32)	GHTLPY (配列番号 42)
	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYTSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYITFDGAN NYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSVTEDTATYYCTRSSYDYDVL DYWGQGTTLTV SS (配列番号 43)		

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

Ab	系番号	IMGT	Kabat	Chothia
	VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWFYQQRPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDFSLTVSNLEQEDIATYFCQQGHTLPYTFGGGKLEIK (配列番号 44)		
5-H12	CDR-H1	GYSFTDYC (配列番号 45)	DYCIN (配列番号 51)	GYSFTDY (配列番号 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (配列番号 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (配列番号 52)	GSG (配列番号 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (配列番号 47)	EDYYPYHGMDY (配列番号 53)	DYYPYHGMD (配列番号 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (配列番号 48)	RASESVDGYDNSFMH (配列番号 54)	SESVDGYDNSF (配列番号 59)
	CDR-L2	RAS (配列番号 49)	RASNLES (配列番号 55)	RAS (配列番号 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (配列番号 50)	QQSSEDPWT (配列番号 50)	SSEDPW (配列番号 60)
	VH	QIQLQQSGPELVVRPGASVKISCKASGYSFTDYCINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTRY YSERFKGKATLTVDTSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSTV TVSS (配列番号 61)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASNLES GIPARFSGSGSRTDFLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGKLEIK (配列番号 62)		
5-H12 C33Y*	CDR-H1	GYSFTDYY (配列番号 63)	DYYIN (配列番号 64)	GYSFTDY (配列番号 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (配列番号 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (配列番号 52)	GSG (配列番号 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (配列番号 47)	EDYYPYHGMDY (配列番号 53)	DYYPYHGMD (配列番号 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (配列番号 48)	RASESVDGYDNSFMH (配列番号 54)	SESVDGYDNSF (配列番号 59)
	CDR-L2	RAS (配列番号 49)	RASNLES (配列番号 55)	RAS (配列番号 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (配列番号 50)	QQSSEDPWT (配列番号 50)	SSEDPW (配列番号 60)
	VH	QIQLQQSGPELVVRPGASVKISCKASGYSFTDYYINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTRY YSERFKGKATLTVDTSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSTV TVSS (配列番号 65)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASNLES GIPARFSGSGSRTDFLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGKLEIK (配列番号 62)		
5-H12 C33D*	CDR-H1	GYSFTDYD (配列番号 66)	DYDIN (配列番号 67)	GYSFTDY (配列番号 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (配列番号 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (配列番号 52)	GSG (配列番号 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (配列番号 47)	EDYYPYHGMDY (配列番号 53)	DYYPYHGMD (配列番号 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (配列番号 48)	RASESVDGYDNSFMH (配列番号 54)	SESVDGYDNSF (配列番号 59)
	CDR-L2	RAS (配列番号 49)	RASNLES (配列番号 55)	RAS (配列番号 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (配列番号 50)	QQSSEDPWT (配列番号 50)	SSEDPW (配列番号 60)
	VH	QIQLQQSGPELVVRPGASVKISCKASGYSFTDYDINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTRY SERFKGKATLTVDTSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSTV SS (配列番号 68)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASNLES GIPARFSGSGSRTDFLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGKLEIK (配列番号 62)		
	CDR-H1	GYSFTSYW (配列番号 138)	SYWIG (配列番号 144)	GYSFTSY (配列番号 149)

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

Ab	系番号	IMGT	Kabat	Chothia
抗 TfR クロー ン 8	CDR- H2	IYPGDSDT (配列番号 139)	IIYPGDSDDTRYSPSFQGG (配列番号 145)	GDS (配列番号 150)
	CDR- H3	ARFPYDSSGYYSFDY (配列番号 140)	FPYDSSGYYSFDY (配列番号 146)	PYDSSGYYSFD (配列番号 151)
	CDR- L1	QSISSY (配列番号 141)	RASQSISSYLN (配列番号 147)	SQSISSY (配列番号 152)
	CDR- L2	AAS (配列番号 142)	AASSLQS (配列番号 148)	AAS (配列番号 142)
	CDR- L3	QQSYSTPLT (配列番号 143)	QQSYSTPLT (配列番号 143)	SYSTPL (配列番号 153)

10

* 変異の位置は、変異を含む各 VH 配列の Kabat ナンバリングに従っている

【0093】

いくつかの態様において、本開示の抗 TfR1 抗体は、表 2 に示される抗 TfR1 抗体のいずれか 1 つのヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、本開示の抗 TfR1 抗体は、表 2 に提供される示される抗 TfR1 抗体のいずれか 1 つの CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 と同じ CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、および CDR-L3 を含み、ヒト化重鎖可変領域および / または (例として、および) ヒト化軽鎖可変領域を含む。

20

【0094】

本明細書に記載の抗 TfR1 抗体のアミノ酸配列の例は、表 3 に示される。

【表 3 - 1】

表 3. 抗 TfR1 抗体の可変領域

抗体	可変領域のアミノ酸配列**
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDP ETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRGLD YWGQGTLVTVSS (配列番号 69)
	VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQSPRLLIYR MSNLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEY PFTFGGGTK VEIK (配列番号 70)
3A4 VH3 (N54S*)/Vk4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDP ESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRGLD YWGQGTLVTVSS (配列番号 71)
	VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQSPRLLIYR MSNLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEY PFTFGGGTK VEIK (配列番号 70)
3A4 VH3 /Vk4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDP ENG DTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL WLRRGLD YWGQGTLVTVSS (配列番号 72)
	VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQSPRLLIYR MSNLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEY PFTFGGGTK VEIK (配列番号 70)
3M12 VH3/Vk2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSIT SGYYWNWIRQPPGKGLEWMGYITF DGANNYNPSLKNRVSISR DTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR SSYDYDVL DY WGQGTITVTVSS (配列番号 73)

30

40

50

【表 3 - 2】

抗体	可変領域のアミノ酸配列**
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLIYYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFC QQGHTLPYTF GGGTKLEIK (配列 番号 74)
3M12 VH3/Vκ3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWMGYITF DGANNYNPSLKNRV SISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR SSYDYDVL DY WGQGTITVTVSS (配列番号 73)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLIYYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQGHTLPYTF GGGTKLEIK (配列 番号 75)
3M12 VH4/Vκ2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYITFD GANNYNPSLKNRV SISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR SSYDYDVL DYW GGQTTITVTVSS (配列番号 76)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLIYYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFC QQGHTLPYTF GGGTKLEIK (配列 番号 74)
3M12 VH4/Vκ3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYITFD GANNYNPSLKNRV SISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR SSYDYDVL DYW GGQTTITVTVSS (配列番号 76)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLIYYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQGHTLPYTF GGGTKLEIK (配列 番号 75)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYINWVRQAPGQGLEWMGWYIY PGSGNTRYSERFKGR VTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE DYYPYH GMDYWGQGT LTVTVSS (配列番号 77)
	VL: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESV DGYD NSFMHWYQQKPGQPPKLLIFR ASNLES GVDPDRFSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQSSEDPWTF GGGTKL EIK (配列番号 78)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYINWVRQAPGQGLEWMGWYIY PGSGNTRYSERFKGR VTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE DYYPYH GMDYWGQGT LTVTVSS (配列番号 79)
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESV DGYD NSFMHWYQQKPGQPPKLLIFR ASNLES GVDPDRFSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQSSEDPWTF GGGTKL EIK (配列番号 80)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYINWVRQAPGQGLEWMGWYIY PGSGNTRYSERFKGR VTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE DYYPYH GMDYWGQGT LTVTVSS (配列番号 77)
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESV DGYD NSFMHWYQQKPGQPPKLLIFR ASNLES GVDPDRFSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQSSEDPWTF GGGTKL EIK (配列番号 80)
抗 TIR クローン 8	VH: QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYP GSDTRYSPSFQQT ISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR FYPDSSGY SFDYWGQGT LTVTVSS (配列番号 154)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWFYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLT FGGGTKVEIK (配列 番号 155)

* 変異の位置は、変異を含む各 VII 配列の Kabat ナンバリングに従っている

** Kabat ナンバリング系による CDR は太字

【0095】

いくつかの態様において、本開示の抗 Tfr1 抗体は、表 3 に示される抗 Tfr1 抗体のいずれか 1 つの CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 を含む VH を含み、表 3 に提供されるそれぞれの VH と比較して、1 つ以上 (例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上) のアミノ酸変異を含む。あるいは、または加えて (例として、加えて)、本開示の抗 Tfr1 抗体は、表 3 に提供される抗 Tfr1 抗体のいずれか 1 つの CDR-L1、CDR-L2、および CDR-L3 を含む VL を含み、表 3 に提供されるそれぞれの VL と比較して、1 つ以上 (例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上) のアミノ酸変異を含む。いくつかの態様において、抗 Tfr1 抗体の VH はヒト化 VH であり、かつ/または抗 T

fR1抗体のVLはヒト化VLである。

【0096】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、表3に示される抗TfR1抗体のうちのいずれか1つのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、かつ、表3に示されるそれぞれのVHと比較して、フレームワーク領域において少なくとも70%(例として、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%)同一であるアミノ酸配列を含むVHを含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本開示の抗TfR1抗体は、表3に示される抗TfR1抗体のいずれか1つのCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含み、かつ、表3に示されるそれぞれのVLと比較してフレームワーク領域において少なくとも70%(例として、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%)同一であるアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの態様において、抗TfR1抗体のVHはヒト化VHであり、かつ/または抗TfR1抗体のVLはヒト化VLである。

10

【0097】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号69のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

【0098】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号71のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

20

【0099】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号72のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

【0100】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号73のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号74のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

【0101】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号73のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号75のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

【0102】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号74のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

30

【0103】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号75のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

【0104】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号77のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号78のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

【0105】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号79のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号80のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

40

【0106】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号77のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号80のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

【0107】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号154のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号155のアミノ酸配列を含むヒト化VLを含む。

【0108】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、完全長IgGであり、これはヒト抗体からの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を包含し得る。いくつかの態様におい

50

て、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれかの重鎖は、重鎖定常領域(CH)またはそのある部分(例として、CH1、CH2、CH3、またはそれらの組み合わせ)を含み得る。重鎖定常領域は、任意の好適な起源、例として、ヒト、マウス、ラット、またはウサギに由来し得る。特定の一例において、重鎖定常領域は、ヒトIgG(ガンマ重鎖)、例として、IgG1、IgG2、またはIgG4に由来する。ヒトIgG1定常領域の例は、下に与えられる:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号81)

10

【0109】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれかの重鎖は、変異ヒトIgG1定常領域を含む。例えば、ヒトIgG1のCH2ドメイン上のLALA変異の導入(ヒンジ下部残基Leu234 Leu235をAla234およびAla235によって置き換えるように変異させられたmAb b12に由来する変異体)は、Fcγ受容体結合を低減することが知られている(Bruhns, P., et al. (2009) および Xu, D. et al. (2000))。変異ヒトIgG1定常領域を以下に示す(変異が太字で表され、および下線が付されている):

【数1】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 82)

20

【0110】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれかの軽鎖はさらに、軽鎖定常領域(CL)を含み得、これは当該技術分野において知られているいずれかのCLであり得る。いくつかの例において、CLは、カップ軽鎖である。他の例において、CLは、ラムダ軽鎖である。いくつかの態様において、CLはカップ軽鎖であって、その配列は以下に示される。

30

RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号83)

【0111】

他の抗体の重鎖および軽鎖定常領域は当該技術分野において周知であり、例として、IMGTデータベース(www.imgt.org)において、またはwww.vbase2.org/vbstat.phpにて提供されるものであるが、これらの両方とも参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0112】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVHまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号81または配列番号82と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一である重鎖定常領域を含む重鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVHまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号81または配列番号82と比較して25個以下のアミノ酸変異(例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個以下のアミノ酸変異)を含有する重鎖

50

定常領域を含む重鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVHまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号81に示される重鎖定常領域を含む重鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVHまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号82に示される重鎖定常領域を含む重鎖を含む。

【0113】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVLまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号83と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一である軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVLまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号83と比較して25個以下のアミノ酸変異(例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個以下のアミノ酸変異)を含有する軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVLまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号83で表されるとおりの軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む。

【0114】

記載される抗TfR1抗体のIgG重鎖および軽鎖アミノ酸配列の例は、下の表4に示される。

【表4-1】

表4. 抗TfR1 IgGの例の重鎖配列と軽鎖配列

抗体	IgG 重鎖配列/軽鎖配列**
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	重鎖 (野生型ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDPE</u> <u>TGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRGLDYW</u> <u>GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL</u> TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号 84)
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQORPGQSPRLLIYRMS</u> <u>NLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFTGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVPFIAPPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配 列番号 85)
3A4 VH3 (N54S*)/Vk4	重鎖 (野生型ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDPE</u> <u>SGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRGLDYW</u> <u>GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL</u> TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号 86)

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

抗体	IgG 重鎖配列/軽鎖配列**
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLHSNGYTYLFWFOORPGQSPRLLIYRMS</u> <u>NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOHLEYPTFGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配 列番号 85)
3A4 VH3/Vκ4	重鎖 (野生型ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>EVQLVQSGSELKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDPE</u> <u>NGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCTLWLRRGLDYW</u> <u>GQGLTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL</u> TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号 87) 軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLHSNGYTYLFWFOORPGQSPRLLIYRMS</u> <u>NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMOHLEYPTFGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配 列番号 85)
3M12 VH3/Vκ2	重鎖 (野生型ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSTSGYYWNWIRQPPGKGLEWMGYITFD</u> <u>GANNYNPSLKNRVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVLVDYWG</u> <u>QGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号 88) 軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNFLNWOQKPGQPVKLLIYYTSRLHS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQOQHITLPTYTFGGGTKEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 89)
3M12 VH3/Vκ3	重鎖 (野生型ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSTSGYYWNWIRQPPGKGLEWMGYITFD</u> <u>GANNYNPSLKNRVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVLVDYWG</u> <u>QGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号 88) 軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNFLNWOQKPGQPVKLLIYYTSRLHS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQHITLPTYTFGGGTKEIKRTVAA</u> PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 90)

10

20

30

40

【表 4 - 3】

抗体	IgG 重鎖配列/軽鎖配列**
3M12 VH4/Vκ2	重鎖（野生型ヒト IgG1 定常領域を含む） <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYITFDG</u> <u>ANNYNPSLKNRVVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL</u> <u>DYWGQ</u> <u>GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 91)
	軽鎖（kappa 軽鎖定常領域を含む） <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQDISNFLNWIYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHS</u> <u>GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQOGHTLPYTFGQGT</u> <u>KLEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 89)
3M12 VH4/Vκ3	重鎖（野生型ヒト IgG1 定常領域を含む） <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYITFDG</u> <u>ANNYNPSLKNRVVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL</u> <u>DYWGQ</u> <u>GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 91)
	軽鎖（kappa 軽鎖定常領域を含む） <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQDISNFLNWIYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHS</u> <u>GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOGHTLPYTFGQGT</u> <u>KLEIKRTVAA</u> PSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 90)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	重鎖（野生型ヒト IgG1 定常領域を含む） <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIYP</u> <u>GSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE</u> <u>DYYPYHGM</u> <u>DYWGQGTFLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u> SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号 92)
	軽鎖（kappa 軽鎖定常領域を含む） <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVDGYDNSFMHWYQOKPGQPPKLLIFRAS</u> <u>NLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEDPWT</u> <u>FGQGT</u> <u>KLEIKR</u> TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番 号 93)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	重鎖（野生型ヒト IgG1 定常領域を含む） <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYDINWVRQAPGQGLEWMGWIYP</u> <u>GSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE</u> <u>DYYPYHGM</u> <u>DYWGQGTFLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u> SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号 94)

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

抗体	IgG 重鎖配列/軽鎖配列**
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPGOPPCKLLIFRA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOQSEDPWTFGQGTKLEIK</u> RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSK DSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列 番号 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	重鎖 (野生型ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTDYIYNWVRQAPGQGLEWMGWIYP</u> <u>GSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDYYPYHGM</u> <u>DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u> SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号 92)
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPGOPPCKLLIFRA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOQSEDPWTFGQGTKLEIK</u> RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSK DSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列 番号 95)
抗 TfR クローン 8	VH: <u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPG</u> <u>DS DTRYSPSFQGOVTISADKSISTAYLOWSSLKASDTAMYYCARFPYDSSGYYSF</u> <u>DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u> SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号 156)
	VL: <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSLOS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSYSTPLTFGGGTKEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 157)

* 変異の位置は、変異を含む各 VH 配列の Kabat ナンバリング に従っている

** Kabat ナンバリング 系による CDR は太字、VH/VL 配列は下線

【0115】

いくつかの態様において、本開示の抗 TfR1 抗体は、配列番号 84、86、87、88、91、92、94、および 156 のいずれか 1 つに示される重鎖と比較して、25 個以下のアミノ酸変異 (例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個以下のアミノ酸変異) を含有する重鎖を含む。あるいは、または加えて、(例として、追加で)、本開示の抗 TfR1 抗体は、配列番号 85、89、90、93、95 および 157 のいずれか 1 つに示される軽鎖と比較して、25 個以下のアミノ酸変異 (例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個以下のアミノ酸変異) を含有する軽鎖を含む。

【0116】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗 TfR1 抗体は、配列番号 84、86、87、88、91、92、94 および 156 のいずれか 1 つと少なくとも 75% (例として、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または 99%) 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。あるいは、または加えて (例として、加えて)、本明細書に記載の抗 TfR1 抗体は、配列

番号85、89、90、93、95、および157のうちのいずれか1つと少なくとも75%(例として、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%)同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号84、86、87、88、91、92、94および156のいずれか1つのアミノ酸配列を含む重鎖を含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号85、89、90、93、95および157のいずれか1つのアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0117】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号84のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0118】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号86のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0119】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号87のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0120】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号88のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0121】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号88のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0122】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号91のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0123】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号91のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0124】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号92のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0125】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号94のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0126】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号92のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0127】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号156のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号157のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0128】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、インタクトな抗体(完全長抗体)のFabフラグメント、Fab'フラグメント、またはF(ab')₂フラグメントである。インタクトな抗体(完全長抗体)の抗原結合フラグメントは定型的な方法によって(例として、組み換え的に、または全長IgGの重鎖定常領域をパパインなどの酵素を使用して消化することによって)調製され得る。例えば、F(ab')₂フラグメントは抗体分子のペプシンまたはパパイン消化によって生じ得、FabフラグメントはF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって作出され得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体のFabフラグメントにおける重鎖領域は、ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP

10

20

30

40

50

SNTKVDKKVEPKSCDKTHTのアミノ酸配列を含む。(配列番号96)

【0129】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVHまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号96と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一である重鎖定常領域を含む重鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVHまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号96と比較して25個以下のアミノ酸変異(例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個以下のアミノ酸変異)を含有する重鎖定常領域を含む重鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVHまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号96に示される重鎖定常領域を含む重鎖を含む。

10

【0130】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVLまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号83と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一である軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVLまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号83と比較して25個以下のアミノ酸変異(例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個以下のアミノ酸変異)を含有する軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、表3に挙げられるVLまたはそれらのいずれかのバリエーションのいずれか1つ、および配列番号83で表されるとおりの軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む。

20

【0131】

記載される抗TfR1抗体のFab重鎖および軽鎖アミノ酸配列の例は、下の表5に示される。

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5. 抗 TfR1 Fab の例の重鎖配列および軽鎖配列

抗体	Fab 重鎖配列/軽鎖配列**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDPE</u> <u>TGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRGLDYW</u> <u>GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL</u> <u>TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS</u> CDKHT (配列番号 97)
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQORPGQSPRLLIYRMS</u> <u>NLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFTGGGKVEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES</u> <u>VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配 列番号 85)
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDPE</u> <u>SGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRGLDYW</u> <u>GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL</u> <u>TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS</u> CDKHT (配列番号 98)
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQORPGQSPRLLIYRMS</u> <u>NLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFTGGGKVEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES</u> <u>VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配 列番号 85)
3A4 VH3 /Vκ4	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWIGWIDPE</u> <u>NGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTLWLRRGLDYW</u> <u>GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL</u> <u>TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS</u> CDKHT (配列番号 99)
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQORPGQSPRLLIYRMS</u> <u>NLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFTGGGKVEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES</u> <u>VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配 列番号 85)
3M12 VH3/Vκ2	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCSVTGYISITSGYYWNWIROP PGKGLEWMGYITFD</u> <u>GANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL DYWG</u> <u>QGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC</u> DKHT (配列番号 100)

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

抗体	Fab 重鎖配列/軽鎖配列**
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNFLN</u><u>WYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHS</u> <u>GVP</u><u>SRFSGSGSGTDFTLT</u><u>TISSLOPEDFATYFCQOGHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAP</u> <u>SVFIFPPSDEQLKSGTASV</u><u>VCLLN</u><u>NFY</u><u>P</u><u>REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> <u>DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配列番号 89)
3M12 VH3/Vκ3	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u><u>SLTCSVTGY</u><u>SITSGYYWNWIROPP</u><u>GKGLEWMGYITFD</u> <u>GANNYNPSLKNRVSISRDT</u><u>SKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u><u>SSYD</u><u>YDVL</u><u>DYWG</u> <u>QGT</u><u>TVTVSS</u><u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u><u>TV</u><u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC</u> <u>DKTHT</u> (配列番号 100) 軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNFLN</u><u>WYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHS</u> <u>GVP</u><u>SRFSGSGSGTDFTLT</u><u>TISSLOPEDFATYFCQOGHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAP</u> <u>PSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u><u>VCLLN</u><u>NFY</u><u>P</u><u>REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS</u> <u>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配列番号 90)
3M12 VH4/Vκ2	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u><u>SLTCTVTGY</u><u>SITSGYYWNWIROPP</u><u>GKGLEWIGYITFDG</u> <u>ANNYNPSLKNRVSISRDT</u><u>SKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u><u>SSYD</u><u>YDVL</u><u>DYWGQ</u> <u>GTT</u><u>TVTVSS</u><u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u><u>TV</u><u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD</u> <u>KTHT</u> (配列番号 101) 軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNFLN</u><u>WYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHS</u> <u>GVP</u><u>SRFSGSGSGTDFTLT</u><u>TISSLOPEDFATYFCQOGHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAP</u> <u>SVFIFPPSDEQLKSGTASV</u><u>VCLLN</u><u>NFY</u><u>P</u><u>REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> <u>DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配列番号 89)
3M12 VH4/Vκ3	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u><u>SLTCTVTGY</u><u>SITSGYYWNWIROPP</u><u>GKGLEWIGYITFDG</u> <u>ANNYNPSLKNRVSISRDT</u><u>SKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR</u><u>SSYD</u><u>YDVL</u><u>DYWGQ</u> <u>GTT</u><u>TVTVSS</u><u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u><u>TV</u><u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD</u> <u>KTHT</u> (配列番号 101) 軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNFLN</u><u>WYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHS</u> <u>GVP</u><u>SRFSGSGSGTDFTLT</u><u>TISSLOPEDFATYFCQOGHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAP</u> <u>PSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u><u>VCLLN</u><u>NFY</u><u>P</u><u>REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS</u> <u>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配列番号 90)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u><u>SCKASGYSTDY</u><u>YNWVRQAPGQGLEWMGWIYP</u> <u>GSGNTRYSERFKGRVTIT</u><u>RDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE</u><u>DYYPYHGM</u> <u>DYWGQ</u><u>GLTVTVSS</u><u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVSWN</u> <u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u><u>TV</u><u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u> <u>EPKSCDKTHT</u> (配列番号 102) 軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATIN</u><u>CRASEVDGYDN</u><u>SFMHWYQOKPGQPPKLLIFRAS</u> <u>NLESGVPDRFSGSGSR</u><u>TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOSSEDPWTFGQGTKLEIKR</u> <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u><u>VCLLN</u><u>NFY</u><u>P</u><u>REAKVQWKVDNALQSGNSQESVT</u> <u>EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配列番号 93)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u><u>SCKASGYSTDY</u><u>DINWVRQAPGQGLEWMGWIYP</u> <u>GSGNTRYSERFKGRVTIT</u><u>RDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE</u><u>DYYPYHGM</u> <u>DYWGQ</u><u>GLTVTVSS</u><u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u><u>TVSWN</u> <u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u><u>TV</u><u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV</u> <u>EPKSCDKTHT</u> (配列番号 103)

10

20

30

40

【表 5 - 3】

抗体	Fab 重鎖配列/軽鎖配列**
	軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPD</u><u>SLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMH</u><u>WYQOKPGQPPKLLIFRA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u><u>TISSLQAEDVAVYYCQOQSEDPWTFGQGTKLEIK</u> RTVAAPS~~VFIFPPS~~DEQLKSGTASV~~VCL~~NNFY~~P~~REAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTL~~SKADYE~~KKHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vk4	重鎖 (部分ヒト IgG1 定常領域を含む) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIYP</u> <u>GSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDYYPYHGM</u> <u>DYWGQGT</u><u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u> SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~PSSSL~~GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (配列番号 102) 軽鎖 (kappa 軽鎖定常領域を含む) <u>DIVMTQSPD</u><u>SLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMH</u><u>WYQOKPGQPPKLLIFRA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u><u>TISSLQAEDVAVYYCQOQSEDPWTFGQGTKLEIK</u> RTVAAPS~~VFIFPPS~~DEQLKSGTASV~~VCL~~NNFY~~P~~REAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTL~~SKADYE~~KKHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 95)
抗 TfR クローン 8 バージョン 1	VH: <u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPG</u> <u>DSDTRYSPSFQGOVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARFPYDSSGYYSF</u> <u>DYWGQGT</u><u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u> SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~PSSSL~~GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP (配列番号 158) VL: <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSLOS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLT</u><u>TISSLQPEDFATYYCQOQSYSTPLTFGGGT</u><u>KVEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASV~~VCL~~NNFY~~P~~REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTL~~SKADYE~~KKHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 157)
抗 TfR クローン 8 バージョン 2	VH: <u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPG</u> <u>DSDTRYSPSFQGOVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARFPYDSSGYYSF</u> <u>DYWGQGT</u><u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u> SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~PSSSL~~GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (配列番号 159) VL: <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSLOS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLT</u><u>TISSLQPEDFATYYCQOQSYSTPLTFGGGT</u><u>KVEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASV~~VCL~~NNFY~~P~~REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTL~~SKADYE~~KKHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 157)

* 変異の位置は、変異を含む各 VH 配列の Kabatナンバリングに従っている

** Kabatナンバリング系による CDR は太字、VH/VL 配列は下線

【0132】

いくつかの態様において、本開示の抗 TfR1 抗体は、配列番号 97~103、158 および 159 のいずれか 1 つに示される重鎖と比較して、25 個以下のアミノ酸変異 (例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個以下のアミノ酸変異) を含有する重鎖を含む。あるいは、または加えて、(例として、追加で)、本開示の抗 TfR1 抗体は、配列番号 85、89、90、93、95 および 157 のいずれか 1 つに示される軽鎖と比較して、25 個以下のアミノ酸変異 (例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個以下のアミノ酸変異) を含有する軽鎖を含む。

【0133】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗 TfR1 抗体は、配列番号 97~103、15

10

20

30

40

50

8および159のいずれか1つと少なくとも75%(例として、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%)同一であるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号85、89、90、93、95、および157のうちのいずれか1つと少なくとも75%(例として、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%)同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号97~103、158および159のいずれか1つのアミノ酸配列を含む重鎖を含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号85、89、90、93、95および157のいずれか1つのアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0134】

10

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号97のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0135】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号98のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0136】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号99のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0137】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

【0138】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0139】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0140】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

【0141】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0142】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号103のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0143】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0144】

40

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号158のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号157のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0145】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号159のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号157のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0146】

他の公知の抗TfR1抗体

当該技術分野において知られているいずれか他の適切な抗TfR1抗体は、本明細書に開示の複合体において筋標的化剤として使用され得る。知られている抗TfR1抗体(関連する参考文献および結合エピトープを包含する)の例は、表6に挙げられる。いくつかの態

50

様において、抗TfR1抗体は、本明細書で提供される抗TfR1抗体のいずれかの相補性決定領域(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3)、例として表6に列挙される抗TfR1抗体を含む。

【表6-1】

表6- 抗TfR1抗体クローンのリスト（関連する参考文献と結合エピトープの情報を含む）

抗体クローンの名称	参考文献	エピトープ / 注釈
OKT9	米国特許第 4,364,934 号、1979/12/4 出願、標題「MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME」 Schneider C. et al. “Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9.” J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.	TfR1 の先端ドメイン（ヒト TfR1 配列の残基 305-366 XM_052730.3、GenBank で入手可能）
(JCR 製) クローン M11 クローン M23 クローン M27 クローン B84	- 国際公開第 2015/098989 号、2014/12/24 出願、「Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier」 - 米国特許第 9,994,641 号、2014/12/24 出願、「Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier」	先端ドメイン（TfR1 の残基 230-244 および 326-347）およびプロテアーゼ様ドメイン（残基 461-473）

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

抗体クローンの名称	参考文献	エピトープ / 注釈
(Genentech 製) 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12, および 13D4	- 国際公開第 2016/081643 号、2016/5/26 出願、標題「ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE」 - 米国特許第 9,708,406 号、2014/5/20 出願、「Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use」	先端ドメインおよび非先端ドメイン
(Armagen 製) 8D3	- Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse" 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052. - 米国特許出願第 2010/077498 号、2008/9/11 出願、標題「COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE」	
OX26	Haobam, B. et al. 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806-21.	
DF1513	Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. Plant J 48:757-70 (2006).	
1A1B2, 66IG10, MEM-189, JF0956, 29806, 1A1B2, TFRC/1818, 1E6, 66Ig10, TFRC/1059, Q1/71, 23D10, 13E4, TFRC/1149, ER-MP21, YTA74.4, BU54, 2B6, RI7 217	市販の抗トランスフェリン受容体抗体	Novus Biologicals 8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120
(INSERM 製) BA120g	米国特許出願第 2011/0311544 号、2005/6/15 出願、標題「ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS」	OKT9 と競合しない
LUCA31	米国特許第 7,572,895 号、2004/6/7 出願、標題「TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES」	“LUCA31 エピトープ”

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

抗体クローンの名称	参考文献	エピトープ / 注釈		
(Salk Institute) B3/25 T58/30	Trowbridge, I.S. et al. “Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin–antibody conjugates affect growth of human tumour cells.” Nature, 1981, volume 294, pages 171–173			
R17 217.1.3, 5E9C11, OKT9 (BE0023 クローン)	市販の抗トランスフェリン受容体抗体	BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B West Lebanon, NH 03784-1671 USA		
BK19.9, B3/25, T56/14 および T58/1	Gatter, K.C. et al. “Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance.” J Clin Pathol. 1983 May;36(5):539-45.			
抗 TfR1 抗体				
CDRH1 (配列番号 2179)				
CDRH2 (配列番号 2180)				
CDRH3 (配列番号 2181)				
CDRL1 (配列番号 2182)				
CDRL2 (配列番号 2183)				
CDRL3 (配列番号 2184)				
VH (配列番号 2185)				
VL (配列番号 2186)				
他の抗 TfR1 抗体の配列番号				
	VH/VL	CDR1	CDR2	CDR3
VH1	2194	2187	2188	2181
VH2	2195	2187	2189	2181
VH3	2196	2187	2190	2181
VH4	2197	2187	2189	2181
VL1	2198	2182	2183	115
VL2	2199	2182	2183	115
VL3	2200	2182	2191	2184
VL4	2201	2192	2193	2184

【0147】

いくつかの態様において、本開示の抗 TfR1 抗体は、表 6 から選択される抗 TfR1 抗体のいずれか 1 つからの CDR-H (例として、CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3) アミノ酸配列の 1 つ以上を含む。いくつかの態様において、抗 TfR1 抗体は、表 6 から選択される抗 TfR1 抗体のいずれか 1 つについて提供される CDR-L1、CDR-L2、および CDR-L3 を含む。いくつかの態様において、抗 TfR1 抗体は、表 6 から選択される抗 TfR1 抗体のいずれか 1 つについて提供される CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、および CDR-L3 を含む。

【0148】

いくつかの態様において、本開示の抗 TfR1 抗体は、表 6 から選択される抗 TfR1 抗体のいずれか 1 つなどの、任意の抗 TfR1 抗体の重鎖可変ドメインおよび/または(例として、および)軽鎖可変ドメインを含む任意の抗体を含む。いくつかの態様において、本開示の抗 TfR1 抗体は、任意の抗 TfR1 抗体の重鎖可変対および軽鎖可変対を含む、表 6 から選択される抗 TfR1 抗体のいずれか 1 つなどの任意の抗体を含む。

【0149】

本開示の側面は、本明細書に記載のもののいずれかに相同な重鎖可変(VH)および/または(例として、および)軽鎖可変(VL)ドメインアミノ酸配列を有する抗 TfR1 抗体を提供する。いくつかの態様において、抗 TfR1 抗体は、表 6 から選択される抗 TfR1 抗体のいずれか 1 つなどの任意の抗 TfR1 抗体の重鎖可変配列および/またはいずれかの軽鎖可変配列と少なくとも 75% (例として、80%、85%、90%、95%、98%、または 99%) 同一の重鎖可変配列または軽鎖可変配列を含む。いくつかの態様において、相同な重鎖可変および/または(例として、および)軽鎖可変アミノ酸配列は、本明細書で提供される CDR 配列

のいずれかにおいては変動しない。例えば、いくつかの態様において、配列変異の程度(例として、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%)は、本明細書で提供されるCDR配列のいずれかを除外した重鎖可変および/または(例として、および)軽鎖可変配列内で起こり得る。いくつかの態様において、本明細書で提供される抗TfR1抗体のいずれも、表6から選択される抗TfR1抗体のいずれか1つなどの任意の抗TfR1抗体のフレームワーク配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一のフレームワーク配列を含む重鎖可変配列および軽鎖可変配列を含む。

【0150】

本開示に従って使用され得るトランスフェリン受容体抗体の例は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/081643号に記載されている。この抗体のアミノ酸配列は表7に示される。

10

【表7-1】

表7. 公知の抗TfR1抗体の例の重鎖CDRおよび軽鎖CDR

配列タイプ	Kabat	Chothia	Contact
CDR-H1	SYWMH (配列番号110)	GYTFTSY (配列番号116)	TSYWMH (配列番号118)
CDR-H2	EINPTNGRTNYIEKFS (配列番号111)	NPTNGR (配列番号117)	WIGEINPTNGRTN (配列番号119)
CDR-H3	GTRAYHY (配列番号112)	GTRAYHY (配列番号112)	ARGTRA (配列番号120)
CDR-L1	RASDNLYSNLA (配列番号113)	RASDNLYSNLA (配列番号113)	YSNLAWY (配列番号121)
CDR-L2	DATNLAD (配列番号114)	DATNLAD (配列番号114)	LLVYDATNLA (配列番号122)
CDR-L3	QHFWGTPLT (配列番号115)	QHFWGTPLT (配列番号115)	QHFWGTPL (配列番号123)
マウス VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQTSVTSS (配列番号124)		
マウス VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKGKSPQLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYCQHFWGTPLTFGAGTKLELK (配列番号125)		
ヒト化 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVSS (配列番号128)		
ヒト化 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPLTFGQGTKEIK (配列番号129)		

20

30

40

50

【表 7 - 2】

配列タイプ	Kabat	Chothia	Contact
キメラ完全長 IgG1 の HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYW GQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 132)		
キメラ完全長 IgG1 の LC	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKSPQLLVYDATNL ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYTCQHFHWTPLTFGAGTKLELKR TVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 133)		
ヒト完全長 IgG1 の HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIN PTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHY WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 134)		
ヒト完全長 IgG1 の LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASDNLYSNLAWYQQKPKSPKLLVYDATNL ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFHWTPLTFGQGTKEIKRT VAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 135)		
キメラ Fab の HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYW GQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCP (配列番号 136)		
完全ヒト Fab の HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIN PTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHY WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP (配列番号 137)		

10

20

30

【0151】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、表7に示されるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と同じであるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本開示の抗TfR1抗体は、表7に示されるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3と同じであるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。

【0152】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、CDR-L3を含み、これは表7に示されるCDR-L3と比較して3個以下のアミノ酸変異(例として、3、2、または1個以下のアミノ酸変異)を含む。いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、表7に示されるCDR-L3と比較して1つのアミノ酸変異を含有するCDR-L3を含む。いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、QHFGATPLT(KabatおよびChothia定義系に従う配列番号126)またはQHFGATPL(Contact定義系に従う配列番号127)のCDR-L3を含む。いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、表7に示されるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と同じであるCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、およびCDR-L2を含み、QHFGATPLT(配列番号126)(KabatおよびChothia定義系に従う)またはQHFGATPL(配列番号127)(Contact定義系に従う)のCDR-L3を含む。

40

【0153】

50

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、表7に示される重鎖CDRと、合わせて少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一である重鎖CDRを含む。あるいは、または加えて、(例として、加えて)、本開示の抗TfR1抗体は、表7に示される軽鎖CDRと、合わせて少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一である軽鎖CDRを含む。

【0154】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号124のアミノ酸配列を含むVHを含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号125のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0155】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号128のアミノ酸配列を含むVHを含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号129のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0156】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号128に示されるVHと比較して、25個以下のアミノ酸変異(例として、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個以下のアミノ酸変異)を含有するVHを含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本開示の抗TfR1抗体は、配列番号129に示されるVLと比較して、15個以下のアミノ酸変異(例として、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個以下のアミノ酸変異)を含有するVLを含む。

【0157】

いくつかの態様において、本開示の抗TfR1抗体は、完全長IgG1抗体であり、これはヒト抗体からの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれかの重鎖は、重鎖定常領域(CH)またはそのある部分(例として、CH1、CH2、CH3、またはそれらの組み合わせ)を含み得る。重鎖定常領域は、任意の好適な起源、例として、ヒト、マウス、ラット、またはウサギに由来し得る。特定の一例において、重鎖定常領域は、ヒトIgG(ガンマ重鎖)、例として、IgG1、IgG2、またはIgG4に由来する。ヒトIgG1定常領域の例は下記のとおりである：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号81)

【0158】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれかの軽鎖はさらに、軽鎖定常領域(CL)を含み得、これは当該技術分野において知られているいずれかのCLであり得る。いくつかの例において、CLは、カップ軽鎖である。他の例において、CLは、ラムダ軽鎖である。いくつかの態様において、CLはカップ軽鎖であって、その配列は以下に示される。

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号83)

【0159】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号132のアミノ酸配列を含む重鎖を含むキメラ抗体である。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号133のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0160】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号134のアミノ酸

配列を含む重鎖を含む完全ヒト抗体である。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、配列番号135のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0161】

いくつかの態様において、抗TfR1抗体は、インタクトな抗体(完全長抗体)の抗原結合性フラグメント(Fab)である。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1 Fabは、配列番号136のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本明細書に記載の抗TfR1 Fabは、配列番号133のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1 Fabは、配列番号137のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。あるいは、または加えて(例として、加えて)、本明細書に記載の抗TfR1 Fabは、配列番号135のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

10

【0162】

本明細書に記載の抗TfR1抗体は、いずれかの抗体形態であり得、インタクトな(すなわち全長)抗体、それらの抗原結合フラグメント(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvなど)、一本鎖抗体、二重特異性抗体、またはナノボディを含むが、これらに限定されない。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体はscFvである。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、scFv-Fabである(例として、定常領域のある部分に融合されたscFv)。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、定常領域(例として、配列番号81で示されるヒトIgG1定常領域)と縮合されたscFvである。

【0163】

いくつかの態様において、保存的突然変異は、例えば、結晶構造に基づき決定されるとき、その残基が標的抗原(例として、トランスフェリン受容体)との相互作用に関与しそうな位置にて、抗体配列(例として、CDRまたはフレームワーク配列)中へ導入され得る。いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上の変異(例として、アミノ酸置換)は、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または(例として、および)細胞への抗原依存的細胞傷害性などの、抗体の1つ以上の機能特性を変更させるために、本明細書に記載の抗TfR1抗体のFc領域中(例として、Kabatナンバリング系(例として、KabatのEUインデックス)に従うナンバリングで、CH2ドメイン(ヒトIgG1の残基231~340)中、および/または(例として、および)CH3ドメイン(ヒトIgG1の残基341~447)中、および/または(例として、および)ヒンジ領域中)へ導入される。

20

【0164】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上の変異(例として、アミノ酸置換)は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が、例として米国特許第5,677,425号に記載のとおり変動(例として、増大または減少)され得るように、Fc領域(CH1ドメイン)のヒンジ領域に導入される。CH1ドメインのヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例として、軽鎖と重鎖の会合を容易にさせるために、または抗体の安定性を変える(例として、増大または減少させる)ため、またはリンカーの抱合を容易にさせるために、変更され得る。

30

【0165】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上の変異(例として、アミノ酸置換)は、抗体の、エフェクター細胞表面上のFc受容体(例として、活性化されたFc受容体)への親和性を増加または減少させるため、本明細書に記載の筋標的化抗体のFc領域中(例として、Kabatナンバリング系(例として、KabatのEUインデックス)に従うナンバリングで、CH2ドメイン(ヒトIgG1の残基231~340)中、および/または(例として、および)CH3ドメイン(ヒトIgG1の残基341~447)中、および/または(例として、および)ヒンジ領域中)へ導入される。抗体のFc受容体への親和性を増大または減少させる抗体のFc領域中の変異、およびかかる変異をFc受容体中またはそのフラグメントに導入するための技法は、当業者に知られている。抗体のFc受容体への親和性を変更するためになされ得る、抗体のFc受容体中の突然変異の例は、例として、Smith P et al., (2012) PNAS 109:6181-6186、米国特許第6,737,056号、ならびに国際公開第02/060919号;第98/23289号;および第97/34631号(これらは参照により本明細書に組み込まれる)に記載

40

50

されている。

【0166】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸変異(すなわち、置換、挿入、または欠失)は、*in vivo*での抗体の半減期を変更(例として、増加または減少)させるため、IgG定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)に導入される。例として、*in vivo*での抗体の半減期を変更(例として、増加または減少)させるであろう変異の例として、国際公開第02/060919号、国際公開第98/23289号、および国際公開第97/34631号、ならびに米国特許第5,869,046号、米国特許第6,121,022号、米国特許第6,277,375号、および米国特許第6,165,745号を参照されたい。

【0167】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸変異(すなわち、置換、挿入、または欠失)は、*in vivo*での抗TfR1抗体の半減期を減少させるため、IgG定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)に導入される。いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸変異(すなわち、置換、挿入、または欠失)は、*in vivo*での抗体の半減期を増加させるため、IgG定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)に導入される。いくつかの態様において、抗体は、KabatのEUインデックス(上記のKabat E A et al., (1991))に従うナンバリングで第2定常(CH2)ドメイン(ヒトIgG1の残基231~340)中および/または(例として、および)第3定常(CH3)ドメイン(ヒトIgG1の残基341~447)中に、1つ以上のアミノ酸変異(例として、置換)を有し得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のIgG1定常領域は、KabatにあるようなEUインデックスに従ってナンバリングされた位置252におけるメチオニン(M)からチロシン(Y)への置換、位置254におけるセリン(S)からトレオニン(T)への置換、および位置256におけるトレオニン(T)からグルタミン酸(E)への置換を含む。米国特許第7,658,921号(これは、参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。「YTE突然変異体」と称されるこのタイプの突然変異IgGは、同じ抗体の野生型バージョンと比較して4倍増大した半減期を発揮したことが示されている(Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281:23514-24を参照されたい)。いくつかの態様において、抗体は、KabatにあるようなEUインデックスに従ってナンバリングされた位置251~257、285~290、308~314、385~389、および428~436でのアミノ酸残基の、1、2、3以上のアミノ酸置換を含むIgG定常領域を含む。

【0168】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸置換は、抗TfR1抗体のエフェクター機能を変更するため、IgG定常領域Fc領域に導入される。自身への親和性に変更されたエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1構成要素であり得る。このアプローチは、米国特許第5,624,821号および第5,648,260号においてさらに詳細に記載される。いくつかの態様において、定常領域ドメインの欠失または不活化(点突然変異または他の手段を通して)は、循環抗体のFc受容体への結合を低減し、それによって腫瘍局在化を増大し得る。定常領域を欠失または不活化し、それによって腫瘍局在化を増大させる変異の記載については、例として、米国特許第5,585,097号および米国特許第8,591,886号を参照されたい。いくつかの態様において、1つ以上のアミノ酸置換は、Fc領域上の潜在的なグリコシル化部位を除去するため(これによってFc受容体への結合が低減されることもある)、本明細書に記載の抗体のFc領域に導入されてもよい(例として、Shields R L et al., (2001) J Biol Chem 276:6591-604を参照されたい)。

【0169】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体の定常領域中の1つ以上のアミノ酸残基は、抗体が変更されたC1q結合および/または(例として、および)低減もしくは消失された補体依存性細胞傷害性(CDC)を有し得るように、異なるアミノ酸残基に置

10

20

30

40

50

き換えられ得る。このアプローチは、米国特許第6,194,551号(Idusogie et al)においてさらに詳細に記載されている。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のC H2ドメインのN末端領域中の1以上のアミノ酸残基が変更されて、それによって抗体の補体結合能を変更する。このアプローチは、国際公開第94/29351号においてさらに詳しく記載されている。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のFc領域は、抗体の、細胞への抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の媒介能を増大させるため、および/または(例として、および)、抗体のFcγ受容体への親和性を増大させるため、修飾されている。このアプローチは、国際公開第00/42072号においてさらに詳しく記載されている。

【0170】

いくつかの態様において、本明細書で提供される抗体の重鎖および/または(例として、および)軽鎖可変ドメイン(単数または複数)配列(単数または複数)は、本明細書の他の箇所に記載されるとおり、例えば、CDR接合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、もしくは複合ヒト抗体、または抗原結合性フラグメントを生成するために使用され得る。当業者によって理解されるとおり、本明細書で提供される抗体のいずれかに由来するいずれのバリエーション、CDR接合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または複合抗体は、本明細書に記載の組成物および方法に有用であってもよく、バリエーション、CDR接合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または複合抗体が、これが由来する元の抗体と比べて、トランスフェリン受容体への少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%以上の結合を有し得るように、トランスフェリン受容体への特異的結合能を維持するであろう。

【0171】

いくつかの態様において、本明細書で提供される抗体は、所望の特性を抗体へ付与する突然変異を含む。例えば、ネイティブなIgG4 mAbに生じることが知られているFabアーム交換(Fab-arm exchange)に起因する潜在的合併症を回避するため、本明細書で提供される抗体は、安定化「Adair」突然変異を含んでもよく(Angal S., et al., 「A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4)antibody」, Mol Immunol 30,105-108;1993)、ここでセリン228(EUナンバリング;残基241 Kabatナンバリング)は、IgG1様ヒンジ配列をもたらしプロリンへ変換されている。したがって、抗体のいずれも、安定化「Adair」突然変異を包含していてもよい。

【0172】

いくつかの態様において、抗体は修飾されている(例として、グリコシル化、リン酸化、SUMO化、および/または(例として、および)、メチル化を介して修飾されている)。いくつかの態様において、抗体は、1個以上の糖または炭水化物分子へ抱合されたグリコシル化抗体である。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、N-グリコシル化、O-グリコシル化、C-グリコシル化、グリπιエーション(GPIアンカー付着)、および/または(例として、および)、ホスホグリコシル化を介して、抗体へ抱合されている。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、またはグリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、分枝オリゴ糖類または分枝グリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、マンノース単位、グルコース単位、N-アセチルグルコサミン単位、N-アセチルガラクトサミン単位、ガラクトース単位、フコース単位、またはホスホ脂質単位を包含する。いくつかの態様において、糖分子は、約1~10個、約1~5個、約5~10個、約1~4個、約1~3個、または約2個存在する。いくつかの態様において、グリコシル化抗体は、全体的にまたは部分的にグリコシル化されている。いくつかの態様において、抗体は、化学反応によって、または酵素的な手段によってグリコシル化されている。いくつかの態様において、抗体は、in vitroでまたは細胞(任意にN-またはO-グリコシル化経路中の酵素(例として、グリコシルトランスフェラーゼ)を欠乏していてもよい)内部でグリコシル化される。いくつかの態様において、抗体は、「Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof」

と題する2014年5月1日に公開された国際公開第2014065661号に記載されるような糖または炭水化物分子で官能化されている。

【0173】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれか1つは、重鎖および/または(例として、および)軽鎖配列上にシグナルペプチド(例として、N末端シグナルペプチド)を含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗TfR1抗体は、VHおよびVL配列のいずれか1つ、IgG重鎖および軽鎖配列のいずれか1つ、または本明細書に記載のF(ab')重鎖および軽鎖配列のいずれか1つを含み、さらにシグナルペプチド(例として、N末端シグナルペプチド)を含む。いくつかの態様において、シグナルペプチドはMGWSCIIILFLVATATGVHS(配列番号104)のアミノ酸配列を含む。

10

【0174】

いくつかの態様において、本明細書で提供される抗体は、1以上の翻訳後修飾を有し得る。いくつかの態様において、ピログルタミン酸形成(ピロGlu)ともまた呼ばれるN末端環化が、産生の間にN末端グルタミン酸(Glu)および/またはグルタミン(Gln)残基において抗体に生起し得る。したがって、当然のことながら、N末端グルタメートまたはグルタミン残基を含む配列を有すると特定される抗体は、翻訳後修飾に起因するピログルタメート形成を受けた抗体を包含する。いくつかの態様において、ピログルタミン酸形成は、重鎖配列に生起する。いくつかの態様において、ピログルタミン酸形成は軽鎖配列に生起する。

【0175】

20

b. 他の筋標的抗体

いくつかの態様において、筋標的化抗体は、ヘモジュベリン(hemojuvelin)、カベオリン-3、デュシェンヌ型筋ジストロフィーペプチド、ミオシンIIb、またはCD63に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、筋原性前駆体タンパク質に特異的に結合する抗体である。例示の筋原性前駆体タンパク質は、限定せずに、ABCG2、M-カドヘリン/カドヘリン-15、カベオリン-1、CD34、FoxK1、インテグリンアルファ7、インテグリンアルファ7ベータ1、MYF-5、MyoD、ミオゲニン、NCAM-1/CD56、Pax3、Pax7、およびPax9を包含する。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、骨格筋タンパク質に特異的に結合する抗体である。例示的な骨格筋タンパク質としては、限定するものではないが、アルファ-サルコグリカン、ベータ-サルコグリカン、カルパインインヒビター、クレアチンキナーゼMM/CKMM、eIF5A、エノラーゼ2/ニューロン特異的エノラーゼ、イブシロン-サルコグリカン、FABP3/H-FABP、GDF-8/ミオスタチン、GDF-11/GDF-8、インテグリンアルファ7、インテグリンアルファ7ベータ1、インテグリンベータ1/CD29、MCAM/CD146、MyoD、ミオゲニン、ミオシン軽鎖キナーゼインヒビター、NCAM-1/CD56、およびトロポニンIが挙げられ、いくつかの態様において、筋標的化抗体は、平滑筋タンパク質に特異的に結合する抗体である。例示の平滑筋タンパク質は、限定せずに、アルファ-平滑筋アクチン、VE-カドヘリン、カルデスモン/CALD1、カルポニン1、デスミン、ヒスタミンH2 R、モチリンR/GPR38、トランスジェリン(Transgelin)/TAGLN、およびビメンチンを包含する。しかしながら、当然のことながら、追加の標的への抗体が本開示の範囲内であること、および本明細書で提供される標的の例示のリストが限定することを意図していない。

30

40

【0176】

c. 抗体の特徴/変更

いくつかの態様において、保存的突然変異は、例えば、結晶構造に基づき決定されるとき、その残基が標的抗原(例として、トランスフェリン受容体)との相互作用に関与しそうな位置にて、抗体配列(例として、CDRまたはフレームワーク配列)中へ導入され得る。いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上の変異(例として、アミノ酸置換)は、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または(例として、および)細胞への抗原依存的細胞傷害性などの、抗体の1つ以上の機能特性を変更させるために、本明細書に記載の筋標的化抗体のFc領域中(例として、Kabatナンバリング系(例として、Kaba

50

tのEUインデックス)に従うナンバリングで、CH2ドメイン(ヒトIgG1の残基231~340)中、および/または(例として、および)CH3ドメイン(ヒトIgG1の残基341~447)中、および/または(例として、および)ヒンジ領域中)へ導入される。

【0177】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上の変異(例として、アミノ酸置換)は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が、例として米国特許第5,677,425号に記載のとおり変動(例として、増大または減少)され得るように、Fc領域(CH1ドメイン)のヒンジ領域に導入される。CH1ドメインのヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例として、軽鎖と重鎖の会合を容易にさせるために、または抗体の安定性を変える(例として、増大または減少させる)ため、またはリンカーの抱合を容易にさせるために、変更され得る。

10

【0178】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上の変異(例として、アミノ酸置換)は、抗体の、エフェクター細胞表面上のFc受容体(例として、活性化されたFc受容体)への親和性を増加または減少させるため、本明細書に記載の筋標的化抗体のFc領域中(例として、Kabatナンバリング系(例として、KabatのEUインデックス)に従うナンバリングで、CH2ドメイン(ヒトIgG1の残基231~340)中、および/または(例として、および)CH3ドメイン(ヒトIgG1の残基341~447)中、および/または(例として、および)ヒンジ領域中)へ導入される。抗体のFc受容体への親和性を増大または減少させる抗体のFc領域中の変異、およびかかる変異をFc受容体中またはそのフラグメントに導入するための技法は、当業者に知られている。抗体のFc受容体への親和性を変更するためになされ得る、抗体のFc受容体中の突然変異の例は、例として、Smith P et al., (2012) PNAS 109:6181-6186、米国特許第6,737,056号、ならびに国際公開第02/060919号、同第98/23289号、および同第97/34631号(これらは参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

20

【0179】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸変異(すなわち、置換、挿入、または欠失)は、in vivoでの抗体の半減期を変更(例として、増加または減少)させるため、IgG定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)に導入される。例として、in vivoでの抗体の半減期を変更(例として、増加または減少)させるであろう変異の例として、国際公開第02/060919号、国際公開第98/23289号、および国際公開第97/34631号、ならびに米国特許第5,869,046号、米国特許第6,121,022号、米国特許第6,277,375号、および米国特許第6,165,745号を参照されたい。

30

【0180】

いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸変異(すなわち、置換、挿入、または欠失)は、in vivoでの抗トランスフェリン受容体抗体の半減期を減少させるため、IgG定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)に導入される。いくつかの態様において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸変異(すなわち、置換、挿入、または欠失)は、in vivoでの抗体の半減期を増加させるため、IgG定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)に導入される。いくつかの態様において、抗体は、KabatのEUインデックス(上記のKabat E A et al., (1991))に従うナンバリングで第2定常(CH2)ドメイン(ヒトIgG1の残基231~340)中および/または(例として、および)第3定常(CH3)ドメイン(ヒトIgG1の残基341~447)中に、1つ以上のアミノ酸変異(例として、置換)を有し得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のIgG1定常領域は、KabatにあるようなEUインデックスに従ってナンバリングされた位置252におけるメチオニン(M)からチロシン(Y)への置換、位置254におけるセリン(S)からトレオニン(T)への置換、および位置256におけるトレオニン(T)からグルタミン酸(E)への置換を含む。米国特許第7,658,921号(これは、参照により本明細書に組み込まれる)を

40

50

参照されたい。「YTE突然変異体」と称されるこのタイプの突然変異IgGは、同じ抗体の野生型バージョンと比較して4倍増大した半減期を発揮したことが示されている(Dall'Aquila W F et al.,(2006)J Biol Chem 281:23514-24を参照されたい)。いくつかの態様において、抗体は、KabatにあるようなEUインデックスに従ってナンバリングされた位置251~257、285~290、308~314、385~389、および428~436でのアミノ酸残基の、1、2、3以上のアミノ酸置換を含むIgG定常領域を含む。

【0181】

いくつかの態様において、1、2以上のアミノ酸置換は、抗トランスフェリン受容体抗体のエフェクター機能(単数または複数)を変更するため、IgG定常領域Fc領域中へ導入される。自身への親和性に変更されたエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1構成要素であり得る。このアプローチは、米国特許第5,624,821号および第5,648,260号においてさらに詳細に記載される。いくつかの態様において、定常領域ドメインの欠失または不活化(点突然変異または他の手段を通して)は、循環抗体のFc受容体への結合を低減し、それによって腫瘍局在化を増大し得る。定常領域を欠失または不活化し、それによって腫瘍局在化を増大させる変異の記載については、例として、米国特許第5,585,097号および米国特許第8,591,886号を参照されたい。いくつかの態様において、1つ以上のアミノ酸置換は、Fc領域上の潜在的なグリコシル化部位を除去するため(これによってFc受容体への結合が低減されることもある)、本明細書に記載の抗体のFc領域に導入されてもよい(例として、Shields R L et al.,(2001)J Biol Chem 276:6591-604を参照されたい)。

【0182】

いくつかの態様において、本明細書に記載の筋標的化抗体の定常領域中の1つ以上のアミノ酸残基は、抗体が変更されたC1q結合および/または(例として、および)低減もしくは消失された補体依存性細胞傷害性(CDC)を有し得るように、異なるアミノ酸残基に置き換えられ得る。このアプローチは、米国特許第6,194,551号(Idusogie et al)においてさらに詳細に記載されている。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のCH2ドメインのN末端領域中の1以上のアミノ酸残基が変更されて、それによって抗体の補体結合能を変更する。このアプローチは、国際公開第94/29351号においてさらに詳しく記載されている。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のFc領域は、抗体の、細胞への抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の媒介能を増大させるため、および/または(例として、および)、抗体のFcγ受容体への親和性を増大させるため、修飾されている。このアプローチは、国際公開第00/42072号においてさらに詳しく記載されている。

【0183】

いくつかの態様において、本明細書で提供される抗体の重鎖および/または(例として、および)軽鎖可変ドメイン(単数または複数)配列(単数または複数)は、本明細書の他の箇所に記載されるとおり、例えば、CDR接合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、もしくは複合ヒト抗体、または抗原結合性フラグメントを生成するために使用され得る。当業者によって理解されるとおり、本明細書で提供される抗体のいずれかに由来するいずれのバリエーション、CDR接合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または複合抗体は、本明細書に記載の組成物および方法に有用であってもよく、バリエーション、CDR接合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または複合抗体が、これが由来する元の抗体と比べて、トランスフェリン受容体への少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%以上の結合を有し得るように、トランスフェリン受容体への特異的結合能を維持するであろう。

【0184】

いくつかの態様において、本明細書で提供される抗体は、所望の特性を抗体へ付与する突然変異を含む。例えば、ネイティブなIgG4 mAbに生じることが知られているFabアーム交換(Fab-arm exchange)に起因する潜在的合併症を回避するため、本明細書で提供される抗体は、安定化「Adair」突然変異を含んでいてもよく(Angal S.,et al.,「A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric

mouse/human(IgG4)antibody」,Mol Immunol 30,105-108;1993)、ここでセリン228(EUナンバリング;残基241 Kabatナンバリング)は、IgG1様ヒンジ配列をもたらすプロリンへ変換されている。したがって、抗体のいずれも、安定化「Adair」突然変異を包含していてもよい。

【0185】

本明細書で提供されるとおり、本開示の抗体は、任意に、定常領域またはその一部を含んでいてもよい。例えば、VLドメインは、そのC末端にて、軽鎖定常領域様CκまたはCλへ付着されていてもよい。同様に、VHドメインまたはその一部は、すべてのまたは一部の重鎖様IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、およびいずれのアイソタイプのサブクラスへ付着されていてもよい。抗体は、好適な定常領域を包含していてもよい(例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No.91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md.(1991)を参照されたい)。したがって、本開示の範囲内の抗体は、いずれの好適な定常領域と組み合わせられて、VHおよびVLドメイン、またはその抗原結合部を包含していてもよい。

10

【0186】

iii.筋標的化ペプチド

本開示のいくつかの側面は、筋標的化ペプチドを筋標的化剤として提供する。特定の細胞型に結合する短いペプチド配列(例として、5~20アミノ酸長のペプチド配列)は記載されている。例えば、細胞標的化ペプチドは、Vines e., et al., A. 「Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery」 Biochim Biophys Acta 2008,1786:126-38、Jarver P., et al., 「In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery」 Trends Pharmacol Sci 2010;31:528-35、Samoylova T.I., et al., 「Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening」 Muscle Nerve 1999;22:460-6、米国特許第6,329,501号、2001年12月11日発行、表題「METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE」、およびSamoylov A.M., et al., 「Recognition of cell-specific binding of phage display derived peptides using an acoustic wave sensor.」 Biomol Eng 2002;18:269-72に記載されており、こ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。特定の細胞表面抗原(例として、受容体)と相互作用するようにペプチドを設計することによって、所望される組織、例として、筋肉への選択性が獲得され得る。骨格筋標的化が調査されており、広範な分子ペイロードが送達されることができる。巨大な抗体またはウイルス粒子についての実際上の不利な点の多くが存在しないこれらのアプローチは、筋組織への高選択性を有していてもよい。したがって、いくつかの態様において、筋標的化剤は、4アミノ酸長から50アミノ酸長の筋標的化ペプチドである。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸長である。筋標的化ペプチドは、ファージディスプレイなどのいくつかの方法のいずれかを使用して生成され得る。

20

30

【0187】

いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、他のある細胞と比較して、筋細胞において過剰発現されているかまたは相対的に高度に発現されている、内在化する細胞表面受容体(例として、トランスフェリン受容体)に結合し得る。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、トランスフェリン受容体を標的化し得る(例として、トランスフェリン受容体に結合し得る)。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体を標的化するペプチドは、天然に存在するリガンド、例として、トランスフェリンのセグメントを含み得る。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体を標的化するペプチドは、米国特許第6,743,893号、11/30/2000出願、「RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF PEPTIDES THAT BIND THE HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR」に記載のとおりである。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体を標的化するペプチドは、

40

50

Kawamoto, M. et al, 「A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells.」 BMC Cancer. 2011 Aug 18; 11:359 に記載のとおりである。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体を標的化するペプチドは、米国特許第 8,399,653 号、2011 年 5 月 20 日出願、「TRANSFERRIN/TRANSFERRIN RECEPTOR-MEDIATED SIRNA DELIVERY」に記載のとおりである。

【0188】

上述のとおり、筋標的化ペプチドの例は報告されている。例えば、筋肉特異的ペプチドは、表面ヘプタペプチドを提示するファージディスプレイライブラリを使用して同定された。一例として、アミノ酸配列 ASSLNIA (配列番号 2170) を有するペプチドは、*in vitro* で C2C12 マウス筋管へ結合し、かつ *in vivo* でマウス筋組織へ結合した。したがって、いくつかの態様において、筋標的化剤は、アミノ酸配列 ASSLNIA (配列番号 2170) を含む。このペプチドは、肝臓、腎臓、および脳への結合が低減された、マウスへの静脈内注射後の心筋組織および骨格筋組織への結合について改善された特異性を発揮した。追加の筋肉特異的ペプチドがファージディスプレイを使用して同定されている。例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの処置という文脈において、12 アミノ酸ペプチドが、筋標的化のためのファージディスプレイライブラリによって同定された。Yoshida D., et al., 「Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats.」 *Int J Pharm* 2002; 231:177-84 を参照されたい。この内容全体はこれによって参照により組み込まれる。ここで、配列 SKTFNTHPQSTP (配列番号 2171) を有する 12 アミノ酸ペプチドが同定され、この筋標的化ペプチドは、ASSLNIA (配列番号 2170) ペプチドと比べて C2C12 細胞への改善された結合を示した。

【0189】

他の細胞型より筋肉 (例として、骨格筋) に対して選択的なペプチドを同定するためのいずれの追加の方法は *in vitro* での選択を含み、これは Ghosh D., et al., 「Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting」 *J Virol* 2005; 79:13667-72 に記載されている。この内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。ランダム 12-mer ペプチドファージディスプレイライブラリを非筋細胞型の混合物とブレインキューベートすることによって、非特異的細胞バインダーが選出された。選択を繰り返した後、12 アミノ酸ペプチド TARGEHKEEELI (配列番号 2172) が最も頻繁に現れた。したがって、いくつかの態様において、筋標的化剤は、アミノ酸配列 TARGEHKEEELI (配列番号 2172) を含む。

【0190】

筋標的化剤は、アミノ酸含有分子またはペプチドであってもよい。筋標的化ペプチドは、筋細胞から見出されたタンパク質受容体へ優先的に結合するタンパク質の配列に対応していてもよい。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、ペプチドが筋細胞を優先的に標的にし得るように、疎水性アミノ酸 (例として、バリン) の性質を強く有する。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、これまでに特徴付けも開示もされていない。これらのペプチドは、数種の方法論のいずれか、例として、ファージディスプレイドペプチドライブラリ、1 ビーズ・1 化合物 (one-bead one-compound) ペプチドライブラリ、または位置走査性 (positional scanning) 合成ペプチドコンビナトリアルライブラリを使用して、想起、産生、合成、および/または (例として、および)、誘導体化されてもよい。例示の方法論は、当該技術分野において特徴付けられてきており、参照により組み込まれる (Gray, B.P. and Brown, K.C. 「Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides」 *Chem Rev.* 2014, 114:2, 1020-1081.; Samoylova, T.I. and Smith, B.F. 「Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening.」 *Muscle Nerve*, 1999, 22:4, 460-6.). いくつかの態様において、筋標的化ペプチドはこれまでに開示されている (例として、Writer M.J. et al. 「Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic ve

ctors incorporating novel targeting peptides selected by phage display.」J. Drug Targeting. 2004;12:185;Cai, D. 「BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart.」Physiol Genomics. 2006, 24: 3, 191-7.; Zhang, L. 「Molecular profiling of heart endothelial cells.」Circulation, 2005, 112:11, 1601-11.; McGuire, M. J. et al. 「In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo.」J Mol Biol. 2004, 342:1, 171-82を参照されたい)。例示の筋標的化ペプチドは、以下の群のアミノ酸配列を含む:CQAQGQLVC(配列番号2173)、CSERSMNFC(配列番号2174)、CPKTRRVP(配列番号2175)、WLSEAGPVVTVRALRGTSW(配列番号2176)、ASSLNI A(配列番号2170)、CMQHSMRVC(配列番号2177)、およびDDTRHWG(配列番号2178)。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、約2~25アミノ酸、約2~20アミノ酸、約2~15アミノ酸、約2~10アミノ酸、または約2~5アミノ酸を含んでいてもよい。筋標的化ペプチドは、天然に存在するアミノ酸、例として、システイン、アラニン、または天然に存在しないか、もしくは修飾アミノ酸を含んでいてもよい。天然に存在しないアミノ酸は、β-アミノ酸、ホモ-アミノ酸、プロリン誘導体、3-置換アラニン誘導体、線形コアアミノ酸、N-メチルアミノ酸、および当該技術分野において知られているその他のアミノ酸を包含する。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは線状であってもよい;他の態様において、筋標的化ペプチドは環状(例として、二環式)であってもよい(例として、Silvana, M. G. et al. Mol. Therapy, 2018, 26:1, 132-147を参照されたい)。

10

20

【0191】

iii. 筋標的化受容体リガンド

筋標的化剤は、リガンド、例として、受容体タンパク質へ結合するリガンドであってもよい。筋標的化リガンドは、タンパク質、例としてトランスフェリンであってもよく、それは筋細胞によって発現される内在化する細胞表面受容体へ結合する。したがって、いくつかの態様において、筋標的化剤は、トランスフェリン、またはトランスフェリン受容体へ結合するその誘導体である。筋標的化リガンドは、代替的に、小分子、例として、他の細胞型と比べて優先的に筋細胞を標的化する親油性小分子であってもよい。筋細胞を標的にしてもよい例示の親油性小分子は、コレステロール、コレステリル、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、オレイル、リノレン酸、リノール酸、ミリスチン酸、ステロール、ジヒドロテストステロン、テストステロン誘導体、グリセリン、アルキル鎖、トリチル基、およびアルコキシ酸を含む化合物を包含する。

30

【0192】

iv. 筋標的化アプタマー

筋標的化剤は、他の細胞型と比べて優先的に筋細胞を標的化するアプタマー、例としてRNAアプタマーであってもよい。いくつかの態様において、筋標的化アプタマーはこれまでに特徴付けも開示もされていない。これらのアプタマーは、数種の方法論のいずれか、例として、指数関数的濃縮によるリガンドの体系的進化を使用して、着想、産生、合成、および/または(例として、および)、誘導体化されてもよい。例示の方法論は当該技術分野において特徴付けされており、参照により組み込まれる(Yan, A. C. and Levy, M. 「Aptamers and aptamer targeted delivery」RNA biology, 2009, 6:3, 316-20.; Germer, K. et al. 「RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications.」Int. J. Biochem. Mol. Biol. 2013; 4:27-40)。いくつかの態様において、筋標的化アプタマーはこれまでに開示されている(例として、Phillippou, S. et al. 「Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers.」Mol Ther Nucleic Acids. 2018, 10:199-214.; Thiel, W. H. et al. 「Smooth Muscle Cell-targeted RNA Aptamer Inhibits Neointimal Formation.」Mol Ther. 2016, 24:4, 779-87を参照されたい)。例示の筋標的化アプタマーは、A01B RNAアプタマーおよびRNA Apt 14を包含する。いくつかの態様において、アプタマーは、核酸をベースとしたアプタマー、オリゴヌクレオチドアプタマー、またはペプチドアプタ

40

50

マーである。いくつかの態様において、アプタマーは、約5～15kDa、約5～10kDa、約10～15kDa、約1～5Da、約1～3kDa、またはこれより小さいものであってもよい。

【0193】

v. 他の筋標的化剤

筋細胞(例として、骨格筋細胞)を標的化するための1つの戦略は、筋線維鞘上に発現されたトランスポータータンパク質などの筋肉トランスポータータンパク質の基質を使用することである。いくつかの態様において、筋標的化剤は、筋組織に特異的な流入トランスポーターの基質である。いくつかの態様において、流入トランスポーターは、骨格筋組織に特異的である。骨格筋の筋線維鞘上に発現されるトランスポーターの二大クラスは、(1)骨格筋組織からの流出に容易にさせる、アデノシン三リン酸(ATP)結合カセット(ABC)スーパーファミリー、および(2)基質の骨格筋中への流入を容易にし得る、溶質輸送体(solute carrier)(SLC)スーパーファミリーである。いくつかの態様において、筋標的化剤は、トランスポーターのABCスーパーファミリーまたはSLCスーパーファミリーへ結合する基質である。いくつかの態様において、トランスポーターのABCまたはSLCスーパーファミリーへ結合する基質は、天然に存在する基質である。いくつかの態様において、トランスポーターのABCまたはSLCスーパーファミリーへ結合する基質は、天然に存在しない基質、例えば、トランスポーターのABCまたはSLCスーパーファミリーへ結合するその合成誘導体である。

10

【0194】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、輸送体のSLCスーパーファミリーを標的化する本明細書に記載のいずれかの筋標的化剤(例として、抗体、核酸、小分子、ペプチド、アプタマー、脂質、糖部分)である。いくつかの態様において、筋標的化剤は、トランスポーターのSLCスーパーファミリーの基質である。SLCトランスポーターは、平衡型であるか、または基質の輸送を推進させる膜にわたって創出されたプロトンもしくはナトリウムのイオン勾配を使用するかのものである。骨格筋への高発現を有する例示のSLCトランスポーターは、限定せずに、SATTトランスポーター(ASCT1;SLC1A4)、GLUT4トランスポーター(SLC2A4)、GLUT7トランスポーター(GLUT7;SLC2A7)、ATRC2トランスポーター(CAT-2;SLC7A2)、LAT3トランスポーター(KIAA0245;SLC7A6)、PHT1トランスポーター(PTR4;SLC15A4)、OATP-Jトランスポーター(OATP5A1;SLC21A15)、OCT3トランスポーター(EMT;SLC22A3)、OCTN2トランスポーター(FLJ46769;SLC22A5)、ENTトランスポーター(ENT1;SLC29A1およびENT2;SLC29A2)、PAT2トランスポーター(SLC36A2)、およびSAT2トランスポーター(KIAA1382;SLC38A2)を包含する。これらのトランスポーターは、基質の骨格筋中への流入を容易にさせることで、筋標的化のための好機を提供し得る。

20

30

【0195】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、平衡型ヌクレオシドトランスポーター2(ENT2)トランスポーターの基質である。他のトランスポーターと比べて、ENT2は、骨格筋において最高発現するmRNAの1つを有する。ヒトENT2(hENT2)は、脳、心臓、胎盤、胸腺、脾臓、前立腺、および腎臓などのほとんどの体器官に発現されるものの、特に骨格筋に豊富である。ヒトENT2は、その基質の取り込みを、それらの濃度勾配に応じて容易にさせる。ENT2は、広範なプリンおよびピリミジン核酸塩基を輸送することによってヌクレオシドホメオスタシスを維持する役割を果たす。hENT2トランスポーターは、イノシンを除くすべてのヌクレオシド(アデノシン、グアノシン、ウリジン、チミジン、およびシチジン)に対して低親和性を有する。したがって、いくつかの態様において、筋標的化剤は、ENT2基質である。例示のENT2基質は、限定せずに、イノシン、2',3'-ジデオキシイノシン、およびクロファラビンを包含する。いくつかの態様において、本明細書で提供される筋標的化剤のいずれも、分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチドペイロード)に関連する。いくつかの態様において、筋標的化剤は、分子ペイロードへ共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、筋標的化剤は、分子ペイロードへ非共有結合的に連結されている。

40

50

【0196】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、ナトリウムイオン依存性の高親和性カルニチントランスポーターである有機カチオン/カルニチントランスポーター(OCTN2)の基質である。いくつかの態様において、筋標的化剤は、カルニチン、ミルドロネート、アセチルカルニチン、またはOCTN2へ結合するそのいずれかの誘導体である。いくつかの態様において、カルニチン、ミルドロネート、アセチルカルニチン、またはそれらの誘導体は、分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチドペイロード)へ共有結合的に連結されている。

【0197】

筋標的化剤は、筋細胞を標的化する少なくとも1つの可溶性形態で存在するタンパク質であるタンパク質であってもよい。いくつかの態様において、筋標的化タンパク質は、鉄過剰およびホメオスタシスに關与するタンパク質ヘモジュベリン(またrepulsive guidance molecule Cまたはヘモクロマトーシスタイプ2タンパク質としても知られている)であってもよい。いくつかの態様において、ヘモジュベリンは、完全長もしくはフラグメントであっても、または機能的ヘモジュベリンタンパク質と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%配列同一性を有する突然変異体であってもよい。いくつかの態様において、ヘモジュベリン突然変異体は、可溶性フラグメントであってもよく、N末端シグナリングを欠いていてもよく、かつ/または(例として、かつ)、C末端アンカードメイを欠いていてもよい。いくつかの態様において、ヘモジュベリンは、GenBank RefSeq受託番号NM_001316767.1、NM_145277.4、NM_202004.3、NM_213652.3、またはNM_213653.3の注釈付きのものであってもよい。当然のことながら、ヘモジュベリンがヒト、霊長目の非ヒト動物、または齧歯類の動物を起源とするものであってもよい。

【0198】

B. 分子ペイロード

本開示のいくつかの側面は、例として生物学的成果、例として、DNA配列の転写、RNA配列のスプライシングおよびプロセシング、タンパク質の発現、またはタンパク質の活性を調節するための分子ペイロードを提供する。いくつかの態様において、分子ペイロードは、筋標的化剤へ連結されているか、または別様に結び付けられている。いくつかの態様において、かかる分子ペイロードは、例として、結び付けられた筋標的化剤による筋細胞への送達を受けた筋細胞中の核酸またはタンパク質への特異的結合を介して、筋細胞を標的化することが可能である。当然のことながら、様々なタイプの分子ペイロードが本開示に従って使用されてもよい。例えば、分子ペイロードは、オリゴヌクレオチド(例として、アンチセンスオリゴヌクレオチド)、ペプチド(例として、疾患に關連する筋細胞中の核酸もしくはタンパク質に結合するペプチド)、タンパク質(例として、疾患に關連する筋細胞中の核酸もしくはタンパク質に結合するタンパク質)、または小分子(例として、疾患に關連する筋細胞中の核酸もしくはタンパク質の機能をモジュレートする小分子)を含んでいてもよく、またはこれらからなってもよい。いくつかの態様において、分子ペイロードは、変異DMD対立遺伝子に対する相補性領域を有する鎖を含むオリゴヌクレオチドである。例示の分子ペイロードは本明細書にさらに詳細に記載されているが、しかしながら、当然のことながら、本明細書で提供される例示の分子ペイロードが限定されることを意図していない。

【0199】

i. オリゴヌクレオチド

本開示の側面は、例として、DMD対立遺伝子由来のジストロフィンの発現を調節する(例として、増加させる)ように構成されたオリゴヌクレオチドに關する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、DMDプレ-mRNAのスプライシングを変化させてジストロフィンタンパク質(例として、機能的な切断型ジストロフィンタンパク質)の発現を促進するように構成される。いくつかの態様において、本明細書で

提供されるオリゴヌクレオチドは、リーディングフレームを回復させるために、DMDにおける、例として、変異DMD対立遺伝子における1つ以上のエクソンのスキッピングを促進するように構成される。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、機能的なジストロフィンタンパク質発現を可能にする(例として、Watanabe N, Nagata T, Sato u Y, et al. NS-065/NCNP-01: an antisense oligonucleotide for potential treatment of exon 53 skipping in Duchenne muscular dystrophy. Mol Ther Nucleic Acids. 2018;13:442-449に記載されている)。いくつかの態様において、提供されるオリゴヌクレオチドは、エクソン55のスキッピングを促進して、ジストロフィンのより短い機能的なバージョン(例として、フレーム内欠失を含む)を生成するように構成される。いくつかの態様において、エクソン55のスキッピングを促進するオリゴヌクレオチドが提供される(例として、これは、例えば、DMDエクソン3~54、4~54、5~54、6~54、9~54、10~54、11~54、13~54、14~54、15~54、16~54、17~54、19~54、21~54、23~54、24~54、25~54、26~54、27~54、28~54、29~54、30~54、31~54、32~54、33~54、34~54、35~54、36~54、37~54、38~54、39~54、40~54、41~54、42~54、43~54、45~54、47~54、48~54、49~54、50~54、52~54、54、56、56~62、56~65、56~68、56~70、56~71、56~72、56~73、または56~74において欠失を有する患者などの、エクソン55のスキッピングに適した相当な数の患者に適し得る)。

10

【0200】

表8は、DMDの標的化、例として、エクソンスキッピング、およびDMD内の標的配列に有用なオリゴヌクレオチドの配列の非限定的な例を示す。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、表8に示される任意のアンチセンス配列または表8に示される標的配列に相補的な配列を含み得る。

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 8. DMD を標的化するためのオリゴヌクレオチド配列

配列 番号	標的配列 [†] (5'から 3')	配列 番号	アンチセンス 配列 [†] (5'から 3')	配列 番号	アンチセンス 配列 [†] (5'から 3')	標的部位
160	GGAGAAACUCAU AGAUUACUGCA	780	UGCAGUAAUCUAU GAGUUUCUUC	1400	TGCAGTAATCTAT GAGTTTCTTCC	エクソン 55
161	GAAACAACUGCCA AUGUCCUAC	781	GUAGGACAUUGGC AGUUGUUUC	1401	GTAGGACATTGGC AGTTGTTC	エクソン 55
162	GAAACAACUGCCA AUGUCCUACA	782	UGUAGGACAUUGG CAGUUGUUUC	1402	TGTAGGACATTGG CAGTTGTTTC	エクソン 55
163	GAAACAACUGCCA AUGUCCUACAG	783	CUGUAGGACAUUG GCAGUUGUUUC	1403	CTGTAGGACATTG GCAGTTGTTTC	エクソン 55
164	GAAACAACUGCCA AUGUCCUACAGG	784	CCUGUAGGACAUU GGCAGUUGUUUC	1404	CCTGTAGGACATT GGCAGTTGTTTC	エクソン 55
165	AAACAACUGCCAA UUCUCCUACAGG	785	CCUGUAGGACAUU GGCAGUUGUUU	1405	CCTGTAGGACATT GGCAGTTGTTT	エクソン 55
166	AAACAACUGCCAA UGUCCUACAGGA	786	UCCUGUAGGACAU UGGCAGUUGUUU	1406	TCCTGTAGGACAT TGGCAGTTGTTT	エクソン 55
167	AACAACUGCCAAU GUCCUACAG	787	CUGUAGGACAUUG GCAGUUGUU	1407	CTGTAGGACATTG GCAGTTGTT	エクソン 55
168	AACAACUGCCAAU GUCCUACAGG	788	CCUGUAGGACAUU GGCAGUUGUU	1408	CCTGTAGGACATT GGCAGTTGTT	エクソン 55
169	AACAACUGCCAAU GUCCUACAGGA	789	UCCUGUAGGACAU UGGCAGUUGUU	1409	TCCTGTAGGACAT TGGCAGTTGTT	エクソン 55
170	ACAACUGCCAAUG UCCUACA	790	UGUAGGACAUUGG CAGUUGU	1410	TGTAGGACATTGG CAGTTGT	エクソン 55
171	ACAACUGCCAAUG UCCUACAG	791	CUGUAGGACAUUG GCAGUUGU	1411	CTGTAGGACATTG GCAGTTGT	エクソン 55
172	ACAACUGCCAAUG UCCUACAGG	792	CCUGUAGGACAUU GGCAGUUGU	1412	CCTGTAGGACATT GGCAGTTGT	エクソン 55
173	ACAACUGCCAAUG UCCUACAGGA	793	UCCUGUAGGACAU UGGCAGUUGU	1413	TCCTGTAGGACAT TGGCAGTTGT	エクソン 55
174	CAACUGCCAAUGU CCUACAGG	794	CCUGUAGGACAUU GGCAGUUG	1414	CCTGTAGGACATT GGCAGTTG	エクソン 55
175	CAACUGCCAAUGU CCUACAGGA	795	UCCUGUAGGACAU UGGCAGUUG	1415	TCCTGTAGGACAT TGGCAGTTG	エクソン 55
176	AACUGCCAAUGUC CUACAGGA	796	UCCUGUAGGACAU UGGCAGUU	1416	TCCTGTAGGACAT TGGCAGTT	エクソン 55
177	ACUGCCAAUGUCC UACAGGA	797	UCCUGUAGGACAU UGGCAGU	1417	TCCTGTAGGACAT TGGCAGT	エクソン 55
178	AGAAACUCAUAGA UUACUGCAACA	798	UGUUGCAGUAAUC UAUGAGUUUCU	1418	TGTTGCAGTAATC TATGAGTTTCT	エクソン 55
179	AGAAACUCAUAGA UUACUGCAACAG	799	CUGUUGCAGUAAU CUAUGAGUUUCU	1419	CTGTTGCAGTAAT CTATGAGTTTCT	エクソン 55
180	GAAACUCAUAGAU UACUGCAACAG	800	CUGUUGCAGUAAU CUAUGAGUUUC	1420	CTGTTGCAGTAAT CTATGAGTTTC	エクソン 55
181	GAUGAUACCAGAA AAGUCCACAU	801	AUGUGGACUUUUC UGGUAUCAUC	1421	ATGTGGACTTTTC TGGTATCATC	エクソン 54
182	GAUGAUACCAGAA AAGUCCACAUGA	802	UCAUGUGGACUUU UCUGGUAUCAUC	1422	TCATGTGGACTTT TCTGGTATCATC	エクソン 54
183	AUGAUACCAGAAA AGUCCACAUGA	803	UCAUGUGGACUUU UCUGGUAUCAU	1423	TCATGTGGACTTT TCTGGTATCAT	エクソン 54
184	AUGAUACCAGAAA AGUCCACAUGAU	804	AUCAUGUGGACUU UUCUGGUAUCAU	1424	ATCATGTGGACTT TTCTGGTATCAT	エクソン 54
185	UGAUACCAGAAAA GUCCACAUGA	805	UCAUGUGGACUUU UCUGGUAUCA	1425	TCATGTGGACTTT TCTGGTATCA	エクソン 54
186	UGAUACCAGAAAA GUCCACAUGAU	806	AUCAUGUGGACUU UUCUGGUAUCA	1426	ATCATGTGGACTT TTCTGGTATCA	エクソン 54
187	GAUACCAGAAAAG UCCACAUGA	807	UCAUGUGGACUUU UCUGGUAUC	1427	TCATGTGGACTTT TCTGGTATC	エクソン 54

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

188	GAUACCAGAAAAG UCCACAUGAU	808	AUCAUGUGGACUU UUCUGGUAUC	1428	ATCATGTGGACTT TTCTGGTATC	エクソン 54
189	GAUACCAGAAAAG UCCACAUGAUAA	809	UUAUCAUGUGGAC UUUUCUGGUAUC	1429	TTATCATGTGGAC TTTTCTGGTATC	エクソン 54
190	AUACCAGAAAAGU CCACAUGA	810	UCAUGUGGACUUU UCUGGUAU	1430	TCATGTGGACTTT TCTGGTAT	エクソン 54
191	AUACCAGAAAAGU CCACAUGAU	811	AUCAUGUGGACUU UUCUGGUAU	1431	ATCATGTGGACTT TTCTGGTAT	エクソン 54
192	AUACCAGAAAAGU CCACAUGAUAA	812	GUUAUCAUGUGGA CUUUUCUGGUAU	1432	GTTATCATGTGGA CTTTTCTGGTAT	エクソン 54
193	UACCAGAAAAGUC CACAUGA	813	UCAUGUGGACUUU UCUGGUA	1433	TCATGTGGACTTT TCTGGTA	エクソン 54
194	UACCAGAAAAGUC ACAUGAU	814	AUCAUGUGGACUU UUCUGGUA	1434	ATCATGTGGACTT TTCTGGTA	エクソン 54
195	UACCAGAAAAGUC CACAUGAUAA	815	UUAUCAUGUGGAC UUUUCUGGUA	1435	TTATCATGTGGAC TTTTCTGGTA	エクソン 54
196	UACCAGAAAAGUC CACAUGAUAA	816	GUUAUCAUGUGGA CUUUUCUGGUA	1436	GTTATCATGTGGA CTTTTCTGGTA	エクソン 54
197	UACCAGAAAAGUC CACAUGAUAA	817	UGUUAUCAUGUGG ACUUUUCUGGUA	1437	TGTTATCATGTGG ACTTTTCTGGTA	エクソン 54
198	ACCAGAAAAGUCC ACAUGAU	818	AUCAUGUGGACUU UUCUGGU	1438	ATCATGTGGACTT TTCTGGT	エクソン 54
199	ACCAGAAAAGUCC ACAUGAUAA	819	UUAUCAUGUGGAC UUUUCUGGU	1439	TTATCATGTGGAC TTTTCTGGT	エクソン 54
200	ACCAGAAAAGUCC ACAUGAUAA	820	GUUAUCAUGUGGA CUUUUCUGGU	1440	GTTATCATGTGGA CTTTTCTGGT	エクソン 54
201	ACCAGAAAAGUCC ACAUGAUAA	821	UGUUAUCAUGUGG ACUUUUCUGGU	1441	TGTTATCATGTGG ACTTTTCTGGT	エクソン 54
202	ACCAGAAAAGUCC ACAUGAUAA	822	CUGUUAUCAUGUG GACUUUUCUGGU	1442	CTGTTATCATGTG GACTTTTCTGGT	エクソン 54
203	CCAGAAAAGUCCA CAUGAUAA	823	UUAUCAUGUGGAC UUUUCUGG	1443	TTATCATGTGGAC TTTTCTGG	エクソン 54
204	CCAGAAAAGUCCA CAUGAUAA	824	GUUAUCAUGUGGA CUUUUCUGG	1444	GTTATCATGTGGA CTTTTCTGG	エクソン 54
205	CCAGAAAAGUCCA CAUGAUAA	825	UGUUAUCAUGUGG ACUUUUCUGG	1445	TGTTATCATGTGG ACTTTTCTGG	エクソン 54
206	CCAGAAAAGUCCA CAUGAUAA	826	CUGUUAUCAUGUG GACUUUUCUGG	1446	CTGTTATCATGTG GACTTTTCTGG	エクソン 54
207	CCAGAAAAGUCCA CAUGAUAA	827	UCUGUUAUCAUGU GGACUUUUCUGG	1447	TCTGTTATCATGT GGACTTTTCTGG	エクソン 54
208	CAGAAAAGUCCAC AUGAUAA	828	GUUAUCAUGUGGA CUUUUCUG	1448	GTTATCATGTGGA CTTTTCTG	エクソン 54
209	CAGAAAAGUCCAC AUGAUAA	829	UGUUAUCAUGUGG ACUUUUCUG	1449	TGTTATCATGTGG ACTTTTCTG	エクソン 54
210	CAGAAAAGUCCAC AUGAUAA	830	CUGUUAUCAUGUG GACUUUUCUG	1450	CTGTTATCATGTG GACTTTTCTG	エクソン 54
211	CAGAAAAGUCCAC AUGAUAA	831	UCUGUUAUCAUGU GGACUUUUCUG	1451	TCTGTTATCATGT GGACTTTTCTG	エクソン 54
212	CAGAAAAGUCCAC AUGAUAA	832	CUCUGUUAUCAUG UGGACUUUUCUG	1452	CTCTGTTATCATG TGGACTTTTCTG	エクソン 54
213	AGAAAAGUCCACA UGAUAA	833	UCUGUUAUCAUGU GGACUUUUCU	1453	TCTGTTATCATGT GGACTTTTCT	エクソン 54
214	AGAAAAGUCCACA UGAUAA	834	CUCUGUUAUCAUG UGGACUUUUCU	1454	CTCTGTTATCATG TGGACTTTTCT	エクソン 54
215	AGAAAAGUCCACA UGAUAA	835	UCUCUGUUAUCAU GUGGACUUUUCU	1455	TCTCTGTTATCAT GTGGACTTTTCT	エクソン 54
216	GAAAAGUCCACAU GAUAA	836	CUGUUAUCAUGUG GACUUUUC	1456	CTGTTATCATGTG GACTTTTC	エクソン 54
217	GAAAAGUCCACAU GAUAA	837	UCUGUUAUCAUGU GGACUUUUC	1457	TCTGTTATCATGT GGACTTTTC	エクソン 54
218	GAAAAGUCCACAU GAUAA	838	CUCUGUUAUCAUG UGGACUUUUC	1458	CTCTGTTATCATG TGGACTTTTC	エクソン 54

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

219	GAAAAGUCCACAU GAUAAACAGAGA	839	UCUCUGUUAUCAU GUGGACUUUUC	1459	TCTCTGTTATCAT GTGGACTTTTC	エクソン 54
220	GAAAAGUCCACAU GAUAAACAGAGAA	840	UUCUCUGUUAUCA UGUGGACUUUUC	1460	TTCTCTGTTATCA TGTGGACTTTTC	エクソン 54
221	AAAAGUCCACAUG AUAACAGAG	841	CUCUGUUAUCAUG UGGACUUUUC	1461	CTCTGTTATCATG TGGACTTTT	エクソン 54
222	AAAAGUCCACAUG AUAACAGAGA	842	UCUCUGUUAUCAU GUGGACUUUUC	1462	TCTCTGTTATCAT GTGGACTTTT	エクソン 54
223	AAAAGUCCACAUG AUAACAGAGAA	843	UUCUCUGUUAUCA UGUGGACUUUUC	1463	TTCTCTGTTATCA TGTGGACTTTT	エクソン 54
224	AAAAGUCCACAUG AUAACAGAGAAU	844	AUUCUCUGUUAUC AUGUGGACUUUUC	1464	ATTCTCTGTTATC ATGTGGACTTTT	エクソン 54
225	AAAGUCCACAUGA UAACAGAG	845	CUCUGUUAUCAUG UGGACUUUUC	1465	CTCTGTTATCATG TGGACTTT	エクソン 54
226	AAAGUCCACAUGA UAACAGAGA	846	UCUCUGUUAUCAU GUGGACUUUUC	1466	TCTCTGTTATCAT GTGGACTTT	エクソン 54
227	AAAGUCCACAUGA UAACAGAGAA	847	UUCUCUGUUAUCA UGUGGACUUUUC	1467	TTCTCTGTTATCA TGTGGACTTT	エクソン 54
228	AAAGUCCACAUGA UAACAGAGAAU	848	AUUCUCUGUUAUC AUGUGGACUUUUC	1468	ATTCTCTGTTATC ATGTGGACTTT	エクソン 54
229	AAAGUCCACAUGA UAACAGAGAAUA	849	UAUUCUCUGUUAU CAUGUGGACUUU	1469	TATTCTCTGTTAT CATGTGGACTTT	エクソン 54
230	AAGUCCACAUGAU AACAGAG	850	CUCUGUUAUCAUG UGGACUUUUC	1470	CTCTGTTATCATG TGGACTT	エクソン 54
231	AAGUCCACAUGAU AACAGAGA	851	UCUCUGUUAUCAU GUGGACUUUUC	1471	TCTCTGTTATCAT GTGGACTT	エクソン 54
232	AAGUCCACAUGAU AACAGAGAA	852	UUCUCUGUUAUCA UGUGGACUUUUC	1472	TTCTCTGTTATCA TGTGGACTT	エクソン 54
233	AAGUCCACAUGAU AACAGAGAAU	853	AUUCUCUGUUAUC AUGUGGACUUUUC	1473	ATTCTCTGTTATC ATGTGGACTT	エクソン 54
234	AAGUCCACAUGAU AACAGAGAAUA	854	UAUUCUCUGUUAU CAUGUGGACUUU	1474	TATTCTCTGTTAT CATGTGGACTT	エクソン 54
235	AAGUCCACAUGAU AACAGAGAAUAU	855	AUAUUCUCUGUUA UCAUGUGGACUU	1475	ATATTCTCTGTTA TCATGTGGACTT	エクソン 54
236	AGUCCACAUGAUA ACAGAGAA	856	UUCUCUGUUAUCA UGUGGACUUUUC	1476	TTCTCTGTTATCA TGTGGACT	エクソン 54
237	AGUCCACAUGAUA ACAGAGAAU	857	AUUCUCUGUUAUC AUGUGGACUUUUC	1477	ATTCTCTGTTATC ATGTGGACT	エクソン 54
238	AGUCCACAUGAUA ACAGAGAAUA	858	UAUUCUCUGUUAU CAUGUGGACUUU	1478	TATTCTCTGTTAT CATGTGGACT	エクソン 54
239	AGUCCACAUGAUA ACAGAGAAUAU	859	AUAUUCUCUGUUA UCAUGUGGACUU	1479	ATATTCTCTGTTA TCATGTGGACT	エクソン 54
240	AGUCCACAUGAUA ACAGAGAAUAUC	860	GAUAUUCUCUGUU AUCAUGUGGACUU	1480	GATATTCTCTGTT ATCATGTGGACT	エクソン 54
241	GUCCACAUGAUAA CAGAGAAUAUC	861	GAUAUUCUCUGUU AUCAUGUGGACUU	1481	GATATTCTCTGTT ATCATGTGGAC	エクソン 54
242	GUCCACAUGAUAA CAGAGAAUAUCA	862	UGAUUUCUCUGUU UAUCAUGUGGACUU	1482	TGATATTCTCTGT TATCATGTGGAC	エクソン 54
243	GGAAGAAACUCAU AGAUAUACUGCAA	863	UUGCAGUAAUCUA UGAGUUUCUUC	1483	TTGCAGTAATCTA TGAGTTTCTTCC	エクソン 55
244	GCUGAAACAACUG CCAAUGUCCUAC	864	UAGGACAUUGGCA GUUGUUUCAGC	1484	TAGGACATTGGCA GTTGTTTCAGC	エクソン 55
245	GCUGAAACAACUG CCAAUGUCCUAC	865	GUAGGACAUUGGC AGUUGUUUCAGC	1485	GTAGGACATTGGC AGTTGTTTCAGC	エクソン 55
246	UGAAACAACUGCC AAUGUCCUAC	866	GUAGGACAUUGGC AGUUGUUUCA	1486	GTAGGACATTGGC AGTTGTTTCA	エクソン 55
247	UGAAACAACUGCC AAUGUCCUACA	867	UGUAGGACAUUGG CAGUUGUUUCA	1487	TGTAGGACATTGG CAGTTGTTTCA	エクソン 55
248	UGAAACAACUGCC AAUGUCCUACAG	868	CUGUAGGACAUUG GCAGUUGUUUCA	1488	CTGTAGGACATTG GCAGTTGTTTCA	エクソン 55
249	AACAACUGCCAAU GUCCUACAGGAU	869	AUCCUGUAGGACA UUGGCAGUUGUU	1489	ATCCTGTAGGACA TTGGCAGTTGTT	エクソン 55

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

250	ACAACUGCCAUG UCCUACAGGAU	870	AUCCUGUAGGACA UUGGCAGUUGU	1490	ATCCTGTAGGACA TTGGCAGTTGT	エクソン 55
251	CAACUGCCAAUGU CCUACAGGAU	871	AUCCUGUAGGACA UUGGCAGUUG	1491	ATCCTGTAGGACA TTGGCAGTTG	エクソン 55
252	AACUGCCAAUGUC CUACAGGAU	872	AUCCUGUAGGACA UUGGCAGUU	1492	ATCCTGTAGGACA TTGGCAGTT	エクソン 55
253	AACUGCCAAUGUC CUACAGGAUGCU	873	AGCAUCCUGUAGG ACAUUGGCAGUU	1493	AGCATCCTGTAGG ACATTGGCAGTT	エクソン 55
254	ACUGCCAAUGUCC UACAGGAU	874	AUCCUGUAGGACA UUGGCAGU	1494	ATCCTGTAGGACA TTGGCAGT	エクソン 55
255	ACUGCCAAUGUCC UACAGGAUGCU	875	AGCAUCCUGUAGG ACAUUGGCAGU	1495	AGCATCCTGTAGG ACATTGGCAGT	エクソン 55
256	CUGCCAAUGUCCU ACAGGAUGCU	876	AGCAUCCUGUAGG ACAUUGGCAG	1496	AGCATCCTGTAGG ACATTGGCAG	エクソン 55
257	UGCCAAUGUCCUA CAGGAUGCU	877	AGCAUCCUGUAGG ACAUUGGCA	1497	AGCATCCTGTAGG ACATTGGCA	エクソン 55
258	GCCAAUGUCCUAC AGGAUGCU	878	AGCAUCCUGUAGG ACAUUGGC	1498	AGCATCCTGTAGG ACATTGGC	エクソン 55
259	AGAUGAUACCAGA AAAGUCC	879	GGACUUUUCUGGU AUCAUCU	1499	GGACTTTTCTGGT ATCATCT	エクソン 54
260	AGAUGAUACCAGA AAAGUCCACA	880	UGUGGACUUUUCU GGUAUCAUCU	1500	TGTGGACTTTTCT GGTATCATCT	エクソン 54
261	AGAUGAUACCAGA AAAGUCCACAU	881	AUGUGGACUUUUC UGUAUCAUCU	1501	ATGTGGACTTTTC TGGTATCATCT	エクソン 54
262	CUGAAACAACUGC CAAUGUCCUAC	882	GUAGGACAUUGGC AGUUGUUUCAG	1502	GTAGGACATTGGC AGTTGTTTCAG	エクソン 55
263	CUGAAACAACUGC CAAUGUCCUACA	883	UGUAGGACAUUGG CAGUUGUUUCAG	1503	TGTAGGACATTGG CAGTTGTTTCAG	エクソン 55
264	ACAACUGCCAUG UCCUACAGGAUG	884	CAUCCUGUAGGAC AUUGGCAGUUGU	1504	CATCCTGTAGGAC ATTGGCAGTTGT	エクソン 55
265	CAACUGCCAAUGU CCUACAGGAUG	885	CAUCCUGUAGGAC AUUGGCAGUUG	1505	CATCCTGTAGGAC ATTGGCAGTTG	エクソン 55
266	AACUGCCAAUGUC CUACAGGAUG	886	CAUCCUGUAGGAC AUUGGCAGUU	1506	CATCCTGTAGGAC ATTGGCAGTT	エクソン 55
267	ACUGCCAAUGUCC UACAGGAUG	887	CAUCCUGUAGGAC AUUGGCAGU	1507	CATCCTGTAGGAC ATTGGCAGT	エクソン 55
268	ACUGCCAAUGUCC UACAGGAUGCUA	888	UAGCAUCCUGUAG GACAUUGGCAGU	1508	TAGCATCCTGTAG GACATTGGCAGT	エクソン 55
269	CUGCCAAUGUCCU ACAGGAUG	889	CAUCCUGUAGGAC AUUGGCAG	1509	CATCCTGTAGGAC ATTGGCAG	エクソン 55
270	CUGCCAAUGUCCU ACAGGAUGCUA	890	UAGCAUCCUGUAG GACAUUGGCAG	1510	TAGCATCCTGTAG GACATTGGCAG	エクソン 55
271	UGCCAAUGUCCUA CAGGAUGCUA	891	UAGCAUCCUGUAG GACAUUGGCA	1511	TAGCATCCTGTAG GACATTGGCA	エクソン 55
272	UGCCAAUGUCCUA CAGGAUGCUACC	892	GGUAGCAUCCUGU AGGACAUUGGCA	1512	GGTAGCATCCTGT AGGACATTGGCA	エクソン 55
273	GCCAAUGUCCUAC AGGAUGCUA	893	UAGCAUCCUGUAG GACAUUGGC	1513	TAGCATCCTGTAG GACATTGGC	エクソン 55
274	GCCAAUGUCCUAC AGGAUGCUACC	894	GGUAGCAUCCUGU AGGACAUUGGC	1514	GGTAGCATCCTGT AGGACATTGGC	エクソン 55
275	CCAAGGGAGUAAA AGAGCUGA	895	UCAGCUCUUUAC UCCCUUGG	1515	TCAGCTCTTTTAC TCCCTTGG	エクソン 55
276	CCAAGGGAGUAAA AGAGCUGAU	896	AUCAGCUCUUUUA CUCCCUUGG	1516	ATCAGCTCTTTTA CTCCCTTGG	エクソン 55
277	CCAAGGGAGUAAA AGAGCUGAUG	897	CAUCAGCUCUUUU ACUCCCUUGG	1517	CATCAGCTCTTTT ACTCCCTTGG	エクソン 55
278	CCAAGGGAGUAAA AGAGCUGAUGA	898	UCAUCAGCUCUUU UACUCCCUUGG	1518	TCATCAGCTCTTT TACTCCCTTGG	エクソン 55
279	CAAGGGAGUAAAA GAGCUGAUGA	899	UCAUCAGCUCUUU UACUCCCUUG	1519	TCATCAGCTCTTT TACTCCCTTG	エクソン 55
280	CAAGGGAGUAAAA GAGCUGAUGAA	900	UUCAUCAGCUCUU UACUCCCUUG	1520	TTATCAGCTCTT TTACTCCCTTG	エクソン 55

10

20

30

40

50

【表 8 - 5】

281	AGGGAGUAAAAGA GCUGAUGAAA	901	UUUCAUCAGCUCU UUUACUCCCU	1521	TTTCATCAGCTCT TTTACTCCCT	エクソン 55
282	CUGAUGAAACAAU GGCAAGUAAGUC	902	GACUUACUUGCCA UUGUUUCAUCAG	1522	GACTTACTTGCCA TTGTTTCATCAG	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
283	UGAUGAAACAAUG GCAAGUAAGUC	903	GACUUACUUGCCA UUGUUUCAUCA	1523	GACTTACTTGCCA TTGTTTCATCA	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
284	GAUGAAACAAUGG CAAGUAAGUC	904	GACUUACUUGCCA UUGUUUCAUC	1524	GACTTACTTGCCA TTGTTTCATC	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
285	CCUGGAAGGUUCC GAUGAUGC	905	GCAUCAUCGGAAC CUUCCAGG	1525	GCATCATCGGAAC CTTCCAGG	エクソン 56
286	CCUGGAAGGUUCC GAUGAUGCA	906	UGCAUCAUCGGAA CCUCCAGG	1526	TGCATCATCGGAA CCTTCCAGG	エクソン 56
287	CAGAUGAUACCAG AAAAGUCCACA	907	UGUGGACUUUUCU GGUAUCAUCUG	1527	TGTGGACTTTTCT GGTATCATCTG	エクソン 54
288	CAGAUGAUACCAG AAAAGUCCACAU	908	AUGUGGACUUUUC UGGUAUCAUCUG	1528	ATGTGGACTTTTC TGGTATCATCTG	エクソン 54
289	CUGCCAUGUCCU ACAGGAUGCUAC	909	GUAGCAUCCUGUA GGACAUUGGCAG	1529	GTAGCATCCTGTA GGACATTGGCAG	エクソン 55
290	UGCCAAUGUCCUA CAGGAUGCUAC	910	GUAGCAUCCUGUA GGACAUUGGCA	1530	GTAGCATCCTGTA GGACATTGGCA	エクソン 55
291	GCCAAUGUCCUAC AGGAUGCUAC	911	GUAGCAUCCUGUA GGACAUUGGC	1531	GTAGCATCCTGTA GGACATTGGC	エクソン 55
292	CCAAUGUCCUACA GGAUGCUAC	912	GUAGCAUCCUGUA GGACAUUGG	1532	GTAGCATCCTGTA GGACATTGG	エクソン 55
293	AGGGAGUAAAAGA GCUGAUGAAAC	913	GUUUCAUCAGCUC UUUUACUCCCU	1533	GTTTCATCAGCTC TTTTACTCCCT	エクソン 55
294	UGAUGAAACAAUG GCAAGUAAGUCA	914	UGACUUACUUGCC AUUGUUUCAUCA	1534	TGACTTACTTGCC ATTGTTTCATCA	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
295	GAUGAAACAAUGG CAAGUAAGUCA	915	UGACUUACUUGCC AUUGUUUCAUC	1535	TGACTTACTTGCC ATTGTTTCATC	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
296	CCUGGAAGGUUCC GAUGAUGCAG	916	CUGCAUCAUCGGA ACCUUCCAGG	1536	CTGCATCATCGGA ACCTTCCAGG	エクソン 56
297	GGAGGUUCCGAU GAUGCAG	917	CUGCAUCAUCGGA ACCUUCC	1537	CTGCATCATCGGA ACCTTCC	エクソン 56
298	GAUCCAAUUGAAC AAUUCUCAGCA	918	UGCUGAGAAUUGU UCAAUUGGAUC	1538	TGCTGAGAATTGT TCAATTGGATC	イントロン 55
299	AGGUUCCGAUGAU GCAGUCCUGU	919	ACAGGACUGCAUC AUCGGAACCU	1539	ACAGGACTGCATC ATCGGAACCT	エクソン 56
300	GGUUCGGAUGAUG CAGUCCUGU	920	ACAGGACUGCAUC AUCGGAACC	1540	ACAGGACTGCATC ATCGGAACC	エクソン 56
301	CCUGGAAGGUUCC GAUGAUGCAGU	921	ACUGCAUCAUCGG AACCUUCCAGG	1541	ACTGCATCATCGG AACCTTCCAGG	エクソン 56
302	CUGGAAGGUUCCG AUGAUGCAGU	922	ACUGCAUCAUCGG AACCUUCCAG	1542	ACTGCATCATCGG AACCTTCCAG	エクソン 56
303	GGAGGUUCCGAU GAUGCAGU	923	ACUGCAUCAUCGG AACCUUCC	1543	ACTGCATCATCGG AACCTTCC	エクソン 56
304	GAAGGUUCCGAUG AUGCAGUCCUGU	924	ACAGGACUGCAUC AUCGGAACCUUC	1544	ACAGGACTGCATC ATCGGAACCTTC	エクソン 56
305	GGUUCGGAUGAUG CAGUCCUGUAC	925	GUAACAGGACUGC AUCAUCGGAACC	1545	GTAACAGGACTGC ATCATCGGAACC	エクソン 56
306	GUUCCGAUGAUGC AGUCCUGUAC	926	GUAACAGGACUGC AUCAUCGGAAC	1546	GTAACAGGACTGC ATCATCGGAAC	エクソン 56
307	GUGGAUCCAAUUG AACAAUUCUC	927	GAGAAUUGUCAA UUGGAUCCAC	1547	GAGAAATTGTTCAA TTGGATCCAC	イントロン 55
308	GGAUCCAAUUGAA CAAUUCUCAGCA	928	UGCUGAGAAUUGU UCAAUUGGAUCC	1548	TGCTGAGAATTGT TCAATTGGATCC	イントロン 55
309	GAUCCAAUUGAAC AAUUCUCAGCAU	929	AUGCAUGAGAAUG UUCAAUUGGAUC	1549	ATGCTGAGAATTG TTCAATTGGATC	イントロン 55
310	AAGGUUCCGAUGA UGCAGUCCUGU	930	ACAGGACUGCAUC AUCGGAACCUU	1550	ACAGGACTGCATC ATCGGAACCTT	エクソン 56
311	AGGUUCCGAUGAU GCAGUCC	931	GGACUGCAUCAUC GGAACCU	1551	GGACTGCATCATC GGAACCT	エクソン 56

10

20

30

40

50

【表 8 - 6】

312	GUGGAUCCAAUUG AACAAUUCUCA	932	UGAGAAUUGUUCA AUUGGAUCCAC	1552	TGAGAATTGTTCA ATTGGATCCAC	イントロン 55
313	AGGUUCCGAUGAU GCAGUCCUGUUA	933	UACAGGACUGCA UCAUCGGAACCU	1553	TAACAGGACTGCA TCATCGGAACCT	エクソン 56
314	GGUUCCGAUGAUG CAGUCCUGUUA	934	UACAGGACUGCA UCAUCGGAACC	1554	TAACAGGACTGCA TCATCGGAACC	エクソン 56
315	CUGGAAGGUUCCG AUGAUGCAGUCC	935	GGACUGCAUCAUC GGAACCUUCCAG	1555	GGACTGCATCATC GGAACCTTCCAG	エクソン 56
316	UGGAAGGUUCCGA UGAUCAGUCC	936	GGACUGCAUCAUC GGAACCUUCCA	1556	GGACTGCATCATC GGAACCTTCCA	エクソン 56
317	GGAAGGUUCCGAU GAUGCAGUCC	937	GGACUGCAUCAUC GGAACCUUCC	1557	GGACTGCATCATC GGAACCTTCC	エクソン 56
318	UGUGGAUCCAAU GAACAAUUCUC	938	GAGAAUUGUUCAA UUGGAUCCACA	1558	GAGAATTGTTCAA TTGGATCCACA	イントロン 55
319	UUGUGGAUCCAAU UGAACAAUUCUC	939	GAGAAUUGUUCAA UUGGAUCCACAA	1559	GAGAATTGTTCAA TTGGATCCACAA	イントロン 55
320	UGUGGAUCCAAU GAACAAUUCUCA	940	UGAGAAUUGUUCA AUUGGAUCCACA	1560	TGAGAATTGTTCA ATTGGATCCACA	イントロン 55
321	GUUCCGAUGAUGC AGUCCUGU	941	ACAGGACUGCAUC AUCGGAAC	1561	ACAGGACTGCATC ATCGGAAC	エクソン 56
322	UCCGAUGAUGCAG UCCUGUUA	942	UACAGGACUGCA UCAUCGGA	1562	TAACAGGACTGCA TCATCGGA	エクソン 56
323	UCCGAUGAUGCAG UCCUGUUA	943	GUAACAGGACUGC AUCAUCGGA	1563	GTAACAGGACTGC ATCATCGGA	エクソン 56
324	GUUCCGAUGAUGC AGUCCUGUUA	944	UACAGGACUGCA UCAUCGGAAC	1564	TAACAGGACTGCA TCATCGGAAC	エクソン 56
325	UUCGAUGAUGCAG GUCCUGUUA	945	GUAACAGGACUGC AUCAUCGGAA	1565	GTAACAGGACTGC ATCATCGGAA	エクソン 56
326	CUCCAAAUUCACA UUCACGCUUG	946	CAAGCGAUGAAUG UGAAUUUGGAG	1566	CAAGCGATGAATG TGAATTGGAG	イントロン 55
327	GAAGGUUCCGAUG AUGCAGUCC	947	GGACUGCAUCAUC GGAACCUUC	1567	GGACTGCATCATC GGAACCTTC	エクソン 56
328	AAGGUUCCGAUGA UGCAGUCC	948	GGACUGCAUCAUC GGAACCUU	1568	GGACTGCATCATC GGAACCTT	エクソン 56
329	GGAGCUUGGGAGG GUUCAAGACGA	949	UCGUCUUGAACCC UCCCAAGCUCC	1569	TCGTCTTGAACCC TCCCAAGCTCC	イントロン 54
330	GGAGCUUGGGAGG GUUCAAGACGAU	950	AUCGUCUUGAAC CUCCCAAGCUCC	1570	ATCGTCTTGAACC CTCCCAAGCTCC	イントロン 54
331	UGGCUGUAAUAAU GGGUGUGUG	951	CACCACCCCAUUA UUACAGCCA	1571	CACCACCCCATTA TTACAGCCA	イントロン 54
332	UGGCUGUAAUAAU GGGUGUGUGA	952	UCACCACCCCAU AUUACAGCCA	1572	TCACCACCCCAT ATTACAGCCA	イントロン 54
333	GGCUGUAAUAAUG GGGUGUGUGA	953	UCACCACCCCAU AUUACAGCC	1573	TCACCACCCCAT ATTACAGCC	イントロン 54
334	GGGUGUGUGAAAC UGGAUGG	954	CCAUCCAGUUUCA CCACCCC	1574	CCATCCAGTTTCA CCACCCC	イントロン 54
335	UUGGCUGUAAUAA UGGGUGUGUGA	955	UCACCACCCCAU AUUACAGCCAA	1575	TCACCACCCCAT ATTACAGCCAA	イントロン 54
336	GGGUGUGUGAAAC UGGAUGGA	956	UCCAUCAGUUUC ACCACCCC	1576	TCCATCCAGTTTC ACCACCCC	イントロン 54
337	GCUGUAAUAAUGG GGUGUGUGA	957	UCACCACCCCAU AUUACAGC	1577	TCACCACCCCAT ATTACAGC	イントロン 54
338	UGGGUGUGUGAAA CUGGAUGG	958	CCAUCCAGUUUCA CCACCCCA	1578	CCATCCAGTTTCA CCACCCCA	イントロン 54
339	UGGCUGUAAUAAU GGGUGUGUGAAA	959	UUUACACCCCA UUAUACAGCCA	1579	TTTACACCCCA TTATTACAGCCA	イントロン 54
340	GGCUGUAAUAAUG GGGUGUGUGAAA	960	UUUACACCCCA UUAUACAGCC	1580	TTTACACCCCA TTATTACAGCC	イントロン 54
341	UGGGUGUGUGAAA CUGGAUG	961	CAUCCAGUUUCAC CACCCCA	1581	CATCCAGTTTCAC CACCCCA	イントロン 54
342	UGGGUGUGUGAAA CUGGAUGGA	962	UCCAUCAGUUUC ACCACCCCA	1582	TCCATCCAGTTTC ACCACCCCA	イントロン 54

10

20

30

40

50

【表 8 - 7】

343	AUGGCAAGUAAGU CAGGCAUUUCC	963	GGAAAUGCCUGAC UUACUUUGCCAU	1583	GGAAATGCCTGAC TTACTTGCCAT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
344	GCUGUAAUAAUGG GGUGGUGAAACU	964	AGUUUACACACCC CAUUUUACAGC	1584	AGTTTCACACACCC CATTATTACAGC	イントロン 54
345	AUGGGGUGGUGAA ACUGGAUG	965	CAUCCAGUUUCAC CACCCCAU	1585	CATCCAGTTTCAC CACCCCAT	イントロン 54
346	AUGGGGUGGUGAA ACUGGAUGG	966	CCAUCCAGUUUCA CCACCCCAU	1586	CCATCCAGTTTCA CCACCCCAT	イントロン 54
347	GCAAGUAAGUCAG GCAUUUCCGC	967	GCGGAAAUGCCUG ACUUACUUGC	1587	GCGGAAATGCCTG ACTTACTTGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
348	GGCUGUAAUAAUG GGUGGUGAAAC	968	GUUUCACACACCC AUUAAUACAGCC	1588	GTTTCACACACCC ATTATTACAGCC	イントロン 54
349	AAUGGGGUGGUGA AACUGGAUG	969	CAUCCAGUUUCAC CACCCCAU	1589	CATCCAGTTTCAC CACCCCAT	イントロン 54
350	AUGGGGUGGUGAA ACUGGAUGGA	970	UCCAUCCAGUUUC ACCACCCCAU	1590	TCCATCCAGTTTC ACCACCCCAT	イントロン 54
351	UGGCAAGUAAGUC AGGCAUUUCCGC	971	GCGGAAAUGCCUG ACUUACUUGCA	1591	GCGGAAATGCCTG ACTTACTTGCCA	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
352	GCUGUAAUAAUGG GGUGGUGAAA	972	UUUACACACCCCA UUAUUACAGC	1592	TTTCACACACCCCA TTATTACAGC	イントロン 54
353	UAAUGGGGUGGUG AACUGGAUG	973	CAUCCAGUUUCAC CACCCCAUUA	1593	CATCCAGTTTCAC CACCCCATTA	イントロン 54
354	UAAUGGGGUGGUG AACUGGAUGG	974	CCAUCCAGUUUCA CCACCCCAUUA	1594	CCATCCAGTTTCA CCACCCCATTA	イントロン 54
355	AAUGGGGUGGUGA AACUGGAUGG	975	CCAUCCAGUUUCA CCACCCCAU	1595	CCATCCAGTTTCA CCACCCCAT	イントロン 54
356	AUGGCAAGUAAGU CAGGCAUUUC	976	GAAAUGCCUGACU UACUUUGCCAU	1596	GAAATGCCTGACT TACTTGCCAT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
357	GGCAAGUAAGUCA GGCAUUUCCGC	977	GCGGAAAUGCCUG ACUUACUUGCC	1597	GCGGAAATGCCTG ACTTACTTGCC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
358	GGCAAGUAAGUCA GGCAUUUCCGCU	978	AGCGGAAAUGCCU GACUUACUUGCC	1598	AGCGGAAATGCCT GACTTACTTGCC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
359	AAUGGGGUGGUGA AACUGGAUGGA	979	UCCAUCCAGUUUC ACCACCCCAU	1599	TCCATCCAGTTTC ACCACCCCAT	イントロン 54
360	GGGUGGUGAAACU GGAUGGA	980	UCCAUCCAGUUUC ACCACCC	1600	TCCATCCAGTTTC ACCACCC	イントロン 54
361	AUAAUGGGGUGGU GAAACUGGAUG	981	CAUCCAGUUUCAC CACCCCAUUAU	1601	CATCCAGTTTCAC CACCCCAT	イントロン 54
362	AUAAUGGGGUGGU GAAACUGGAUGG	982	CCAUCCAGUUUCA CCACCCCAUUAU	1602	CCATCCAGTTTCA CCACCCCAT	イントロン 54
363	UAAUGGGGUGGUG AACUGGAUGGA	983	UCCAUCCAGUUUC ACCACCCCAUUA	1603	TCCATCCAGTTTC ACCACCCCATTA	イントロン 54
364	AAUGGCAAGUAAG UCAGGCAUUUC	984	GAAAUGCCUGACU UACUUUGCCAU	1604	GAAATGCCTGACT TACTTGCCAT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
365	AAUAAUGGGGUGG UGAAACUGGAUG	985	CAUCCAGUUUCAC CACCCCAUUAU	1605	CATCCAGTTTCAC CACCCCAT	イントロン 54
366	AAUGGCAAGUAAG UCAGGCAUUUCC	986	GGAAAUGCCUGAC UUACUUUGCCAU	1606	GGAAATGCCTGAC TTACTTGCCAT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
367	UGGCAAGUAAGUC AGGCAUUUCC	987	GGAAAUGCCUGAC UUACUUUGCCA	1607	GGAAATGCCTGAC TTACTTGCCA	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
368	CCGAUGAUGCAGU CCUGUUAC	988	GUAACAGGACUGC AUCAUCGG	1608	GTAACAGGACTGC ATCATCGG	エクソン 56
369	UCCAAAUUACAU UCAUCGCUUGU	989	ACAAGCGAUGAAU GUGAAUUUGGA	1609	ACAAGCGATGAAT GTGAATTGGA	イントロン 55
370	GUAAUAAUGGGGU GGUGAAAC	990	GUUUCACACACCC AUUAAUAC	1610	GTTTCACACACCC ATTATTAC	イントロン 54
371	GCUGUAAUAAUGG GGUGGUGAAAC	991	GUUUCACACACCC AUUAAUACAGC	1611	GTTTCACACACCC ATTATTACAGC	イントロン 54
372	GCUUUGGAAGAAA CUCAUAGAUUAC	992	GUAAUCUAGAGU UUCUCCAAAGC	1612	GTAATCTATGAGT TTCTTCCAAAGC	エクソン 55
373	UUGGAAGAAACUC AUAGAUUACUGC	993	GCAGUAAUCUAG AGUUUCUCCAA	1613	GCAGTAATCTATG AGTTTCTTCCAA	エクソン 55

10

20

30

40

50

【表 8 - 8】

374	UGGAAGAAACUCA UAGAUUACUGC	994	GCAGUAAUCUAUG AGUUUCUCCA	1614	GCAGTAATCTATG AGTTTCTTCCA	エクソン 55
375	UGGAAGAAACUCA UAGAUUACUGCA	995	UGCAGUAAUCUAU GAGUUUCUCCA	1615	TGCAGTAATCTAT GAGTTCTTCCA	エクソン 55
376	GGAAAGAAACUCAU AGAUUACUGC	996	GCAGUAAUCUAUG AGUUUCUCCA	1616	GCAGTAATCTATG AGTTTCTTCC	エクソン 55
377	GAAGAAACUCAUA GAUUAUCUGCA	997	UGCAGUAAUCUAU GAGUUUCUUC	1617	TGCAGTAATCTAT GAGTTCTTTC	エクソン 55
378	AAACAACUGCCAA UGUCCUACA	998	UGUAGGACAUUGG CAGUUGUUU	1618	TGTAGGACATTGG CAGTTGTTT	エクソン 55
379	AAACAACUGCCAA UGUCCUACAG	999	CUGUAGGACAUUG GCAGUUGUUU	1619	CTGTAGGACATTG GCAGTTGTTT	エクソン 55
380	AACAACUGCCAAU GUCCUAC	1000	GUAGGACAUUGGC AGUUGUU	1620	GTAGGACATTGGC AGTTGTT	エクソン 55
381	AACAACUGCCAAU GUCCUACA	1001	UGUAGGACAUUGG CAGUUGUU	1621	TGTAGGACATTGG CAGTTGTT	エクソン 55
382	CAACUGCCAAUGU CCUACAG	1002	CUGUAGGACAUUG GCAGUUG	1622	CTGTAGGACATTG GCAGTTG	エクソン 55
383	AACUGCCAAUGUC CUACAGG	1003	CCUGUAGGACAUU GGCAGUU	1623	CCTGTAGGACATT GGCAGTT	エクソン 55
384	GAUGAAAAACAGCC AAAAAAUCC	1004	GGAUUUUUUGGCU GUUUUCAUC	1624	GGATTTTTTGCT GTTTTTCATC	エクソン 56
385	GAUGAAAAACAGCC AAAAAAUCCU	1005	AGGAUUUUUUGGC UGUUUCAUC	1625	AGGATTTTTTGCT TGTTTTTCATC	エクソン 56
386	GAUGAAAAACAGCC AAAAAAUCCUG	1006	CAGGAUUUUUUGG CUGUUUCAUC	1626	CAGGATTTTTTG CTGTTTTTCATC	エクソン 56
387	GAUGAAAAACAGCC AAAAAAUCCUGA	1007	UCAGGAUUUUUUG GCUGUUUCAUC	1627	TCAGGATTTTTTG GCTGTTTTTCATC	エクソン 56
388	AUGAAAAACAGCCA AAAAAUCCUGAG	1008	CUCAGGAUUUUUU GGCUGUUUCAU	1628	CTCAGGATTTTT GGCTGTTTTCAT	エクソン 56
389	UGAAAAACAGCCAA AAAAUCCUGAG	1009	CUCAGGAUUUUUU GGCUGUUUCA	1629	CTCAGGATTTTT GGCTGTTTTCA	エクソン 56
390	UGAAAAACAGCCAA AAAAUCCUGAGA	1010	UCUCAGGAUUUUU UGGCUGUUUCA	1630	TCTCAGGATTTTT TGGCTGTTTTCA	エクソン 56
391	GAAAAACAGCCAAA AAAUCCUGAGA	1011	UCUCAGGAUUUUU UGGCUGUUUC	1631	TCTCAGGATTTTT TGGCTGTTTTC	エクソン 56
392	GAAAAACAGCCAAA AAAUCCUGAGAU	1012	AUCUCAGGAUUUU UUGGCUGUUUC	1632	ATCTCAGGATTTT TTGGCTGTTTTC	エクソン 56
393	AAACAGCCAAAAA AUCCUGAGAU	1013	GAUCUCAGGAUUU UUUGGCUGUUU	1633	GATCTCAGGATTT TTTGCTGT	エクソン 56
394	AAACAGCCAAAAA AUCCUGAGAUCC	1014	GGAUCUCAGGAUU UUUUGGCUGUU	1634	GGATCTCAGGATT TTTTGGCTGT	エクソン 56
395	AACAGCCAAAAA UCCUGAGAUCC	1015	GGAUCUCAGGAUU UUUUGGCUGUU	1635	GGATCTCAGGATT TTTTGGCTGT	エクソン 56
396	AACAGCCAAAAA UCCUGAGAUCCC	1016	GGGAUCUCAGGAU UUUUGGCUGUU	1636	GGATCTCAGGAT TTTTGGCTGT	エクソン 56
397	CCUGAGAUCCUG GAAGGUUC	1017	GAACCUUCCAGGG AUCUCAGG	1637	GAACCTTCCAGGG ATCTCAGG	エクソン 56
398	GAAGAAACUCAUA GAUUAUCUGCAAC	1018	GUUGCAGUAAUCU AUGAGUUUCUUC	1638	GTTGCAGTAATCT ATGAGTTTCTTC	エクソン 55
399	AAGAAACUCAUAG AUUACUGCAAC	1019	GUUGCAGUAAUCU AUGAGUUUCU	1639	GTTGCAGTAATCT ATGAGTTTCT	エクソン 55
400	AAGAAACUCAUAG AUUACUGCAACA	1020	UGUUGCAGUAAUC UAUGAGUUUCU	1640	TGTTGCAGTAATC TATGAGTTTCT	エクソン 55
401	AGAAACUCAUAGA UUACUGCAAC	1021	GUUGCAGUAAUCU AUGAGUUUCU	1641	GTTGCAGTAATCT ATGAGTTTCT	エクソン 55
402	GAAACUCAUAGAU UACUGCAAC	1022	GUUGCAGUAAUCU AUGAGUUUC	1642	GTTGCAGTAATCT ATGAGTTTCT	エクソン 55
403	GAAACUCAUAGAU UACUGCAACA	1023	UGUUGCAGUAAUC UAUGAGUUUC	1643	TGTTGCAGTAATC TATGAGTTTCT	エクソン 55
404	AAACUCAUAGAUU ACUGCAACAG	1024	CUGUUGCAGUAAU CUAUGAGUUU	1644	CTGTTGCAGTAAT CTATGAGTTT	エクソン 55

10

20

30

40

50

【表 8 - 9】

405	AACUCAUAGAUUA CUGCAAC	1025	GUUGCAGUAAUCU AUGAGUU	1645	GTTGCAGTAATCT ATGAGTT	エクソン 55
406	AACUCAUAGAUUA CUGCAACA	1026	UGUUGCAGUAAUC UAUGAGUU	1646	TGTTGCAGTAATC TATGAGTT	エクソン 55
407	AACUCAUAGAUUA CUGCAACAG	1027	CUGUUGCAGUAAU CUAUGAGUU	1647	CTGTTGCAGTAAT CTATGAGTT	エクソン 55
408	ACUCAUAGAUUAC UGCAACA	1028	UGUUGCAGUAAUC UAUGAGU	1648	TGTTGCAGTAATC TATGAGT	エクソン 55
409	ACUCAUAGAUUAC AGCAACAG	1029	CUGUUGCAGUAAU CUAUGAGU	1649	CTGTTGCAGTAAT CTATGAGT	エクソン 55
410	GAUGAUACCAGAA AAGUCCA	1030	UGGACUUUUCUGG UAUCAUC	1650	TGGACTTTTCTGG TATCATC	エクソン 54
411	GAUGAUACCAGAA AAGUCCAC	1031	GUGGACUUUUCUG GUAUCAUC	1651	GTGGACTTTTCTG GTATCATC	エクソン 54
412	GAUGAUACCAGAA AAGUCCACA	1032	UGGACUUUUCU GGUAUCAUC	1652	TGTGGACTTTTCT GGTATCATC	エクソン 54
413	GAUGAUACCAGAA AAGUCCACAUG	1033	CAUGUGGACUUUU CUGGUUAUCAUC	1653	CATGTGGACTTTT CTGGTATCATC	エクソン 54
414	AUGAUACCAGAAA AGUCCACAU	1034	AUGUGGACUUUUC UGGUUAUCAU	1654	ATGTGGACTTTTC TGGTATCAT	エクソン 54
415	AUGAUACCAGAAA AGUCCACAUG	1035	CAUGUGGACUUUU CUGGUUAUCAU	1655	CATGTGGACTTTT CTGGTATCAT	エクソン 54
416	UGAUACCAGAAAA GUCCACA	1036	UGUGGACUUUUCU GGUAUCA	1656	TGTGGACTTTTCT GGTATCA	エクソン 54
417	UGAUACCAGAAAA GUCCACAU	1037	AUGUGGACUUUUC UGGUUAUCA	1657	ATGTGGACTTTTC TGGTATCA	エクソン 54
418	UGAUACCAGAAAA GUCCACAUG	1038	CAUGUGGACUUUU CUGGUUAUCA	1658	CATGTGGACTTTT CTGGTATCA	エクソン 54
419	UGAUACCAGAAAA GUCCACAUGAUA	1039	UAUCAUGUGGACU UUUCUGGUAUCA	1659	TATCATGTGGACT TTTCTGGTATCA	エクソン 54
420	GAUACCAGAAAAG UCCACAU	1040	AUGUGGACUUUUC UGGUUAUC	1660	ATGTGGACTTTTC TGGTATC	エクソン 54
421	GAUACCAGAAAAG UCCACAUG	1041	CAUGUGGACUUUU CUGGUUAUC	1661	CATGTGGACTTTT CTGGTATC	エクソン 54
422	GAUACCAGAAAAG UCCACAUGAUA	1042	UAUCAUGUGGACU UUUCUGGUAUC	1662	TATCATGTGGACT TTTCTGGTATC	エクソン 54
423	AUACCAGAAAAGU CCACAUG	1043	CAUGUGGACUUUU CUGGUUAU	1663	CATGTGGACTTTT CTGGTAT	エクソン 54
424	AUACCAGAAAAGU CCACAUGAUA	1044	UAUCAUGUGGACU UUUCUGGUAU	1664	TATCATGTGGACT TTTCTGGTAT	エクソン 54
425	AUACCAGAAAAGU CCACAUGAUA	1045	UUAUCAUGUGGAC UUUCUGGUAU	1665	TTATCATGTGGAC TTTCTGGTAT	エクソン 54
426	UACCAGAAAAGUC CACAUGAUA	1046	UAUCAUGUGGACU UUUCUGGUA	1666	TATCATGTGGACT TTTCTGGTA	エクソン 54
427	ACCAGAAAAGUCC ACAUGAUA	1047	UAUCAUGUGGACU UUUCUGGU	1667	TATCATGTGGACT TTTCTGGT	エクソン 54
428	CCAGAAAAGUCCA CAUGAUA	1048	UAUCAUGUGGACU UUUCUGG	1668	TATCATGTGGACT TTTCTGG	エクソン 54
429	CAGAAAAGUCCAC AUGAUA	1049	UUAUCAUGUGGAC UUUCUG	1669	TTATCATGTGGAC TTTTCTG	エクソン 54
430	AGAAAAGUCCACA UGAUAAC	1050	GUUAUCAUGUGGA CUUUUCU	1670	GTTATCATGTGGA CTTTTCT	エクソン 54
431	AGAAAAGUCCACA UGAUAAACA	1051	UGUUAUCAUGUGG ACUUUUCU	1671	TGTTATCATGTGG ACTTTTCT	エクソン 54
432	AGAAAAGUCCACA UGAUAACAG	1052	CUGUUAUCAUGUG GACUUUUCU	1672	CTGTTATCATGTG GACTTTTCT	エクソン 54
433	GAAAAGUCCACAU GAUAACA	1053	UGUUAUCAUGUGG ACUUUUC	1673	TGTTATCATGTGG ACTTTTC	エクソン 54
434	AAAAGUCCACAUG AUAACAGA	1054	UCUGUUAUCAUGU GGACUUUU	1674	TCTGTTATCATGT GGACTTTT	エクソン 54
435	AAAGUCCACAUGA UAACAGA	1055	UCUGUUAUCAUGU GGACUUU	1675	TCTGTTATCATGT GGACTTT	エクソン 54

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 0】

436	AGUCCACAUGAAU ACAGAGA	1056	UCUCUGUUAUCAU GUGGACU	1676	TCTCTGTTATCAT GTGGACT	エクソン 54
437	GUCCACAUGAUA CAGAGAA	1057	UUCUCUGUUAUCA UGUGGAC	1677	TTCTCTGTTATCA TGTGGAC	エクソン 54
438	GUCCACAUGAUA CAGAGAAU	1058	AUUCUCUGUUAUC AUGUGGAC	1678	ATTCTCTGTTATC ATGTGGAC	エクソン 54
439	GUCCACAUGAUA CAGAGAAUA	1059	UAUUCUCUGUUAU CAUGUGGAC	1679	TATTCTCTGTTAT CATGTGGAC	エクソン 54
440	GUCCACAUGAUA CAGAGAAUAU	1060	AUAUUCUCUGUUA UCAUGUGGAC	1680	ATATTCTCTGTTA TCATGTGGAC	エクソン 54
441	CCACAUGAUAACA GAGAAUA	1061	UAUUCUCUGUUAU CAUGUGG	1681	TATTCTCTGTTAT CATGTGG	エクソン 54
442	GAAGAAACUCAUA GAUUAUCUGCAA	1062	UUGCAGUAAUCUA UGAGUUUCUUC	1682	TGACAGTAATCTA TGAGTTCTTC	エクソン 55
443	GAAGCUGAAACAA CUGCCAAUGUCC	1063	GGACAUUGGCAGU UGUUUCAGCUUC	1683	GGACATTGGCAGT TGTTTCAGCTTC	エクソン 55
444	AAGCUGAAACAAC UGCCAAUGUCC	1064	GGACAUUGGCAGU UGUUUCAGCUU	1684	GGACATTGGCAGT TGTTTCAGCTT	エクソン 55
445	AAGCUGAAACAAC UGCCAAUGUCCU	1065	AGGACAUUGGCAG UGUUUCAGCUU	1685	AGGACATTGGCAG TGTTTCAGCTT	エクソン 55
446	AGCUGAAACAACU GCCAAUGUC	1066	GACAUUGGCAGUU GUUUCAGCU	1686	GACATTGGCAGTT GTTTCAGCT	エクソン 55
447	AGCUGAAACAACU GCCAAUGUCC	1067	GGACAUUGGCAGU UGUUUCAGCU	1687	GGACATTGGCAGT TGTTTCAGCT	エクソン 55
448	AGCUGAAACAACU GCCAAUGUCCU	1068	AGGACAUUGGCAG UGUUUCAGCU	1688	AGGACATTGGCAG TGTTTCAGCT	エクソン 55
449	AGCUGAAACAACU GCCAAUGUCCUA	1069	UAGGACAUUGGCA GUUGUUUCAGCU	1689	TAGGACATTGGCA GTTGTTTCAGCT	エクソン 55
450	GCUGAAACAACUG CCAAGUC	1070	GACAUUGGCAGUU GUUUCAGC	1690	GACATTGGCAGTT GTTTCAGC	エクソン 55
451	GCUGAAACAACUG CCAAGUCC	1071	GGACAUUGGCAGU UGUUUCAGC	1691	GGACATTGGCAGT TGTTTCAGC	エクソン 55
452	GCUGAAACAACUG CCAAGUCCU	1072	AGGACAUUGGCAG UGUUUCAGC	1692	AGGACATTGGCAG TGTTTCAGC	エクソン 55
453	CAACUGCCAAUGU CCUACAGGAUGC	1073	GCAUCCUGUAGGA CAUUGGCAGUUG	1693	GCATCCTGTAGGA CATTGGCAGTTG	エクソン 55
454	AACUGCCAAUGUC CUACAGGAUGC	1074	GCAUCCUGUAGGA CAUUGGCAGUU	1694	GCATCCTGTAGGA CATTGGCAGTT	エクソン 55
455	ACUGCCAAUGUCC UACAGGAUGC	1075	GCAUCCUGUAGGA CAUUGGCAGU	1695	GCATCCTGTAGGA CATTGGCAGT	エクソン 55
456	CUGCCAAUGUCCU ACAGGAU	1076	AUCCUGUAGGACA UUGGCAG	1696	ATCCTGTAGGACA TTGGCAG	エクソン 55
457	CUGCCAAUGUCCU ACAGGAUGC	1077	GCAUCCUGUAGGA CAUUGGCAG	1697	GCATCCTGTAGGA CATTGGCAG	エクソン 55
458	UGCCAAUGUCCUA CAGGAUGC	1078	GCAUCCUGUAGGA CAUUGGCA	1698	GCATCCTGTAGGA CATTGGCA	エクソン 55
459	GCCAAUGUCCUAC AGGAUGC	1079	GCAUCCUGUAGGA CAUUGGC	1699	GCATCCTGTAGGA CATTGGC	エクソン 55
460	CCAUGUCCUACA GGAUGCU	1080	AGCAUCCUGUAGG ACAUUGG	1700	AGCATCCTGTAGG ACATTGG	エクソン 55
461	AGAGCUGAUGAAA CAAUGGCAAG	1081	CUUGCCAUUGUUU CAUCAGCUCU	1701	CTTGCCATTGTTT CATCAGCTCT	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
462	AGAGCUGAUGAAA CAAUGGCAAGU	1082	ACUUGCCAUUGUU UCAUCAGCUCU	1702	ACTTGCCATTGTT TCATCAGCTCT	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
463	AGAGCUGAUGAAA CAAUGGCAAGUA	1083	UACUUGCCAUUGU UUCAUCAGCUCU	1703	TACTTGCCATTGT TTCATCAGCTCT	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
464	GAGCUGAUGAAAC AAUGGCAAGU	1084	ACUUGCCAUUGUU UCAUCAGCUC	1704	ACTTGCCATTGTT TCATCAGCTC	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
465	GAGCUGAUGAAAC AAUGGCAAGUA	1085	UACUUGCCAUUGU UUCAUCAGCUC	1705	TACTTGCCATTGT TTCATCAGCTC	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
466	GAGCUGAUGAAAC AAUGGCAAGUAA	1086	UUACUUGCCAUUG UUCAUCAGCUC	1706	TTACTTGCCATTG TTCATCAGCTC	エクソン 55/イン トロン 55 接合部

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 1】

467	AGCUGAUGAAACA AUGGCAAGUAAG	1087	CUUACUUGCCAUU GUUUCaucagcu	1707	CTTACTTGCCATT GTTTCATCAGCT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
468	GCUGAUGAAACAA UGGCAAGUAAG	1088	CUUACUUGCCAUU GUUUCaucagc	1708	CTTACTTGCCATT GTTTCATCAGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
469	GCUGAUGAAACAA UGGCAAGUAAGU	1089	ACUUACUUGCCAU UGUUUCAUCAGC	1709	ACTTACTTGCCAT TGTTTCATCAGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
470	CUGAUGAAACAAU GGCAAGUAAGU	1090	ACUUACUUGCCAU UGUUUCAUCAG	1710	ACTTACTTGCCAT TGTTTCATCAG	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
471	UAUCACAACCCUGG AUGAAACAGCC	1091	GGCUGUUUUAUC CAGGUUGUGAUA	1711	GGCTGTTTTCATC CAGGTGTGATA	エクソン 56
472	AUCACAACCCUGGA UGAAACAGGCC	1092	GGCUGUUUUAUC CAGGUUGUGAU	1712	GGCTGTTTTCATC CAGGTGTGAT	エクソン 56
473	AUCACAACCCUGGA AAAACAGGCCA	1093	UGGCUGUUUUAU CCAGGUUGUGAU	1713	TGGCTGTTTTCAT CCAGGTGTGAT	エクソン 56
474	UCACAACCCUGGAU GAAACAGGCC	1094	GGCUGUUUUAUC CAGGUUGUGA	1714	GGCTGTTTTCATC CAGGTGTGA	エクソン 56
475	UCACAACCCUGGAU GAAACAGGCCA	1095	UGGCUGUUUUAU CCAGGUUGUGA	1715	TGGCTGTTTTCAT CCAGGTGTGA	エクソン 56
476	UCACAACCCUGGAU GAAACAGGCCAA	1096	UUGGCUGUUUUA UCCAGGUUGUGA	1716	TGGCTGTTTTCA TCCAGGTGTGA	エクソン 56
477	CACAACCCUGGAUG AAAACAGCCAAA	1097	UUUGGCUGUUUUC AUCCAGGUUGUG	1717	TTTGGCTGTTTT ATCCAGGTGTG	エクソン 56
478	ACAACCCUGGAUGA AAACAGCCAAAA	1098	UUUUGGCUGUUUU CAUCCAGGUUGU	1718	TTTTGGCTGTTTT CATCCAGGTGT	エクソン 56
479	GGAUGAAAACAGC CAAAAAAUC	1099	GAUUUUUUGGCUG UUUUAUCC	1719	GATTTTTTGGCTG TTTTCATCC	エクソン 56
480	GGAUGAAAACAGC CAAAAAAUCC	1100	GGAUUUUUUGGCU GUUUUAUCC	1720	GGATTTTTTGGCT GTTTTCATCC	エクソン 56
481	GGAUGAAAACAGC CAAAAAAUCCU	1101	AGGAUUUUUUGGC UGUUUAUCC	1721	AGGATTTTTTGGC TGTTTCATCC	エクソン 56
482	GGAUGAAAACAGC CAAAAAAUCCUG	1102	CAGGAUUUUUUGG CUGUUUAUCC	1722	CAGGATTTTTTGG CTGTTTTCATCC	エクソン 56
483	ACAGCCAAAAAAU CCUGAGAUC	1103	GGAUUCUAGGAUU UUUUGGCUGU	1723	GGATCTCAGGATT TTTTGGCTGT	エクソン 56
484	ACAGCCAAAAAAU CCUGAGAUC	1104	GGGAUCUAGGAU UUUUGGCUGU	1724	GGATCTCAGGAT TTTTGGCTGT	エクソン 56
485	CCUGAGAUC	1105	UCGGAACCUUCCA GGGAUCUCAGG	1725	TCGGAACCTTCCA GGGATCTCAGG	エクソン 56
486	CCUGAGAUC	1106	AUCGGAACCUUCC AGGGAUCUCAGG	1726	ATCGGAACCTTCC AGGGATCTCAGG	エクソン 56
487	CUGAGAUC	1107	UCGGAACCUUCCA GGGAUCUCAG	1727	TCGGAACCTTCCA GGGATCTCAG	エクソン 56
488	CUGAGAUC	1108	AUCGGAACCUUCC AGGGAUCUCAG	1728	ATCGGAACCTTCC AGGGATCTCAG	エクソン 56
489	CUGAGAUC	1109	CAUCGGAACCUUC CAGGGAUCUCAG	1729	CATCGGAACCTTC CAGGGATCTCAG	エクソン 56
490	UGAGAUC	1110	UCGGAACCUUCCA GGGAUCUCA	1730	TCGGAACCTTCCA GGGATCTCA	エクソン 56
491	UGAGAUC	1111	AUCGGAACCUUCC AGGGAUCUCA	1731	ATCGGAACCTTCC AGGGATCTCA	エクソン 56
492	UGAGAUC	1112	CAUCGGAACCUUC CAGGGAUCUCA	1732	CATCGGAACCTTC CAGGGATCTCA	エクソン 56
493	UGAGAUC	1113	UCAUCGGAACCUU CCAGGGAUCUCA	1733	TCATCGGAACCTT CCAGGGATCTCA	エクソン 56
494	GAGAUC	1114	UCGGAACCUUCCA GGGAUCUC	1734	TCGGAACCTTCCA GGGATCTC	エクソン 56
495	GAGAUC	1115	AUCGGAACCUUCC AGGGAUCUC	1735	ATCGGAACCTTCC AGGGATCTC	エクソン 56
496	GAGAUC	1116	CAUCGGAACCUUC CAGGGAUCUC	1736	CATCGGAACCTTC CAGGGATCTC	エクソン 56
497	GAGAUC	1117	UCAUCGGAACCUU CCAGGGAUCUC	1737	TCATCGGAACCTT CCAGGGATCTC	エクソン 56

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 2】

498	AGAUGCCUGGAAG GUUCCGAUG	1118	CAUCGGAACCUUC CAGGGAUCU	1738	CATCGGAACCTTC CAGGGATCT	エクソン 56
499	AGAUGCCUGGAAG GUUCCGAUGA	1119	UCAUCGGAACCUU CCAGGGAUCU	1739	TCATCGGAACCTT CCAGGGATCT	エクソン 56
500	GAUCCUGGAAGG UUCCGAU	1120	AUCGGAACCUUCC AGGGAUC	1740	ATCGGAACCTTCC AGGGATC	エクソン 56
501	GAUCCUGGAAGG UUCCGAUG	1121	CAUCGGAACCUUC CAGGGAUC	1741	CATCGGAACCTTC CAGGGATC	エクソン 56
502	GAUCCUGGAAGG UUCCGAUGA	1122	UCAUCGGAACCUU CCAGGGAUC	1742	TCATCGGAACCTT CCAGGGATC	エクソン 56
503	AUCCUGGAAGGU UCCGAUGA	1123	UCAUCGGAACCUU CCAGGGAU	1743	TCATCGGAACCTT CCAGGGAT	エクソン 56
504	UCCUGGAAGGUU CGAUGA	1124	UCAUCGGAACCUU CCAGGGA	1744	TCATCGGAACCTT CCAGGGA	エクソン 56
505	AGAUGAUACCAGA AAAGUCCA	1125	UGGACUUUUCUGG UAUCAUCU	1745	TGGACTTTTCTGG TATCATCT	エクソン 54
506	AGAUGAUACCAGA AAAGUCCAC	1126	GUGGACUUUUCUG GUAUCAUCU	1746	GTGGACTTTTCTG GTATCATCT	エクソン 54
507	AGAUGAUACCAGA AAAGUCCACAUG	1127	CAUGUGGACUUUU CUGGUAUCAUCU	1747	CATGTGGACTTTT CTGGTATCATCT	エクソン 54
508	UCCACAUGAUAA AGAGAAUAUC	1128	GAUAUUCUCUGUU AUCAUGUGGA	1748	GATATTCTCTGTT ATCATGTGGA	エクソン 54
509	CUGAAACAACUGC CAAUGUCC	1129	GGACAUUGGCAGU UGUUUCAG	1749	GGACATTGGCAGT TGTTTCAG	エクソン 55
510	CUGAAACAACUGC CAAUGUCCU	1130	AGGACAUUGGCAG UUGUUUCAG	1750	AGGACATTGGCAG TGTTTCAG	エクソン 55
511	CUGAAACAACUGC CAAUGUCCUA	1131	UAGGACAUUGGCA GUGUUUCAG	1751	TAGGACATTGGCA GTGTGTTTCAG	エクソン 55
512	UGCCAAUGUCCUA CAGGAUG	1132	CAUCCUGUAGGAC AUUGGCA	1752	CATCCTGTAGGAC ATTGGCA	エクソン 55
513	CCAUGUCCUACA GGAUGCUA	1133	UAGCAUCCUGUAG GACAUUGG	1753	TAGCATCCTGTAG GACATTGG	エクソン 55
514	CCAUGUCCUACA GAGCUAUG	1134	GGUAGCAUCCUGU AGGACAUUGG	1754	GGTAGCATCCTGT AGGACATTGG	エクソン 55
515	CUCCAAGGGAGUA AAAGAGCUGAU	1135	AUCAGCUCUUUUA CUCCCUUGGAG	1755	ATCAGCTCTTTTA CTCCCTTGGAG	エクソン 55
516	UCCAAGGGAGUAA AAGAGCUGA	1136	UCAGCUCUUUUA UCCCUUGGA	1756	TCAGCTCTTTTAC TCCCTTGA	エクソン 55
517	UCCAAGGGAGUAA AAGAGCUGAU	1137	AUCAGCUCUUUUA CUCCCUUGGA	1757	ATCAGCTCTTTTA CTCCCTTGA	エクソン 55
518	CCAAGGGAGUAAA AGAGCUG	1138	CAGCUCUUUUA CCCUUGG	1758	CAGCTCTTTTACT CCCTTGG	エクソン 55
519	CCAAGGGAGUAAA AGAGCUGAUGAA	1139	UUCAUCAGCUCUU UUACUCCCUUGG	1759	TTCATCAGCTCTT TACTCCCTTGG	エクソン 55
520	CAAGGGAGUAAAA GAGCUGAUG	1140	CAUCAGCUCUUUU ACUCCCUUG	1760	CATCAGCTCTTTT ACTCCCTTG	エクソン 55
521	CAAGGGAGUAAAA GAGCUGAUGAAA	1141	UUUCAUCAGCUCU UUUACUCCCUUG	1761	TTTCATCAGCTCT TTTACTCCCTTG	エクソン 55
522	AGGGAGUAAAAGA GCUGAUGA	1142	UCAUCAGCUCUUU UACUCCCU	1762	TCATCAGCTCTTT TACTCCCT	エクソン 55
523	AGGGAGUAAAAGA GCUGAUGAA	1143	UUCAUCAGCUCUU UUACUCCCU	1763	TTCATCAGCTCTT TACTCCCT	エクソン 55
524	AAGAGCUGAUGAA ACAAUGGCCAA	1144	UUGCCAUGUUUUC AUCAGCUCUU	1764	TGCGCATTGTTTC ATCAGCTCTT	エクソン 55
525	AAGAGCUGAUGAA ACAAUGGCCAAG	1145	CUUGCCAUGUUUU CAUCAGCUCUU	1765	CTTGCCATTGTTT CATCAGCTCTT	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
526	AAGAGCUGAUGAA ACAAUGGCCAAGU	1146	ACUUGCCAUGUUU UCAUCAGCUCUU	1766	ACTTGCCATTGTT TCATCAGCTCTT	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
527	AUGAAACAUGGC AAGUAAGUC	1147	GACUUACUUGCCA UUGUUUCAU	1767	GACTTACTTGCCA TTGTTTCAT	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
528	UCCAAGGUGAAAA UGAAGCUCACAC	1148	GUGUGAGCUUCAA UUUACCUUGGA	1768	GTGTGAGCTTCAA TTTACCTTGGA	エクソン 56

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 3】

529	CCAAGGUGAAAUU GAAGCUCACAC	1149	GUGUGAGCUUCA UUUACCUUGG	1769	GTGTGAGCTTCAA TTTCACCTTGG	エクソン 56
530	CCAAGGUGAAAUU GAAGCUCACACA	1150	UGUGUGAGCUUCA AUUUCACCUUGG	1770	TGTGTGAGCTTCA ATTTACCTTGG	エクソン 56
531	CAAGGUGAAAUUG AAGCUCACACAG	1151	CUGUGUGAGCUUC AAUUUCACCUUG	1771	CTGTGTGAGCTTC AATTTACCTTG	エクソン 56
532	AAGGUGAAAUUGA AGCUCACACAGA	1152	UCUGUGUGAGCUU CAAUUUCACCUU	1772	TCTGTGTGAGCTT CAATTTACCTT	エクソン 56
533	AGGUGAAAUUGAA GCUCACACAGA	1153	UCUGUGUGAGCUU CAAUUUCACCU	1773	TCTGTGTGAGCTT CAATTTACCT	エクソン 56
534	AGGUGAAAUUGAA GCUCACACAGAU	1154	AUCUGUGUGAGCU UCAUUUCACCU	1774	ATCTGTGTGAGCT TCAATTTACCT	エクソン 56
535	UUAUCACAACCUG CAAGAAAACAGC	1155	GCUGUUUUCAUCC AGGUUGUGAUAA	1775	GCTGTTTTTCATCC AGGTTGTGATAA	エクソン 56
536	UGGAUGAAAACAG CCAAAAAUCC	1156	GGAUUUUUUGGCU GUUUUCAUCCA	1776	GGATTTTTTGGCT GTTTTTCATCCA	エクソン 56
537	UGGAUGAAAACAG CCAAAAAUCCU	1157	AGGAUUUUUUGGC UGUUUCAUCCA	1777	AGGATTTTTTGGC TGTTTTTCATCCA	エクソン 56
538	CCUGAGAUCCTUG GAAGGUUCCG	1158	CGGAACCUUCCAG GAUCUCAGG	1778	CGGAACCTTCCAG GGATCTCAGG	エクソン 56
539	CUGAGAUCCTUGG AAGGUUCCG	1159	CGGAACCUUCCAG GAUCUCAG	1779	CGGAACCTTCCAG GGATCTCAG	エクソン 56
540	GAGAUCCUGGAA GGUUCGGAUGAU	1160	AUCAUCGGAACCU UCCAGGGAUCUC	1780	ATCATCGGAACCT TCCAGGGATCTC	エクソン 56
541	AGAUCCTUGGAAG GUUCCGAUGAU	1161	AUCAUCGGAACCU UCCAGGGAUCU	1781	ATCATCGGAACCT TCCAGGGATCT	エクソン 56
542	GAUCCUGGAAGG UUCGGAUGAU	1162	AUCAUCGGAACCU UCCAGGGAUC	1782	ATCATCGGAACCT TCCAGGGATC	エクソン 56
543	GAUCCUGGAAGG UUCGGAUGAUC	1163	GCAUCAUCGGAAC CUUCCAGGGAUC	1783	GCATCATCGGAAC CTTCCAGGGATC	エクソン 56
544	AUCCUGGAAGGU UCCGAUGAU	1164	AUCAUCGGAACCU UCCAGGGAU	1784	ATCATCGGAACCT TCCAGGGAT	エクソン 56
545	AUCCUGGAAGGU UCCGAUGAUC	1165	GCAUCAUCGGAAC CUUCCAGGGAU	1785	GCATCATCGGAAC CTTCCAGGGAT	エクソン 56
546	AUCCUGGAAGGU UCCGAUGAUGCA	1166	UGCAUCAUCGGAA CCUCCAGGGAU	1786	TGCATCATCGGAA CCTTCCAGGGAT	エクソン 56
547	UCCUGGAAGGUU CCGAUGAU	1167	AUCAUCGGAACCU UCCAGGGA	1787	ATCATCGGAACCT TCCAGGGA	エクソン 56
548	UCCUGGAAGGUU CCGAUGAUC	1168	GCAUCAUCGGAAC CUUCCAGGGA	1788	GCATCATCGGAAC CTTCCAGGGA	エクソン 56
549	UCCUGGAAGGUU CCGAUGAUGCA	1169	UGCAUCAUCGGAA CCUCCAGGGA	1789	TGCATCATCGGAA CCTTCCAGGGA	エクソン 56
550	CCCUGGAAGGUUC CGAUGAUC	1170	GCAUCAUCGGAAC CUUCCAGGG	1790	GCATCATCGGAAC CTTCCAGGG	エクソン 56
551	CCCUGGAAGGUUC CGAUGAUGCA	1171	UGCAUCAUCGGAA CCUCCAGGG	1791	TGCATCATCGGAA CCTTCCAGGG	エクソン 56
552	CUGGAAGGUUCCG AUGAUC	1172	GCAUCAUCGGAAC CUUCCAG	1792	GCATCATCGGAAC CTTCCAG	エクソン 56
553	CUGGAAGGUUCCG AUGAUGCA	1173	UGCAUCAUCGGAA CCUCCAG	1793	TGCATCATCGGAA CCTTCCAG	エクソン 56
554	UGGAAGGUUCCGA UGAUGCA	1174	UGCAUCAUCGGAA CCUCCA	1794	TGCATCATCGGAA CCTTCCA	エクソン 56
555	GGCUUACAGAAGC UGAAACAACUGC	1175	GCAGUUGUUUCAG CUUCUGUAAGCC	1795	GCAGTTGTTTCAG CTTCTGTAAGCC	エクソン 55
556	GGGAGUAAAAGAG CUGAUGAAA	1176	UUUCAUCAGCUCU UUUACUCCC	1796	TTTCATCAGCTCT TTTACTCCC	エクソン 55
557	GGGAGUAAAAGAG CUGAUGAAAC	1177	GUUUCAUCAGCUC UUUUACUCCC	1797	GTTTCATCAGCTC TTTTACTCCC	エクソン 55
558	AAAAGAGCUGAUG AAACA AUGCAA	1178	UUGCCAUUGUUUC AUCAGCUCUUUU	1798	TTGCCATTGTTTC ATCAGCTCTTTT	エクソン 55
559	AGGUUCCGAUGAU GCAGUCCU	1179	AGGACUGCAUCAU CGGAACCU	1799	AGGACTGCATCAT CGGAACCT	エクソン 56

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 4】

560	AGGUUCCGAUGAU GCAGUCCUG	1180	CAGGACUGCAUCA UCGGAACCU	1800	CAGGACTGCATCA TCGGAACCT	エクソン 56
561	GGUUCCGAUGAUG CAGUCCU	1181	AGGACUGCAUCAU CGGAACC	1801	AGGACTGCATCAT CGGAACC	エクソン 56
562	GGUUCCGAUGAUG CAGUCCUG	1182	CAGGACUGCAUCA UCGGAACC	1802	CAGGACTGCATCA TCGGAACC	エクソン 56
563	CAGAUGAUACCAG AAAAGUCC	1183	GGACUUUUCUGGU AUCAUCUG	1803	GGACTTTTCTGGT ATCATCTG	エクソン 54
564	CAGAUGAUACCAG AAAAGUCCA	1184	UGGACUUUUCUGG UAUCAUCUG	1804	TGGACTTTTCTGG TATCATCTG	エクソン 54
565	CAGAUGAUACCAG AAAAGUCCAC	1185	GUGGACUUUUCUG GUUCAUCUG	1805	GTGGACTTTTCTG GTATCATCTG	エクソン 54
566	CA AUGUCCUACAG AGUCUAC	1186	GUAGCAUCCUGUA GGACAUG	1806	GTAGCATCCTGTA GGACATTG	エクソン 55
567	AAGGGAGUAAAAG AGCUGAUGA	1187	UCAUCAGCUCUUU UACUCCCUU	1807	TCATCAGCTCTTT TACTCCCTT	エクソン 55
568	AAGGGAGUAAAAG AGCUGAUGAA	1188	UUCAUCAGCUCUU UUACUCCCUU	1808	TTCATCAGCTCTT TTACTCCCTT	エクソン 55
569	AAGGGAGUAAAAG AGCUGAUGAAA	1189	UUUCAUCAGCUCU UUUACUCCCUU	1809	TTTCATCAGCTCT TTTACTCCCTT	エクソン 55
570	AAGGGAGUAAAAG AGCUGAUGAAAC	1190	GUUUCAUCAGCUC UUUUACUCCCUU	1810	GTTTCATCAGCTC TTTTACTCCCTT	エクソン 55
571	AAAGAGCUGAUGA AACAAUGGCA	1191	UGCCAUGUUUCA UCAGCUCUUU	1811	TGCCATTGTTTCA TCAGCTCTTT	エクソン 55
572	AAAGAGCUGAUGA AACAAUGGCAA	1192	UUGCCAUGUUUUC AUCAGCUCUUU	1812	TTGCCATTGTTTC ATCAGCTCTTT	エクソン 55
573	AAAGAGCUGAUGA AACAAUGGCAAG	1193	CUUGCCAUGUUUU CAUCAGCUCUUU	1813	CTTGCCATTGTTT CATCAGCTCTTT	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
574	AUGAAACA AUGGC AAGUAAGUCA	1194	UGACUUACUUGCC AUUGUUUCAU	1814	TGACTTACTTGCC ATTGTTTCAT	エクソン 55/イン トロン 55 接合部
575	CCAGGGACAAAAC AAAAGUAGUUGC	1195	GCAACUAUUUUGU UUUGUCCUGG	1815	GCAACTATTTTGT TTTGTCCTGG	イントロン 55
576	GCAAUUCUCCAAA UUCACAUC	1196	GAAUGUGAAUUG GAGAAUUGC	1816	GAATGTGAATTTG GAGAATTGC	イントロン 55
577	CAAUUCUCCAAA UCACAUCA	1197	UGAAUGUGAAUUU GGAGAAUUG	1817	TGAATGTGAATTT GGAGAATTG	イントロン 55
578	AUUCUCCAAAUC ACAUAUC	1198	GAUGAAUGUGAAU UUGGAGAAU	1818	GATGAATGTGAAT TTGGAGAAU	イントロン 55
579	GGUGAAAUGAAG CUCACACAGAUG	1199	CAUCUGUGUGAGC UUCAAUUUACCC	1819	CATCTGTGTGAGC TTCAATTTACCC	エクソン 56
580	CUCACACAGAUGU UUAUCAACAACU	1200	AGGUUGUGAUAAA CAUCUGUGUGAG	1820	AGGTTGTGATAAA CATCTGTGTGAG	エクソン 56
581	ACAACCUGGAUGA AAACAGCC	1201	GGCUGUUUUAUC CAGGUUGU	1821	GGCTGTTTTCATC CAGGTTGT	エクソン 56
582	ACAACCUGGAUGA AAACAGCCA	1202	UGGCUGUUUUAU CCAGGUUGU	1822	TGGCTGTTTTCAT CCAGGTTGT	エクソン 56
583	ACAACCUGGAUGA AAACAGCCAA	1203	UUGGCUGUUUUA UCCAGGUUGU	1823	TTGGCTGTTTTCA TCCAGGTTGT	エクソン 56
584	CUGGAUGAAAACA GCCAAAAAUCC	1204	GGAUUUUUUGGCU GUUUUCAUCCAG	1824	GGATTTTTTGGCT GTTTTCATCCAG	エクソン 56
585	AGAUCCCUGGAAG GUUCCGAUGAUG	1205	CAUCAUCGGAACC UUCCAGGGAUCU	1825	CATCATCGGAACC TTCCAGGGATCT	エクソン 56
586	GAUCCCUGGAAGG UUCGAUGAUG	1206	CAUCAUCGGAACC UUCCAGGGAUC	1826	CATCATCGGAACC TTCCAGGGATC	エクソン 56
587	AUCCCUGGAAGGU UCCGAUGAUG	1207	CAUCAUCGGAACC UUCCAGGGAU	1827	CATCATCGGAACC TTCCAGGGAT	エクソン 56
588	UCCCUGGAAGGUU CCGAUGAUG	1208	CAUCAUCGGAACC UUCCAGGGA	1828	CATCATCGGAACC TTCCAGGGA	エクソン 56
589	UCCCUGGAAGGUU CCGAUGAUGCAG	1209	CUGCAUCAUCGGA ACCUCCAGGGA	1829	CTGCATCATCGGA ACCTTCCAGGGA	エクソン 56
590	CCUGGAAGGUUC CGAUGAUG	1210	CAUCAUCGGAACC UUCCAGGG	1830	CATCATCGGAACC TTCCAGGG	エクソン 56

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 5】

591	CCCUGGAAGGUUC CGAUGAUGCAG	1211	CUGCAUCAUCGGA ACCUUCCAGGG	1831	CTGCATCATCGGA ACCTTCCAGGG	エクソン 56
592	CUGGAAGGUUCCG AUGAUGCAG	1212	CUGCAUCAUCGGA ACCUUCCAG	1832	CTGCATCATCGGA ACCTTCCAG	エクソン 56
593	UGGAAGGUUCCGA UGAUGCAG	1213	CUGCAUCAUCGGA ACCUUCCA	1833	CTGCATCATCGGA ACCTTCCA	エクソン 56
594	GAUGAUGCAGUCC UGUUAACAAAGAC	1214	GUCUUUGUAAACAG GACUGCAUCAUC	1834	GTCTTTGTAAACAG GACTGCATCATC	エクソン 56
595	GCUUACAGAAGCU GAAACAACUGCC	1215	GGCAGUUGUUUCA GCUUCUGUAAGC	1835	GGCAGTTGTTTCA GCTTCTGTAAGC	エクソン 55
596	GGGAGUAAAAGAG CUGAUGAAACA	1216	UGUUUCAUCAGCU CUUUUACUCCC	1836	TGTTTCATCAGCT CTTTTACTCCC	エクソン 55
597	GAGUAAAAGAGCU GAGAAACAAUG	1217	CAUUGUUUCAUCA GCUCUUUUACUC	1837	CATTGTTTCATCA GCTCTTTTACTC	エクソン 55
598	UAAAAGAGCUGAU GAAACAAGGCC	1218	GCCAUUGUUUCAU CAGCUCUUUUA	1838	GCCATTGTTTCAT CAGCTCTTTTA	エクソン 55
599	GAUCCAAUUGAAC AAUUCUCAGC	1219	GCUGAGAAUUGUU CAAUUGGAUC	1839	GCTGAGAATTGTT CAATTGGATC	イントロン 55
600	AAGGUUCCGAUGA UGCAGUCCUG	1220	CAGGACUGCAUCA UCGGAACCUU	1840	CAGGACTGCATCA TCGGAACCTT	エクソン 56
601	CAAGGGAGUAAAA GAGCUGA	1221	UCAGCUCUUUAC UCCCUUG	1841	TCAGCTCTTTTAC TCCCTTG	エクソン 55
602	AGGGAGUAAAAGA GCUGAUGAAACA	1222	UGUUUCAUCAGCU CUUUUACUCCCU	1842	TGTTTCATCAGCT CTTTTACTCCCT	エクソン 55
603	GCCAGGGACAAAA CAAAAUAGUUGC	1223	GCAACUAUUUUGU UUUGUCCUGGC	1843	GCAACTATTTTGT TTTGTCCCTGGC	イントロン 55
604	UGCAAUUCUCCAA AUUCACAUUC	1224	GAAUGUGAAUUG GAGAAUUGCA	1844	GAATGTGAATTTG GAGAATTGCA	イントロン 55
605	GCAAUUCUCCAAA UUCACAUUCA	1225	UGAAUGUGAAUUU GGAGAAUUGC	1845	TGAATGTGAATTT GGAGAATTGC	イントロン 55
606	AAUUCUCCAAAUU CACAUUCAUC	1226	GAUGAAUGUGAAU UUGGAGAAUU	1846	GATGAATGTGAAT TTGGAGAATT	イントロン 55
607	AUUCUCCAAAUUC ACAUUCAUCG	1227	CGAUGAAUGUGAA UUUGGAGAAU	1847	CGATGAATGTGAA TTTGAGAAAT	イントロン 55
608	UUCUCCAAAUUCA CAUUCAUCG	1228	CGAUGAAUGUGAA UUUGGAGAA	1848	CGATGAATGTGAA TTTGAGAGAA	イントロン 55
609	UCUCCAAAUUCAC AUUCAUCG	1229	CGAUGAAUGUGAA UUUGGAGA	1849	CGATGAATGTGAA TTTGAGAA	イントロン 55
610	GGUAAUUCUGCAC AUUUCUUCUUC	1230	GAAGAAGAAUUG UGCAGAAUUAAC	1850	GAAGAAGAAATATG TGCAGAAATTACC	イントロン 55
611	GCUCACACAGAUG UUUAUCAACAAC	1231	GGUUGUGAUAAAC AUCUGUGUGAGC	1851	GGTTGTGATAAAC ATCTGTGTGAGC	エクソン 56
612	UCACAACCUGGAU GAAAAACAG	1232	CUGUUUUAUCCA GGUUGUGA	1852	CTGTTTTTCATCCA GGTTTGTA	エクソン 56
613	CACAACCUGGAUG AAAACAGCC	1233	GGCUGUUUUAUC CAGGUUGUG	1853	GGCTGTTTTTCATC CAGGTGTG	エクソン 56
614	CACAACCUGGAUG AAAACAGCCA	1234	UGGCUGUUUUAU CCAGGUUGUG	1854	TGGCTGTTTTTCAT CCAGGTGTG	エクソン 56
615	CACAACCUGGAUG AAAACAGCCAA	1235	UUGGCUGUUUUA UCCAGGUUGUG	1855	TTGGCTGTTTTTCA TCCAGGTGTG	エクソン 56
616	ACAACCUGGAUGA AAACAGCCAAA	1236	UUUGGCUGUUUUC AUCCAGGUUGU	1856	TTTGGCTGTTTTTC ATCCAGGTTGT	エクソン 56
617	CCUGGAUGAAAAAC AGCCAAAAAUC	1237	GAUUUUUUGGCUG UUUUAUCCAGG	1857	GATTTTTTGGCTG TTTTTCATCCAGG	エクソン 56
618	CCCUGGAAGGUUC CGAUGAUGCAGU	1238	ACUGCAUCAUCGG AACCUUCCAGGG	1858	ACTGCATCATCGG AACCTTCCAGGG	エクソン 56
619	UGGAAGGUUCCGA UGAUGCAGU	1239	ACUGCAUCAUCGG AACCUUCCA	1859	ACTGCATCATCGG AACCTTCCA	エクソン 56
620	UGGAAGGUUCCGA UGAUGCAGUCCU	1240	AGGACUGCAUCAU CGGAACCUUCCA	1860	AGGACTGCATCAT CGGAACCTTCCA	エクソン 56
621	GGAAGGUUCCGAU GAUGCAGUCCU	1241	AGGACUGCAUCAU CGGAACCUUCC	1861	AGGACTGCATCAT CGGAACCTTCC	エクソン 56

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 6】

622	GGAAGGUUCCGAU GAUGCAGUCCUG	1242	CAGGACUGCAUCA UCGGAACCUUCC	1862	CAGGACTGCATCA TCGGAACCTTCC	エクソン 56
623	GAAGGUUCCGAUG AUGCAGU	1243	ACUGCAUCAUCGG AACCUUC	1863	ACTGCATCATCGG AACCTTC	エクソン 56
624	GUUCCGAUGAUGC AGUCCUGUUACA	1244	UGUAACAGGACUG CAUCAUCGGAAC	1864	TGTAAACAGGACTG CATCATCGGAAC	エクソン 56
625	GGGAGUAAAAGAG CUGAUGAAACAA	1245	UUGUUUCAUCAGC UCUUUUACUCCC	1865	TTGTTTCATCAGC TCTTTTACTCCC	エクソン 55
626	GGAUCCAAUUGAA CAAUUCUCAGC	1246	GCUGAGAAUUGUU CAAUUGGAUCC	1866	GCTGAGAATTGTT CAATTGGATCC	イントロン 55
627	GAAGGUUCCGAUG AUGCAGUCCUG	1247	CAGGACUGCAUCA UCGGAACCUUCC	1867	CAGGACTGCATCA TCGGAACCTTC	エクソン 56
628	AGGUUCCGAUGAU GCAGUCCUGUU	1248	AACAGGACUGCAU CAUCGGAACCU	1868	AACAGGACTGCAT CATCGGAACCT	エクソン 56
629	GGUCCGAUGAUG CAGUCCUGUU	1249	AACAGGACUGCAU CAUCGGAACC	1869	AACAGGACTGCAT CATCGGAACC	エクソン 56
630	CAAGGGAGUAAAA GAGCUGAU	1250	AUCAGCUCUUUUA CUCCCUUG	1870	ATCAGCTCTTTTA CTCCCTTG	エクソン 55
631	AGCACUCUUGUGG AUCCA AUUGAAC	1251	GUUCAAUUGGAUC CACAAGAGUGCU	1871	GTTCAATTGGATC CACAAGAGTGCT	イントロン 55
632	GCCAGGGACAAAA CAAAAUAG	1252	CUAUUUUGUUUUG UCCCUGGC	1872	CTATTTTGTTTTG TCCCTGGC	イントロン 55
633	UUGCAAUUCUCCA AAUUCACAUUC	1253	GAAUGUGAAUUUG GAGAAUUGCAA	1873	GAATGTGAATTTG GAGAATTGCAA	イントロン 55
634	UGCAAUUCUCCAA AUACACAUUCA	1254	UGAAUGUGAAUUU GGAGAAUUGCA	1874	TGAATGTGAATTT GGAGAATTGCA	イントロン 55
635	GCAAUUCUCCAAA UUCACAUUCAU	1255	AUGAAUGUGAAUU UGGAGAAUUGC	1875	ATGAATGTGAATT TGGAGAATTGC	イントロン 55
636	CAAUUCUCCAAAU UCACAUUCAUC	1256	GGAUGAAUGUGAAU UUGGAGAAUUG	1876	GATGAATGTGAAT TTGGAGAATTG	イントロン 55
637	AAUUCUCCAAAUU CACAUUCAUCG	1257	CGAUGAAUGUGAA UUUGGAGAAUU	1877	CGATGAATGTGAA TTTGGAGAATT	イントロン 55
638	AUUCUCCAAAUUC ACAUUCAUCGC	1258	GCGAUGAAUGUGA AUUUGGAGAAU	1878	GCGATGAATGTGA ATTTGGAGAAT	イントロン 55
639	UUCUCCAAAUUCA CAUUCAUCGC	1259	GCGAUGAAUGUGA AUUUGGAGAA	1879	GCGATGAATGTGA ATTTGGAGAA	イントロン 55
640	UCUCCAAAUUCAC AUUCAUCGC	1260	GCGAUGAAUGUGA AUUUGGAGAA	1880	GCGATGAATGTGA ATTTGGAGAA	イントロン 55
641	GUGAAAUUGAAGC UCACACAGAUGU	1261	ACAUCUGUGUGAG CUUCAAUUUCAC	1881	ACATCTGTGTGAG CTTCAATTCAC	エクソン 56
642	UAUCACAACCUUG AUGAAAACAG	1262	CUGUUUUAUCA GGUUGUGAUA	1882	CTGTTTTCATCCA GGTTGTGATA	エクソン 56
643	AUCACAACCUUGA UGAAAACAG	1263	CUGUUUUAUCA GGUUGUGAU	1883	CTGTTTTCATCCA GGTTGTGAT	エクソン 56
644	CCUGGAAGGUUCC GAUGAUGCAGUC	1264	GACUGCAUCAUCG GAACCUUCCAGG	1884	GACTGCATCATCG GAACCTTCCAGG	エクソン 56
645	CUGGAAGGUUCCG AUGAUGCAGUC	1265	GACUGCAUCAUCG GAACCUUCCAG	1885	GACTGCATCATCG GAACCTTCCAG	エクソン 56
646	UGGAAGGUUCCGA UGAUGCAGUC	1266	GACUGCAUCAUCG GAACCUUCCA	1886	GACTGCATCATCG GAACCTTCCA	エクソン 56
647	GGAAGGUUCCGAU GAUGCAGUC	1267	GACUGCAUCAUCG GAACCUUCC	1887	GACTGCATCATCG GAACCTTCC	エクソン 56
648	GGAGUAAAAGAGC UGAUGAAACAAU	1268	AUUGUUUCAUCAG CUCUUUUACUCC	1888	ATTGTTTTCATCAG CTCTTTTACTCC	エクソン 55
649	UGUGGAUCCAAUU GAACAAUUC	1269	GAAUUGUCAAUU GGAUCCACA	1889	GAATTGTTCAATT GGATCCACA	イントロン 55
650	AAGGUUCCGAUGA UGCAGUCCUGUU	1270	AACAGGACUGCAU CAUCGGAACCUU	1890	AACAGGACTGCAT CATCGGAACCTT	エクソン 56
651	AUAAUGGGGUGGU GAAACUG	1271	CAGUUUACACCACC CCAUAU	1891	CAGTTTACCACC CCATTAT	イントロン 54
652	GCACUCUUGUGGA UCCAAUUGAACA	1272	UGUCAAUUGGAU CCACAAGAGUGC	1892	TGTTCAATTGGAT CCACAAGAGTGC	イントロン 55

10

20

30

40

【表 8 - 1 7】

653	GGAUCCAAUUGAA CAAUUCUCAG	1273	CUGAGAAUUGUUC AAUUGGAUCC	1893	CTGAGAATTGTTC AATTGGATCC	イントロン 55
654	GCCAGGGACAAAA CAAAUAGU	1274	ACUAAUUUGUUUU GUCCUGGC	1894	ACTATTTTGTITT GTCCCTGGC	イントロン 55
655	UUUGCAAUUCUCC AAAUUCACAUUC	1275	GAAUGUGAAUUUG GAGAAUUGCAAA	1895	GAATGTGAATTG GAGAATTGCAAA	イントロン 55
656	UUGCAAUUCUCCA AAUUCACAUUCA	1276	UGAAUGUGAAUUU GGAGAAUUGCAA	1896	TGAATGTGAATT GGAGAATTGCAA	イントロン 55
657	UGCAAUUCUCCAA AAUCACAUUCAU	1277	AUGAAUGUGAAUU UGGAGAAUUGCA	1897	ATGAATGTGAATT TGGAGAATTGCA	イントロン 55
658	GCAAUUCUCCAAA UUCACAUUCAUC	1278	GAUGAAUGUGAAU UUGGAGAAUUGC	1898	GATGAATGTGAAT TTGGAGAATTGC	イントロン 55
659	CAAUUCUCCAAAU ACAAUUCAUUCG	1279	CGAUGAAUGUGAA UUUGGAGAAUUG	1899	CGATGAATGTGAA TTTGGAGAATTG	イントロン 55
660	AAUUCUCCAAAUU CACAUUCAUCGC	1280	GCGAUGAAUGUGA AUUUGGAGAAUU	1900	GCGATGAATGTGA ATTTGGAGAATT	イントロン 55
661	AUUCUCCAAAUUC ACAUUCAUCGCU	1281	AGCGAUGAAUGUG AAUUUGGAGAAU	1901	AGCGATGAATGTG AATTGGAGAAT	イントロン 55
662	UCUCCAAAUUCAC AUUCAUCGCU	1282	AGCGAUGAAUGUG AAUUUGGAGA	1902	AGCGATGAATGTG AATTGGAGA	イントロン 55
663	UCCAAAUUCACAU UCAUCGC	1283	GCGAUGAAUGUGA AUUUGGA	1903	GCGATGAATGTGA ATTTGGA	イントロン 55
664	UUAUCACAACCUG GAUGAAAACAG	1284	CUGUUUUAUCCA GGUUGUGAUAA	1904	CTGTTTTTCATCCA GGTTGTGATAA	エクソン 56
665	UAUCACAACCUGG AUGAAAACAGC	1285	GCUGUUUUAUCC AGGUUGUGAUAA	1905	GCTGTTTTTCATCC AGGTTGTGATA	エクソン 56
666	UGUGGAUCCAAUU GAACAAUUCU	1286	AGAAUUGUCAAU UGGAUCCACA	1906	AGAATTGTTCAAT TGGATCCACA	イントロン 55
667	GUGGAUCCAAUUG AACAAUUC	1287	GAAUUGUCAAUU GGAUCCAC	1907	GAATTGTTCAATT GGATCCAC	イントロン 55
668	UCCAAUUGAACAA UUCUCAGCAU	1288	AUGCUGAGAAUUG UUCAAUUGGA	1908	ATGCTGAGAATTG TTCAATTGGA	イントロン 55
669	CCAGGGACAAAAC AAAAUAGU	1289	ACUAAUUUGUUUU GUCCUGG	1909	ACTATTTTGTITT GTCCCTGG	イントロン 55
670	AAUAAUGGGUGG UGAAACUG	1290	CAGUUUACCACC CCAUAUU	1910	CAGTTTACCACC CCATTATT	イントロン 54
671	UGGAUCCAAUUGA ACAAUUCUCAG	1291	CUGAGAAUUGUUC AAUUGGAUCCA	1911	CTGAGAATTGTTC AATTGGATCCA	イントロン 55
672	AGCCAGGGACAAA ACAAAUAGU	1292	ACUAAUUUGUUUU GUCCUGGCU	1912	ACTATTTTGTITT GTCCCTGGCT	イントロン 55
673	GCCAGGGACAAA CAAAUAGUU	1293	AACUAAUUUGUUU UGUCCUGGC	1913	AACTATTTTGTIT TGTCCTGGC	イントロン 55
674	UUCUCCAAAUUCA CAUUCAUCGCU	1294	AGCGAUGAAUGUG AAUUUGGAGAA	1914	AGCGATGAATGTG AATTGGAGAA	イントロン 55
675	UCUCCAAAUUCAC AUUCAUCGCUU	1295	AAGCGAUGAAUGU GAAUUUGGAGA	1915	AAGCGATGAATGT GAATTGGAGA	イントロン 55
676	CUCCAAAUUCACA UUCAUCGC	1296	GCGAUGAAUGUGA AUUUGGAG	1916	GCGATGAATGTGA ATTTGGAG	イントロン 55
677	UCCAAAUUCACAU UCAUCGCU	1297	AGCGAUGAAUGUG AAUUUGGA	1917	AGCGATGAATGTG AATTGGGA	イントロン 55
678	GUAAUUCUGCACA UAUUCUUCUCC	1298	GGAAGAAGAAUAU GUGCAGAAUAC	1918	GGAAGAAGAATAT GTGCAGAATTAC	イントロン 55
679	UUUAUCACAACCU GGAUGAAAACAG	1299	CUGUUUUAUCCA GGUUGUGAUAAA	1919	CTGTTTTTCATCCA GGTTGTGATAAA	エクソン 56
680	GUGGAUCCAAUUG AACAAUUCU	1300	AGAAUUGUCAAU UGGAUCCAC	1920	AGAATTGTTCAAT TGGATCCAC	イントロン 55
681	UCCAAUUGAACAA UUCUCAGCAUU	1301	AAUGCUGAGAAUU GUUCAAUUGGA	1921	AATGCTGAGAATT GTTC AATTGGA	イントロン 55
682	CCAGGGACAAAAC AAAAUAGUU	1302	AACUAAUUUGUUU UGUCCUGG	1922	AACTATTTTGTIT TGTCCTGG	イントロン 55
683	UCCAAAUUCACAU UCAUCGCUU	1303	AAGCGAUGAAUGU GAAUUUGGA	1923	AAGCGATGAATGT GAATTGGA	イントロン 55

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 8】

684	CCAAAUUCACAUU CAUCGCUUG	1304	CAAGCGAUGAAUG UGAAUUUGG	1924	CAAGCGATGAATG TGAATTGG	イントロン 55
685	UGGUAAUUCUGCA CAUAUUCUUC	1305	GAAGAAUUGUGC AGAAUUACCA	1925	GAAGAATATGTGC AGAATTACCA	イントロン 55
686	GUGGAUCCAAUUG AACAAUUCUCAG	1306	CUGAGAAUUGUUC AAUUGGAUCCAC	1926	CTGAGAATTGTTC AATTGGATCCAC	イントロン 55
687	UGGAUCCAAUUGA ACAAUUCUCAGC	1307	GCUGAGAAUUGUU CAAUUGGAUCCA	1927	GCTGAGAATTGTT CAATTGGATCCA	イントロン 55
688	GGAUCCAAUUGAA CAAUUCUC	1308	GAGAAUUGUUCAA UUGGAUCC	1928	GAGAATTGTTCAA TTGGATCC	イントロン 55
689	CAAGCCAGGGACA AAAAAAUAG	1309	CUAUUUUGUUUUG UCCUGGCUUG	1929	CTATTTTGTTTTG TCCCTGGCTTG	イントロン 55
690	AAGCCAGGGACAA AAACAAUAGU	1310	ACUAUUUUGUUUU GUCCUGGCUU	1930	ACTATTTTGTTTT GTCCCTGGCTT	イントロン 55
691	AGCCAGGGACAAA ACAAAUAGUU	1311	AACUAUUUUGUUU UGUCCUGGCU	1931	AACTATTTTGTTT TGTCCTGGCT	イントロン 55
692	GCCAGGGACAAAA CAAAUAGUUG	1312	CAACUAUUUUGUU UUGUCCUGGC	1932	CAACTATTTTGT TTGTCCCTGGC	イントロン 55
693	UUCUCCAAAUUCA CAUUCUUCGCU	1313	AAGCGAUGAAUGU GAAUUUGGAGAA	1933	AAGCGATGAATGT GAATTTGGAGAA	イントロン 55
694	UCUCCAAAUUCAC AUCAUUCGCUUG	1314	CAAGCGAUGAAUG UGAAUUUGGAGA	1934	CAAGCGATGAATG TGAATTTGGAGA	イントロン 55
695	CUCCAAAUUCACA UUCUUCGCU	1315	AGCGAUGAAUGUG AAUUUGGAG	1935	AGCGATGAATGTG AATTTGGAG	イントロン 55
696	GUUCCGAUGAUGC AGUCCUG	1316	CAGGACUGCAUCA UCGGAAC	1936	CAGGACTGCATCA TCGGAAC	エクソン 56
697	UUCCGAUGAUGCA GUCCUGU	1317	ACAGGACUGCAUC AUCGGAA	1937	ACAGGACTGCATC ATCGGAA	エクソン 56
698	UCCGAUGAUGCAG UCCUGUU	1318	AACAGGACUGCAU CAUCGGA	1938	AACAGGACTGCAT CATCGGA	エクソン 56
699	UCCGAUGAUGCAG UCCUGUUAACA	1319	UUGUAACAGGACU GCAUCAUCGGA	1939	TTGTAACAGGACT GCATCATCGGA	エクソン 56
700	UCCGAUGAUGCAG UCCUGUUAACAA	1320	UUUGUAACAGGAC UGCAUCAUCGGA	1940	TTTGTAACAGGAC TGCATCATCGGA	エクソン 56
701	UCCAAUUGAACAA UUCUCAGCAUUU	1321	AAUUGCUGAGAAU UGUUCAAUUGGA	1941	AAATGCTGAGAAT TGTTCAATTGGA	イントロン 55
702	CCAGGGACAAAAC AAAAUAGUUG	1322	CAACUAUUUUGUU UUGUCCUGG	1942	CAACTATTTTGT TTGTCCCTGG	イントロン 55
703	CUCCAAAUUCACA UUCUUCGCUU	1323	AAGCGAUGAAUGU GAAUUUGGAG	1943	AAGCGATGAATGT GAATTTGGAG	イントロン 55
704	UCCAAAUUCACAU UCAUCGCUUG	1324	CAAGCGAUGAAUG UGAAUUUGGA	1944	CAAGCGATGAATG TGAATTTGGA	イントロン 55
705	UUGGUAAUUCUGC ACAUAUUCUUC	1325	GAAGAAUUGUGC AGAAUUACCAA	1945	GAAGAATATGTGC AGAATTACCAA	イントロン 55
706	UGGUAAUUCUGCA CAUAUUCUUCU	1326	AGAAGAAUUGUG CAGAAUUACCA	1946	AGAAGAATATGTG CAGAATTACCA	イントロン 55
707	UAAUUAUUGGGUG GUGAAAC	1327	GUUUCACCACCCC AUUAUUA	1947	GTTTCACCACCCC ATTATTA	イントロン 54
708	UGGAUCCAAUUGA ACAAUUCUC	1328	GAGAAUUGUUCAA UUGGAUCCA	1948	GAGAATTGTTCAA TTGGATCCA	イントロン 55
709	CAAGCCAGGGACA AAACAAAUAGU	1329	ACUAUUUUGUUUU GUCCUGGCUUG	1949	ACTATTTTGTTTT GTCCCTGGCTTG	イントロン 55
710	AGCCAGGGACAAA ACAAAUAGUUG	1330	CAACUAUUUUGUU UUGUCCUGGCU	1950	CAACTATTTTGT TTGTCCCTGGCT	イントロン 55
711	UUCCGAUGAUGCA GUCCUGUU	1331	AACAGGACUGCAU CAUCGGAA	1951	AACAGGACTGCAT CATCGGAA	エクソン 56
712	UUUGGUAAUUCUG CACAUUUCUUC	1332	GAAGAAUUGUGC AGAAUUACCAA	1952	GAAGAATATGTGC AGAATTACCAA	イントロン 55
713	UUGGUAAUUCUGC ACAUAUUCUUCU	1333	AGAAGAAUUGUG CAGAAUUACCAA	1953	AGAAGAATATGTG CAGAATTACCAA	イントロン 55
714	UGGUAAUUCUGCA CAUAUUCUUCU	1334	AAGAAGAAUUGU GCAGAAUACCA	1954	AAGAAGAATATGT GCAGAATTACCA	イントロン 55

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 9】

715	UGGAUCCAAUUGA ACAAUUCUCA	1335	UGAGAAUUGUUCA AUUGGAUCCA	1955	TGAGAATTGTTCA ATTGGATCCA	イントロン 55
716	GUUCCGAUGAUGC AGUCCUGUU	1336	AACAGGACUGCAU CAUCGGAAC	1956	AACAGGACTGCAT CATCGGAAC	エクソン 56
717	UUCCGAUGAUGCA GUCCUGUUA	1337	UAACAGGACUGCA UCAUCGGAA	1957	TAACAGGACTGCA TCATCGGAA	エクソン 56
718	GGUAAUUCUGCAC AUAUUCUUC	1338	GAAGAAUUAUGUG AGAAUUACC	1958	GAAGAATATGTGC AGAATTACC	イントロン 55
719	UCCGAUGAUGCAG UCCUGUUACA	1339	UGUAAACAGGACUG CAUCAUCGGA	1959	TGTAACAGGACTG CATCATCGGA	エクソン 56
720	GGUAAUUCUGCAC AUAUUCUUCU	1340	AGAAGAAUUAUGUG CAGAAUUACC	1960	AGAAGAATATGTG CAGAATTACC	イントロン 55
721	UUCCGAUGAUGCA GUCCUGUACA	1341	UGUAAACAGGACUG CAUCAUCGGA	1961	TGTAACAGGACTG CATCATCGGAA	エクソン 56
722	GUAAUUCUGCACA UAUUCUUCUUC	1342	GAAGAAGAAUAUG UGCAGAAUAC	1962	GAAGAAGAATATG TGCAGAATTAC	イントロン 55
723	AUUGAACAAUUCU GACCAUUGUAC	1343	GUACAAUUGCUGA GAAUUGUCAAU	1963	GTACAAATGCTGA GAATGTGTTCAAT	イントロン 55
724	AUCACAACCUGGA UGAAAACAGC	1344	GCUGUUUUAUCC AGGUUGUGAU	1964	GCTGTTTTTCATCC AGGTGTGTAT	エクソン 56
725	UCACAACCUGGAU GAAAACAGC	1345	GCUGUUUUAUCC AGGUUGUGA	1965	GCTGTTTTTCATCC AGGTGTGTA	エクソン 56
726	CACAACCUGGAUG AAAACAGC	1346	GCUGUUUUAUCC AGGUUGUG	1966	GCTGTTTTTCATCC AGGTGTG	エクソン 56
727	GAAGGUUCCGAUG AUGCAGUC	1347	GACUGCAUCAUCG GAACCUUC	1967	GACTGCATCATCG GAACCTTC	エクソン 56
728	GAAGGUUCCGAUG AUGCAGUCCU	1348	AGGACUGCAUCAU CGGAACCUUC	1968	AGGACTGCATCAT CGGAACCTTC	エクソン 56
729	AAGGUUCCGAUGA UGCAGUC	1349	GACUGCAUCAUCG GAACCUU	1969	GACTGCATCATCG GAACCTT	エクソン 56
730	AAGGUUCCGAUGA UGCAGUCCU	1350	AGGACUGCAUCAU CGGAACCUU	1970	AGGACTGCATCAT CGGAACCTT	エクソン 56
731	GGAGCUUGGGAGG GUUCAAGACG	1351	CGUCUUGAACCCU CCCAAGCUCC	1971	CGTCTTGAACCCCT CCCAAGCTCC	イントロン 54
732	CCUGAGAUCCTUG GAAGGUUCC	1352	GGAACCUUCCAGG GAUCUCAGG	1972	GGAACCTTCCAGG GATCTCAGG	エクソン 56
733	UGGCUGUAAUAAU GGGUGGU	1353	ACCACCCCAUUAU UACAGCCA	1973	ACCACCCCAATTAT TACAGCCA	イントロン 54
734	GGCUGUAAUAAUG GGGUGGU	1354	ACCACCCCAUUAU UACAGCC	1974	ACCACCCCAATTAT TACAGCC	イントロン 54
735	GGCUGUAAUAAUG GGGUGGU	1355	CACCACCCCAUUA UUACAGCC	1975	CACCACCCCAATTA TTACAGCC	イントロン 54
736	UUGGCUGUAAUAA UGGGUGGU	1356	ACCACCCCAUUAU UACAGCCAA	1976	ACCACCCCAATTAT TACAGCCAA	イントロン 54
737	UUGGCUGUAAUAA UGGGUGGU	1357	CACCACCCCAUUA UUACAGCCAA	1977	CACCACCCCAATTA TTACAGCCAA	イントロン 54
738	AUGGCAAGUAAGU CAGGCAU	1358	AUGCCUGACUUAC UUGCCAU	1978	ATGCCTGACTTAC TTGCCAT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
739	UGGCUGUAAUAAU GGGUGGUGAA	1359	UUCACCACCCCAU UAUUAACAGCCA	1979	TTCACCACCCCAT TATTACAGCCA	イントロン 54
740	GGCUGUAAUAAUG GGGUGGUGAA	1360	UUCACCACCCCAU UAUUAACAGCC	1980	TTCACCACCCCAT TATTACAGCC	イントロン 54
741	GCUGUAAUAAUGG GGUGGUG	1361	CACCACCCCAUUA UUACAGC	1981	CACCACCCCAATTA TTACAGC	イントロン 54
742	GGAGCUUGGGAGG GUUCAAGAC	1362	GUCUUGAACCCUC CCAAGCUCC	1982	GTCTTGAACCCCTC CCAAGCTCC	イントロン 54
743	AUGGAGUUCACUA GGUGCAC	1363	GUGCACCUAGUGA ACUCCAU	1983	GTGCACCTAGTGA ACTCCAT	イントロン 54
744	AAUGGCAAGUAAG UCAGGCAU	1364	AUGCCUGACUUAC UUGCCAU	1984	ATGCCTGACTTAC TTGCCATT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
745	AUGGCAAGUAAGU CAGGCAU	1365	AAUGCCUGACUUA CUUGCCAU	1985	AATGCCTGACTTA CTTGCCAT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部

10

20

30

40

50

【表 8 - 20】

746	UUGGCUGUAAUAA UGGGUGUGUGAA	1366	UUCACCACCCCAU UAUUACAGCCAA	1986	TTCACCACCCCAT TATTACAGCCAA	イントロン 54
747	UAAUGGGUGUGUG AAACUGG	1367	CCAGUUUACCCAC CCCAUUA	1987	CCAGTTTACCCAC CCCATT	イントロン 54
748	UGGCAAGUAAGUC AGGCAUUUCCG	1368	CGGAAAUGCCUGA CUUACUUGCCA	1988	CGGAAATGCCTGA CTTACTTGCCA	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
749	GCUGUAAUAUUGG GGUGUGUGAA	1369	UUCACCACCCCAU UAUUACAGC	1989	TTCACCACCCCAT TATTACAGC	イントロン 54
750	AAUGGCAAGUAAG UCAGGCAUU	1370	AAUGCCUGACUUA CUUGCCAUU	1990	AATGCCTGACTTA CTTGCCATT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
751	AUGGCAAGUAAGU CAGGCAUUU	1371	AAAUGCCUGACUU ACUUGCCA	1991	AAATGCCTGACTT ACTTGCCAT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
752	GCAAGUAAGUCAG GCAUUUCCGCU	1372	AGCGGAAAUGCCU GACUUACUUGC	1992	AGCGGAAATGCCT GACTTACTTGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
753	AUAAUGGGUGUGU GAAACUGG	1373	CCAGUUUACCCAC CCCAUUAU	1993	CCAGTTTACCCAC CCCATTAT	イントロン 54
754	AAUGGCAAGUAAG UCAGGCA	1374	UGCCUGACUUACU UGCCA	1994	TGCCTGACTTACT TGCCATT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
755	AUGGCAAGUAAGU CAGGCAUUUCCG	1375	CGGAAAUGCCUGA CUUACUUGCCA	1995	CGGAAATGCCTGA CTTACTTGCCAT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
756	CUGAUGCAGUC GCAUUUCAAAGA	1376	UCUUUGUAACAGG ACUGCAUCAUGC	1996	TCTTTGTAACAGG ACTGCATCATCG	エクソン 56
757	AAUGGCAAGUAAG UCAGGCAUUU	1377	AAAUGCCUGACUU ACUUGCCA	1997	AAATGCCTGACTT ACTTGCCATT	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
758	GCAAGUAAGUCAG GCAUUUCCG	1378	GGAAAUGCCUGAC UACUUGC	1998	GGAAATGCCTGAC TTACTTGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
759	GCAAGUAAGUCAG GCAUUUCCGCU	1379	AAGCGGAAAUGCC UGACUUACUUGC	1999	AAGCGGAAATGCC TGACTTACTTGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
760	CAAGUAAGUCAGG GCAUUUCCGCU	1380	AGCGGAAAUGCCU GACUUACUUGC	2000	AGCGGAAATGCCT GACTTACTTGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
761	AAUAAUGGGUGUG UGAAACUGG	1381	CCAGUUUACCCAC CCCAUUAUU	2001	CCAGTTTACCCAC CCCATTATT	イントロン 54
762	GGCAAGUAAGUCA GGCAUUUC	1382	GAAAUGCCUGACU UACUUGCC	2002	GAAATGCCTGACT TACTTGCC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
763	CCGAUGAUGCAGU CCUGUACAAAG	1383	CUUUGUAACAGGA CUGCAUCAUCGG	2003	CTTTGTAACAGGA CTGCATCATCGG	エクソン 56
764	GCAAGUAAGUCAG GCAUUUCCG	1384	CGGAAAUGCCUGA CUUACUUGC	2004	CGGAAATGCCTGA CTTACTTGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
765	CAAGUAAGUCAGG CAUUUCCG	1385	GCGGAAAUGCCUG ACUUACUUG	2005	GCGGAAATGCCTG ACTTACTTGC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
766	GUUUGGUAAUUCU GCACAUUUUC	1386	GAAUAUGUGCAGA AUUACCAAAC	2006	GAATATGTGCAGA ATTACCAAAC	イントロン 55
767	UAAUAAUGGGUG GUGAAACUGG	1387	CCAGUUUACCCAC CCCAUUAUU	2007	CCAGTTTACCCAC CCCATTATTA	イントロン 54
768	UGGCAAGUAAGUC AGGCAUUUC	1388	GAAAUGCCUGACU UACUUGCCA	2008	GAAATGCCTGACT TACTTGCCA	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
769	GGCAAGUAAGUCA GGCAUUUCC	1389	GGAAAUGCCUGAC UUACUUGCC	2009	GGAAATGCCTGAC TTACTTGCC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部
770	CCGAUGAUGCAGU CCUGUUA	1390	UAACAGGACUGCA UCAUCGG	2010	TAACAGGACTGCA TCATCGG	エクソン 56
771	CGAUGAUGCAGUC CUGUUAC	1391	GUAACAGGACUGC AUCAUCG	2011	GTAACAGGACTGC ATCATCG	エクソン 56
772	CCAAAUUCACAUU CAUCGCUUGU	1392	ACAAGCGAUGAAU GUGAAUUUGG	2012	ACAAGCGATGAAT GTGAATTGG	イントロン 55
773	GUUUGGUAAUUCU GCACAUUUUCU	1393	AGAAUAUGUGCAG AAUUAACAAAC	2013	AGAATATGTGCAG AATTACCAAAC	イントロン 55
774	GUAUAAUGGGGU GGUGAAA	1394	UUUCACCACCCCA UUAUUAC	2014	TTTACCACCCCA TTATTAC	イントロン 54
775	GUAUAAUGGGGU GGUGAAACUG	1395	CAGUUUACCCACC CCAUAUUUAC	2015	CAGTTTACCCACC CCATTATTAC	イントロン 54
776	GGCAAGUAAGUCA GGCAUUUCCG	1396	CGGAAAUGCCUGA CUUACUUGCC	2016	CGGAAATGCCTGA CTTACTTGCC	エクソン 55/イン ترون 55 接合部

10

20

30

40

50

【表 8 - 2 1】

777	CCGAUGAUGCAGU CCUGUUACA	1397	UGUACAGGACUG CAUCAUCGG	2017	TGTAACAGGACTG CATCATCGG	エクソン 56
778	GUAUAAUGGGGU GGUGAAACU	1398	AGUUUCACCACCC CAUUAUAC	2018	AGTTTCACCACCC CATTATTAC	イントロン 54
779	CUCCAAAUUCACA UUCAUCGCUUGU	1399	ACAAGCGAUGAAU GUGAAUUUGGAG	2019	ACAAGCGATGAAT GTGAATTGGAG	イントロン 55

† 表 8 に示されるオリゴヌクレオチドおよびまたは標的配列のいずれか 1 つの各チミン塩基 (T) は、独立しておよび任意にウラシル塩基 (U) で置き換えられていてもよく、かつまたは各 U は独立しておよび任意に T で置き換えられていてもよい。表 8 に列挙された標的配列は U を含むが、RNA およびまたは DNA への DMD 標的化オリゴヌクレオチドの結合が企図される。

10

【0201】

いくつかの態様において、DMD を標的化するために (例として、エクソンスキッピングのために) 有用なオリゴヌクレオチドは、DMD 配列の領域を標的化する。いくつかの態様において、DMD を標的化するために (例として、エクソンスキッピングのために) 有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNA (例として、配列番号 130 の Dp427m 転写物) の領域を標的化する。いくつかの態様において、DMD を標的化するために (例として、エクソンスキッピングのために) 有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNA (例として、配列番号 130 の Dp427m 転写物) に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMD を標的化するために (例として、エクソンスキッピングのために) 有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNA (例として、配列番号 2142、2152 または 2165) のエクソンに対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMD を標的化するために (例として、エクソンスキッピングのために) 有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNA (例として、配列番号 2145 または 2157) のイントロンに対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMD を標的化するために (例として、エクソンスキッピングのために) 有用なオリゴヌクレオチドは、DMD 配列 (例として、配列番号 2143、2144、2146 ~ 2151、2153 ~ 2156、2158 ~ 2164 および 2166 ~ 2169 のいずれか 1 つによって提供される配列) の一部に対する相補性領域を含む。DMD 配列の例を以下に示す。以下に示される DMD 配列のそれぞれは、チミンヌクレオチド (T) を含むが、当然のことながら、各配列は、T のいずれかまたはすべてがウラシルヌクレオチド (U) で置換される DNA 配列または RNA 配列を表すことができる。

20

30

【0202】

Homo sapiens ジストロフィン (DMD)、転写変異体 Dp427m、mRNA (NCBI 参照配列: NM_004006.2)

TCCTGGCATCAGTTACTGTGTTGACTCACTCAGTGTTGGGATCACTCACTTTCCCCC
TACAGGACTCAGATCTGGGAGGCAATTACCTTCGGAGAAAAACGAATAGGAAAAAC
TGAAGTGTTACTTTTTTTTAAAGCTGCTGAAGTTTGTTGGTTTCTCATTGTTTTTAAG
CCTACTGGAGCAATAAAGTTTGAAGAACTTTTACCAGGTTTTTTTTATCGCTGCCTT
GATATACACTTTTCAAATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATGAAAGA
GAAGATGTTCAAAGAAAAACATTCACAAAATGGGTAAATGCACAATTTTCTAAGTT
TGGGAAGCAGCATATTGAGAACCTCTTCAGTGACCTACAGGATGGGAGGCGCCTCC
TAGACCTCCTCGAAGGCCTGACAGGGCAAAAACCTGCCAAAAGAAAAAGGATCCACA
AGAGTTCATGCCCTGAACAATGTCAACAAGGCACTGCGGGTTTTTGCAGAACAATAA
TGTTGATTTAGTGAATATTGGAAGTACTGACATCGTAGATGGAAATCATAAACTGA
CTCTTGTTTTGATTTGGAATATAATCCTCCACTGGCAGGTCAAAAATGTAATGAAA
AATATCATGGCTGGATTGCAACAAACCAACAGTGAAAAGATTCTCCTGAGCTGGGT
CCGACAATCAACTCGTAATTATCCACAGGTTAATGTAATCAACTTCACCACCAGCT
GGTCTGATGGCCTGGCTTTGAATGCTCTCATCCATAGTCATAGGCCAGACCTATTT
GACTGGAATAGTGTGGTTTGCCAGCAGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATT
CAACATCGCCAGATATCAATTAGGCATAGAGAACTACTCGATCCTGAAGATGTTG

40

50

ATACCACCTATCCAGATAAGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCACTCTTCCAA
GTTTTGCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCCATCCAGGAAGTGGAATGTTGCCAAG
GCCACCTAAAGTGAATAAAGAAGAACATTTTCAGTTACATCATCAAATGCACTATT
CTCAACAGATCACGGTCAGTCTAGCACAGGGATATGAGAGAACTTCTTCCCCTAAG
CCTCGATTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCTTATGTCACCACTCTGACCC
TACACGGAGCCCATTTCCTTCACAGCATTGGAAGCTCCTGAAGACAAGTCATTTG
GCAGTTCATTGATGGAGAGTGAAAGTAAACCTGGACCGTTATCAAACAGCTTTAGAA
GAAGTATTATCGTGGCTTCTTTCTGCTGAGGACACATTGCAAGCACAAGGAGAGAT
TTCTAATGATGTGGAAGTGGTGAAAGACCAGTTTCATACTCATGAGGGGTACATGA
TGGATTTGACAGCCCATCAGGGGCCGGGTGGTAATATTCTACAATTGGGAAGTAAG
CTGATTGGAACAGGAAAATTATCAGAAGATGAAGAACTGAAGTACAAGAGCAGAT
GAATCTCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAGGGTAGCTAGCATGGAAAAACAAA
GCAATTTACATAGAGTTTTAATGGATCTCCAGAATCAGAACTGAAAGAGTTGAAT
GACTGGCTAACAAAAACAGAAGAAAGAACAAGGAAAATGGAGGAAGAGCCTCTTGG
ACCTGATCTTGAAGACCTAAAACGCCAAGTACAACAACATAAGGTGCTTCAAGAAG
ATCTAGAACAAGAACAAGTCAGGGTCAATTCTCTCACTCACATGGTGGTGGTAGTT
GATGAATCTAGTGGAGATCACGCAACTGCTGCTTTGGAAGAACAACCTTAAGGTATT
GGGAGATCGATGGGCAACATCTGTAGATGGACAGAAGACCGCTGGGTCTTTTAC
AAGACATCCTTCTCAAATGGCAACGTCTTACTGAAGAACAGTGCCTTTTTAGTGCA
TGGCTTTCAGAAAAAGAAGATGCAGTGAACAAGATTACACAACCTGGCTTTAAAGA
TCAAAATGAAATGTTATCAAGTCTTCAAAAACCTGGCCGTTTTTAAAGCGGATCTAG
AAAAGAAAAAGCAATCCATGGGCAAACTGTATTTCACTCAAACAAGATCTTCTTTCA
ACACTGAAGAATAAGTCAGTGACCCAGAAGACGGAAGCATGGCTGGATAACTTTGC
CCGGTGTTGGGATAATTTAGTCCAAAAACTTGAAAAGAGTACAGCACAGATTTTAC
AGGCTGTCACCACCACTCAGCCATCACTAACACAGACAACCTGTAATGGAAACAGTA
ACTACGGTGACCACAAGGGAACAGATCCTGGTAAAGCATGCTCAAGAGGAACTTCC
ACCACCACCTCCCCAAAAGAAGAGGCAGATTACTGTGGATTCTGAAATTAGGAAAA
GGTTGGATGTTGATATAACTGAACTTCACAGCTGGATTACTCGCTCAGAAGCTGTG
TTGCAGAGTCCTGAATTTGCAATCTTTCGGAAGGAAGGCAACTTCTCAGACTTAAA
AGAAAAAGTCAATGCCATAGAGCGAGAAAAAGCTGAGAAGTTCAGAAAACTGCAAG
ATGCCAGCAGATCAGCTCAGGCCCTGGTGGAACAGATGGTGAATGAGGGTGTTAAT
GCAGATAGCATCAAACAAGCCTCAGAACAACTGAACAGCCGGTGGATCGAATTCTG
CCAGTTGCTAAGTGAGAGACTTAACTGGCTGGAGTATCAGAACAAACATCATCGCTT
TCTATAATCAGCTACAACAATTGGAGCAGATGACAACCTACTGCTGAAAACCTGGTTG
AAAATCCAACCCACCACCCCATCAGAGCCAACAGCAATTAAAAGTCAGTTAAAAAT
TTGTAAGGATGAAGTCAACCGGCTATCAGGTCTTCAACCTCAAATTGAACGATTAA
AAATTCAAAGCATAGCCCTGAAAGAGAAAGGACAAGGACCCATGTTCTGATGCA
GACTTTGTGGCCTTTACAAATCATTTTTAAGCAAGTCTTTTCTGATGTGCAGGCCAG
AGAGAAAGAGCTACAGACAATTTTTGACACTTTGCCACCAATGCGCTATCAGGAGA
CCATGAGTGCCATCAGGACATGGGTCCAGCAGTCAGAAACCAAACCTCTCCATACCT
CAACTTAGTGTCACCGACTATGAAATCATGGAGCAGAGACTCGGGGAATTGCAGGC
TTTACAAAGTTCTCTGCAAGAGCAACAAAGTGGCCTATACTATCTCAGCACCACTG
TGAAAGAGATGTCGAAGAAAGCGCCCTCTGAAATTAGCCGGAAATATCAATCAGAA
TTTGAAGAAATTGAGGGACGCTGGAAGAAGCTCTCCTCCAGCTGGTTGAGCATTG
TCAAAAGCTAGAGGAGCAAATGAATAAACTCCGAAAAATTGAGAATCACATACAAA
CCCTGAAGAAATGGATGGCTGAAGTTGATGTTTTTCTGAAGGAGGAATGGCCTGCC
CTTGGGGATTGAGAAATTCTAAAAAAGCAGCTGAAACAGTGCAGACTTTTAGTCAG
TGATATTGAGACAATTCAGCCCAGTCTAAACAGTGTCAATGAAGGTGGGCAGAAAG
TAAAGAATGAAGCAGAGCCAGAGTTTGCTTCGAGACTTGAGACAGAAGTCAAAGAA
CTTAACACTCAGTGGGATCACATGTGCCAACAGGTCTATGCCAGAAAGGAGGCCTT

10

20

30

40

50

GAAGGGAGGTTTGGAGAAAAGCTGTAAGCCTCCAGAAAGATCTATCAGAGATGCACG
AATGGATGACACAAGCTGAAGAAGAGTATCTTGAGAGAGATTTTGAATATAAACT
CCAGATGAATTACAGAAAGCAGTTGAAGAGATGAAGAGAGCTAAAGAAGAGGCCCA
ACAAAAAGAAGCGAAAGTGAACTCCTTACTGAGTCTGTAAATAGTGTCTAGCTC
AAGCTCCACCTGTAGCACAAAGAGGCCTTAAAAAAGGAACTTGAACTCTAACCACC
AACTACCAGTGGCTCTGCACTAGGCTGAATGGGAAATGCAAGACTTTGGAAGAAGT
TTGGGCATGTTGGCATGAGTTATTGTCATACTTGGAGAAAGCAAACAAGTGGCTAA
ATGAAGTAGAATTTAACTTAAAACCACTGAAAACATTCTGCGGAGCTGAGGAA
ATCTCTGAGGTGCTAGATTCACTTGAAAATTTGATGCGACATTCAGAGGATAACCC
AAATCAGATTTCGCATATTGGCACAGACCCTAACAGATGGCGGAGTCATGGATGAGC
TAATCAATGAGGAACTTGAGACATTTAATTCTCGTTGGAGGGAAGTACATGAAGAG
GCTGTAAGGAGGCAAAAGTTGCTTGAACAGAGCATCCAGTCTGCCCAGGAGACTGA
AAAATCCTTACACTTAATCCAGGAGTCCCTCACATTCATTGACAAGCAGTTGGCAG
CTTATATTGCAGACAAGGTGGACGCAGCTCAAATGCCTCAGGAAGCCCAGAAAATC
CAATCTGATTTGACAAGTCATGAGATCAGTTTAGAAGAAATGAAGAAACATAATCA
GGGGAAGGAGGCTGCCCAAAGAGTCCGTCTCAGATTGATGTTGCACAGAAAAAAT
TACAAGATGTCTCCATGAAGTTTCGATTATTCCAGAAACCAGCCAATTTTGAGCAG
CGTCTACAAGAAAGTAAGATGATTTTAGATGAAGTGAAGATGCACTTGCCTGCATT
GGAAACAAAGAGTGTGGAACAGGAAGTAGTACAGTCACAGCTAAATCATTGTGTGA
ACTTGTATAAAAGTCTGAGTGAAGTGAAGTCTGAAGTGGAAATGGTGATAAAGACT
GGACGTCAGATTGTACAGAAAAAGCAGACGGAAATCCCAAAGAACTTGATGAAAG
AGTAACAGCTTTGAAATTGCATTATAATGAGCTGGGAGCAAAGGTAACAGAAAGAA
AGCAACAGTTGGAGAAATGCTTGAAATTGTCCCGTAAGATGCGAAAGGAAATGAAT
GTCTTGACAGAATGGCTGGCAGCTACAGATATGGAATTGACAAAGAGATCAGCAGT
TGAAGGAATGCCTAGTAATTTGGATTCTGAAGTTGCCTGGGGAAAGGCTACTCAA
AAGAGATTGAGAAACAGAAGGTGCACCTGAAGAGTATCACAGAGGTAGGAGAGGCC
TTGAAAACAGTTTTTGGGCAAGAAGGAGACGTTGGTGGAAAGATAAACTCAGTCTTCT
GAATAGTAACCTGGATAGCTGTACCTCCCGAGCAGAAGAGTGGTTAAATCTTTTGT
TGGAATACCAGAAACACATGGAAACTTTTGACCAGAATGTGGACCACATCACAAAG
TGGATCATTCAAGGCTGACACACTTTTGGATGAATCAGAGAAAAAGAAACCCAGCA
AAAAGAAGACGTGCTTAAGCGTTTAAAGGCAGAACTGAATGACATACGCCCAAAGG
TGGACTCTACACGTGACCAAGCAGCAAACTTGATGGCAAACCGCGGTGACCACTGC
AGGAAATTAGTAGAGCCCCAAATCTCAGAGCTCAACCATCGATTTGCAGCCATTTT
ACACAGAATTAAGACTGGAAAGGCCTCCATTCTTTGAAGGAATTGGAGCAGTTTA
ACTCAGATATACAAAAATTGCTTGAACCACTGGAGGCTGAAATTCAGCAGGGGGTG
AATCTGAAAGAGGAAGACTTCAATAAAGATATGAATGAAGACAATGAGGGTACTGT
AAAAGAATTGTTGCAAAGAGGAGACAACCTTACAACAAAGAATCACAGATGAGAGAA
AGCGAGAGGAAATAAAGATAAAACAGCAGCTGTTACAGACAAAACATAATGCTCTC
AAGGATTTGAGGTCTCAAAGAAGAAAAAAGGCTCTAGAAATTTCTCATCAGTGGTA
TCAGTACAAGAGGCAGGCTGATGATCTCCTGAAATGCTTGGATGACATTGAAAAAA
AATTAGCCAGCCTACCTGAGCCCAGAGATGAAAGGAAAATAAAGGAAATTGATCGG
GAATTGCAGAAGAAGAAAGAGGAGCTGAATGCAGTGCGTAGGCAAGCTGAGGGCTT
GTCTGAGGATGGGGCCGCAATGGCAGTGGAGCCAACTCAGATCCAGCTCAGCAAGC
GCTGGCGGGAAATTGAGAGCAAATTTGCTCAGTTTTCGAAGACTCAACTTTGCACAA
ATTCACACTGTCCGTGAAGAAACGATGATGGTGATGACTGAAGACATGCCTTTGGA
AATTTCTTATGTGCCTTCTACTTATTTGACTGAAATCACTCATGTCTCACAAGCCCT
ATTAGAAGTGGAAACAACCTTCTCAATGCTCCTGACCTCTGTGCTAAGGACTTTGAAG
ATCTCTTTAAGCAAGAGGAGTCTCTGAAGAATATAAAAGATAGTCTACAACAAAGC
TCAGGTCGGATTGACATTATTCATAGCAAGAAGACAGCAGCATTGCAAAGTGCAAC
GCCTGTGGAAAGGGTGAAGCTACAGGAAGCTCTCTCCAGCTTGATTTCCAATGGG

10

20

30

40

50

AAAAAGTTAACAAAATGTACAAGGACCGACAAGGGCGATTTGACAGATCTGTTGAG
AAATGGCGGCGTTTTTCATTATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGC
TGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACA
AATGGTATCTTAAGGAACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCAAACTGTTGTCAGA
ACATTGAATGCAACTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAG
TATTCTACAGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAAC
AGCTGTCAGACAGAAAAAAGAGGCTAGAAGAACAAGAATATCTTGTGCAGAATTT
CAAAGAGATTTAAATGAATTTGTTTTATGGTTGGAGGAAGCAGATAACATTGCTAG
TATCCCACTTGAACCTGGAAAAGAGCAGCAACTAAAAGAAAAGCTTGAGCAAGTCA
AGTTACTGGTGGAAGAGTTGCCCTGCGCCAGGGAATTCTCAAACAATTAATGAA
ACTGGAGGACCCGTGCTTGTAAGTGCTCCATAAGCCCAGAAAGAGCAAGATAAACT
TGAAAATAAGCTCAAGCAGACAAATCTCCAGTGGATAAAGGTTTCCAGAGCTTTAC
CTGAGAAACAAGGAGAAATTGAAGCTCAAATAAAAGACCTTGGGCAGCTTGAAAAA
AAGCTTGAAGACCTTGAAGAGCAGTTAAATCATCTGCTGCTGTGGTTATCTCCTAT
TAGGAATCAGTTGGAATTTATAACCAACCAAAACCAAGAAGGACCATTTGACGTTT
AGGAAACTGAAATAGCAGTTCAAGCTAAACAACCGGATGTGGAAGAGATTTTGTCT
AAAGGGCAGCATTGTGTACAAGGAAAAACCAGCCACTCAGCCAGTGAAGAGGAAGTT
AGAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAGAGCTGAGGG
CAAAGCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCCTCTCCTACTCAG
ACTGTTACTCTGGTGACACAACCTGTGGTTACTAAGGAACTGCCATCTCCAAACT
AGAAATGCCATCTTCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCAGATTTCAACCGGG
CTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATCAAGTTATAAAATCACAG
AGGGTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCATCAAGCAGAAGGC
AACAATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCCCCAGTTGGAAGAAGCTCATTACCGCTG
CCCAAAATTTGAAAAACAAGACCAGCAATCAAGAGGCTAGAACAATCATTACGGAT
CGAATTGAAAGAATTCAGAATCAGTGGGATGAAGTACAAGAACACCTTCAGAACCG
GAGGCAACAGTTGAATGAAATGTTAAAGGATTCAACACAATGGCTGGAAGCTAAGG
AAGAAGCTGAGCAGGTCTTAGGACAGGCCAGAGCCAAGCTTGAGTCATGGAAGGAG
GGTCCCTATACAGTAGATGCAATCCAAAAGAAAATCACAGAAACCAAGCAGTTGGC
CAAAGACCTCCGCCAGTGGCAGACAAATGTAGATGTGGCAAATGACTTGGCCCTGA
AACTTCTCCGGGATTATTCTGCAGATGATACCAGAAAAGTCCACATGATAACAGAG
AATATCAATGCCTCTTGAGAGAAGCATTATATAAAGGGTGAGTGAGCGAGAGGCTGC
TTTGGAAGAACTCATAGATTACTGCAACAGTTCCCCCTGGACCTGGAAAAGTTTC
TTGCCTGGCTTACAGAAGCTGAAACAACCTGCCAATGTCCTACAGGATGCTACCCGT
AAGGAAAGGCTCCTAGAAGACTCCAAGGGAGTAAAAGAGCTGATGAAACAATGGCA
AGACCTCCAAGGTGAAATTGAAGCTCACACAGATGTTTATCACAACTGGATGAAA
ACAGCCAAAAAATCCTGAGATCCCTGGAAGGTTCCGATGATGCAGTCCTGTTACAA
AGACGTTTGGATAACATGAACCTTCAAGTGGAGTGAACCTTCGGAAAAAGTCTCTCAA
CATTAGGTCCCATTTGGAAGCCAGTTCTGACCAGTGGAAAGCGTCTGCACCTTTCTC
TGCAGGAACCTTCTGGTGTGGCTACAGCTGAAAGATGATGAATTAAGCCGGCAGGCA
CCTATTGGAGGCGACTTTCCAGCAGTTCAGAAGCAGAACGATGTACATAGGGCCTT
CAAGAGGGAATTGAAAACCTAAAGAACCTGTAATCATGAGTACTCTTGAGACTGTAC
GAATATTTCTGACAGAGCAGCCTTTGGAAGGACTAGAGAACTCTACCAGGAGCCC
AGAGAGCTGCCTCCTGAGGAGAGAGCCCAGAAATGTCCTCGGCTTCTACGAAAGCA
GGCTGAGGAGGTCAATACTGAGTGGGAAAAAATTGAACCTGCACTCCGCTGACTGGC
AGAGAAAAATAGATGAGACCCTTGAAAGACTCCAGGAACCTTCAAGAGGCCACGGAT
GAGCTGGACCTCAAGCTGCGCCAAGCTGAGGTGATCAAGGGATCCTGGCAGCCCGT
GGGCGATCTCCTCATTGACTCTCTCCAAGATCACCTCGAGAAAGTCAAGGCACTTC
GAGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACGTGAGCCACGTCAATGACCTTGCTCGC
CAGCTTACCACTTTGGGCATTGAGCTCTCACCGTATAACCTCAGCACTCTGGAAGA

10

20

30

40

50

CCTGAACACCAGATGGAAGCTTCTGCAGGTGGCCGTCGAGGACCGAGTCAGGCAGC
TGCATGAAGCCCACAGGGACTTTGGTCCAGCATCTCAGCACTTTCTTTCCACGTCT
GTCCAGGGTCCCTGGGAGAGAGCCATCTCGCCAAACAAAGTGCCCTACTATATCAA
CCACGAGACTCAAACAACCTTGCTGGGACCATCCCAAATGACAGAGCTCTACCAGT
CTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGATTCTCAGCTTATAGGACTGCCATGAACTC
CGAAGACTGCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCTGCATGTGA
TGCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGACCAGCCCATGGATATCCTGCAGA
TTATTAATTGTTTGACCACTATTTATGACCGCCTGGAGCAAGAGCACAAACATTTG
GTCAACGTCCCTCTCTGCGTGGATATGTGTCTGAACTGGCTGCTGAATGTTTATGA
TACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCCTGTCTTTTAAAACTGGCATCATTTCCT
TGTGTAAAGCACATTTGGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGT
TCAACAGGATTTTGTGACCAGCGCAGGCTGGGCCTCCTTCTGCATGATTCTATCCA
AATTCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCATCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCAA
GTGTCCGGAGCTGCTTCCAATTTGCTAATAATAAGCCAGAGATCGAAGCGGCCCTC
TTCCTAGACTGGATGAGACTGGAACCCAGTCCATGGTGTGGCTGCCCGTCCTGCA
CAGAGTGGCTGCTGCAGAACTGCCAAGCATCAGGCCAAATGTAACATCTGCAAAG
AGTGTCCAATCATTGGATTCAGGTACAGGAGTCTAAAGCACTTTA
ATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGTCGAGTTGCAAAAGGCCATAAA
ATGCACTATCCCATGGTGGAATATTGCACTCCGACTACATCAGGAGAAGATGTTTCG
AGACTTTGCCAAGGTACTAAAAAACAAATTTGGAACCAAAAGGTATTTTGCGAAGC
ATCCCCGAATGGGCTACCTGCCAGTGCAGACTGTCTTAGAGGGGGGACAACATGGAA
ACTCCCGTTACTCTGATCAACTTCTGGCCAGTAGATTCTGCGCCTGCCTCGTCCCCCT
CAGCTTTCACACGATGATACTCATTACGCATTGAACATTATGCTAGCAGGCTAGC
AGAAATGGAAAACAGCAATGGATCTTATCTAAATGATAGCATCTCTCCTAATGAGA
GCATAGATGATGAACATTTGTTAATCCAGCATTACTGCCAAAGTTTGAACCAGGAC
TCCCCCTGAGCCAGCCTCGTAGTCCTGCCCAGATCTTGATTTCTTAGAGAGTGGA
GGAAAGAGGGGAGCTAGAGAGAATCCTAGCAGATCTTGAGGAAGAAAACAGGAATC
TGCAAGCAGAATATGACCGTCTAAAGCAGCAGCACGAACATAAAGGCCTGTCCCCA
CTGCCGTCCCCTCCTGAAATGATGCCACCTCTCCCCAGAGTCCCCGGGATGCTGA
GCTCATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGTCAACACAAAGGCCGCCTGGAAGCCAGGA
TGCAAATCCTGGAAGACCACAATAAACAGCTGGAGTCACAGTTACACAGGCTAAGG
CAGCTGCTGGAGCAACCCAGGCAGAGGCCAAAGTGAATGGCACAACGGTGTCTC
TCCTTCTACCTCTCTACAGAGGTCCGACAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGG
TTGGCAGTCAAACCTTCGGACTCCATGGGTGAGGAAGATCTTCTCAGTCCTCCCCAG
GACACAAGCACAGGGTTAGAGGAGGTGATGGAGCAACTCAACAACTCCTTCCCTAG
TTCAAGAGGAAGAAATACCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGGAAG
TCTTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCTTAGTATCAGTCA
TGACAGATGAAGAAGGAGCAGAATAAATGTTTTACAACCTCCTGATTCCCGCATGGT
TTTTATAATATTCATACAACAAAGAGGATTAGACAGTAAGAGTTTACAAGAAATAA
ATCTATATTTTTGTGAAGGGTAGTGGTATTATACTGTAGATTTTCAGTAGTTTCTAA
GTCTGTTATTGTTTTGTTAACAATGGCAGGTTTTTACACGTCTATGCAATTGTACAA
AAAAGTTATAAGAAAACATCATGTAAATCTTGATAGCTAAATAACTTGCCATTTT
TTTATATGGAACGCATTTTGGGTGTTTTAAAAATTTATAACAGTTATAAAGAAAGA
TTGTAAACTAAAGTGTGCTTTATAAAAAAAGTTGTTTATAAAAAACCCCTAAAAAC
AAAACAAACACACACACACACACATACACACACACACACAAAACCTTTGAGGCAGCG
CATTGTTTTGCATCCTTTTGGCGTGATATCCATATGAAATTCATGGCTTTTTCTTTT
TTTGCATATTAAAGATAAGACTTCCTCTACCACCACACCAAATGACTACTACACAC
TGCTCATTTGAGAACTGTCAGCTGAGTGGGGCAGGCTTGAGTTTTCATTTTCATATA
TCTATATGTCTATAAGTATATAAATACTATAGTTATATAGATAAAGAGATACGAAT
TTCTATAGACTGACTTTTTCCATTTTTTAAATGTTTCATGTCACATCCTAATAGAAAG

10

20

30

40

50

AAATTACTTCTAGTCAGTCATCCAGGCTTACCTGCTTGGTCTAGAATGGATTTTTTCC
CGGAGCCGGAAGCCAGGAGGAACTACACCACACTAAAACATTGTCTACAGCTCCA
GATGTTTTCTCATTTTTAAACAACCTTTCCACTGACAACGAAAGTAAAGTAAAGTATTG
GATTTTTTTAAAGGGAACATGTGAATGAATACACAGGACTTATTATATCAGAGTGA
GTAATCGGTTGGTTGGTTGATTGATTGATTGATTGATACATTTCAGCTTCTCTGCTGCT
AGCAATGCCACGATTTAGATTTAATGATGCTTCAGTGGAAATCAATCAGAAGGTAT
TCTGACCTTGTGAACATCAGAAGGTATTTTTTAACTCCCAAGCAGTAGCAGGACGA
TGATAGGGCTGGAGGGCTATGGATTCCCAGCCCATCCCTGTGAAGGAGTAGGCCAC
TCTTTAAGTGAAGGATTGGATGATTGTTTCATAATACATAAAGTTCTCTGTAATTAC
AACTAAATTATTATGCCCTCTTCTCACAGTCAAAAGGAACTGGGTGGTTTTGGTTTT
TGTTGCTTTTTTAGATTTATTGTCCCATGTGGGATGAGTTTTTAAATGCCACAAGAC
ATAATTTAAAATAAATAAACTTTGGGAAAAGGTGTAAAACAGTAGCCCCATCACAT
TTGTGATACTGACAGGTATCAACCCAGAAGCCCATGAACTGTGTTTTCCATCCTTTG
CATTTCTCTGCGAGTAGTTCCACACAGGTTTGTAAGTAAGTAAGAAAGAAGGCAAA
TTGATTCAAATGTTACAAAAAAACCCTTCTTGGTGGATTAGACAGGTTAAATATAT
AAACAAACAAACAAAAATTGCTCAAAAAAGAGGAGAAAAGCTCAAGAGGAAAAGCT
AAGGACTGGTAGGAAAAAGCTTTACTCTTTCATGCCATTTTATTTCTTTTTGATTTT
TAAATCATTCAATTCAATAGATACCACCGTGTGACCTATAATTTTGCAAATCTGTTA
CCTCTGACATCAAGTGTAATTAGCTTTTGAGAGAGTGGGCTGACATCAAGTGTAATT
AGCTTTTGAGAGAGTGGGTTTTGTCCATTATTAATAATTAATTAATTAACATCAAAC
ACGGCTTCTCATGCTATTTCTACCTCACTTTGGTTTTGGGGTGTTCCTGATAATTGT
GCACACCTGAGTTCACAGCTTCACCACTTGTCCATTGCGTTATTTTCTTTTTCTTT
ATAATTCTTTCTTTTTCTTTCATAATTTTCAAAAGAAAACCCAAAGCTCTAAGGTA
ACAAATTACCAAATTACATGAAGATTTGGTTTTTGTCTTGCATTTTTTTCTTTTATG
TGACGCTGGACCTTTTCTTTACCCAAGGATTTTTTAAACTCAGATTTAAACAAGG
GGTTACTTTACATCCTACTAAGAAGTTTAAGTAAGTAAGTTTCATTCTAAAATCAG
AGGTAAATAGAGTGCATAAATAATTTGTTTTAATCTTTTTGTTTTCTTTTAGACA
CATTAGCTCTGGAGTGAGTCTGTCATAATATTTGAACAAAAATTGAGAGCTTTATT
GCTGCATTTTAAGCATAATTAATTTGGACATTATTTCTGTGTTGTGTTCTTTATAACC
ACCAAGTATTAAGTGTAAATCATAATGTAAGTGAAGCATAAACATCACATGGCAT
GTTTTGTCATTGTTTTTCAGGTAAGTCTTACTTGAAGTATCATAATATATTGTGT
TTTAACACCAACACTGTAACATTTACGAATTATTTTTTTAACTTCAGTTTTACTGC
ATTTTCACAACATATCAGACTTCACCAAATATATGCCTTACTATTGTATTATAGTAC
TGCTTTACTGTGTATCTCAATAAAGCACGCAGTTATGTTAC (配列番号130)

10

20

30

40

50

【0203】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、転写変異体Dp427m、エクソン54(NCBI参照配列:NM_004006.2のヌクレオチド位置8117~8271、NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1686466~1686620)

CAGTTGGCCAAAGACCTCCGCCAGTGGCAGACAAATGTAGATGTGGCAAATGACTT
GGCCCTGAAACTTCTCCGGGATTATTCTGCAGATGATACCAGAAAAGTCCACATGA
TAACAGAGAATATCAATGCCTCTTGGAGAAGCATTTCATAAAAG (配列番号2142)

【0204】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、エクソン54標的配列1(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1686541~1686602)

GATTATTCTGCAGATGATACCAGAAAAGTCCACATGATAACAGAGAATATCAATGC
CTCTTG (配列番号2143)

【0205】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)エクソン54/イントロン54接合部(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1686591から1686650)

CAATGCCTCTTGGAGAAGCATTTCATAAAAGGTATGAATTACATTATTTCTAAACT

ACTG(配列番号2144)

【0206】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン54(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1686621~1716747)

GTATGAATTACATTATTTCTAAACTACTGTTGGCTGTAATAATGGGGTGGTGAAA
CTGGATGGACCATGAGGATTTGTTTTTCCAATCCAGCTAAACTGGAGCTTGGGAGG
GTTCAAGACGATAAATACCAACTAAACTCACGGACTTGGCTCAGACTTCTATTTTA
AAAACGAGGAACATAAGATCTCATTTGCCCGCTGTCACAAAAGTAGTGACATAACC
AAGAGATTAAACAAAAAGCAAAATACTGATTTATAGCTAGAAGAGCCATTTATCAG
TCTACTTTTGATAACTCTATCCAAAGGAATATCTTTCTATCTCATCATGGCGCACACT
GCCTTACCTGTTATCTGATAAATAAGTCACTTTGGGATTCATGATAGAGTTATAGC
TGTACATGGTCTCATCCTAGTATCTCACTCCACACACCCCAATGGGAAAATTTGTGG
AGGGCAATATGACTCGTCACTTCATTTCCCATTTATATGAATGGAAATTAACAGC
GCTTATAGACAGTATCTCCTCAAACCTAAGCCTTGTATCCTTATTATACCTCTCTTGA
TCTCTAGTGCTTTTTTCACTAGCATTTTATTCCAATCATAAATAAAAAATATAAATTAT
GTAACCTAATTGTTAAATATTTGTCCTTTAAATTAATCTAAATGCCATGAGGGCAGA
GATTTTGTCTTTCTCATTTGATACATCCCCAGGTCCTGAACCACGTGATATAATAGG
GAGCTAGTAAATGTTTTTTGAATGATGACTCCCTTTGCAGAATGTACAATTACCTT
GTGCAAGCTGAAAAAATAGCACCTGTACAATATGAGGAAGACCACGGTGAAAAATA
ATTGAGTTCCAAAATATGACATCAATTACTGAAAAAATAAGCTCGGTGATTTTTTAA
CAAGAAGTAAAAGTCACCACTGGGGCCAAAACAGATTTTGAACCTAAGAGTAGGAAG
TCTTAGGAGAAATGAGATAATGATATATGGAAATTAAGCGGCCAACTAAATTTTGA
AACTGAGCTAGACATTAGAGAGTAAAACTCCTGTGAAGCTGAATTTAAGCTGGTC
ACCCTGGGGAATAGAGCAACTCTAATCCTGAATTCAGACAGTAGGTGTATAGATG
GAAAAGACCATGGAAAAGAAGATTCAACCTAAAGTTGGGAAGTTTTAATTGGAGCC
CTATGAAAAAGACCCTGGTGGAGAAAGGGCAAACCTTGAATATGGAGCTGATATTTG
GAAAAATTCTCATAGTAACTACTTTTTCTCAATGGCAAGGCTTGGACTTTCTTCTCA
AAATACAGATCTTATATGTGTTCAATTAAACAGGGACAGATTAGGTTTCAGGAAGAA
TTATTCACATGGAATCAATTGGTATCAGAGAGTCAACCATTAGATCTTAGTGGGAA
ATATCTGCTTCTCAAAGAGAAGTCTTTTGGGGAAAGCAAATTAAGTCAGAGATTA
ATTTGATGAGTTTAGGTAATATAAACTAAGGGGCCAAGAAAAAAGCTTGCTCATGG
TATGAACTAGAGCTTGAGGACACTGATCTAGTCTATCTATACTACTCTTTCTGAC
AGACCCCTCTCTTCATTCTCATGCTCCTTGATGGCCCAAGCCACTCTCTCAGTTTTT
TAAAAAATTGTTTTATCAAGGTCTCTGGATTCTTCATGGGAATGACTTCCAGTTTA
TATTTTTTTGGCTTGGTTCCAAAAAGCTATCAGCTAAGGAATGCATATACTTACTTC
CCCTATGGGTAAAGTAAATGAGAATTTTGAAGCCAACCTCACATTTTTTAGCCTGTA
CAGAATCTGCAATTCACCAAGCTACTTCTGACTCATGTCTATAAAGTTCTTCCCTGT
TCTTTTCTCACTTCACATGTACTCTTTGCAAGAATTCATCCACTTGTGTAGTTTCAG
TCTGTTGATGACTACCCATCTATAATTCCAGCTGAGAATGATCTTTTGAGTTTTAGA
CATGTAGATCCTGCTGCTTTCTTTTCGATGTTAATGTCCACAGGAACCTTCACATTGA
AGAGGTCCAAAGCTAAACTCATCTTTGCCTTCTTCCAATCTCTTTCTCCAAATGCAA
CCTACTTCTGTTGTCTTGTCTTAGTCCTTTTCGTGCTTCCGTAACAAAATACCACA
GACTGGGTAATTTATAATGAACAGGGATTTGTTGGCTCATAGTTCTGGAGGCTGCG
AAGTCCAAGATCAAGGGGCTGGAATCTGGTAAGGGCCTTCTTGTTGTGTCATGATT
CCATGATGGAAGGTGGAAGACCAAAAGAGAGAAAAAATGGGGCCAACTTGTCCTT
ATATGAACTCACTCCCACAATAATGATGCTAATCCGTTTCATGAAGGCAGAGCCTT
CATGTCCTAATCACCTCTTCAAGGTCACATTTACTACTGTTGCAATGGCAATTAAA
TTTTACCATAAGTTTGGGAAGGGAAAAACATTAAACCATAGCATTCTGCCCCCTTT
TCCCCAAAATTCTTGTTCTTCTCAAAGACAAAATACATTCATTTTCATCCCCAAAGCC
CCAAAAATCTTATTTTCAGCATAACTCAAAGTGCAATCTAATATAAATTAGATAT

10

20

30

40

50

GGGTGAGACTCAAGGCACAATTCATCGTGAGGGCAAATTCCTTCCATCTCTGAGCC
TGCAAAATCGAATCAAGTTCATCCCCTCACCCCTACCCTTCCCAGCATCAGGTAA
CCACCAATCACAGAAAGTTTTACTGATAGTCCTGCTCTAGATCATCTTTGTCTATGT
TCACTTTAGCTATTTATCCTAGTGTTCCATTATTGGAATACTAAGCATGTGGGAATT
ATTTATATTCTACTGTTCAAGGTCCTCACCAAGGTCTGATTGCAAAAATTCAAAAA
ATTGCAACCTTAGGCATAAATGGGTAAAGCAGTTTAGGGTACATTTATAATAATTA
TTTACTGTGCTACTTCAAAAATCTTATTGCCTCTATTTATAAATAAAAAGTGTTGTC
TCTACACAGTGGCTTGTTGTAATGCATTTACTTGTTTCTGCCTGATTTTTTCTATTT
ATACATTTTCTTTTTTATTTTTATTTTTATTTTTTCACTTTTAAGTTCAGGGGTACA
TGTGCAGGTTTGTTACATAGGTAAACTTGTGTCATGGGGGTCTGTTGTACAGATTA
TTTCATCACCTAGGTATTAATCCTGGTACCCGTTAGTTGACTTTCCTGATCCTCTCG
CTCCTCCCACCCTCCACACTCTAATAGTCCCTAGCATGTGTTGTTCCCCTCTACGTG
TCCATGTGTTCTCATCATTTAGCTCCCACCTTATAAATGAGAACATGGGGTATTTGG
TTTTTTGTTCTGTATTAGTTTGATAAGGACAATGGCCTCCAGATCCATCTATGTCC
CTGCAAAGGACATGATCTCATTCTTTTTTTATGGCTACGTAGTATTCCATGGTATTT
GTGTTGGTCTCAAAAACACTACAATATGACAGGATGGCATTTTTCACTTTTGTTGTTA
TATTAACCTCATCTTAAAAAGGAAAGATTAATAATGTCAATATTTGGGTTATGGAG
AAAAAGTATCTCATATCTTTGAAAAAGTTCTGTAACTATAGCTTTTTTAGGTAGGAG
GGATTCTGTGGAAAGTTTTCTGATTACATCATTTCTCACAGTTCAGGTTAGACACC
ATTTTACTATGAAACACTAATGCATTGCCTGCACTGAGACTTTCAGTCACATGGAG
AAACCTAGGCAAAATTTTTGTACACTTGGAAGAATATTTAAATTAGTAATAAATC
TTTAGTTTTAACTGTTGAATGTTAAATAAGATATAAAATGTACTTGAAAGAAATT
TGCTTTGATATCAGACACTGCCATGTTGCAGTTTCAAGACATAATAAAAAAGTAAA
CTAATGTTTATATTTTGCTGTTTAAAGTTTATTAATACATCAGATGAGTCTTCAAATT
CTACAGTGGCTTTTGATATGATCATTTTTTACTTGCCATTTTATATAGAATAAATATA
AATAGGCATTTATGCTTAAAGGAACATAATCTATCTATGGAAAAAAGAGAAGGCTG
CTTCTCAACTAAATTGTACAGTTTAGAAACCCAGATCTGAACATAGATTATTGTTG
TGACCTATGTAGGAAAATATGTTGTTTTCTTATCGTAGTCCTTACAGAGTCCATG
ATAACATATAAAGCCAGAAATGTGAGCCTCTGCAAGTTCATTTCTTTGTCTTCAAT
CTCTGTGAATAGATATGAGTTTGTGAATAAGATAATATTAGATGTGATATTACAAA
TTATTGTGAGAAGCCTCTAAGGATTAGATTTCAAGGACTGCCATCTGGCTGATGAC
TTTATGATGACACTGTCATGAGATTTCATTTCCTTATTTCTGTTCCAGGATCACTCT
TTAAACAAGAAATAAGCATTAACCTCTGAATTGTCTGCTTGCTGTATGAGGGCT
TCCACAACCTGCCAACTAGCCAGGTACAACTCATCAAGCAGAGGAGATGGTCCTTG
CATCAGAGGGTTAAACATGCCTAGAAGTTCCTTAGCTAAGCTCCCAGATACTAAAA
AATCCCTCTAGGTTCTAAGAAAGATTCAGCATGTACATGTGTGTACATGTATGTGT
GTACATATATACATATACGTGTATATGCATATGCATGCATATACATACAAACACAT
TTTCTTCCATAACATCTCAGTATTCTCTGTTCTTTATAATACTGTTTTTGTATTTTAA
TGATCAAAATTAATAGTTGATCATCTGAAAACATTTTGACCTGTTTTCTCCGTCTTT
GACAACCTTGAAAGGCACTTGTAAGTCACTCTTTGCTTCTCTATTCCTAGGTCCTTTC
TCATCTTCATTGCAACAAGAAAAGAGAAAACAATTGAGCCCTATTTTGTGTGTAGC
AAGGAGCTACTCTAGTTAAACACTAGATCTCTTTTACATTCTCCAACATGTTGTTTT
AGTAATTATTCTACTTTCTTTTTTTGGGATATTCAATTTCTTCTTTCTTTTTGCTC
CTCCCCTTTAGCAGGCCAACATACTCAAGTCTCCCTCATCCTAAGAGAACTTTTTTA
GTATATCATTTTTTTTTCTATCCAGCTGTACTTGCTTCTGCTTACTATATCATTTTTA
AGCAGTAGTTGGCATTACTGTTTCCTGTTCTTTAGCTACTAGTTGTACTTTGACCCA
CTCCAGTCTCACTTCCCCAGCACCACTTTATGAAAACAAGGACTTACTAAGAT
CATCAGTGACTTTGTAATAGCTAATTAGTGTATTTTAATTGTCATCTTCTTGACT
ATATTTTAAACATTGATCCTGTTGGTCAACTCTGCTAATCAAACTTTATCCTCCTTG
GTTCCCAGAACAATATTATCTTGAATATCTCATTTCTCTAATCATATAATAATTGTG

10

20

30

40

50

AGGTGCTTGGCACAATGCCTAGTGCGTAGTAAGAACTCAGTAAAATATCATCTGCC
ATCGACACCATAAAAAATTAATTTACTTACTCAACAAATACTTTTGTATGAAGTTTG
TGCTAGGTAGGCCCAGTAATTGGTACTTGGTATAGAGCAATGAAAAGCCCTACCT
CATAAAGCTTATATTCTTGGAAGCAGAAGTTGGAAGACAGACATTGACAAATAAAA
ATTAATAACATGATGTGTCAGATGGTCATACACACAGTGTGGAAGAACAAGAGGA
AAACAAGTGGAGAGAGAGAGGGGAGGTGGAAGAGGAGTGCTGCCATGAAAATGTGGT
AATCAAAAAAGGTCTTACTGAAAAGGTGGCATTTAAGCAAATTCTAAAAGACCTGA
GGATGTGGGCCATATGTATAATTGGGGGGGAAAAAGTAGTCCAGGAGAGTCCTAAT
AAGTTAAAATGCCCCAAAGCAGGAATATTCTTGGCATGTTGAAGGAACCTTAAAAG
GGAGATCAGTTAGGCAGAAAAGGATCAAGCGAGCAGGAAGGTAGTTGACAATAAAT
TTAGAGGGGTAACTGGCATCTGATTATATTGGCCTTTTAGGCCTGTGGACTTTAGC
TTTTAATCTGAATGAGATGGGAGTTATTGGAGGGTTTTGAATGGAGGAGTGACATG
TTTTGTCTTATCTGGCTCCTCTGTTACAATAGACTAAACAGAAGTAGTGAGACCAT
TAGGAAACTGTTGTCATAATTCAGTCAAGAGATGACTGTGGCTGGGATCAGAATGG
GAGAGGTGAATGTGGTGAGGAGTGGTTGGATTCTACTATATTTTGGGTACAGAGCA
CAACAGATTTTATAATGGAATAAATTTAGGTGTGAGAGAAAGAGTCAAGAAGACTC
AAGAATTTTTAGCCTGAGCAACGGAAAGATGGGGTTCATCATTACTGAGATGGGGA
AGGCTCCAGGAGTAACATATTTTGGGAGGAAGATGTGGATATGTTACATTTGAAAT
GCCTATTATACATCTAGGAGATGTGTGGAGTAGATAGCTGGATATATGAATCTTAA
GTTATGGGGAGTAGCTCAAGATACAAAGTTGGGAGTTGTAACAATGATCAGTGCAA
GTTCTCTGTCTTCAATGCAATTTTAAATGTTGATGTTCCATTCTTAATTGTCTCTCT
TCTTTCTCTCTGCACATTTTGAGTAGCTTTGTCTGTTGGCTTCAGTTAACATTAAGA
CTCCTCAGTGTCAACTTCCATCTTACACTCTTCTCCTGATCTCCAGAACTGTACTTT
CTGCCACCTAACCTACATTACCACCTGGATATGCTACAGGCTGCAAAATGTGTCAA
GTAGAATGCATTATCTTGCCCCTAAAAGAAAGTTAAATTTTCTGTGTTTTTCAGTGT
AGTGTAATTGTCTAACTTAATTGTCTCTAAAACCTGGAACCTAAGAATTACCTTCT
ACCTTTCTCTTGATCTCTCTTTCCCAATCTACTGACACATGTATTAAACTGGCTTCC
AAATTCTGTGAATTCTACTTCAAAAATTGCTCTAGAAACAATTCCTCTCTTTATCC
CTATTGTCACCTCATCCTAAAGCCTCTTCATCCTTTGTAGATTTCTGGGAGATTGTA
ACCAACTTTTTCTCTATTCTGCCAGTTATCAAGTCTTTACGCTCATTTGACATTCACA
ACAGCCTTGGATCTGTCTTCCTTGAATGAATCTTCTTGCTTCCCTTTGATTCCAGT
GCTTTTTTTTTTACCCTCCTGAGACTTGATGCATGATATTTACATGTATGACATGTTT
CCAAAAGCATTCTCAAATTTTCTGAAAGTAAAAACAAATGAAAAGTAAACATT
TTCCTGGGAAGAAAAGCAAATAGTGTTATACATTTTTTGCTTGTTCAATTTGTTTGTTT
ATTTAGGAGAGGGACAAGCATTAGAAGTTCATAAGAGTCTTATATGCTGTATCTAC
AAATACCGTCCCTTGGCAATATAATTTTAGAGTTCCTTTTCTGGAACCTACTTAAGG
ACTGTTTTATGATCCTCAGCAGACTGTTATATTATTTTATAGCCATACCTTTTATTT
GCTGAGTAATTGTACTCAATAATTGTTTGTAATTGAATGAAACAATTCATCAGATG
TTGGGCACTGAATGGCTTTGGATTATTTCCAAAAATTTAAAGGATAAAGATTTGCT
GCCTTCAAAGCTATGTACAAAAATATGATAGAATGCTAGCGGGATATTTGTTTAAA
ATACAACCTTTATTACATTGGGGCCTGCTCATAATATATATGTGGCACATTTTATTT
AAAATATTAAAGTTCCTGGTGGGACATGTCCCCATAATCCCAGCACTTTGGGAGGC
CGAGGTGGGGGTGGGAGGATCACTAGAGGCCAAGAGTTTGAGACCAGCCTGGGCAA
CATAGTGAGATACCATTTCTACAAAACATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCAAGTTT
GTAGTCCCAGCTACTTGGGAAGCTGAGGCAAGAGGATTTCTTGAACCTAGGAGTTC
AGTTCAAGGCTGCAGTGAGCTATGATCATGCCAGTGTACTCCAGCCTGGGTGACGT
AGTGAGACTCCATCTCTTAAAATTAAATTAAATTTAAAGCTACAAATGACCCCAA
GCCACCAGTTCAACCCTCTCAATTTTGAATACCCTATTTTAAATTCCTCTTATGCGA
AATGTACCTTGATGTCCATTTTAAAGGACTGAGAGGATTTGGTATGTTAAAAAATTC
AATCCATTATCAACTCCTTTAGGTACACTTAGCAGTATGAAAATGTGTCTTTCGGC

10

20

30

40

50

TCTTCAGGAGAGAGTCATATGTATAGTTACAAGACAATCCCATTTTTATATTGCTG
AGACCCAAATCTTCCCAACTGATTATGAAGCATAAGAACTCTTCGGAGGTTTAAAGT
GAGCTGAGATTGTGCCACTGCACTACAGCCTGGGCGACAGAGCAAGACTTTGTCTC
AAAAAAAAAAAAAAAAAATTCTCTGCATTCTACAGTAGGGTAATATAACATCTATGATG
TGAAATCTTGGGGCTCCGGGGCCAGAGAGTGTCTATGATCCATATGGATCTAAAAGGT
TCATAGTGGTAACAGCCTGCTTCATTTTTATGTCATCTCCTTTCAAGTAATTAGAATG
TTTCTAGCTTGCAGGGATTGCACACAAAGGGAGACATTTGGAACCATGTCATTGGT
GATTTACTGGTGTGGAAAATTACCTGGTGATGTAGCCAAGTAGCCATTTTCATTCT
AACCCAGTCCTACAGTCCTGAACTGGGCTGAACCAACGCACCAAAATATATGCTTA
GAAATGCTCCTATGTATCAGTTTTTCCAGGAAAAACAATAGTATTATCGAAAACCTT
ACCATTTGTTTCTAATAAAAAAATTATAGGATACCAACAGACTGTTTTTTGTTCATA
AATTTAATATTACAGTATCAAATATTAAAGCAAATGGGAGAAAGTTTTTCTTATTT
GGTTTAATTGAACCATTAATGTTAGCTACAATACCCATCATGTTACTTTTCAATTAT
ATTTATATTTTCATTTTATTTCTATCTGTATCATTCTCAGAAAGACTTCTTTAAAC
ATTCAATAAAAAATAGAATTTAGGTAGATTTATTTTTTAGAAAGTTGAGTTTTTTTAA
TAAATGAATATAATCATCACTTGACTTAATTTTTTTCTGCACAATTCTAGAAATCTT
ATAGTTTTTGGGATCCTTTGGCTTTATTCAGTATGTAACAGGGATCTGTTTCCTTTCT
CTAAATCATTAATTCAAATGATTTCTTATATTAAAAATGTTTGGACATATAGGTAT
TAATGAGTTTTATGAAATCTAATCTTTCCAATTTCCCCCTAAAAAGGGATGTCATTT
AATCAGTTCTAGGTTGTGATCAATAGCAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCAGCTCCCTTTCACCCCGTAGGGAAACCTGATATCA
TCCTTGACTAATTGCAGCAAAGAGCCTGGCTCAGGTCCTTTGTCTTATACCGAGTG
TTTATAGATTCTTGAGCCCAGCAGAATCTGAACTCCTGGCTACTGCTACCTACTTCC
CAGCCCAGGCCCCCAAAGCCCTATGTCTGCAGCCCCGTGCACCACTGTGTGTTTTT
GTGGCATTCTGAAACACAGAGCTACTTAACTTGTTTCTAAGCCCAGATTGTGCCT
TTTTGATTTTCTATTTTGGTATTTTATCTACCATTTTTTCTGTGTTTGGATGTTTCTT
CTATATTTTGAATAAATTCTTTCTTTTAGTACAAGTGATTCTTATTGTAGAACTA
TCAAAAATTTACAAATAAAGAATCATTCTCAACATTCTTAGCAATTCCTTCTATCA
TATTTTTGCAAATATATTTTTGCCTATTTTTTATTTTACTTACTCCCTGTTTATTAAC
AGTTAAAAGCATTTTTCAGATAGTTTTATTTTTTTCATTTAAAAAAATCTTACCACATT
TTTATTAGGAAGGAAATGGACAGGTGTTTATCTTTTCAATAAAAAACATGGGGGAA
ATAATTTCTTGAAGTACATAGTGACATTCTTCCAGCCAATGTTTTATGCTGTGGTCA
TTCCGTCTGTCATCAGTATTCATAGAAAGAGATGAAAATTATTTAAATTAAGTAGG
AAATCAATTCCTTCAAAAGCAGTAGTTGTGTGTTTCAAATATCTTCTAATAGTC
AGTTTCACACTTAGCTTTATCAAATTCCTAATTATGATACTCATTACATCACTCTGT
GTCCAGTCAGTGTGTTTATGCCACAGAGCAATTAAGCAA
TCAGGTGAACCAAATTCAATCACCTTTGTAGATAATAACCTACGTTGCTTAACTT
ATGGCCGCTCATACAATTACTGATGGATTGCCTTTTTCTTTTATATTGCCAGTATTT
TAAATGTCCTAGTGAAGTTGGGGTAGCTGTTGAACTTCAACTTTATCACAACTCT
TTTTTAAATGTGTAAACGAAAAACCCTCCATGAAATGACCATAACAGTTTTCA
TGCTGGGACAAATTAGATGAATAATAATCATAAATTCATAATGATTATTTATGATT
TTATGTTTTTATAGTGAGATATGTTTTGTTGAAATGTGTTATATAAGTGATACTTAA
GTTTCCTATTAATAAGAAATGCTAAAATGGCATTGTTCTCTTTAGCTGTGAGTCT
AGCTTTTGACCTCTGCTTAAACGGAAGTGTGTTCCATCCCAATCTGCAACTCTGA
GGCCTATGCTCCCTTCACTGCTGTCTAATGGATACCTATCAATTTGGAAGGAGGTT
TCAGGCAGCTATTCCCGGTAATCTAATCTCAGCTCTGTCCTTTTCAATATTTTCATC
AGTGGCTTGGATGAAGACATAGATAACATTCTTATCAAATCAATGCCACAAAGCAG
GGAGAAATAGCAAATATAGCAGACAAGAGTATCAGGAGCCAAAAAGTTTTTCAACAA
GTTGGACTGGTAGGCTGAATACTGAAAGATGTAATGTAAATGCAAGGTGCTACATG
TGGGTTCAAAAGAAACATGAAACAAAAAACCCATCTAACTTAGACTGGGCTCCCTG

10

20

30

40

50

GAAATAGACTAAGATAGAGAGTTGTGTGCATAAGGTTTGTGAGGAGTGTTCCCAT
GAGATACATGTGTAAGGTTGTAAGATAGGCAAGATTGCACAGACGAAGAAGTGCAG
TGAAGCCTGCAGTGC GTT GCGGCCTCATCAGATTTTCAGGGGAGTTCTGGAAATTG
CATGGCCCTTTAGAGACACGCTGAATTGAAGCAAGGGATCTGGACCTTTGAACCCA
ATACTAGAGAGTTAATGGTCCTGGGTCACCCCATGGGAAAGAGCAGACTGGAGTAA
GATTGTTACCTACAGCTGAAGGCAATTTCCAGGGAGGGAGGCAGCTGTGAGCTGTT
AGTAGTCAATATTCCAACCAGCTAGGGCATGAGGTCTTGGCAGAGCAACAGTGTAC
CCAAGACCGCAGTGTTACCCAAAGTATGGTCCTCTGACTGGCAGCATTGGTATCAC
CTATGAGCTCACTAGAAATTTAAATTTGTAGGTCTACCCCATCCAATAAATCAG
AATCTCTGGGGATGGGACTTGGGGAAC TTTTAAACAAGCTTTCAGGCCTCCAAGTTA
TTTCTATGCATATTTAAATTTGAGAACCCTGCCTACACCAACCAAAAACATTCCA
AATATGGAGATAACATAGAGTTTTTTAGCAACAATAATCTCCTTCTGTTTCACTTCT
CTCTTTACACACACACACACACACACACACAACACACAACACACAATGTGAT
AGAACAGTGGGAAAGGAAAGCCAAAGGGGATCTTAGGCCGAATAAATTTAAGCATA
TAACCTAGTCCTAAGAACGTATATTTTCAGCTTAATAGAGAGAGGAATATTGTTATA
AAGCTGTCCAAAGATGGAACAGGCTGCCTTGTAAGTTGTAGAAGTATTCAGGAAC
AGGTTGGTGATACCTTGGTGGTTGTATGGTATAACATCCTGATCTTCACATACTCA
TCATCTAGAGTGGGAGTTTTCTTTTTCCAAATGGGGTTTTGGCAGAACTAGTTCCA
CTGTATCTTAATAAGTAATAACTCAAGAAAGGGTTCTATGGATGAAAAAATGATTA
GGTAATATCAAGTTAAATCAAAGCGAACAGACTTCTTTCCCATAGGAGTAATCAGA
CCCTTATTACAGTGCATGCTTGGTGAATCAACAAAGTATGTGTATTTATGAAAGTA
TGGGGGGGAAGGGATAATCTATACAGTATGCATCCCTTCTAAAAGTTTTGACCATGAA
AACAATTTCTCAAGAATCTTATACAACACTACAGTATCTGGTCCAATACTATGCAT
AGAACATGCACTCAGTAAGTGTGTTGTAAGATAGATAGCATAGCATATAGGCCAGGC
CACTGAAGGGAAATCATCTCACCGTGAGTTACCTGAATAGTATTCTCTAGTGCCAT
TAGCTCAATTCTTCACGTAGGCATAAGCCTATACATTTGCCATGCTAACCAAGGGA
ATTTGTGTTACGTGAATTTTGA CTCTATT CAGACATTTTTTTCTATGACTCCTCCAA
GGCTGTTATTCTTACCTCATATTCTGGTAGAAGTTTAAGGACTTTTTTTCTGGGAATA
TTGATTAATTAGCTAGCTAGCTAGAGACAGAGAGAGGATAGAGATTGATTCTCTGG
CAGAGCCTATTTGAATCATATTGAATCTTTTTTTTTCTGAGACTTCCCACAAGGAG
GATGGAGGAGAAATTTTTTAGAAATCCACCGAAGTAATCAGGGATATCTTCAGTAA
AAGAAGCTATACTTAATAAAGTCTCTATTTTAGCAGATGGCAATCAACAATAGAGG
CAATAGACAATAGAGTCTATTTAAATTTGCTGGGATCTGCTAATAACGTTTTTTCTTT
TCCCTGAAACAAATGCCATTAACCCTCCTTGACACTCTGTCTTCATCAACATTCTAA
TAGAATGGAAGTAACTCATAATTTTGAGGATTTTTTTTCCACACAAAACCTATAAA
CCACACCACGCTAGTGATTACTTTTAGCCTAGTTGCTAGGTTGCTGCTGGTAACAG
TAAAACTTATCCTGACAGGTAGGCAATTCCAGAAGCCCAGCCAAGCACTTGGTGTG
TGTGAGTAAACCCCATACACTTCTCATGTAGAGTAACCCTGGCCAACCCATAACT
CTTAGCAACTATTCTGCTGGTGGACGGACCTGGTCTACTCTAAGAAGAGGCCAAGGTT
CTTTAATAGTGCAGTTGCAAGAACCAGAATTGAAAGTCAAAGTTCTAGCAAGATTT
TGCAGACTCCTTGGCAAACCAGTGGCTTGGGACTCATTCTTGACTTCAAGCCCTTA
ATTGATAATGGTAGGACAGCTTGCTTGCGCTGGGTTCTGCTCCCTGGGATATGCAC
TGTTTGCCAAATGAGTAGCAGGTGGACAGACATCTTTACAATTTGCTGTCCCATAT
TCTAAATGAACGTGACATTCTATAGGTCTGAGTTAACCTATGAAGTCACCAATTTTC
AATATCAAAATATTTATGACAGAGAAAAGGATACTGAGGCACAGAGAGTCTGTGAC
TTTCCTAAGCTCAAAACACCAGTTTGTGTTAATTCTGACACAGAAATTCTTGTATTT
GCTATCAGTCTCCTTTTTCTGTGTGTGTGTGTGTTTTTACATTGCAGCATCACCTAT
ATGATGTTAGGTTCTGTAACTTTTTGAGAATTTTCTCACATACAGTGATGTGTTACT
TTTTGATATTTCAAATAGTTCTAGTAAGTCTTTTCTACTTTTATTAGCGTATTAACA
TACTGGCTCTAAGAGGGCATCTCACCACATCTTTGCCATTCTTCCTGGAAAGGCAA

10

20

30

40

50

GTTTCTCTCCATCTTCTTTTTTGTATTCCAAAGTTTTGCCAAAGTTTGCTTTTGAAA
ATGGGTTACCTGGCAGAGCTTTATTATTCTAACTTTGAAAGTACAAGTCAGAATCA
GACAGTGGCAGTTATATATGCACTACTGTGATTACTATATAATGAAAGTATCTATG
GTGAAAATACTGATACTGACATATATTTGCCATTTTCTAATTAAGTGCTTCAGTAA
AAATTAAGCACTCACTCTTTGCCAGATACTGCAATAGATATTGAGCACATTGAACA
AAATTCTCCATATACATATATATGAGTCCACATTCTATGAAAGTATAATGTTTTTCT
GAGAAAAGGCATAATATTCTATTAATATCAGCTTTTGCTTCTTCCACCATATATTG
AAAGAATTCTGAATACTGTTATAATTTAATGGGAGAATCTAGAGAATTCTGTATTT
GCTTTCACTGCATTGATGAACTAAGATTTTTAAAAAATGTATTCTTCATAGAACTA
CTTTTCCATATTTACCTAATATTATTCTTATATCATTGAGCACATATTTCACTAAC
AAAACAAATGTGCAATGTTATTAGTTCTAACATCAAATTAACACTGATACTTTAAT
TTTTATCCTATTATTTTTTCATGCAGATTAAAATAATTATAGCTACATCACATGTTGC
AAGTTTTAAGAGCTACTTTAAAAATATATGCTTCAGGAAAGACATGATTAGATGGG
GAAATGGATGATGTTTCATATTTTCAAATGAAAAGTTTTAAAAAAGTGCCATCACA
AACACTAAATTTTTACATAAATTATCAACTACTAATATATCTACAAGAAATACCAT
TTTTCCCTACAAAACTCTTAACAATAATTGTTAAACTTAGTCCTGGAACCTGCTA
ATATAATCGGACAAATGTTGTCAATAAGAAGGTGAAAAAGAAAGCATATATAGTTT
ATCAAACCTATAAAATATAGTTTATCAAACCAATTTTTCTATTGACATTTATTCA
GGAAGGAAAATGGATGAGTGAAATGAACAATGGTCTCTAAGAGAGGTGGGAGATAG
CAATAAATTCAGACCACGTTTTCTGTCAATTACAGCAGGGAAGTAAAAGAGCTACAG
TCAACTCTCGAAAGTACTTGGGGGAACTAATGATTCCCTGTAGACCTGTGATGTTT
TTGAAATTTAATTCAACAATTTGATATACACCGCAAAGCGAACAGATAGTCAGATC
AAAATCGGAAGAACGATTGTCTGAATGGCATCCATTTTTCTTAGATGTGCTGTCCC
ATCCTGTGTCAATTAACTTTTCAAGGTGATCTTCAAACATATTTCCAAGTAAAAGGT
ATTGCAGTTATCCTATAAACTGGCCTCTTCCCCAGCACTGCTTTTGCTGTGGTCAAC
TTTATTTCTTTGGGCTCACAAAACCTGATAGAGCAAATAAGGAAAACGGAACATTG
GATTAAAATAAATTAATTCCCATTCTGTGACTCACTAAAAAAAATGATAACTAT
GCTTCTGTGAGCATTAAATAAGGAAATGAATAAGGAAATGACCAAATTGTTCAAGTGG
ACAACCTTGTATGGGATTTTTTAAGTATTGTGTCAATCAATGTTGTCAATTAGCAT
ATACTTTGAAATCAACTAAAGCAAATCAGTTGACTAATCATTAAGGGTCTTTTTTAA
ATGACAACATCTAAACAGCAAATGTTTTATTTTGGAAAATCATGACAGCACAAAGAA
TGAGCCAGATGTTTTACAACATGATATCCATAATTTAAAGTATGTAGTAGTCACTC
AAAGGATTTCTATTTTCAAGTTTCTTATGATTTGGCTAAGCTAGAATTTGGAAAAAC
ACTTTAAGGTAATGTGAGAAACAGCAAATTTCAACATGTGGATTTTTTTCACTAAAG
CTTATTTCTGATTATTTTTTTTACAACTTTACTAGGTATATGTTAACTTCATGACACT
TATAGCAGTGGACCGTAGTTTTTAATAAAATGTGAATGTATACTCTTTTCTCAATAA
TATTAAAGAATGTTGACTTTTCGTGAGGATATTTTTATTTTTCTCAACATTAAGAAGT
GTCAAAGATTTAATTCTACAACAGAAGACGTGAATTTTGTTTTCTAAAGGAGAACA
GAATCTATAGAAGAAGTGTGCTCATAGTACTCAGATTGTTGACCAATCTTAAAGG
AGAAACCGTCAATTAATTTACCGAGAAGTAATAACATTATCTTTTTCTTCAATTAT
GCACATCCACAAAGATTTGGGGCAAATCCACTTAAATGATATTATACATAATAGA
TGAGTATTCATATGTTGTAAGAGTCCTGGCTTCTTCCCTGCAAATGATTAAACCT
TGGATCAGAAACCAATTAATAAATCCATTCTAATCCCAAATGTATGTAAGTGTACT
ATAAGAAAAATAAATATTTCTTCTTGAGGGATATCCATTAGTTAAGGATATTCATA
ACATGGTGTCTTGTAGGAAATGTTAATCTTTGGGTGAATAGGGATGTTTGGGAATA
ACAAGACTCAAAGAGATGTTGCACTTACTCACTTTTCTCTGAGTTGTTATTTCTGTC
ATTTCCCCAGTGCGCCTGTCCTCAACTTTGCCTCTCTCCTTATTCTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTGGAGACGGAGTCTCGCTCTCTTGCCCAGGCTGTAGTGCAAGTGGTGCGA
TCTTGGCTCACTGCAACCTCTCCCTCCTGGGTTCAAGCAATTCTCTGTCTCAGCCTC
CCGAGTGGCTGGGATTACAGGCACCCACCACCGCCCTGCTAATTTTTTTTTGTAT

10

20

30

40

50

TTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATCTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCCTGACC
TCGTGATCCACCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACC
ATGGCCGATCCCTCCTTATTTCTTTTTATCTCTACCTCTGCCTCAATGGTATTTCTC
TATTACTGTTAGCATTTTGCTTTCTGTGAGCTCTTGCACACTGTCAGCTTATATACAT
GTTCTCTGTTACATGTTTTCTGTCCCCAGTGGTTACAACATGTCTTCTATCTCAGC
CCACTCTAGAATTGTCTTACTTTTCCAGGTCTCCTGCTCCTCAGTATTTTTTCCCCT
TTTCTAGATTTCATGTTTTTCCCATCTGCATATTTCTCTTCCATGTCTGCACTGTCATC
CGCTTAGAAGACAGCGCATAAGGACACTGTTATCTGAGCAAATCTTCAGCACAGCC
ACCATGAAGCATGGTTACCTTGTCACTTTCCATTTTTTCCCATAGTGTGTGCAAACCTG
CCCTGATCTGCATAGAAAGGTATCATAATTGAGGAAACAAAATGCACAAAAAATGTC
CTTGGTTATTCCACCCCTCAGAAATATAGGAGAGAAGTAATTTACAGAATTACACA
GAATAACGCTATGTCACATGGACATGGAGTTATCGGGTTAGCATATAATTGGAAAA
TATTTCTTAGGACCTTGACATTTACTCACTTTTTGTTTTCAAATTACATGTCCCTAT
CTATTAGTTGCAAATTATTTTAATGCACCGTTTACCAAAGAAAGGCTGTTTTCTTCTG
AAAGCTTTTCAATTTGACAAGTAACTTGTA AAAATATTACATTGTGTATCTGTTTTCC
CCTTCTAGTCCAAACTCTAGTTATCTTAAACTTTGCGCAGTTATAAAAAATCATAA
CAAAAAAAGCTTCCTCGTTGTCATTCTTGTCAAAACAGGTTTACCAGACTTAGGTA
AACTTAAAATAGTTAGTGTA AAAAGTTAAAAGCTGATTTGCTCCTTCCAGCGTGTT
TGTTGCCTTTTTTGCCACAGCAAAATTGTAAATGTAAACGTATTCCTAGGAGATGA
GCTGGGCTGCAATTTTCAGCTAATTGGGAGAAGCAGCCCTGAGTTGAGCACTGTCA
GGCTGATTTGAGTCTTAAGATATGATGATGATTATTGTGTCAAATGTAATCAAGAA
CGTGGGCTCTGAACTGACTCAAGGGCTGGCTGTTTTTAATTCAGGTTTCGTATATGA
AGTAGACCTCCGGTTACCGATAGTCACAGCTGGTTGTAGAAGAGAGCAATTTTTTA
AAATGCTATTTCAATTCTCTATGGAGCTCTAGGGATCAGAGATTGGATGCACAGGGA
GGGGACACATCCTCATTCTCTCCTGAAAAATTCTATTAATTTTCAGTATAATAAAC
TTTCTCTTGAGATTCCCCAGTGGCTCTGTATCGGTGGTTTTTCAAACCTTCTCAGACCC
AATGCCACCCCTCTTTTTCTTTTTTAAATAACAAATACTTTGTAATACCTTCTTTACG
ATTATAAGCCAAAATATGTAGACAACATACCCTACTTATACAGGCAATAGTTTAAA
TGATGCCGTAACCTCTATTTTTAAAGAGAAATAAGAGTCATTTATAATAAAATAATAT
GTGTTGTAGTATGCAGTTATTCAGGCAGGATCACACTGGAACACAAGTGAAGTTTT
TAGATCACGAGACTATCAATGCAGTATAAACAAATGCAGAATGACACCATTGTGTT
GTATGGAGACTCAAATACCATGAGGGGCATTGGTCATCCATAGCGTAATTTTTCCAA
AATGCTGAACAACCTCTTGGCAAAATTCCTAACACCATGAAATAAATTTTTTCTTGG
ATCGTTATGGCAGTTAGTTGCATGGCTGAAAAATTCAATGTCTTAAATCATGAGG
AAAATATCTTATGTTTACGTGTAAAATTGAGTTACGTTCCAGGTTTAGGTGTTTAT
AAACAGGGTTTCCACATACATGCATGTCCAGTGGGATATTCCAAAGTGCTGTCAGA
CTTGGGAGAGTTCTTTGTTGTATAAGAAGTCTACCATCTTCATTCCCTCTCCACAGA
ATGCTATTATAGTAACACTCTTCAATCACTGTGATAGTCAAATGTCCTCCCTCAATT
TCTAGGATGCCTCTTTTTTTTTGTGGTCTGTATAATTTGGTTAAATATCTTTCCAGAC
AAATACTGATTTGTGAATTAATGAAATAGCAGTATTTTTCGGAGCACCTAACCTATT
TCTGAGTGATACAGTTGCCATTTTTTACAAGACTAAATGAAATTACCATTTTCAGACC
TGCCAGATTGTCTAGCCCAGTCTTTTACAATTCTGTGATTATCACTGCAATTATAAT
CTATTTTCCACCACTTGAATGGCATGATCTCTATAAAAGGGTGGTGATAACACTCAT
CTATTCTCCTTCCCCTCACATAGCTATATCAATCGCCCCCTAACCAAGTTGTTGATAA
ATGCAGTTGAATTTTATGTAAAATTATAAGAGATATTATTGTAGCTGTCCAAGAC
ATTTAAAATGCTAAATGCAACTTACGTGGAGGCTATAAGAGAAATATGAACCCATT
TATTGAAGAGATTAGCTAATTTAGTAAAACAACACAGATATACCTGCATACAGGGA
TAAATCCCTATTGTCTAAATTATTGAGATAAAATAATGTTTTTACAATGAAAAACTT
TTAGACAAGTAGGTAAGTAAAATGCAGCAGTCTATTTGCATTTTCATCTGGGCATTT
GACAAAGTCTTTCGTTATACTCTTGTGAATAAGTTGGAGAAATACTGGCTAGATGC

10

20

30

40

50

AAGATAAATTGGATGGCTTAGAAGCCACTTCATGATTTTACGCAAAGGATGTCGAT
TAATAGACCAGTGTGAGGTGGTGATGGAAGATCTCTGGTGCTATGTCACAAGCTTC
TGTTCTCAACCCTGACACACTGGATGTTTTTACAGAACATGAGTAGAACTACAGA
GAGGAGGCCCATCAAACCTTATGGGTGATAAAAAGCAGGGAGGGCAGGAGTATTTTG
GGTGACAGAAGCCAAATGGGTGTCTGGACAGGATGCGTTTTAAGGCACTTTTGGTA
CTTGATGTCTGAAGACCAGGATCAAACCTTATAGGCAATCTGAACATTTGCCAAAT
AACAGGTTAATTTTGACAGAAGTTATTATTTGTATGCTGTCTATTTCTTTAATACAC
CTAGAAAGTATTGAAATAACATTTTTTGCAGACACTCATTTTGAAAATTCAGAAAA
AAAATTGTTAACTTTCTGTTGGAAGAGTAACAGAACTCAGTCATTGACAGCTAAATA
CAATGTGTTGCCAGTAAAATAGTCCACCCCTTCACTTTTCATGGCTAATATAAAAT
TTGATGAAAGATACAAATTCCAAAGATTGAATATCTGTACATTTGCAAAGCAAAC
ACAATTTTGGGCACAGAATTGCTCATTCTCATTTTTTAAACATCTTGGTTATAACTGA
ACAATAGTTTTTTATAACAAAGATAATTTTTCAAATTATTATGAGGTTCAACTGA
AATAATTTATGTGAAAGCAATGTCTAACTCTAAAATTCTATATAAATATAAATTA
TTATTCAATAAATTACATCAAGAAAATTTTAAAGTTTTTTAAGAACAAGAGCCTAT
GGCCTTGTTTTTAGAAGCTGTATACCTTATCGGTAGTAGGTTTATTGACTTTAATTA
AATTTATTGAGTATCTATTAAATTGCCAGGAACTGTGGTGTGAATCTTTGCCCTCA
AATAATTTACAGTAAGTTGTGGTTGATGAATGGTGATGACGATGATGAATATCCAG
ACTATAG
TAAGTGGTATATTCATAAGTCAGAGGATTCTTAAAACCAGATGCACCCTCAGATTC
ATTCCTTTTCATGTTGTACTTCTAATTGAAAAAATAAATCCTAAATTATGACTGTTC
TTTATAAATTTTAATTGATCTTATAAAAGGCCATCAATACATTTCAAAGTATCTAG
GTCTTTTAAATGCAATTTTTACCCCTGGTAATTAAAAGTACGAAAGCAAGAACTT
TAAATCTTTATTTTGATAAGTTTTAATTAGCTCAAGCTACTTGTAATCCACATCTT
GTCTTGTAATCATATCTGAGCCATTAAAATAGGTTTACAATTAGAAGGGCAATTC
TTTTAGAATCTACTTAACTAAGTCACTTCGACAAATTAATTCATCGTTCAGTTGGT
TTTATTAAAATGTATTTATTTCACTGTAAAATGTCTAGTAAAGCAATGTATGAAGT
ATTTTATTTTCATGTTAGAAATTTTATGTAAAAGATATCCCAAATACATAGACAT
TCAGATACTCTCTGTATCATTAACCAACATTTACTAACTTATCATTTAGAGAAGGC
CAAATTTGTATGTACTATAACTTTGTATAATTTTATAAGAATTAAAATATTGATT
AATGCCTGTAATGCCTTCTTTCTAAATCAAATCCTCAAGCTTACCTCGAGTTCAAA
GTTGAGTATTTATTGTAACACATCTCATAGATGACGGATGAAGATGGTAAGCAAAG
GAATAATAATTTCTTTTCTTTTCCACACATATATACACACATACCCCATATCCTA
ATTCATATAATAATAACAGAAAACAAAGGGCTTTTGAGAATAGTGACATATTAATA
TCCATTATATTTACTTCACAGGGAGACTGGCAAGTCTACCTTGAGAGGTAATGTCT
TATAGTACAGTGGACTAGATTGTTTCAAGATTTGTCTATTTATTTTGGCAACTCACCC
AGCTTCCCTGAAAGTTAAGTTCCTCATCTATAAACTGTTTCATGATAATTACAACCT
GCCTCATTAGCCTCATCAAGCTATTTAAAATATGAAAGGAGGTGCTATCTGTGGAT
CCTGTCAAAGGAGCTTGAAAACCTGCAGAACATTATTTTAGTGTAATACTATAAC
AATACATGTTGAATATAAAATGGCTTTTTCTTAACTTTTATTTTAAAGTTCAGGAGC
ACGTGTGCAGGTTTGTATATAGGTAACTCATGTCTATGGGGGTTTGTGTACCGA
TTATTTTGTACCCAGGTATTAAGCGTAGTACACATTAGATATTTTCTTGATCCTC
TCCCTCCTCCCACCCCTCCCCACTCCAGTAGGCTTCCACGTCTGTTGTTTCTCTGT
GTCCATGTGTTCTCATCATTTAGCTCCCACTAATAAGTGAGAACATGCAGTATTTG
GTTTTCTGTTCTGCTAGTTTGTCTAAGGACAATGGCCTGCAGCTCCATCCATGAT
CTCTGAAGAATCTCCACACTGGTTTTTCACAATGACTGAAATAACATACACTATAAC
CAACAGTTTATAAGCAATGCTTTTTCTCCAGAACCTGTTATTTTGAAGTATTTAGTG
ATAGCCATTCTGACTGGTATGTGATGGTATCTCCTTGTGGTTTTGATTTGCATTTCT
CCAATGATCAGTGATGTTGAGCTTTTTTTTCATATGCTTGTGTTGGTCGCATGTATGTT
TCTTTTAAAAGTGCTGTTCATGTGCTTTGCTAAAAGGGCCCTTTCAAATGTGTAT

10

20

30

40

50

TATTAACCACAAGAGAGTACTGAGTAAGAGACTAGGTAATAAAAAGTCACAAATATT
TCGATATCATAATTTCAGAATTTAGATCAGCGGTTATGAAATTGTTTCGTATTTCCAA
ATTCCACTGACAGGACTCTACTATAAGTTTATTTTCATCTGTTGATATGTTTTTAGCC
ACTTCTTTCTTTTAAAGTGAATCTGTTGTGTGTTTGCCATTTGATATTAGAAAAGCTG
AACCTGCCTGCTTTGCTGTCTTCTGAATATTATGTATCAACAACCTAACAAGCTACA
GTTAGTTGTTTTGTTCTGTTTTTCTCTAAGTTATTGTGGATGAGGATATATATAACT
GCACAGTCTTATCAGGTTTGTAAGAGATGATCTTAGGCTCATCTTTTAAATTGGTT
TTTATACTATTTTAAACAAATCCTTTTAGGAGAGAAGAAAAGCTGCTTAGTCTATC
AACATTAGGAAATATATCTTTAAAGAGTTTATCACTGCAAGTAACCAAAGCCAACT
TAAAAATTTCGCATTATACAAATCATTGAGAATTTATTTAGAACAGAAATGTGTCCA
ACTATAGGTCAACACCAATTTTAAAGTGTGTAATTATCTGGGAAGTAGTGTTAACTG
CATTTTTTTCTAAAGATCCCTTACAGTTGTATAAATGCCCAAAGGATATTTTGAG
TCTCTGTATATTAACCAAACCAAATGTAATTCATTACTCCCAACATTATATTTCAAC
CTCTCCAAATAGTACCTTTTTCGTATTGTATCAGCAGAAAAATATAAAATGCAGATC
TTAAAGAGTATCAATCTCTTTAAAAAATTCAAGAAAGAAAAAAATATGTGTGTATAG
AGACGTGTATTTTCATCTGCTCATAACACTGTGTACATTTCTTTATCAACTAATTTTT
TTCAGTGATTTATGAGTTGAAATACAAATCAAATGAAACGGGTAATGCAAAGTAAA
GTAGAAAACACATTTTCTACTGCTGTCTCCTAATGCAGGTCTTTTCAGGAAAGTAC
TAATGGTTTTAGGGAAAGTGTATAATTATGGTTGTTCCCTAATGATAAATTCGCA
AATCTCTATTTTAAAAACATTCATAAGGTTAAAAAAATGAGAGATGAAATGTGTCT
TTCAAATTCCTTACGTGATTGATAATGCCTATACTCTCTTACTATCTAAAGTCTAG
GTGATATGTATATTTTTTTTTAAAAAATAAAATGTCTGTATCAGTGAAGGAAGTTTA
CACAGATAGCTTCAAAGCTGTGGTTTATCTTTGGAGGATTAATCTATTTCTCATGC
CAGTGTGTTGCTACTGCACATGTTAAAAAGTCATCCTGTGGTGTCTGGGGTGACAA
AAGATGGGAATGAGTTTTCTGAGAACTAATCAGCAATACTTTGGGAACATTTAGGT
CATGGTTTCCAATTAACCTCTGGAGAGTTTGAGTAATTTAGTACCAGACCTCAAGAG
AGAGGGGATGAAAACCTCGTTAATTCATATGTTGGTGAACGGCAAACCAGCAAATT
TGCATTAAAAATGGATTTTTATTTTAAAGCAAAGAGCAGCCAGATCTTTTCTGCAA
TAGTTTGGGTAGGAGAATATCTTTGTATGTATGTGTTCCCTTATGTGTAGGTATTTG
TATGTTTCAACGACCCTGCATATGGCAATAACAGAAAATTAAATTTGTGCTCTAAA
ATGAAGACCAGGATTCAGTGACATAATCTTCCTTGTGCCTTTCTTTCTTTTAGTACA
ATGAATATATCAGAGAGGAGTGTATTCCAATATCTGTCTTCAGAGTTACAAAACT
TCTTTTCTAGAATGCAAGACTTGGGCTATACCCCCAGCTCTGCCACTTAACTTGTAT
ACAACCTTGGGAACATCATTACAATTCTCTCAGAATCAATCTCTCCAGCCCTAAAA
TGAAACCAGCAAAGCCTGTACTGTATATCTAAAAGGTTTTTTTATTTTTATGAAAA
TTAGTTAGGCAAACCTTTTGTTAAGCATCCATCACTCTATTTTGAGATAAAGCCTTG
CTGGATGATCTCCACCTCTTTTGATGGAAAGAGTAAAACATGTTTAAGATACATTT
ATCACTTGTTTGGCAAATTGAGATAGAAGTTTATGAAAGCAGATTGATATATGTTA
CATTTGAGCTACTGGGAAGGACTCCAGATGGTTTATAGCCTTAATTACATTGTAAC
TCTAGTTAAATGTTTACCTATCTGTACCCTCTGTTAACTTGAATATGTTAAATACC
AAAGTCCATGTATTATTGGATTTTCTGTCAACCATCATCAGGCACAGATCCTGGTAC
ACAATAGGTACGGAATGGATGCATGGATGAATTATTGAATTAGATGTTGGTAGGCA
TGTGGAAATAAGAATGAGGTTCAGAATTAAGATAATCTGTATCGAGTGTAAGCC
ATTGGCAGAGAATGAAATATCCAGCTGAGTATACATAGAAAAAGAAGGTAGGTAGA
AAAATGGAAAATATCTTATGAAGTGATGATAGAATAACTCTGAATATGTTTGAAAA
CATATAAAGAGTTATGTGGATGTTAGCTTTAAAAAATTATCTTCCATGCTGTACATT
AGATCTGCCATTCTTCATGCTGTGGATGAAAAGCAAGCATCAGAAGTTAAATTAAA
ATGATGTCATATATTCCTCGCCTTACAGTTTCATAACAGAGGAGAAAAGAGAAACA
TTCTCTCATTGCCACCACCCTTCTCCAGTCATATTTCTAGGTAGATGTTGCCCAAAA
ACAGATAAAACCACAGAGTTGGTTTTGCTAGGAATGGACTACTAATCCAGGCAATG

10

20

30

40

50

TTGACAGCTTTTGCTTCTCATTAGTGACGTTACTAATAGAATTGCTAGAGATTAA
AAGGAATCCTTTCTACAAAGTGCTGTATATCCATAGGTGACAAAATTCTAGCTTCC
CCTCACAAGTACAATATAAAGTTATGTTTTAAAATCAAAATGCAATTTACTAGCAA
ACTAGTAGGAACTGTTATGGTTACAGGAAATTTGAATTTTCAGATTAACTCTGGTTC
TATGAGTAGCGGTTGATATGGCAAGAATCATTTTGATCTTACATCCAGGTGCTACT
AAGGTCTCTCTGACCTATATCTCACCAAAAAAAGGAACAAAATAATGATCCTTTAA
TCTTTCTCCTAAAATATCATAGGAAATGATAGTGGCTAAATTGCAAATAAACTAGG
AAGGAAAGATTTCAGAGTATTTTATGTGATTACTCTATAACAATGCCAGGCCATAGT
GAAAGTGTTATTTAGCAGAAGACTGAGTTCTTTGAATGTTCCCTAATTTATCACATT
TTAAAAATAACCTGGGCAAAATAACCTTTTCATATCAGATTGAGCCTTTTTCTAAAA
ATACTCAATATGTTTCTGTAATTATACCTACACACTTACAATTCACAGTATAATGC
ACCGATAAAGTATTTTTTCATCCATATATCTAATAGTAGAATGGTGTGTATACAATA
ATTAAGCTCTTTAGGCTTACCCCGGAAAGCAACAAGTTTCCCTTCCTTTTTCTTTT
TATGTATTATGTTGGCCATAAGAAATTGATGATATTCAACTCAATGCAGTCTTAGA
GATTTATTCAGAAATACCATGGTGTGTGTGTGTGGCGGGAGTAGGGTTCTAATGAC
AGGTCAGAACTTACTTATTTGATTTCTTCATTGATAATCAGGTCTTAAAAAGAAAA
TGGGTATGCTGAAAACATGCCTTCTGTGATTCTTTACCTTCATGTGCAGTTGTCTCT
GGATAAACACTTTCTTTGGCACGTATAGGGTTGCACTAAGCTTTATAGCTCCAACA
CTCCGCCCTTCAGTAGATTCTTGCTTGTAAGTGTGATAATGCAAACCTGTATTAT
CTATAGGTCTCCTTAAAGGGCAACCAAAAGTTTCAGTAGCAATTCAGGCACAATTAC
TGCATGTGAGAATCCTCCATCTTGTTCCCTTTGGAGACCACATATATTTCTTAGGCA
AGTATATTTTTTAAAATCCTTGTTTCAGCATGACAATTCAGGAGGTCAAGTTCTCCCA
GAAAGCAGATTCTGAGAAAGTGATTAGCATGAAGGAATTTTATTGGAGAGTGCTCT
CAGGATTAACACCTGTGAGCGGAGGAAAGGAAAGGGAGCAGGATTGGGCAGAAAGGA
GAAGCTGGGCTACCATACAGTCACAACCTACAACACAATCAACCCTCCGCCTCTCCT
TCCTAGCCTTCCCCAGGAGGATCTCTGAAGTCTGAAGGTAGAATAGCCCTTCAGAA
TTGTCCTGAGTTGCAGCAAGGGACCCAGGATTTTATACCCCACTCTCCCATCA
ACCAATACGTGCAGCCCGTCTCGGGGACATAGTGGGTAACTTTGGGCTAGGCACCT
CTCTTTAGCTGAGTCCAGCTCTCAGACAGGAATAACAGCTGAGGACTGTGAGCCAG
TAGCACTACCAGCAGCTGGGGTCAGAAAGTATTTTCAGTCCTGAAAAGGGGTCCGGGC
AGCCCAGCTTAGCATCTACTATGCCAGTCGTTCTCAAATCTGGTTCTGGCAACTG
TGATTCTCAAGCTTTAGCATATATTGGAAGGCTTGTTAAACACAGCTTGCCGGAT
TTTACCCACAGAGTCTCTGATTCAGTAGAGCTAGGCTGAGGCCTGGGAATTTGCAT
TTCTAATAACTTCTCAGACGTTGCTGGTGCTGCTGGTCCATGGACTATGAGAACAC
TGTTTCATGCTGCCCTTATTTACATACTGAGAATGGTACACAGTGCTCTTATGAAT
AGAATGAAAACCTTTTTGAAATCACATTATTCCTTACTCCATCAAATTCTCAGCTATT
TTTGTGCACCATAAAGCTGGAATAGCTGATTATAAACTTTGTTATGTAAAAAAGT
ACTTAACCAATACAGTAGATTCTGTTTGCAAAGCATTATTACAGTTTCTAATATCT
GGTCATTGTTACTTGTAATAATTCAGCCAAATTTTCTCCAGGGCCTGTAGTTTGATA
ACTTGGACAAAGGAATTTAAAAAAAATCTAATTCAGACCTTTGGTTTTTTTTCT
GAACATATCTTTTTTTTTCTTTATGATTCTTATTTTTTACATTTTACTTATCATATAAG
CCACTTAAACCATATGGTTCGGGAAAATTTAAACTATATGATACATTTAGAGCA
TGTTGAATGCACAGATATGGAAATTAAGTATTCTTGACTCATTCTAGACTAGACCT
GGCACAATTAATAATTTAGGGATTCAACGTACACACACATAGATTCCGAGAGAAATG
TTGAAGCCGTAAAACCCCCACACAAGCAGGAAACAACAGTCTTACCTATTATTCAA
GAGGCACGTAAAGGAGCTCATTTGAGGAGATTTTCTGCTGTTATTGCCATCGAATT
TTTAACGTATTTTCCAAATTAGAAAATATTTCAGCCTGATGTTGTCAATATTTTCA
CCACAAGGGTATCATTTAGGAAAATGGTTTCTTACTGTCCTGAAAGAGTTACTGTT
CTTCCCTAAGGGCCTAATTTACAAAGCAGCAAACCTTGCTGGTAGGATTTGGCTGAA
AATCACATTGTCTCGGTAGAACTCTTTCATCTGATTTATGTGCATTGCATTTTGCAA

10

20

30

40

50

ATAACTCTTGGAAGTTATTTACTAGTTACTTTCTCTGGAAGCAGAGGGTAAGCGG
CATTTCTAGTTTAAGGATAGAGGAGCTAAGATGCATCAAGCGCAGCTCATCATGAA
GCTGATGCTGATAAAATGCACAATATTACATTCTCTAAGTTTCACTCTGCCATGGG
AGAATTTTCATATTTTTTAAATTTTGTGTTGAAATTGGACTACATTAGAAAATATGTCA
AATGTCTAACCCTGCATTTTATATTCTGGAATGTGACAGCTTATTTCTGTTCCAAATT
TTGCACTGGAGATGGAGTAAGTCTTAATGCAAACCTGCATGAAACTGCCACTTTTAT
AGGTACACCCAGTCAATTGTCAGCAGTTACACATGGTTCAAACCTGTAAGGTGTAT
GCCCAATTGTAGCATTGAGATTCGTGGAGTTGTTGCAGTGGTTCTGAATTTTTCAA
GCATGATACATAAAAAGATAAATGACTCTTTTGATATTTCTCCTTGCATTGATAGT
TTGCCTGAAAACCTAGATAAGCAGGGAGCCGGCAGTCCACGTTAGCCCTTGAACCTAC
ATGAGGTTTAATTTATTTGCCCAACCAGAACCCTACACTACCTTTTCACTGTGCAG
TATTAAGTTTATTTAGGAGTTGATAAATAGCTTAGTGCAATGCTTCCTTTTTTCCA
GTAGCTACATCCTCATAAACCTATTCTACCCTCCACCAGTTAATGCAGACAGAAGA
TTTTTATCCAGTATGAGCACTGAAACTCCACTGTGGAAGACTGTGTGCTCAGCAAA
AACCTCACCCATGATGAATAAACAGCTCTTCCGGGGGCTTTGCTGCCGCTGGCTCG
GCAGGAGTTGTTTATTGCCTGGTTTGCACATCCCATGATAAAGTTGCTGCTGAAAT
AAATTGCAGTTTTGCATAATTATTGACAATCACATCTTAACAAGCAATGTGTATCA
TATTCAAGTGTTCAATTTTTTAAAATCCATTTTATGCTTATGTTTAATCCCAGAAAG
TGTTTGTGTAGTAATAGAAGGCAAATAAGACATTTAAATAGAGTACTAATTTCTC
ATTGCAGACAAAGTTTACCTGAATCTTTTTCCATAGGACTGTTACTGCCTAAGGCA
ATTTTCCTTTCTAAGCTATTATTATATAGATATTTGCTGAGGGCATATGTGTGTGA
TCCACAATACATGCATTTTATATATATATATATATATATATATATATATGATCAAAAATA
TGAATACATTTTTTAGAGTTTTTGTTCATGAAAGAGTTTTGTTTCATTTTTTAAATAT
TACAGGAATGGGGAAATGGGATATGGGTAGAAGGAACTAATGTTTTTGAGTAACTG
TAATGTATAACTGTATAACGTGGGGCACTCAACTTCACAGGAATTTTTTATTTTAA
TTCTCATCACAGCAATAGATATTGCAGATGAGAACTGAGAATCAGAGAGGGAACT
TGCCATATCACGTAAGTGGTAAAGAACACTGGGAATTGAACTCAGATCTGCCTAGT
TTTTAAAACCTCTACTCTTTTTTCATTACACATAACATTTTTATTTTGGAAAATGTTCT
CAGTTGTATGATCAAGTAGTTAAATATGAAACTAACACAATAATTATAACTGATGT
CATGCAAAATGATAGTTTGCACAAAATGATAGTTTCTATGAAATGTTATTTCTTTA
CTTGTTAAGTCTTTCTTCCTTTGCCCTCCAATCCCCTTCTTTTTGTCTTTTCCTCTA
GTCTTTTCCTTTTGATTCTAGGTTTGTATTTCTTGACTTTTCTCCTTGCATATCAA
ATCCTTGTTTTCTGCCTCAGAGCAGCATCAAAGACAAGCATGGTACAGGGATTTTA
GGGTTTTAACTATAAAGGTTTGTCTCAAATTTGGCAGTATATTAATAAATAAGCTTT
CAAAATTGACCAACAAAACTACAAAATTGAAAAAAGGTACTTTGAACTTTCACA
TGTTCAAATATATGTATATATATTTTACATATATATATGAAACCTCCTCTGTGGAG
AGGGGTTTATAGAAATCTGTAATTGTCATTCTTGATGCCTTCCCCCATACAAACG
CCTTTAAGTTAAATAAAAATGAAAGTAAATAGACTGCACAATATTATAGTTGTTGC
TTAAAGGAAGAGCTGTAGCAACAACCTACCCCATTTGTTGGTATATTACAATTTAGT
TCCTCCATCTTTCTCTTTTTATGGAGTTCACTAGGTGCACCATTTCTGATATTTAATA
ATTGCATCTGAACATTTGGTCCTTTGCAG(配列番号2145)

10

20

30

40

50

【0207】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン54標的配列1(NCBI参照配列:NG
_012232.1のヌクレオチド位置1686621~1686670)

GTATGAATTACATTATTTCTAAACTACTGTTGGCTGTAATAATGGGGTG(配列番号
2146)

【0208】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン54標的配列2(NCBI参照配列:NG
_012232.1のヌクレオチド位置1686641~1686695)

AAAACCTACTGTTGGCTGTAATAATGGGGTGGTGAACTGGATGGACCATGAGGAT(

配列番号2147)

【0209】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン54標的配列3(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1686710~1686754)

CAGCTAAACTGGAGCTTGGGAGGGTTCAAGACGATAAATACCAAC(配列番号2148)

【0210】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン54標的配列4(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716672-1716711)

TTCTCTTTTATGGAGTTCACTAGGTGCACCATTTCTGATA(配列番号2149)

【0211】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン54標的配列5(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716498~1716747)

GTTTATAGAAATCTGTAATTGTCATTCTTGTCATGCCTTCCCCCATACAAACGCCTTT
AAGTTAAATAAAAATGAAAGTAAATAGACTGCACAATATTATAGTTGTTGCTTAAA
GGAAGAGCTGTAGCAACAACCTACCCCCATTGTTGGTATATTACAATTTAGTTTCCTC
CATCTTTCTCTTTTATGGAGTTCACTAGGTGCACCATTTCTGATATTTAATAATTGC
ATCTGAACATTTGGTCCTTTGCAG(配列番号2150)

【0212】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)イントロン54/エクソン55接合部(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716718~1716777)

AATTGCATCTGAACATTTGGTCCTTTGCAGGGTGAGTGAGCGAGAGGCTGCTTTGG
AAGA(配列番号2151)

【0213】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、転写変異体Dp427m、エクソン55(NCBI参照配列のヌクレオチド位置8272~8461;NM_004006.2;NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716748~1716937)

GGTGAGTGAGCGAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTCATAGATTACTGCAACAGTTCC
CCCTGGACCTGGAAAAGTTTCTTGCTTGCTTACAGAAAGCTGAAACAACCTGCCAAT
GTCCTACAGGATGCTACCCGTAAGGAAAGGCTCCTAGAAGACTCCAAGGGAGTAAA
AGAGCTGATGAAACAATGGCAA(配列番号2152)

【0214】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、エクソン55標的配列1(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716757~1716809)

GCGAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTCATAGATTACTGCAACAGTTCCCCCTGG(配列番号2153)

【0215】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、エクソン55標的配列2(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716821~1716887)

TTTCTTGCTTGCTTACAGAAAGCTGAAACAACCTGCCAATGTCCTACAGGATGCTAC
CCGTAAGGAAA(配列番号2154)

【0216】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、エクソン55標的配列3(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716891~1716937)

TCCTAGAAGACTCCAAGGGAGTAAAAGAGCTGATGAAACAATGGCAA(配列番号2155)

【0217】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)エクソン55/イントロン55接合部(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716908~1716967)

GGAGTAAAAGAGCTGATGAAACAATGGCAAGTAAGTCAGGCATTTCCGCTTTAGCA
CTCT(配列番号2156)

10

20

30

40

50

【 0 2 1 8 】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン55(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1716938~1837156)

GTAAGTCAGGCATTTCCGCTTTAGCACTCTTGTGGATCCAATTGAACAATTCTCAG
CATTTGTACTTGTAAGTGAACAAGCCAGGGACAAAACAAAATAGTTGCTTTTATACA
GCCTGATGTATTTTCGGTATTTGGACAAGGAGGAGAGAGGCAGAGGGGAGAAGGAAAC
ATCATTTATAAATTCACCTTAACACCCTCGTCTTAGAAAAAGTACATGCTCTGACCA
GGAAAACATTTGCATATAAAACCAGAGCTTCGGTCAAGGAGAACTTTGCTCAGAG
AAATAACTTAGGGATTGGTTTATTAAATTTTAAAAGTTGACATTTTTGAGTGTTTA
TTTAATATTTTACAGGGAAAGCATCTGTATGAATTGTCTGTTTTATTTAGCGTTGCT
AACTGAATCAGTTTCCCTTCATTACTTTCAAATATGTTTTGAAATGTTAATCTGGCA
TTTTGTAGCTTTCTTCCTAACATGATCTGTGAAAATAAGAATGAGATGGCTGAATT
TGTCGTAGTTAATGATCAAACAATTTTCAGACAATTGTTTTTCCTAGAAACAAAAA
TTATTTCCATAAAGTTCCATATGCATAAACAGTGAAAACAGAACGTGGGGTAGTTT
TGTTTAAATGAAGTCTTGGTGAGAATCATATTCTGTAGTACAAGGAGGCTCTTAAA
GTTTATTCTCAATACCTGATATAATTTTCCTGAACTATTATGGAGTTTTGTTATGTA
TAGTTGGTTTTTCTGACTTGATATAATAACTTTACTAGTCTCTCAAATACAATTTGG
ATATAAATCATTATAATAAGATGATTGATTTTTTAGACTAACTTTATTTTTTGATAT
TTTTAACTATTATGAAAAACTATTATGAACTATTATGATATTTTTTAACTATTAT
GAAAAGTATATTCTAGTTTGAATAATTCCAGAATCAAATCATAATAAGCAGAAGTT
CTTCTCCTCTCCCTCCTATCGTTCTCCTTCTCCTGTTTTTCTTTTTTGATATGATAG
TTGATCTACTTTGCTGCTCTGTTGCATAGAGTACGTAACAGTGGCAATGTATGGCT
CCTGAATTTATCGTTCTTGCTTCATCATCCTGCTTTGACCCCACTTTCTCCTCCAAA
ATGCGTGTTGAGTTAGTTTGATCATTTGGAGGTAATTTGTTTGGAACAGTATCAGA
CTTTATAGATATCTCCCATGGCTTGATAGAAATATAAGGGCAATGCAAATGTAGA
GTTTTTTGCTCACTCTTCGATGTATGGTTAGACAATGTACCACTGTAATATATTTGG
CTTAGGCTATTTCATAAATAAAATTTTATTATAAAATATTATAAATGCTGATAAAG
CTACTCCAGAATTTTAATAGATATGTGGGTTTCCCGGCCAGATGCGGTGGCTCATG
CCTGTAACCCCAAGCACTTTGGGAGGCGGAGGTGGGTGGATCACCTGAAGTCAGGAG
TTCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGCGAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAA
TTAGCTGGGTATGGTGACCTGCGCCTGTAATCCTAGCTACTTGGGAGGCTGAGGTG
GGAGAATCGCTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGGTGGCGCCACT
GCACTCCAGCCTGGGTGACAAAGTGAGACTTCATCTCAAAACAAATAAATAAATAA
ATAAAATAACATGGGTTTACATTTTACCCATCAGCTATGGTAGGTAAATAATAAGC
TTTGATTAAAGTCTATTTTAGTCTATTTTATAGCAGATTACTTTGAAAAATAAGAAT
AACCCAATGACTAAAAAATTATTTTATGTCAGGGATTTAATAAAACATATCTTTAA
ATCTAGTTGAGGGCAAAAATACGTCTATTTTCTACTATACAATTTGTATTTATATCT
GCTGTATTATATAATGAAAATTTATCTCTATTTCTAATCTCAAGAACTGCAAGCT
TCTGAATCATTAAAGGGAAGATTCACCATGTGTCCTAACTATATTTACTATGGAAG
CATGGAAAATAAATATTTTATGTTTAGATTTCTGATCTCTCTTTCAAAGCAGTTG
GAAATTATGCTGAGAAAATGTCTTAGCTTATCCCATGTTACTCAAGAAAATGTATT
TATTCGTTTTTGTCCAGTGGCTTAACCAAACCACAGTTTATTTGTTGCTCACATAAA
GTCCAGTGTCGATCAGGCTACTCTTTTCCATCTTTGAGCTAAGGCACATATTACAC
ATAACTTTTCAGTGTACCCGAGGTAGAAAAAGAGAGAGCTTGGAATAAGGCAGGGG
CTTTTTACTGTCTCAACCCCAAAGTGATAAACTACATTTATTCTCAAATCCAGAT
AAAACCTCCCATAGAGCCTCTGAAAACCTCAACATTTGCGTCTTAACTATAATAAGG
TTAACTAAGATTCCAAAATTATTTTAAAACAGAGACAGTTTCCCTCTTCCCTGGCA
GCTAATATTGTATTTTCTATAAATCCAATTGCCCCAAGGTTTAACTACATTTTATGG
ATTGAAATGACATTTATAGCCAACCTCCTGATTTTTTAGTTAGATGGTTGGATAATGA
TCTTTTGATGAAAGACTCGGAGATGTCATGGTAAAACGGTGAACCTACTGAACTAT

10

20

30

40

50

TGATTATTGTTAATGGCACATTTTCAGCTGATTGAATTGAGTCAAGAACTGGTGT
GAAGAGCAACAAATGGAAATGCCGAGCTTGAAAATAAATAAAGCAGCATACCTTAA
GAGATTACATGCAATTTTCAGTATTTTCAGCTAAATGGAAGTGTTTGCTTTTTTTCCTC
TATGAATTTTTATTTTGAACAAAAGGAATTTTCTATAATATGTAGGTAGGAGAAAA
GTGAAATGGCATGCTTTTTTCACTTCATTTGAAGAAGCTGGTAGCATTGTATTCTATA
GATTCATGCTGTATAGCAATCATAGTTCTCATATATTAAGGAAATTTGA
AATGCCTAGCCAAAGCAACAGCTCTGCCAACAGATTTTGATATATCTGTCTACCCC
AAAAGTAGTGATGATTTACTTCATACAAATGCTAGTGAATGAAGAGAGAGGGTGAA
AACCTTCACAAAATGTGTTTTTCTCTAAGACTGTCAATCCGTTTTTCTATATATGGA
GACTCCAGCTCTTGCTAGACTACCTATCACTTTCTGTCTATCAGCCACTTCGTAAGAT
ATTTATTCTCTCAGCAATAATCATAATTCATAGATTCTTTAAACATACATGTAATAT
AAAGCATATACATTCTGAATGGAATTAACATGATTAATTCTTCTCTGAAAGACATT
AGAATTTCTCCCGTATTATAAAAAGGTGTAACCTCACTTTCTTACTAAAATCAAG
AACTTTACCGTCGTCCTTGACTTCAGGATAAGGGGGTGTTTCTTATAAATATTGTT
ATTTCTGATATGCTAACTGGAATTTTTTAAGCAAATGTATTTTTATAGAACGCCATA
CAAAGCCTTTAGGGGTGAAAGTTTCAGGATTTTTAAATTGCAGATTTATCCTTTAA
ATAAAAAAACTATATTCGTAATTGAATCGGATTATTTCTCTATCCAAAACATTTTC
TGCTTTGGGCCTAAGAAGAGTTGACAAAGCTGTTTCATGGTTCAAAGTACTACCATA
AAACCCTGGGTAACCTGAAAATGGAAAGACTCTGTCTTTCTGAATATTTTACA
AGAGTTTTCACAAATATTAAGTGTTCTCTAAGTACCCCTGAGAGATCATTGTAATA
TTAGCTTGTAAGACAATGTGGGGGTGTGGGTATGTGGTGACCTTTATGATGTTCA
TAAAGGTGGTGTAATTAACATATTTTTTCTCAGCAAGACAACTAAGGAGCAATAAA
TATATGAGATACCTTCATCTGTGATCTGGGTCATGTCTCAGGCCATATCTTTCAAAT
CACTCCCTTCCCTAATCTCGTGTTTTACCTACGTCTCCTCTCAATCCCCCATTATA
AAAATTGTCTTCTGATGAATAAAACATTTCCAGAGAGACAAGTTTCATAAAGTTTG
AATTGTACATCTGAGTACACCTATGAATTAAGATATCTTTGATTTCTAATATGTTAT
TAAAATTGGGTGTGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCAGAGGC
GGGCGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACCATCCTGGCCACAAGGTGAAACCCCC
GTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGAGTACGCCTGTAGTCCC
AGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCAGGAGGTGGAGGTTGC
AGTGAGCCGAGATGGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGTGAAAGAGCAGACTCTGTCT
CAAAAAAATAAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATTGGAGAAGTTTCTACCAAAT
TTTGGCGCACGGATTAATTCTGAAGAAAGAAGAAAGAATGCAATCTTAGTAGCACA
ATTAGTACCTTGAATAAATTGGAGTATCGTATTTCTTGGACTATCTGAGAATGCAG
AGGCAATTTAAGGATCCCTAATTCTAAGGAGAAGAAACCTTTAGTGATTCTCTCC
TGTTGCTTTAGTTTGAATTGAGTTTTATATGTATTTTTTAATCTTTCTATTTTGATT
GTTGTCTAAAGAGTGTAAGTGAAATTTTGATATTTTTATTTTGCTGGCGATGAA
TGCCTTCTGCTCTGGATATTTAAAAATTATATACACATATATGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTATATATATATATATATATATATATATATAAATTTTTCTGAG
AACTTTTATTAATTCAGCGTATCTTTGCTAAACACCTGCCATGTGTCTGTGGTGTAG
GTCTGGTGATACAAACATGTTTCAGAGAGATGATTTTCTTTCTTTTTTGGGGGGTGG
GTAAGGGAAAGAAGGCTTATACAAACAGAATCTTATTTCTCACAGTTCTGGAGGCTG
GGATTCCAAGATCAGGGCCTGGTGAGGGCCCCCTCTTCTGTTTGCAGATGGCTTC
CTTCTCTCTGTGTCCTAACATAGCAAAGAGAGACAGAGCTCTGATGACACTTCCTC
TTGTTATAAGGGAACTAATTCATCATAAGGGCCCCAAGAAAGGTGCTTTTTCAAAA
ACAGTTCAGTAAAAGTACTGGGTTGTATAATCACTTTAATGAGTATCAATCCATAT
TTTTAAGATAGAAATGAATGAAATTAGTAAAATAGAATAGAAATAAGGAGTCCATC
ACTTTTAAGTAAGTTTCAATATTGTTTCGTAAAACCTTTGGTTCGGTGGTGTGTGTG
TGTGTATTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTGTCTGGTGGAATACTGGATCACT
TTGTAACATATATTCAAAGCCTCTGTATTTTAACATTATTTCTGCCTTTGAGAGGT

10

20

30

40

50

TCACATTCCAGAGGTGAAGACATACATCCTAAGACAAAATTATAATAGCATTATGA
GAATTACAGTAGAGAGCTGGACAGGGTCTAGCAAAAACAGAAGACTAGGCTAAACC
TTCCAAAGAGGCCAGGAACTCACCTAGAACGGTGGATTTTAACTTGCTTATGCA
CTGGGGGAGATTTTAAAAATATCTCTGCCACAAATAGATACCAACTGAATTGAGCA
TAGCATGTCCTACCCATGAATCTATTGTCCAGTGAGAACCTCTGTTTAGAGAAAGT
CACCTTAGAAGAATTGTTAGGAGTTATTTAGGTTTCATGGGGTTGAAAAGAGCATT
GTGATAGAGGAAACACCATATCCAAAGGCTTAGTCAGTGTGGTAGTGTGAGAATCT
GAAGGAACTTGGCTGGGGTATGGTTGCTACAAGAAATGAAATTAGATCAACTGGGG
CTAAATTATGTGGAAAGACAGCATGATGTAGCAGCTAGAGTATGGACCTTGTAAGC
AGGAAGACCCCTTATTTAGCACTTACTAGCTTATTGTCTGACCTCTGAGTCCCAATT
TTACTCTTCTATACAATGAGTACATCACAGGATTTTATCAGGTTTAAATGATAAGA
TATATGTAAAATGCATACCAGAGAGGCAGACTATTGGACTCGAAGGGCTCAGTAAG
TGTAAGCTGGCTCTCTCTGCCCTTGCCACCTATTTTTTCAGACTCTGGACTTTTATC
ACTTTAAGTCATAGCCTAGTTCTAAGCAAGGAAATGGACTAATCAGACATGTTTTT
AAAAGATCATTCTGGTAGTGGTTAGGAGAATGAATTGGAAAGATATGAGACCCATG
CAGGGACAACAGTTAGGACATTATTTCTGTAATAAGCCAAGCAAGAATTGATGATC
AAAGTGGTGAGGTTGAACAAACAAAACAGATACGTGAGCTATTTGGAGATAAAATC
AACACTGTCTATATGTTTTGTGGGAGGTGGAGGTGAGCAGAAAATGTGAGGTAAAT
GAGAAATCAGTGCTTACCCTTGCCATGATTGACTGAAGGTAGTGTCTTCAC
TCAATCATGAGTTGCAGAATTCAAGATGGCAAACAGTTGTGAGGAGCAAAGTCAAG
AACGTGTTTGATTTTGAGGTATCTGTAAGTGAAAAATCAGAGGTGAAAACCTTACC
TCTCTTGAAGCAGTTGTGAATGTAAATCTAAGGTTTGGAAAAAGATCTGGGTAAA
GATTTAAAATTGAAGGACATCAACATGGAAGCCATAGAAATAAATTATATTACACA
CAAATTTATGTCGTTATTTGAATTTCTCCATGGTCCACTCAGAAATATATCTAAATG
TCACCAAAATGTTACTTACTGTAGTACAGAATTGGTATTAAGTGATACTATTGTCC
ATGTTATTCAAAAAGACAGTTATAGGGACCCTCTTAATAAACTAATTGTGAAAAAG
GCAAAGAATTAGCAAAGCTTTGGCATAAAATTCATATCATGGGCCAGGCGTGGTGG
CTCATGCATATAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGTGGGCAGATCACCTGAGGT
CGGGAGTTTCGAGACCAGCCTGACCAACATGGCGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATA
CAAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGCACACGCCTGTAATCCCACTACTCGGGAGGCA
GAGGCAGGAGAATCGCTTGAACGTAGGAGGCAGAGGATGCAGTGAGCTGAGATCGT
GCCATTGCACTCCAGCCTGGGTGACACAGTGAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAA
AAAAATTATGTCATGGAAAAAGTAAAAGTCTTTGCATAATGTATCCAAGATCATGA
AAAACCTCTTTTCAATAAGATAAATTAGTTTCTTTTCTTATATAAACATGGAAATTTT
ATTTTTCTTTTATTCTCATATTGATACTATAAAAACCCCATCCTCATTACATAAC
TACTGTCTCTACCCTCGATAGATACCAGTTCAATTGAACGTAGCATGTTCTACCCAT
GAATCTATTGTTTCAGTGAGAACCTCTGACTATAATGCTCAGGAATACTCAAGACTC
ACATGATTGTCTTCTTGCTATATTTAGTTACTTTATTATTTTCCATTTTGGGACCCT
GAATTCCTGTAGATCTCAGAGAAAATCCGAAATGAAATAATGAAAATAATTAAAAG
TTTAGAAAAGGGAGTCAATGGGGACAAATGTTTCAGGACTGGTCTTTTATCTCCTGC
AGGAAGAAAGACTGAATGCAGAAAATTAGAATCCATTTTTCATCCAGTCACCCCAA
TTTAATGCAATATGAGTTTAGCTATTTGATTTTAAAGTGTGTACCGTTTTGGACCAT
GTTACCATGGTAACATGAACCATGTCTCATTACATACGTAAACATGTTAATTGTATT
AAAACCTTTAAAACCTACTTCTGGATGTTGCCATTACATTAAACAATTATCTAGAA
TGATACAAAGTAATGACTAAATTGAATAACTTTGTAAATTAATACTATTGGATTTTGT
AATTTTATATCTATAAACCAAAAAGAAAAGCCACATTGGTAAGAAGACACTGTGCA
TACTGAAAAGTCAATTTTGTAGCCTCCAATAACCATTTGTGTTTTATTCTCGCAGA
GCTTTTGTGAGGATCTTATAAGGGAATAAATATGAAAGCACTTTGAAAAGGCTTTC
AAGTGAAAGGTCCTTATTAATTTTATGAATTACCATTAACAAAAGTCAAACCTGAA
GATGTAAATCTAATAGGATGCTCTTAAAAGTCAATGGATCAAAGTTATATTAATTA

10

20

30

40

50

ATAAAGAATAAATACTAAATATTTTATGTTTCATAATTGGCAAAGTATCTTTACTG
TCATTTTCTAATTTGATCCTTAGTGAAAACCTGTGATGTTGGTACTCCTATTATTTT
CATTTTTCATTTGAGAAGAATAAAATTGGAGAGGTTAAGTAATTTATCTATTGCTAC
TTGTTAAAATAACTACTAAATTTTATTACTCCCAGTTAGGAGGGCAATTATATAAA
CTAAAAGCTTGTCAACAATAAATGTTTACTTTTCTGGGATTAAAGTCATCATGTATT
TTTCAATTATTAAGGGGGGTAAATAATAAATAGCTACCTTTTTTAAATAGTTACT
ATGTGCCAAGGTGTGTACTAAGTGCTTTGCTTGCATGATGTAATACCATCGTATAT
TTAGTACAGAGGAAAAACTGAGAGGCTGGGTAACTTCTACTAAGGTAACACACAAG
TACTGGTTGAGTATCCCTTATCCAAAACACTTGGGACCACAAGTGTTATGGATATC
AATTTTTTTCTGATTCTTTTTTTGGATTTTCAGATTTTTTCAGATTTTGGATTACTTG
CTTTATAATTATGGGTTAAGCATCCCAAACCCCAAATTCAAAATTGGAAATACTC
CAATGAGCATTTTACTTTGAGAATCATGTGCGGCGCTCAAAAATTTTTCAGCTTTTAGA
GTTTTTTGGATTTTGGATTTTTCAGATTTGGGATGCTCAACCCGAATATATAGAAAA
GTCAGCATTTTGAACCTAAGTTTGACTTTCTGATCTTCTACCAACTCTACTGTCCTAC
CCATTACTCTACATTGACTCAGCATTACAGGGAAAGACCCAAGATCACCAAAAGCA
AGCTTCAAATCACTCATCTAATAGAAATTAGTGGAATATTTTCTACTTCTTAAACA
TCCATCTTTCCTTTACATTTTAAAGTCAAGTTTCTACATCTGCCTCCCAACTGAAAC
ACTTCTCTATGAAATCACCATAACTACCAAATGCAAATATTTTTATCAAGTCCTCA
TTGCCCTAGAAATCTACTCATATTTTGTATTACTGCTCACTACAGCCTACTGAAAA
ATGTCTCACCTTTTGACTTGCCAGGGTGATATATTATACTAATTGTCTCCTTGTCTC
TCTAAGCACTCATTCTTCTCTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
TAAGCTCTAGGGGCACATGTGCAGGTTTGTACATGGGTAAATTGCATGTCATGGG
AGTTTGGTGAACAGATTATTTTGTACCCAGATAATAAGCATGGTACCTGATAGGT
AGTTTCTCAGTCTTCACCATCCTCCACCCCTCCACCCCTAGAGTAGATCCTGGTTTCT
GTTGTTCCCTTCTTTGTGTTTATATGTAATCAGTGTGTTAGCTCCACTTATAAGTGAG
AATATATGGTATTTGGTTTTCTGTTCTTATGTTATTTACCTAGGATAATGGCCTCC
AGCTCCATCCATGTTGCTGCAAAGAACATAATCTCATTCTTTTTTCTGGCTGCACAG
TATTCCTGGTGTATATGTACCACATTTTCTATATCTGATCTACCATTGATGGGCAT
TTAGGTTGATTCCATGTCTTTGGTATTGGGAATAGTGACAGCAATGAACATACAGCT
GCATGTGTCTTTATGGTAGAATGATTTATATTCCTTTGGGTATATACCCAGTAATG
GCATTGCTGGGTTGAACGGTAGTTCAGTTTTGAGTTCTTAGAGGTATTTCCAACT
GCTTTCCACAGTGGCTGAACTAATTTACATTCCCACCAACAGGGTATAAGCATTCC
CCTTTCTTCACAACCTCACCAGCATCTGGTATTTTTTTGACTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTGGAGACGAAGTCTCGCTCTTGTCCCCCAGGCTGGAGTGCAATGGCGC
AATCTTGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGC
CTCCCAAGTAGCTGGGATTAGAGGGCGCCTTCCACCATGCCTGGCTAATTTTTTTATTT
TTAGTACAGACAGGGTTTACCAGGTTGGCCAGGCTGGTCGCAAACCTCCTGACCTC
AGGTGATGCGCCCGCCCCGGCCTCCCAAACGCTGAGATTACAGGTGTGAGCCACC
ACACCAAGCCCACAGTATCAATTCTATGCATTCTTTTCTGATTTTATTAATCTCATT
ATCTTCATTTGATATTTAGTCAATAGTTACTGTCAGTTATGTGTTAGTTATTATACT
AGAAACAGTCTTTTCTCCATCTCCTTTAATCCAATGATTTGAACATTTTTTATTCCTT
TCCAATGTCTGTCCCACATTTCTTACTGTATGTAGGACATTTCTTACTCAAATGTCT
CACAAATGACATAAATTCAGTATGACCCAAATAGGCCATTTTTTTATACCAAGTCTT
ATTTCTATCCTGCTGTTTATCCCGGTACCATCTTTTTCAGTCAGAGAGTTTCAGATCA
TATAGTCATTTCTAAATCTCCCACTTACTTGCCTCACTTTCAAGTTCATTTTTAAGG
TCTGTAGATTCTGCCTCCCTAATTCTTTATGACCATTCTTTTCTCACTAGCCCCTTA
CCTCCACTCTCATTACACTCTTACTATTTTTTACCCTCCTCCACTCATTCTGCCC
ACCAGTGGCTCCAATCCAATTTGCAGATTTCCATTTAAATTAAGCTTCTAAACA
TAGCTTAGGTTGTAATACTACAATGCAAATTCATGAGAGCAAAGATTTTCATCTGCTT
TATTCATTGTATATATCCATTGTCCAAGACTGTGTGTGTCACATGAAAAGTGTTT

10

20

30

40

50

AATAAGTATTTGTCAGTGAACGAAAATAATATATGACTCCCCTCTTCAAACACCTT
TTTTGACTTCAAAGCCCTTCAGAATATTCTACAGACTCCTTCACCTGGCTCTCCACA
ATTGCCCCTGAGTCTCGTTTCCAATCTTATTTCTTATTTTACCTCTCAATGCACCTT
CAACTCCTACTAAAATGAACAGCTAGCCAGCTTACTTCTGTGTCTTTCGATGATCTT
GTTTTTTGTCTTGAGATTCTTTTTTTTCATCTAAGCTTACCCAAACATTACCTACTT
TTCAAGGAAAGCCATTTTCGAATCTTCCCTTTTTTCCCTGAGCCCCCAAGCTGGAAG
ACATCTTGTCTCCATCTCAATTCCTATAGGCATTTCTCTGCACTTTAAATGACGTTT
AGTACTTCTGACATTGCATTAGAGAGAGGCTGGGGTGGATAGTGTTTCATAGTGTG
AACTTTGAAGCCCGACTGCCTGAGTTTAAATCGTGATTCTGGGGCTTACTGACCAT
AGACGCATTTCTGAATTGCTCTCAGATTATGGAGCATAAATCAAAAGTAATGACAG
CTACCTCTTCAGGTTGTTGTGAGGGTGATGCGAATTAATGTACTGAAGTGCATGGA
ACAGTTTCTGGCACACGGTAAGCACCCAATAAACATAGCTAATATTATGTTATTAC
TATTTTCAGGCTTATTTTTATGTATACATATAGTATGTAATTTTATGTCAATATGTA
TAAATAGACTTTGGTATTGTTTATTTCACTATCACCTTGAGAGCACAAATTCTCATTT
GATTTGTGTGAGAACTACTTAGAAAGAAATAGACGTGTGAATGAACTATGCTTG
AAATATTGGTTACTGTGAGTGTTGAAAATCCATTTTGTTTAAAGAAAGCTTCAATT
GTTAATCTTCCATAAATTTTAGTTCTTAAGCGTTCATATTGACTCGTTTTGGAAAAG
CTCTTTAAAGTCTTGGGATATAAACAAGGCTGAATACCCTCATTTCATGATAACAAA
CATATTATACTGAAAATTGTAAGAGAGATATTTTATCTTTCATAATGCCCTCCTTG
GGAAAATACATTGACTTGGCCCTTCTCTTTCATCAGACACCAAAGTTGAGATTGC
CTGAAACACAGTTTGGTAAAGGAGTTTCTTTTTCCCAAACATCCTGAGTAACACA
GGAAATCACACCAATGACTGATAGATAACGTTAATAAAATTAATAAAGTTGTTTTA
AATGCATACCATGGGGCAGTGGCAATGAAAACATTGAGAAGGCTGGGACTATTTGC
CAACTTTCTTTGATCTCCATTAGAACCTGGACAAGATCCACATAATTTCAGAACTT
CTTCTCCAAACAAGAATTGAAAAGGTCAGGAAAAGTTTGACCACAGAAAAATGTCA
AAGAATTTTGTGTCACTTTCTCCTCCTCCTTCTCTAACCTTGAATAATTTTTTAG
GGTTATTGGTCTTTGGGAGCAGACTTTCTAGACCAAAACAAAAAAATGATATTCC
TCTATGTGATAGGTAACAATCACTACCCATCCTACTGGAAAATTCTCAAAGTGTA
ATTGAGGGGATAAAAAAGAATCTTAAGTCCTTTAAATTATTTTTAAGATGAACTA
CATTAGTGCCTCTCTTGTGCCTTTCATAATTCTGATAATAAACATTCCAGGTATTA
GTCAAAGATTAATGGTATTGAAAATAATTTAGGTTATCAGCATGTGATTTTTCATT
CACATGAGGTCCTTTTGCAGTTTACATGGTTTTCTAAATTATATTAAAAATAAAATG
TCAGAAAGTTCACATTTTTTTTCATGTTTAAACAGCATCAATCTTTAAAGAAAAGTTA
TTGCACAAAGGTCTGTGCATAAATCAGCCATTCTCCGAAGAGGTAAAAGAAGTCAT
TACGCCTGGTTATGAGAGAGAGTTTTCATGAATGTAAGAGACATAAATCATTTCCCA
CTGGAGATCATATTAGTCTAGATGGAAGAATGTCTGTTTCTTGATAGTGAGAAAGC
AACAAATTACTTTTGTGTTGCTCCTGAGTCTGTGGTTGTCCTTGAGAGGTCTGTTAGC
ATGTTGACTATTGACTATTCAATATTAGCATTATAATAACTTACAATGATCTGAGT
CACATAAATATAATCTTTCAGTTCTCTAAAGATTTTACTTTTTCTCTCTAATATCT
ATTCACCTCCAACACCTTTGCAAATATATTATTCTCTGGGAGTTACAAAGAAAGTT
ATTCTCTGCAGGAAGCAGCATTTTCAGTTGCTCTCAGGAGCCAACCACATTTACCT
CAATTCTTTGCTCCCAATTCAACAATTCAATATTGGATTAAATTCAAGGCTGTGAC
CCCAAATAGAATGAGACCTGGATATTTATGAACCACTTGACCAGGCATTCTTCCCA
TGATTTACTCCATAAATCCTTTTTAGTTTTTGCAGTAGCTTTACAAATATTTGGAAA
ATGGCTGTGCAATGCAGTTTTTAAAAGTGCAATGAGTAGAGGTAGCTTCTTCACCT
GGTATGGTAAATTGTTGATTCTCTTTTGGAGTGGAAAACAAGTGTTCTTATTTGGA
TGCAACCATTTGCATTGATTAGACAACCCTAAATTCATCTTTCATCCATGACCTGAA
AGAAATTTTGAATTCATGCAATATATACCCGTAGTGGAAAATGTACTTTTTGAAT
GGATTCCTGAATGTGACTTTTTAAGAAGAGCTATTAAGAAGTGGGATCTTCTACAGA
ACAGTAAACAGGCATGAAAATATACAAGTTGATAAGATATGGAACCTACCCCAAAG

10

20

30

40

50

AGGAATTAATAGTGGTGGGGCTTGGGGCAGGAGGACAGAGAGACCTAGCCAAGGAA
GGAAGGGCTATATTATAATAGAGTACAAAGTCCTTTAGTCATCCAAGAGAAGGGGC
ACCTTCTGCATCCCTTATGAGTAAGATCAGAGAAGGTATTCTAGTTAACTTTTGCT
ACATAACAAGCCAGCCCCAAACTTTCATGGCTTCAGTAAAAATTACTTGTTTTGTTT
ATGAATCTACAGTTTGCTCAAGGTTCAATGGGGCTTGCTTATCCCTGTTTCAGTTG
ATATCAGTTGGGGTAGATTGCCTGATGCTGGAGGATTCACTTCCAAGAGGGCTCAC
TCACATGCCTGGAAAATAGGTGCTGACTGTCAGTTTTTCTTCATGTGGACCTCTCC
ATGGAGCAGTTTGGGCTTTTTTACAGTGTAAGAGTTGGGTCCCAAGAGCAATTATC
CTAAGGGACAAGAAATTAAGCTGCAAGCTTCTCAAGGCCTGCCCTAAAAGCAAGA
ATGGTTTTTGCTTCTCCCATATTCTATTTGTCAATCAGTGACAGAGCTCTGATTCAAG
GGGATGAGAACATAAACTCCACCTTTCCATGGAGAAGTATCAAAAAGTTTTGATGC
CATTTAATTAAAGCTGCCATACAAAGTTTCTTATAAATGACACTGAGCTGAATGAA
TACTAAACAGCAAGTAGTCATTATCCCAGTCAAGAGAAGTTATCTTTGCTCAGAAT
ACCTTTTCTCTCCTTGTCTACCTGGAAAATTCAACTCTTGGCCAAAGCCCTACCTCT
TCTCGAAAGCATTACCAGGCCTTGCCTCTAAGTGTACAATTGGAGATACACCAGTA
TACTGATGTTTTTAAACTTTAACTTTTTTCTACAATAAAACATAAATTAATAA
CTTCCCTTCTGACTTAAAAGCTGCAAAATGCTCATGACAGTAACTATATAAATTAA
AATTAAATCTTAAGCACGATAAATACCTCTCGAATAGCAACATAGATGCTTACTTC
TTTATTTCACTTCTTTATTTGCTTTTCTTTGTCTATAGTTTGCCCCAAAGGTATTTT
AATAATATCGGGTTCATGTATACCAGTGTGTACCAATTAATATTTAGAATATACC
TGTTAATAACCTCATTTGCATAGCCCTACTAATCTGAGCACAGCGCAGCCTTAAGA
AAGTCTTAGTTTTTCTCAGTTTAGTTTCATCTCTCTTCTCTTCTCCTCCTGTCTCTCT
TATTTCTTATTTCTTTTTCTTTTCAAGTGACTTTCAACTAAGTAGAAAATGCATTTT
ACATCACTATGCCGGCCTCCAGGCTCTGTCTATTTTCATTCACCCAGGAATGCCCTTT
CTGAATGCTTTCTCTCATTTAGCAGCTATCTATTGAAGTTGGACAAATGATAGAAA
TTCATTTCTTAAAGAGCCAGAACATCATCTTGAACAAGAAGTTAAAAGAATTGAGC
AAATCAAAAGATGAGCTAATATGGGTGAATCTTAGAGGCATTATGCTAAGTGAAAT
AAACCAGACACAAAATGAAAAATATTGTATGATTCCACTGGTATGAGCTACCTACA
ACAGTCAAATTTATACAGACGTAAAGTTGAAGGATGTTACCAGGAGCTGGAGGAAG
AAGAGAATGAGGGCTTATTGTTTAATGAGTACCTGAGTTTCAGTTTGGGATGATGA
AAACATTCTAGAGATGGATAGTGGTGATGGTTCAACGATAATAATAATATAATATT
AATGTACTTAATAGTACTCAACTGTATACTTAAAAATGGTCAAGAAAATGGTACCC
CGTTATCCTGATGTGATTATTACACATTGTAGGCCATATCAAAATATCTCATGTA
CCCCGTAAATATATGCACCTACTATGTACCCATAAAAAAAATTTAAAGGCTAAATG
GCCAGGCATTGTGGGTCACTTCTGTAATCCCAGAACTGTGGGAGGCTAAAGCAGGA
GGATCACTTGAGCTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAACATGGCAAGGCCCCAT
CTCTACAAAGAATTCAAAAATTAAGTGGGTGTGGGAGCTCATGCTTGATGCTCCAG
ACACACTGGAGGCTGAGGCAGGAGGATTCTTGAACCCAGGAAGTGGAGGAAGCAG
TGAATGACACTGTACCCAGCATGGTCAAGATCCCAATCAAAAAGAAATGATTAA
AATGATCAATTTTATGTTGTGTATATTTTGCCACAATACAAAATGGGGAAAAGCC
TATTCGCTTTTAAAGTATCCTTAAAAAGGCACAGCTTCTTCAGCTAACAGACTCTAA
AACTTTTTTTAATAGAAGTATTAAGGTATTTAGAGAGTGCAAAATATCTTATTTTA
AGTCAAGAAGTTAGGGTCCTGTTCTTAAACACTAGCCTCTGTAATCCTGGGGAAGT
CAGTGCTGTTGGAGATCTCAGGTTGATCTTCTGAAAAATGATGGATCTAGGTAAAA
GATATGTTTCTCCAGGTTTACATACCACGGACACCATCTTTACTTGGAAACTTTATT
AAAAATGCATTGTGTCAGAAGCTCTCTGGGGATGGGTCTGGAATCTGCATATGTA
AAGAGCCCCTAGGTAGTTCTTGTGCCCACTTAAATTTGAGAACCACTAGACCAGAT
GTTTTGCTTATGGCCCTTTTCAGCTCTGAAATTTGAAAAAATAAATGATTCTGC
AAGACAGAGTCTCTGTGCTTTTGCAGGATAAAGAAATGAAGAAAATAAATCTTCCT
GCTTGTGTTGGAGCATTTTTTTTCAATTTGGTATCCCCATCTCCAGTGGCTAGCCAATC

10

20

30

40

50

AAGAATAGTATTGTTTATTCTTCCCCTGTTTTGAAGATACAAAAGGAAAAGCTAA
GCCAGATGACACCTAAAGGCTTCCATTACCATTTTCATGTTTTTCCCTTTGCATAAA
AACTGTCCATGCCTCCATCAGAGCCATGATCACTAGTACAATGTTACACTCTAATG
ACTCATGACATTAAATTATATCTTAGCCTAATATGACCAAATTACAATATCAGAAT
AAAAATTTCTTTTTTTCAGGTTGAATCCCATAACTTAATCCAATTATAATACTGGCTG
AATTTTTTCACAATTATGTCTCAGTCTTGATTTAGGGAATCTTCTCTTTATCATAAAA
ATGCATTTTGTAAACATGTTTCATTATAATCAATTTCTCAAAAGTAAAGTTAATC
AAGAGAAGGAAAAAAGGTTTTGTTTTGATTTGATTTGGAATGTGTATGTGTGTTTA
CTGTATTGAAATAGATTCTGTCTGAAAGACTGTATATAAGATAAAAAGTACAGAAG
AGTAGTCAGAGAGTTATTACCCACCCCTGACTGATGGTGAATAGATTATCTAAGTA
TCCCGTAAAAGGCACAACCTCCTTCAGGTATATTTTACAAATTAATTAGTAACTTTC
TAGCCAAATTTGTGTCTTAAAGACACCAGCTAGAACTTGGTAGTTCTAGCAAAGA
AGATTATTTTATTCTGAAACAGGTTTTTGTGTCGTTTTACTTATTTGAACTTTTTT
CTTGAATATGTATTTCTTTGCACATAAAATATATTGACTTATGAATGTGATTAAAA
TGGAAAATAATTAGTTGATTTTAGAGAGACAGAGAGAGGAGAAGAGAAGTGTGAAG
GAGAGAGGGAGGATAGAAAGGAGAGAGGGGAGAACAGGAAGGACAGAGGGGAGAATG
GGAAGGAGAGGGGAGAGAGAGAGACAGAGAGAGAGGAATGGAGTGGGTAAATAAGCA
AGAGAAAAATGCCAATCATATGCTTTGCTAGTGTGTAAAGTCTGATAACCCAAGGG
AGAGAGGACTACTCTGGCCTAGTGAAACAAAGGAAAGAGAAATATGGTAGAATATT
CTCCTGGTGCTTCACCAAATGTGACACCAGAAGTCTGACAGAAGTCATGTCAGCAT
TTGAGCTCCATAAAACTCAGGCTATCGACCTACCATGTGAGAGTCTCAAAATGAGT
TTAGGTAGGGGCAGAGGAGTTGAAATCCAGTAACATATGCAACAGTGATCACACCA
GGATTGCACATAGAAAGCAAATTAGTCCTCTAATAGAGACGCCAATTTGAAATTCA
CCCTCTGAGCAGGTTTTTAAGCACACTCTTCTTTTACTTTTCTATTTACAAAAATGG
AACACCACCAGAAAAACAAGAATTTGAAAGACGAGATGAGAAAAGTAAGTTGTAAT
TGGAAACAGACAGAATGTGTACACAAACACACACACACGACACACACGTCAT
GCACAGGTGATGAGAGAGTAGTTTGCCTACATGGTGTATCTGACTAAGAAGACTTT
TTGCTCTGGTTGTCTTACAGGAAGTGAATAATCTCATGATGTGAAATATTTTCTT
GCATATTGTATTGAAAAAGAAAATAATTTTCCCAAACCTCCTTAGGGGCGAGTGTGT
CTTATAATTCCCATATAGTATATGCTCTTCAAGTAAGTAACTCCAGAGTTGAGTAA
GACAAGACTCGTGACTCAGATGGCATGCTCTGCTCCCTAGACTAGACATTGCATCA
GTCTGCCTATACTCACATCCGCTGTTAAAGGATTGCCTCCAGTAAAATATGTCTTTT
AATTCCTTATACAAGAATCTGGAAAAAAAAGTAAGATTCTCTATTTCTTAAATTT
AGCAGCAGGTTAATCACTGATAACAATAAAAATACATAACAATCATCTAGCACGGG
TAAATATTGTGGCAAAAATTACACCCTGAAGAATTCAAGTCAAAGATATAAGTAAGT
ACACATCATTGTGTCATGTTCCACAATATATCATCTGCTTTAAAGAACTGTTATGTA
GCTGTAGTAGATTTAATCATTAATCCCATTTCTTCTCCACCTTCTGCAATCACAACC
TTAACAATGCCTCCTTATGAGTGGAATGTACTTCCCAACCCCTAGTCTTAGGGGTT
GGCCATGTGATTTGCTTTAGCAAATGGTAAATGAGCAGGAGTGAGAGGTGACAGTT
TTCAGCCTAGGCCTTAAGAGATCTATACATTCTGTTTGTGCTTCTGCTATCATTCT
GAGAACACGTCCATCTAGGCTGCTGGTCTCAGGAAAACGATAAAAAGACATGAACAG
CAGGGCTGCACTAGCCATTCACATCCAGGAAAAGAAATGATTGTTGCATAAAGCCA
TTGAGCTTTATTCTACATTACTGTGACAATAGCTAATTGAAATAGTAAATATACTT
TGGTTTTTCTAAATGCATATTGAAAATTAATAATATTAGCCATCTGTATGATAAA
AATATAAAGCCTATGTTTTATTTTTTAATGGTTCAGTCCCTAAATAAATTTCCAAA
AAGTAGATGTTCCCTTGTCTAGTGATGTCATTATATTTTATTTATACATCATAAACA
CACTGTTTATTTCTGCTCATTTTTTTTGTAAAGTAACATGTGTTACCGCCAATCTTGAG
ATGATACACACACTTCTGTACTAAATTTTGGAAAACATATTAGCTACCCACTCCTT
ATATCAAAATATTGCCTAATAATGTGTTTTGTTTTAATCCTTCATGAATTTCCAGGA
GAACTGAACTGATACTTGGGTTTGTGAGATATATGAAAATAGTGAACATGAACTTC

10

20

30

40

50

TGGTTTAACCCCTTGTGATGATAATGGAATCATAGCTCTGTTAATTACTCTTGTGGTT
TGTCTTCCTAGAGATAATCATGTACAAAATTCCTTTCCAATTTGTTATATAATATTA
GAAATACTTCCAAAATTGGCATGGATTTATTGTTATCATTTGTTGGCACAATCATT
AAAACGAAACCCATAAAGCTAGATAAATTAATGTTTACAAAGCTATAGTACTCAA
ACAAAAACACTGTGAAAAGAGATTTTTTAAATAATAGTTTTTGCATGCCTTTTGAA
TAATTGGATTATTCTGAATTTCTTCATGTTTAGTCCCTGAATCTAAGTCATACCGTC
TACATAAAAATAGATGTCAGCTGAAGAAAACAGGCAATGGATTTGTCTTGACGAC
AATCTTTTTATATGTTTCACTTTCATTTAACATTAGACTTGTCTGTATTTGAAATTG
GTATTTCTTTACATTTCTGAATTTAGGGAAATGGCACAAGAGAATAACATTAATTT
CCTCTGCATTTTGGCCTAATCAAATTTGAGCCTTTCAAGAGACACAGCCAAGTCAA
TTCAAAGAGACATATGAAAAGACTACTGTTAATGTATCTTTAAAATGAATTAGCGG
CATGAACTGTTGCTAGGTGAGTTAGGTATAGTTGTAGTTTTTGTAGTAACCCTAAGAG
AAGATGCAGTGCATTCTAAAATGTCACAAGGAGTTTGATTGCTCAAAATTCTGGGA
GATTGGCTCTCTGCAAGGCTTCTTGATGTCATTGTTCCCTAGAGGAATGTTGTTCCA
GTACCTATAGCGATTGCAGCCATAACTATTTATGTGTCATTGTAGCCATTGTTATTA
CTACATGCTTCACATACCTCTACTGAGGTCTAAAGAATTAGTGGACTTCATATTCT
GGAGAGAACACTTGAAGAACCAACAGAAGTTTGATGTGAATCTGCATATCCACCA
TTAT
TGTTTCATAGGTTCTCAGGATTAGTTGAGTGATGCCTTAAAGAAAGAAAGTCAGATG
ATAGGTCTTCCTGCTGCCCGCACCACATCATGAGTGTTATTCCTATAGAGGAGGAG
TAAAGAGTGGGAAGAAAATGAAATCTGTCAATACTGTGAATATATAAATAATAAAA
GTAGCAGTAGGACTGATTAATTCTGAATCATCTTTATGAAATGACTGGAGCCGTGA
AAATGCTCAGTCTGCACAGCTGATTGAGAAATGTATGCAATCTGTTGATCGGAATT
TATTTGTGAATGCTCTCTTCCAGAGATTTATATACCAGAGTTCTTAAAACGAATTTT
GTCCCATGAAAAGAAAACCTACAGATCTGTAAGACTGCAATTTAAAATGGAAGAAA
ACATGTTCCCACTTGAAGAACAACCTTTCAAACAACAACCTGATACAAAAAAGTCAA
AAGCTGTTTTGTTTTATATAATAGTTTCAGAATACTTCCAGTCAATATATACCTTGG
TTTGGTGAAAAAATAAAAAGCTAAATCCTTAGATCATTAACCTAGAAATTTTTGTAA
AATAAATAAAAAGCCGTGGGTTTTAGTGCAAGTATCCCATGAAGAGGAATATATTCA
CCATTGGTCTCTTAATCTCAGATAGAATGTACATGTTACTTTATTTTATAACGAAA
GCAACTGTGTTGTGATATTATGTATAATATTATAACAGGAGAAGTCCTCTTAGCTA
ACTCAGTAATCAATAACATTGTACGTTGTGTGTTATTGTAACCAAAAACCTATGACA
GAACCCCATTTTCATAAGATCAGTTTATCCACCTATATGATTTATATTTGAATATTCA
TTTCAGTACTTATGTTGCTTAAACAAGCTACTGTATTAGTCCATTTTTCATACTGCT
ATAAAGAAGTGGCGGAGACTGGGTAAATTTCTAAAGGAAAGAGGTTTAATTGACTCA
CAGTTCCACATGGCTGGGTAGGCCTCAGGAACTTACAATCATGGCAGAAGGTGAA
GGGGAAGCAAGCATCTTCTTCACAAGGCCGCAGGAAGGAGAAGCGCCAGCGAAGT
AGGAAGAGCCCCCTTATAAAACCATCAGATCCCGCTATCATGAGAACAGCATGGGAG
AACTGCCCTTATGATTCCATTACCTCCACCTGGTCTCTCCCTTGACACGTGGGGAT
TATGGAGGTTATGGGGATTACAATTTAAGATGAGATTGTGGGGTGGGGACACAGCC
AAGCCATACCAAAAACCTCTGTTTTTTGTTTTTGTTTAATGGAAATGATTTAGAATT
TATTTTCTGATGTTTCTTTTTCATAAAACACGACACCAAAATCTACTTTTCACTGC
TCCATTCAACTAGTAGAGAATATCTAATCTCTTCTCAAGTATTTCTTTCTCAATTAT
GGTGGTTTTAGCTAAGAACAGCTTATGGCATGCTTTTCTAAATAATATTAGAACAC
ATAAATTATCTGTACCTGGTATTACCACATTGCTCATTTTAAGATCTCAATTG
ATACATTCAATTCATATATATTTAAAATTGATTCATTTAGAGCAAGAGATACAGGC
ATTTTAATGTATTACACTGCTACTAAAGCTTAGCAAATTATTCTTTTTTGTGCCAC
AAATTATCATCCATTCATGTCCTAAAAATAAAATTGAATTTATTATACTTTCCATT
TATCCAAAAAAAAGGTTTTTTTTTAACAATTGATGCAGATACACATTTTCAAGCTAA
AAATATGTGTGAAAGTGGCCTCTTCTCATAGTATTTATTTTAGGAGTCTAGCAAT

10

20

30

40

50

AATTTTTCTTAGGTTATCAGCACATGTCTTAGCCTGAATTATTTGAATTCAGTCTGT
GTCTTCAAGTTCAGATGGTTATGTGATCTTGTTAAGATCTCAAAGTAGTGGGAATG
ATGGAGTATACAACAACCTCATTGTTTTTTATGGCAACTGTCATTTACTGAAGGAC
ATAAGGCTAGCAGAACATGGTCAGAGAAGGAATCAAAGTTTGGTCAGCCAACTCTG
CTCCACAGCTACAAGCTGCTAGACAGGCATAAATTTTTCCAAACCTACACAAAGGG
ACTTAGGGCCCTTGGCTGAGAGCGACATTCTAACCCTTCCTTATTTATGGCTGGT
GGGGTTTGTACATTTTCTCATTTCTGTATAACATTTCTTGACTGTAATAAGCAATGT
ATTCATTCTGCTTTACCACTTTCACTAACCTTAACCTCAATATATACTCAATTAAGC
AATTGAAAACAGCAGTTTTTAATCTTTTGACATAAATGATTTCCCTCCGAAGCAAAAT
GCTGGAAATCCCCTCAAATGCACCTTTTTATTGATGAATACCTATAAGCACCACCTA
CAGTCGCTGGAGGCTGACAGGAACCAAACCTTGATGATAACCACTGAGCTGAGAATT
TTCAACTCACTCTTTTTTCCCTGTATGGTTCTTCTAGCTGCATTATTTCCCACTATTT
AAAGCTACAGCTGGTGAACCTATTCAAATATTTAACTTTGGAGAAGAAAATATCAA
CTTATCACAAACCTCTTTTTTATATTCTAAATTCATATACCTGTTTGGTACTTAAAGG
AAAAATATGCTGAGGAACAGGCTGGTCATAAGACTGTATAGAACGTGCATCTTCCA
TCCTATTGAGGTGACTCCTAGACAATGGGAAAAATGCCTTCACTCGACTTGCTCAT
TAAATGTGACCGTAGCTGCTAATCTTTTGGCGCTGTCTCGAACTTTAATTAGATGT
GCTCTTCTCTTGAAGGTTGGAACCTACAGTATCCAGAGACCATAGAATCACAGAGTT
GAAAACAAAATCTTGGAAATCATTGAATCCACTTATCAGATGAGAAAAAAAATA
AGCCCATGGAGATAGCCATTTTAAAACATATCATTCTATTTAGCCTCCAATGTAAA
ACAATGAGTTACTATGTTTCAATAATGTTGATGTTAAGAAATTATTTGATAGCTTC
CTCACTTGGTCTCCTATATTCTCCAAGGTTACTAGTTAGGAAGACTGTCATTCAA
ATTTGGAGACTACATAAGAAGCAGAAAAAGCATATAAAGAGGCACATGAAATTGGA
ACTTTTCTGGTAAAATCTTCTTTCTTAACTCTCCTCAAATAAGCTGTTGGTGGCAG
GAGGTGAAAGACAGCCTCCACCCTTTAGCACAGTCCGTACTTGTCAGCATTTCCTCA
GGAAGGGTGATGTCTGGAAATGATAGAGATTGTGGAAGCACATTGCATTATGGGTC
AAGAATGCGAAGGTCAAGGAGTGGAGTCTTCCTTTACGAAGTAGTGTTAACTGCTT
GGCGTGGCATTGTTGTAAACAGAAGCCACCAGGAAGGATCATCCTTAGGAGGGGAAC
CTGTAGATATGACTGAAAACAAGAGAGATCCAGTTTTTACCACTCTGGAAACATAGG
TAATAGAAAGCCCAAAGGTACCTTATCACTTGTTTGTTCCTTTCTGTACAAAAGG
ACTTAAATCCTTTCTGAGCAAGAAAGATATTTGAGAATCCAATTTTGTTTTAACT
TGAGCTTAGCATTTTGGAACTATTCCAAAGACCACAGAATTCACAGTCATTAGCAT
ACCACAGCAGACTCTTTTCAAATATTGCAAACCAGAACAGTCTGCTTGAAAACCTG
GAAATACGACCTAGTGGGTTCAACTTGACTTTTTTTTTATTTCTAACCTTACCCCTAG
GCAATTATTGATAACTCATTCTGGTACCTGGTATGTATATGGACTTTGTTAGAAGA
ATTTGACAACCTTTCTAATCATCTGTTTTTTTTCTTTTGCTTGATAGACATACATTTA
GTAGAACTTTACTGGATTGTATTGATTATAAACCACATTTTCAGTTCATATCAGTCC
ATTTTGCTGCACAATAAACAACCAAAAAAATTTAATTCAGTGGCTAATAACAACAA
TATTGATTTATTTCATGGAGCTGCAGTTTGGTAGGGTTTGGCCAATCATGGCTGGAA
ATGGTTTAGCTATGCTTATCTCTAGGCCGTCGGTTCTGTTTCGGGTCTATACCACATA
TTTTCTTCTGAGACTCAAGCTGAAGGGACATCAGCTACTCGGGGTATGACAGAGTA
GCACAAGGCAATGACAGAAGCACAAACAACACTTTTCAAATCTCTCCTCTTGTC
CATTTGTTTATAGCCATTAGACAAAACATGTCTTGTGGCCAAGCCCAAAGTCAAG
GGGTAGGAAAATACTTTCCACCTATGTGAGGCCATGGCTGGAGCGTGAATGTATGA
TACTACTAGGGATGTGAAAGGATTGAGGCCAATAATTCAATCTTCTATTGGAGACA
AGCTCAACGAGTTAGTTAAAATGGAAGGCTAATATTTACTAACTTTGCAACCCAAG
GAAGAGAAAGCAGGATCTCTCTGACGATGACGGAATTTCATACCTCATCTTTGAA
GTTATACTAAAGCTTAGGAACAACCGTCAGATAGGACTGAATTGCTCCCCCTTCCA
GATTCAGCATGTGAAGTATGCAGCATCTTATTATAGCAGTAGCCAAAACAGCCGTT
TTCTTCAATTTGGGAATACAATGTAGGTGTGTTAATTTTCAATTAAGAGTTCTAAA

10

20

30

40

50

CTTATTATCTGCTTGGTAGCTCTTCCATGTGACAGTCATTCCATCTGACTCTTCATG
TTGGCTTTTGAACATAAATTTTAAAGGAACCGCCAAAATTTAAGGGCCATGTACTTT
TTATAACCTGTTTGTGGTCTGGGTAAGAAAATAAAAATTATACAACTGTTCTTTTT
GACCAGCCACAAGCATGTAATGAAAATGACTGTTTTGGCTAGCAGATGTATTAGAA
GCTTTCAAGGTGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGGAGAAAGGAGCCAGTGAATTG
ACCTCAAACAAAACAAGAACAATAAACAAAACACTTGTCTGCACTTCCAAGGAAG
GGTGATATCTAGAAAAGATAGAGATGATGGAAGCACCTTGCATTATGGGTACAAA
CGTGAAGGTCAAGGGGTGGCGTCTTCCTTTATGAAGTAGTATTAAGTCTTGGCAG
GGCATTGTTGTAAAAAGAATCCACCAGAAGTGAAACAAGCAGCACTAAAAGTTAAA
AGATTTATGTGTAAACCTCATCTAAGGCAACAGAAAGCCATTTCTATAAAATAGTAT
AGGACCTTTTATTATATATGGTCCTAGAGTATATTAAAATAAGTCTGTTTGGGTCC
ATTTGCAGCTCATTGGAAGATTTTTATAGGAAAAACATCCTCAAAAATATCATACT
ACAGTGCCTTGATGCTTTTTTCTTTTTATAAGGTACTGCCAGCCCAAATAGTAAGA
AACCGATATGATTTTTGTCCATGTGAGGTGTTAATTGCTTCCCAAAATATGGTTA
TTGTGTAGATGTCACTAACGAAATATATAAAGAGCAGTATTTGGGAAAATTTATTT
TAATACCACCTTTTTCTTTTTTACCCTAAAAGTATTTATTTTTTTTCGTAGCATA
CTCTGTGTCTCAGTATCATTGTTTTTCTATAAAAACATAAATTCTTAACAGAAAATTT
CCTGCAAGCTCCCCTAAGCTTGAAGAGACAAAGGAGATTTGTAATGTAGCTCAGCC
CCAATCAGGGTAAAAGAATGCAGGGCTGACTTTATACTTATAACTCAGAAAAAGGT
TATGCTTCCCGTCTCTTACAGAGCTAGTCTCTTAATTGATTCCGAAGTAGGAACAT
GTACAAGTGGCCACGATCTGGAACAGACTGGCGGATAATGGAATATTGAGACCTT
GTCTATGGTCAGCCATATTAACACTGGATAAGTCTGATAACACTGTGATTACATAT
GTATCAATATAGTATGCTGTTAATATATTAAAACTTATTTACAACATGATTATTG
GACAACTGTTACAGTACAGCCACATCAATCCTATATCAAGTTAGACCATGTCAACT
GGTTTTGTGTTGAGACACCTGTGTATGGACATAGTCTGAACCTTTTCATAGTTTGTG
CTAAATGATAGCAATCAACATCGGTATGGCACTTACAGTTTACTGATAACTTTTCAT
GCCCATTAAACATAGTACCGCAATAACTCTGTGAAGTGCTGAATTTGTGTCCTGTTT
CATGATTGTATTTGTGTTGATATCTCAGTCAGTCAGAGTCCCAACAAGAAACAGAT
GGCACATTCAGATTAGGGTAAGTTGAGGAGTCTTTATTTACAAGGCACTACATACT
CAGGATTGGGCAGGGTGTAGGGAAATCTCACAAGATAGCACAAAGACTCTAGGACTA
GCAGCAGCAGAGCTGTACCTCTCCTAGACCTGAAGCCGTTGTTGGGGAGAGAGGT
TTCTCAGAGCCCAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAATCATGCAGATTTTAATGC
CTTGGGAGGAGCAGTGGCTTTCTCTTAAGGACAGAATTTGCCTCGAAATGATACTC
AGGGAAAAAGAGATGAAGGGAATCAATACTCTGACCCAAGACTCTCCCTTCTCTGC
AGTGGTTTGCTAGTCCTCTCCTTGGTCAAACCCAAACAGAAAACCATAGGGCATAG
GAGTCTAATGATGTAATCCAAGTCAGCCCCCTGGAAGGTGGAAAAAGAAAGGGAAAA
TGGATCTGGATCTGGAGGGATACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCATAGTT
GGCATGCTTGTATTATTGATATTTTCTTGCATGATATAAGAATCCAGATAAATATAG
TAAGAGGTCTATTTTACTAACAATTTTAGGCACCTAATAATAATACTCCTTCTTTGA
ATGTATAACCTCTAGAATTGGTTCAGAAATGTAAGTGTGCCGTTACAATTTCTATT
AGTATTCAACAGTAGATTTCATATCCATTCATCTATGACTGGAGTATCTGCCATTTG
CTGGTTAGTTACTGTGTAAGGTACTTTGTAAGGTATAGAAATACACTTGGGGTTCG
ATGGCTCATGCCTGTAATCCCAAGGATTTGGGAAGCTGAGGCAGGCAGATCACTTG
AGTCCAGGAGTTTGAGATCAGCCTGGGCAACATGGTGAAACCCCATCTCTACAAAA
AATGCAAAAAGAGTACCTGCGCATGGTGGCATGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTCGG
GAGCCTGAGGTAGAAGGATCACGTGAACCCAGGAAGTCGAGGCTGCAGTGAGCCAT
AATGGCACAACCTGCACTCCAGCCTGGATGACAGAGTGAGACCCTATCAAAAAAAAA
TAAGAAATAAATTTGAGCTCAGTGACCTACATTCTAGTGAGAAAAAATGACCAT
AGTTGATTATGAGATTTTAAAGCAATAAACCACATGAGACATACTAATGAGCTCAT
AAGATCATTGAGAAATTGTTTATTATGAACACATAGTACTTTCAGTGTGGCATTA

10

20

30

40

50

ACAGAGATCACTGTCCTTAAACAAGTTAAAAGCAGAATCAAATCATCTGCAAATTA
ACACACCACTAAACTTTAAGCTTCTTGAGTGATTCTGTAATTTTTAAAATGTCTTCA
GCATTTTCAGTGTCAAGATAGTGCAAACCTCAGTAAAAGCTTGTGGAATTGCATTAAA
CAAAACCAAAATAAATAGATTTTATTAAAACCTATATACAATTGTCTTTCTAATCAT
ATCCTCTCCATGAATAGGGAAGAAATAATTTTAGGAATTTAAATATCTTCTATCTT
AATAGTTCCTCTTATTTCCCTCTTAAGCAATGTTCACTCCTTCAAAAATATTTATTG
AGCATCTAATATGTACTTAACACTGTGCCAGGTGCTGTGAAGAATGCCAAGGAAAT
AGAATGAACTTCTAATTCTTTGGAGTTCCAATTAAATAACCTAAAGTTAAATTGGT
TTCGGAGAGAACATTATGCCTTCGAGACTGTAGGCTTCTCTTGATTAGAAAGTCTT
AAACATTTTAAAGTAACTAAACAGATTAAGGAGAATTCAAGGATGCCTCTCACTAGT
AAATTTGGATTAGTCTGGCAAACCTTCAGACCTTAAATGCAAGATTTTTTAATAATTA
AAAGAAGAGAGAAAATGATAATTACATTTCTAGAGTCTATGTTTACCATTTCAGCCT
TCTTAATCATTTCCCTAAGTATATCTGGTGATCAGGATTTTATAACTCCAGAAAATCT
TTCTATACATCGCATAAATCTCTTCTTTTAAAAAGCTCTTCAATTTTGTATTTTGT
AAAACCTTAAAAGCCTCCATGAAAAATGAGACAAAAGTCAGTGAGAGGCTGTAGCAA
TAAAAATCAGATGTGATTTTCTTTTGAATAACATCTGTTTTTACAGTCCTTTTCATGT
TAAACCTTTATAAGAATTTATTATAAACAGCTTTATTGACAGTTCAATCCTATTTCTA
AAAGGATTTATTTTCCCCCAATGGTAAGAGTTTTCTTTTCTTAAACCTAACTAGTTG
CAGATATTTTCAGATACTACATTTCTCATTGTGTAAAGGTAAAGTTTCTGACCACCTG
AATATGACTTGTAGCTCCTGAGAACAATTTGTTTAGTACCGATATCATGCAGTGAC
ATTGGTACAAAGGAATTTTCTTTATTTCACTGTACTGTTTTTCAAGTTTTATTCTATAG
TTGTTAAATAAGACCATTAAATATTTTTATTAGTCTTATTTCTGTTTAACTAGGTG
GGTTTTTGTATCTCTGTTTCAAGTAAAGCATTGTGCTCTTCAGAGCAAGCAATTGAAAA
GCAAATAGTGAGTATTTCTACTGTAAAAGTTTAAACATTAAAAGATATACACACAGC
CAGGCAAGGTGGCTCACGACTGTAATCCCAGCAATTTGGGAGGCTAAGGCAGGAGA
ATCGCTTGAGCCCAGGAGTTCGAGACCAGTCTGGGAACCATAGCAAGACTCCGTCT
CTACCAAAAAAATTTTTTAAAAAATAGTTGGATGTGGTGGAACACCTCTGTAATCC
CAGCTACTCAGGACGCTGAGGCAGGAGGATTGCTTGAGCCTGGGAGGTCAAGGCTG
CAAGGCTGCAGGGAGCTGTGACTATGCTACTGTACTCCAGTCTAGGTGACAGAATG
AGACCCTCTCTCTCTCAATTAATAAAAAAAAAAAAAACAAGATACACACACATATTTG
CGTAGGTAACCTCTAATTTCAATTTCAAGTATGTTATGTAACAACCATTTGTGTAGTG
CTTGTAACAGTCAATATGTAAATACTGACTCATCTTCTTTGACAATTCTACCTAGAT
ACTTATTAGAGTCCCCCTTAGTCATTGAAAGGAAGGTAAAATCAAAGACGTTGT
TTGCCAAAGTAATGAAAGAAAACCTTATAAACACAATGTATCATGTCTGGGGCTGAA
CTAAAACCCTTCTGATATGTGGTATTAACAGATCATCTTTCATGACAGTACCAGTT
ATTAGAAATAAAATGATTGGAGTTATTATTAATACTAACAATAGTGGTATTCTTAA
AATGACTTCCTTATTTATCTTCACCTTTATACATTCTACTACTGCTTCAAGACCCAT
CTTGAATTCTTCTTCCACAGAACATTCTGCATTAATTTTCAAGCAACATTGATTTCTC
TTTTTAAAATTTGTCTTGCACAGTGAATTAGAAAACCAGGAATTGGAAAACCAGAA
AAGCTTATTAAGTAAGAAGCAGAGAGGAGAGAGTTTCAACAAAGGGCCATTCTAAA
GTGGTCTACTGCGGACACCATACTGATTATAGTTGGTGATTAAATCTTATCTTTCC
AACTGATTATAAACTCCTCCAGGGCATACTCTTATATTCCACAAGATGCTTATCTG
GGTGCAGAGCATGCATGCAGTTGGTATTTGCTGATTTATCAACTAACTAAATCTTA
ACATATTATTATTAACAATTTAAAATAAAGTTAAATGTATCACTCTCCACCCCTCA
AAGCCATTTCTGTTCTTTGTTTTCATAGCACCATTATTATTTCTGCTAGTATTTT
TTAAAAACCGTATTTTTTAAAATTTATATATTTGTTTATTTGGGTATACTTCACTAGA
TTGTAAGCGTCACAAAAGCAGAACTATTATAACCCAGCCACTAACACAATGCCTA
ACAAATAGTAGGTTCTCAATATTTGTTGAATGAATGACCTACAGATATTACTTCAT
TATGAAAGATTTTGCTAAGTTGTTTTACATCTATTTTATCCAAAACCTAAAGTTCTTG
AGGCAAAGCCTAGAAATATCTTCTATGTTCTCACAATGCTCTGAATCAGTGCTTCTC

10

20

30

40

50

TTAATATGC

ATAGCAATTGCCTGGAGAGCTTGTTAAAACATAGATTACTTAGCCCCAACCCAGAG
GATGCTGATTCAGTAGGTCCCAGGTGATGCTGCTGCTGCTCAGTCTCTGGCGCACAC
TTTGAGTAGTAGGGCTCTAGGATGTTATATGTACAGACACATGCTGAATAGTGGGC
TATGTGCTTACTTGCTGGCTAAATAATAAATGTTCTCACTGAGTCATAGAACTTTG
AAATTTGCAAGGACTTTTGCTATTATCTAGTCTATGGATAGCAAATAACCTGATAC
CGTGCTATAGTGCTTGACTGCATTTAACCTGCAGAATCCTCATGAGCAGCCCAGCA
CCATCACTCCAAGTGAAACTACTCTCTTCTTGAGGTTGTCCAATTCTATCAATTAAA
GATGAAAACCAGGTTCTGAGAGTTGAAATCTCTGGACTTCAAAGGTCCAACAGCCC
AGGTCTTCTCAATTCTCGTTAGTGTTTCAGCAGCTGAATACAAATTTATTAAGCTGT
ATCAGAGTAGTATCTGTCAAATTGGAGTGTCATAATATGCTTAAACAGAGAACTC
CATTCCAATAACATGAACTTTCTTATGCTTTATTCATCATCGCTTGAAATTTTGAA
TTTTGCCCAAAGAAGTTTATACCAGTACATGTTAAATTACATCATAGCCTTCTTTGT
ATAAATCTTAGAGTAGTTTACTGAAGTACATCGCAAAGTTTTGTTGTTTCTTAGGT
GATTTTAATTATGTATGTTTACTTTAGTAATGCATCTTTTCTCCTTCATCAATATT
ATGTTATGCTAGCTGTAAGTACAAAATAATTGAGAACAAATTATGACAAATTGAAC
CAAGCCACAAAAAAGGAGAAACCAAATACTTTTGTGATTTGAGCTTTTTTTCAGTC
CTTGAAACTTTAAGAATATCTGTCTTTATTAACCTTTTGCTTTTTGCTGATGGTTTCT
CTCATTTTATTATAGCTTATAGCATTGTAAATTAATTTAACATGAAAGGATAAAAA
CGTTGCTTTTGAAATGTTTCTCATTAATTTATGAAAAAATATTACACTAAATAAAA
GAAAGGAATGCCTCTGGTACCAGCTTCTGTTTGCTCAATTATTGCAGTACCCAAAG
TGAATTATTACACAGTTAACTCAGAGGCAATATTATTGTCATTATATTATAAAATA
GATGAGTTGCAATCTTCAAAAAAAAAAACAGCATAGGTCCTTTGAAAGTGAAATA
CCTTTTTTCTTGTGCTTCATTTAAATATATACTGACCCAGTTTTGTTTTTGT
TCCTTTTTTAGAGTTCTTGCTAATGATGGGCCCAAAGTTATATTAAGAACTGCAAAG
TAAATTTCAACCAATTACTTTATTAGGGGAGTCATTAAATTGAGGTACCTCTGAA
ATTTTGGAAGGAATGTACTGCCAATTAGCCGAAAGCACTACTCAATGTCCTTTCTA
TGGTTATAATCTCTCTAGTGTATTTTAAATTGAAGACAACCTCTATAGAGGAGGTG
AGAAGTTGCTATTTATTGGTACTTGTTAGGATGGAATCAAGGGTGTGGAAGATATT
CATCTATTTCTCTCTCCAGCTCCCCACACAAAAAGAATGGTGCTTAATCCATCTGA
AGCATTTGGGGAGCGAGGGTAAAGATGTAATATTTACCATGAGCCGAAACAGATCT
TCAGAAGTGGAATAATGGAAGCATATTGAAGTCCCTCAACTAAACAGACTTTCTTCC
ATATGGAATTCAATGCATTAATGTTTTCAAATCTATAGCTTCAAATCTTAATATT
TTCAAATTATGTGAGCTTATGTCAAAACATTTAAGTGAGCTTTTAAACAATGAGGCA
AATATTTGAATCATTTGTCTACATAACAAATACTACTATAAAGCATATTAAATGTT
ATAAAAATCCTAATATACTAATGTAAGCTATTATAAAGTACAAATAATTAACAAT
ATTTATATGATCAATGTTTTATAATACGATAAACACATTAAATAATTA AAAACTCT
TCCACCGTGCAAAAATGACTAAATAAATTGTTAATTTCTAAGGCTTTTTGAGATTA
CTGTGAAAGGGGGTATAGTTTCAGGAAAGGTGAAACTTCCCTTCAATGTGTAAACC
ATTAAGAACATAATAACCTACTGAGTGTGGGTCTCAATGATATGCCCTGGAAAGT
ATGGGCAACTACTCCACACCCAATTTTGTCTTTATATGATAAGGCACAGCAAATAA
TTATAATGCAATGGATAAATGGTAAATCCCACCAAAGATTAACCAATCAGAGCAGG
ATGAAAATTCTGAGTTTGGAAATCTATTGGAAGATTTACAGATTAGATTAAAGTGC
CCAGTAACCAAACCTATCAAAATTATATGGCTTCAGTTAATTAATGATTTCCAAGGT
TTTTAGTATACTGTATTACAAAACACATTAAGCATCTTAAGCATTCAAACAACATT
TTTTTGATGATTCAGAAAGCATCACAAATTGTTATATCAGCTGATAATAACTTAGG
TACATATCAATTAACTTGTATTATAGACACGCAGAATTCTTCAGACCAGAAGTCG
AAAGGGCTTCTCTAGTTTGTGTTTATGCTAAGTTGTTTAGAGATGACATAACTCTGAG
CTAATTTGTCTATTGCAATGGTTCTCAAAATGGGGGGCGGGGGATATTTTTACCTC
CACCAAGTGGACATTTAGCAATATCTGGAGGCATTTTTAATTATTATTACTGGATT

10

20

30

40

50

GGAGATACAACCTGAAGTCTAGTGGGTAGAGGCCAGATATGGTATAAAATATCCTAC
AATGCATAGGATAGCCCTCCACAAGGAATTATTTAGGCCAAAATGTCAGTAGTATA
AAAATTGAGAAATGCTAGTCTAATATAGTGTTTACTCACCTTTCCTGAAACTATGT
CCCCTTTCACAGTAATCTCAAAAAGCTTTAGAAATTAAAAAATCGTTTtagtcattt
TTGCATGGTGGAAGAGCTTTTTAATTATTTAGTGTTTATCTTATGAAATGTTGAT
AATATAAATATTGTTTAATTATTTGAACTTTATAAGAGCTTATATTAGTATATTAAT
TAGGATTTTATTTAACATTTAATATGCTTTACAATAATATTCATTATATAGACAAA
CGTTTTATTTTTTTCACTTTAACAATGATTTTTAACTCTAATTACATAAGAAAAAGT
ATGAGTTAACAATTTTTTAAATTACATGCTTGGTTTGAGGGCCAAATACACATGAA
AATGTGGACTAAAATTTAAATCAAATAAAATCTATAAAGTCGAGGAAAAAGCTAC
TTTTATGACGAGGCATGGGGAATTCTTCATAGTTTTTGGGTTTTATCAGAAGTTAG
CTATTTTTTTTTCTTTTTGCTCTGTAAACAATCAGATAAGAGAGGGCTCAAATGACATT
TTCAAGTACATCTTAACAAAATACACTTTGAGCATCAATTGAGTAAAGTTTCATTCT
TTTTGAACTTTGGTTTTTCACAAGATTTCTTGAGAGTTTTATTTTATTGGTGTTCTG
TGGGACTTGGGCATCATAATTCTTACAACTACTCAGCTCAATCTAATGTGCAGCG
AAGCTCTGGGAACCTTTTGTGTTTGTCTAGTATCCAGTTGGAAGATTCTATAGCTACA
GAGCTTGGGTTTTAAACCCCTCCAAGTCTTTACCAGCTACCTTTATGACCCTGGCA
AATTACTTAACTGTGTGCCACCATTTTTCTCCTCTGTAATACGGAGGCAATAAAAA
TTTCCACTTTTAGATTTTTCTATATGCGGTTTACAAATTGACTTACTCTGAAGATCAT
CTGGAGTAAAATCTGGAGAAATATGATCCCTTATAACTTCTTCAACCCTTTATATA
TTTCAACATGAGTAACCAATGCTCTAAATATGGATATAAATTATAAGAATAAAAAA
TCTAGGACTATTATAATGGTCTAACTCTCTTCATAGCTAAAAGTGTTGAGTAATT
AAACCAGTTGAGCAGCTAAATCATGTACACACTTCTTTGATCCCTCCCACGATCAT
GTATTTGGCATTGTAATGAAAAGATATGTTTTATTTTCGAGAATAGACATAACTACC
TTTAATAATATGATCACCCAGAAATTTTTACAAACCCCTGGAAAATTTTCATGAATA
TCAGGCTGTGCTCATAAAACCTTAGAGATGAGATCACAAATAGACTGGGTCAACATA
TAGTAATGAGCAGGATTAATAAAACCTCAGATGGGCATTTACAAATGAGTCAAAAC
CATGAGTATAATTAAATAATTGTAGCAAAAAAAGAGCCTTGGGTAATCCTTTCAGC
AAACGTAATCGAAGTGATTGCATTTAGAAGACAAATATTTAATTTGGTGACTAGAA
GGTCTTTTTATTATTCCATTATGTCTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGAGACACTTTTCAA
GGTCAATTTTTACTTATAAATTGTCTCTAATTAAAAATTGACTTGGTTATTAAATCA
TTGAAAATTGGCCATCATCAAATTCCTCATTAAAAATATTTCTATGTGCCATATATAT
ATATATATATATATAGAATATATATGTAGAATATATGTATACATTTATTTTTACTTT
TTTTTTACTGTGCCTACTAGAGAAATTTAACTACATATATGTAGAATATATGTAT
GTTTTAACTAGACATACTGTTAAGTACACTATACCTAATATTTGGCAATATTAATA
CCATCTCATTGAGAAACCTGGAATATATGCACATTTTGGATGTCTATTATATGTTG
GGCACTGGACTAGTCATTGATAATACAGAGATTAGTAAGACTCAGGTTGACTTCAG
CCATGTTGTCAGGAAGCACACACTCTAGTTTGGGACAGCGAGGAGAAATTCAATAA
GAGAAATATATATAAGGCATAATGCTCTAGGAGAATATGCAGTGGATAACTGCCCA
ATAGGACCAGGCAAGGCTTTTTAGAGGAGGAGGTGGCATTGAGTCAAGTGTTAAA
GGCTGAATGGAAATTCAGTGGTTGAGATAAACTCCTTAGGAGGAACTACTTTAATA
GAACTTGCCGTTAGTCCTGAAATAAATGGTGTGCAAAATCATTACCATCTGTCAAT
TCACTCAGTCTACTTTGCTCTTAACTTCAGAAAAAATCAGAAATACAATTA AAC
ATTTGAGCCTATTTTACTGTCTTTTAAAATGAGTTAATTCAAAGAGGAAATTAAAT
ATAATGAGAGAGAATCTCCCCGAGGATTGGGGGCTGGGGAAATGCTATTGATTCT
TTGCTTGTGTTTATTTTCTCTCAAAAATACATTATGCATAAACTTGATGATCAAAA
ATTGAGATTATTACATTTCTAAATTGGCAATGCAATTTATTGCATCATACATCAATC
ACAAAAATGCTCATCTTGCTGACTTTTATAAACTTCTAAATGAACAAAAATGCAAA
AATAGTTTATACTATATTACACTATAGTAGATTTGTTAACTAAACCAGAACAAATG
GTCCATGAAAAATAGGCCTCTGACTCCAAACGCTCACACCACAGGATCTCTCTGAG

10

20

30

40

50

ATTTTTGTGTCATTTCAAGTCAGAGAAAATTGTCTAATAAATTGTTGGCTTGTAAC
AATGAAAAC TAAGATATCTGTGGGGCTATTCTTGTTCTCTTCATTTTACTACAGCA
GCTCTGCCCAGTAGAAATAAAATGTGAGCCACATATGTAATTTAAATTTCTCTAGT
AGGCACACTGAAAAAATAAAAAATAAGAAGTGAAATTAATTTCAACAGTATGTTGT
ATATAACCCAATATACCCAAAACATTGTTCATTTTAAACATGTAATTGTTACAAAAGT
TATTAATTAGATTTTTTTCCGTTAAGTATTTAAAATCTGGTAAGTTTTACTCTTACAG
CGCAACTCAGTTCAGATCAGCCACATTTCAAGTGCTCAGTAGCCATATGTGTCTAG
TGGTTACCATATTAGAAAGTAGTTTGAGAGATCCACATTAAACCAAAAGGAAAAGA
ACTTCCGGCCCTTCACTGATGAGTCACTCTTCACTGCTAACCTTGGAAGCATTCCCA
AATGTAGTCTACAGAGTTTAAATAGTCTATCTTAACATCTCTCAGGGCTTCAGTCT
TAATGCCATAGTATTTTTTAAAGAATGGTGGATATTCTTTTTTACAGAACACTCTGT
AAGAGCAATTAGAAGTTTATGATGCACGTAATGCAAAATACAGGTCATTTCCCAAG
CCTATTTTTAAAAGCGCAAAAACCTGTAGTCATTTATCACCCCTGAGAATGTTGTCTT
AAATGTCTTGTTTTGGATATTGGTGATGTGAGAACTTTGTGATAAGAAAGTAGTCT
TTAAGAATAAGATATCAGACTAAAATTCATATCTAGAATGAAAGTCTTGTTTTTTAA
TGGAAGATTAAGAGCAAGTCTGATTCAGATCATGCATGGGGTACACTAGTCTAGGA
AAACACTAGTCTGAAAATATACTAAAAGTTACTTCGCAACTTAACAAGAAAATGTC
TTGTGGGTGATGTCGTTCTTGATTTTTTAGGCAAACCTACCTACCTTTGCAAAGCAG
CTGGGACCTTTTTGCATTGGAAGAATCATTTGGAGCACAAACAAAATTAGATTATC
AACACTTTGGA AAAACA ACTACGAATGAGCAATCAGAAACCTGACCTTAAGATTACT
TGTGAATTGTGAATCAGCAAAATAAACTCGATTGTTCAATTGCTAAGTGATTTCAA
TTATCAAGGGCCTTCTAGATTATAAGTAGTCTTTTTTTTTTTACTTAGTTTACAATTA
AGATGTGTGGTATTTGAAATACATTTGCCACAGGGAGAAATATAAATTATAATTAA
TTTCCTAGGCTAATTCAATTTATGACATACCTATATACATTATCTGTCATCTATAAT
TTTTCCCTTATTGTTTACTTCCCCTGGAAGAATGAAAATGGAATATTATTACATG
GCACATGGCTTGATACTTTTACAAACTCTGACAATTATGTATTTATTTTGGGAGGC
ATTGAGTTTATTTGTTTTATTTATATAAATTTATGAGGTACAAGTATAATTTTGTTA
CATGCATAGATTGTGTAATGGTCACGTCAGGCCTTTTAGGGTATCCATCACCTTAA
TAAGATGCATTGTACCCATTAAGTAATTTCTCACTCTCATAAAATTCTAATTATGTG
AATTTAATTTAATCTATTTAATGTGTTTTAGGCAAATATAGCCGGTACTATAAACA
GTTGATTTTAAGATATCATTGCTTACATTGAGACTAAGTAAAACAAAATGGGTCAA
TAAATGTCAATCTAGATAACAATGTCAACTAAATAAGAGGTCAAACATGGCAGTAT
TTTTGAAGGTGATCTGTGAAAGTGATTATAGCGTTTACACTCATGGAAAATGCCTT
CAGAGTTTCAACTAAGAATGCCAACAGCTCATTCTTTTATCCTGATGCATATTGTC
TTCCTTCTCACCCCCAGTTCCTTCTTCCCCTAACCCCTACCCGCTTTCTTTTGCTGA
TTTTGACAGAAATAGGACCCCCAATAAGTCAGGGAGATAGCAGGAAATGGGATAGG
ATAGAACCCGGAATGATAGAATAGCTGAGCCTGAAGGCATGAAGAAAGGCTCCTCC
TGACATCTAAATGGAGACCTAAGAGATGGGTGGTCAGGTAGGGGGAAGGAAACAT
GAGGAGTATTCTCTAAGCCAGGCAACATACTGTGCACAAGTCTGAAGTCATGGGAA
AGTGATTTTGAGAGGATTGCTGCTTGGTAAACCTAGAGTTTGAATTGGGAGAGATG
AAGCTAGAAAGTTAGTAAGGGTCAGATTTTTTTTTTTTTTTTACTTGCATGACAATGG
TAAAAACCACTAAAGGTTCTGTGTTAAGCAGAGGAGTGACTTCATTTAAAAAGGTA
AATTGGATTGAAATGAAGGGCATAAACTGAGGCAAAAATATCCTTCGTTAAGTTAT
TGAAGCCCAGTTGAACACACTGGTGGCTTAACTGGAGTATTGGTATAAGTGGGGG
AAAGAGGTTAATAGATTCCAAGTTGAAAAA AAAAAAAAAAACATAGACTTTGCTA
TCTAGTAATGGATTAATATACAAAAGGAAAAAGTAAAGTTTCTACTTTTTGGACAG
CTAGAAACCTTCACCGAAGTAGGGAACCCAAGACTTAGATTATGTTGGGAGGGGCA
GGGTATTTTAGTTGCACAGGGATTTGCTTTACAGAAATGACTGAATGACAATATAG
AGAGATCAATTCCATTAAAAGAAGTTTGATTACTCACAGTTCTCAAGGGAAGAGTA
CATACTACGCCATGCAAAGCCATGCAGGAAAAAAGTTCCAGAGTCGGTCAGCAGGC

10

20

30

40

50

AGAAAAGGAAAGCACAGCCCAAACCCCTTTATTGTGGTTTCCAAGGAAAAGAAATGA
GTGAGGTAGAATAGGCAAGTCTGAGCAAGTTTAGGACTGGATAGTTCAAATAATTT
CCAAAATTTCTGCTGTAAAAGTGGTCTCTGGTTGTCTGGTACCAAGCCCTAGGG
TGAGGGGAAAAAGTTAGGGTGGGGGAAATATTGGTTTGGTGTAAACAACAGTTAGAT
GAAGAAGGTAGTTGGGGATACGGACTTTGGATTAGTTGGTTTGTATAACGAAAAGC
AATCCAACAAATCCACAAGGGAGCAAGTTTACAAGTTATTTGCTATCTTTAGGAAT
TAGCTAGCCCTGGGAGGGGCAGTCTCTCCCTGGCCTTCCAAGGACCTCAAGATGTT
CAAGCATCCATAAAATATGGAAATTTTTTAAAAACATTATAAATACACAGAGTAAA
CGCTGGGCATGATATAGGACAGTGGTTCTCAAACCTTAGCTCCACTGGAATCTCCT
GGAAAACCTTGTTAATATGCAGATGACCGTTTTTACCCTTAAGCTTCTAATTGGGGAG
GTCTGGGGAGGGGCACAGATAATTTGCATTTCTACAAAGTTCTTCCATGATTTTGAT
GCCGCTGGTGAGGGACCAGGCTTTGAGAACACTGATTTAGGACGTGTCCTGTTTAG
GGAATATCCAAAAGGCGGACAAGTTCAGGGAATATTCTTGGGCAGTTGGCTGTGTG
AGTCTGAAATTCAGGATAGAATATTAAGCTGAAATAAAGATTTGGGAGCTTATCTA
CAGTCAAATGATAATTGAAATACTGAGAGTACGGGGGGAGAGAGGTCCATGTACCA
AGAAAAGTGAAAATGACTAATCCCAAGCCTCGCTGACCATTGAGAATGGAGCTAAG
TGAGAGGGAGTTAACAAGCTGACCCAGAAAAAGTCATAAGGGCCTTAGGAGGCCAA
GGAAAAAAAATACATTCCTGCCAACGAGAGGCACTTACGAATGGCTTGACTGGCT
TTGCCAGCATGCATGAACTGCTTCATAATTATTTGTATTGATTACAGTAACAGATA
CATATTTTAACAAGCAACTTAAGTAATACAACCTGATTTTTTAATTATCTTGTTTAAAT
TGATAAAGGTTGTATATATTCATGGTGTACAACATGATGTTTTTGATATACCCATAC
ATTGTGGAATGGCTAAATCAAGCCAATTATCGTATGCATTACCTCACATACACTTT
ATTTGTGGTGAGAACACTTAGAGTATACTCTTAGCAAGTATCAAGTATATAATACA
TTGCTGTAACTATAGTATCCATGTTGTACAATAGGTCTCTTGAACATACTCCTCCT
GTCTAATTGAAATTGTGTTTCTTTCGAACAACCTGATTTTTTTTAAATAAAAAACTTA
ATACCTGTAAGTTAGAATTCTTAATGGTCACCTTAGGAGCCTATACAATTATTCCT
ACGTTGTTGTTACTATTCTGTGTCTTTTTCTTTTTTAAACATCTTTAAAGGTATCAAA
TTTTTATATTTTGAAAGTAGAATTTATTTTTTGTGAGTCTAAAATATTTTTATGTTG
AACAAAATGCATGAATGGTAAACCTAGATGCAATCAATTTTTTCAAATAAAAAAAGT
AGATACCCATGAACATTTCTTTTGTAATTGCAAACTGTCTTGAAAGGCAGTTTCAA
AAAGAGTTTAGTTCCTAAATTGTACCATTACTCACTGCGTTAAATGCAACATTCA
TTTGAGCGTATAACCTTTTGATCAATTTGTTTTTGATGTCTTGTTCCCTGAGAGTTG
TCTCAAATAGATACATATAAATATACACATATCTCAGATTGGCTCTGAGAAATGTC
TTGATTCAAACGTTCTT
GATTCTAAGATTCATGGTACATAGGAACTGTATGGTGACAACCTTGTCAGCCTATC
TTTAGAGTAGCTTTGGATTCTATTGAGAACATTTCCCAAAGCTATTCTGCTATCAA
GAATATAAACAGGAATAGTCAAGGGAAGCTTTTTAAAGGGCAACATTTTCATGTAG
GCATTTTTCTCACATTGAAAAGTACTTAAATGCAGTGTATTACCTTCTCATT
CAAGAAGTCTTTACATTAGTATAAATGCATATGGCAGTTGTGCCAGAAATAAATT
GCCTCTCAAACCTAGCACATGGAAAGAAGAATTCTGAGATTAGCACATATGTAGCT
TTTAAATAGTATACTCTGTTTCAAACATTATGTGTTAGTCCACGTTCTCTTCAGCCA
TTTTCAGTTGCATTTTTACTTTATATTCTTTGTATATTTATCTTTGCTAATCATTG
TCCTGAGATTCTTTAGCTCTTGAATTCTACGTTTTTAAATTAATAGAAAACCTTTCTT
TTTATTTTTTCCCCGACATAGTTGTTTTCTAGAAAGAAACAGTTATAGGTTATAAA
TCCAACACTTTAGGGCCGACTTGAACATGCATCAAAGCTACTAGAGGACTTGTAGA
AATACAGATTGAATGGTCCCATGCCTAGAGTTTTACATTCAGTTACAGATAGGGTA
GGACCTGAGAATTCACATTGCTCACAAATTTCCAGTTGATTTTGATGGCATTGGTC
TAGAGACCAAACCTGAGAACCATTAAAAAACAAACAAACAAACAAACAAACCA
AAAAAAAACCTATATACAGAGATTTTCTTCATTGGCTTTTGCCACTGAAGACATTT
AGATGAAGAGACTCCACAAAGTGTAATCATTTAGTTATGAGAGGGGCCTGATAATT

10

20

30

40

50

TGCATTTCTATCAAATTCCCAGGGGATACTATTGTTGCTGATTGAGAACCACACTT
GGTGAAACACTAATTAAAATACCATTAAAAAGCAAAAACAATTTAGGCCAGCAAAA
CCTCCTAAAGAATGAGGCCTAAAGACTTATTTTGTTTTATTTTGGCAGAAGCTTCT
TATGGGCAAAATTATCACCAACAGAGCTGAGGTTCAAACCTGTGTTTCATAGCAAGC
AAAAGGGATAATTTGGAAAAAAGCTGAGGTTAGCTTTGTGGTTGGTTTGGGAGTG
GGAATGAGTAGGGAGGAAGAAATTTAAAAAAGGAAGAAGCCAAAT
ATTAAATTGTTACAGGGCGAAAAAAGAGAAAAGGAGTAACTAGAAATATCTTAGA
CTGGTTCGGCAAGTCGGGTCCCTCGCAGCTAACAGTGGTCCCACCCTCTGGAGTTT
ATATGTTTACATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGGGTCTCACTCTGT
TGCCTAGGCTGGAGTGCAATGGTATGATCACAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCTG
GGCTCGGGTGATCCCCCAACCTCAGCCTCCCAAGTAGCAGAGACTACAGGCAAGT
GCCACCATGTCCAGCTAATTTTTTGTATTTTTTGCAGAGATGGGGTTTCACCAGTT
GCCTAGGCTGGTCTCAATCTCCTAGGCTCAAGTGATCTGCCACCTCAGCCTCCCA
AAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGCGCCTCATTGGAGTTTGCATTCTAGT
TGGGAAAATAGCCAATAAATTTGTGACTTATTTTCTTTAAAAAAGCTTATTC
TGGCTATTGTGTGACTATAGGATATGGAAGGTGCAAGAGTATGAGGCTAACACCCT
GTTCTAAATTCGCTCTCCTCTGAGCCTTGTCTGTCAAGAATCTCCTCCTTCTATAC
TTTTTAAGTCACCTTCCTACTGATCCTTTGCTGTGCTGCTTACCCTCTGGTACCCTT
CATTTTAACAAACAAACAATTGTCCAAGCTTACCGGTGCTGCTCCTTCACCCCTCC
ACCTGTACCTAGTGTCAATTCTCTCCCTCTTCTGATGGCCAACTTTGTGAACTGT
AGCACAGCTCCATATGTGTTCTGCAAAGGACATGATCTCATTCTTTTATGGCT
GCAGAGTATTCCACAGTGTATATGTACCACATTTTCTTTATCCAGTCTATCACTGAT
GGGCATTTGGGTTGATTCCATGTCTTTGCTATTGTGAATAGTGCTGCAGTGAACAT
ACGTGTGCATGTATCTTTAAAATAGAATGGTTTATATTCTTTGGGTATATAACCA
ATAATGGGATTGCTGGGTCAAATGGTATTTCTGGTTCTAGATCTTTGAGGAGCTGG
AAGCCATTATCCTCAGCAAACTAACACAGGAACAGAAAAGCAAATATCACATGTTT
TCACTTAAAAGTGGGAGCTGAACAATGAGAACACATGGACTCATGGAGGGGAACAA
CACACACTGAGGCCTGTGCGGGGGGTGGGGCGAGGGGAGGGGAGAGCATTGGGAAAAA
TAGCTAATGCATGCTGGGCTTAATATCTAGGTGATGGGCAATAGCAAAGACTTGGA
ACCAACCCAAATGTCCAACAATGATAGACTGGATTGAGAAAATGTGGCACATATAC
ACCATGGAATACTATGCAGCCATAAAAAAGGATGAGTTCATGTCCTTTGTAGGGAC
ATGGATGAAGCTGGAACCATCATTCTCAGCAAACTATGGCAAGGACAAAAAACCA
AACACCACATGTTCTCACTCACAGGTGGGAATTGAACAATGAGAACACATGGACAC
AGGAAGGGGAACATCACACACCAGGGCCTGTTGTGGGGTTCGGGGGAGGGGGGAGGG
ATAGCATTTGGAGATACACCTAATGTTAACTGACGAGTTACTGGGTGCAGCACACC
AACATGGCACATGTATACATATGTAACCTTACGTTGTGCATATGGACCCTA
AACTTAAAGTATAATAATAAAATATATATATATATCTCTAGGTGATGGGTTAA
TAGGTGCAGCAAACCACCATGGCACATGTTTACCTATGTAACAAACCTGCACATCC
TGCACATGTACCACGGAACCTTAAAATAAAAAATTAATCATAGAACTTTAAAAAAGA
AAAGAAAATGTAGCAGAGCTGCCTAGCTCACCTTCTTTACCCACAGCTCACTTTTC
AGTCCATTTATCTGGCTATTACTCCTACCGTGCCAGGCAAACTGCTCTCACTAAGA
AAATCAATAGCCTACCCCTGCCAAATTGCCTGACTCAGCTTCTCCTTGTAATTTTC
TCCTTTAGTTCTCTAACACCCTCTTCCCCAGGTTTTCACCTGACCTGTCTCCATAGG
ACATTTGAGTCTCTTTCCTGATGATTCATCCTCAGCCTCTTCCATAATAAGTATGGC
TGCTCCCCAGATCCTACCCTCAGCACTTCTTCACTTTCCATGCCACATCTCTTCTGT
GATCTCATCTTCATCCACGGCTCTAATTAGTATCTATAAGCAGATGACTCTCAAAG
CATATGCTGCCTATGTACCCCTCTTGGCCATTCTACATTGACATCTGCAACTCCCA
GTGAACTTCTATATTTAGACCACAGGACTGGTACCTGCTGATAAGCACAGGTAGGG
TGTAAGTGTAGTGTGTTTCTCTATTTGGTTGGGCTTTTGCTAAAGCAGTTGTCAAAT
ATTTTGAGTCTTACTCATGGCCACAGACATTTTAACATTAGCATGTCCCAAACCTGA

10

20

30

40

50

AATCCCCTACTGCCTCTATTCTCTATTTTCAGAAGATGGCACCACCATCTACCCAATT
ATTTAAGCTAGAACTTCTGATTCTGGTGAGACTTCTCTCTTTTATGCATATGTCTA
CACTGACACAAAAGACTGCAAATTTTACCTCCTAAGTCTGTCTTAAAGCAGATTTT
TCTCTATGATTCTCTATGGTTTCAGGCCCTTATCACTGTGAAGTCAAGCATACCTGA
TTCGAATCTTGTCACCGTTGGCAAATTTTAAATCTCTTCTAGCCTCAGTTTCCTCA
TAAAGTTTTCTGTTTCTTAGGGTGACTAAAGGGCTTAAATGAGATTACCATACAGA
GAGTAAGGTACATAAAATGCAATTAATAAAGAATAGTCACTATAACTGCTGATGAT
GATGCTATTACTATTCGTATCCTAGAAAACCTCCGGTAACTTGTTCACTGGTCTTTCT
GCATCTAGCATCACTTCCTCAGCCAGAGTTATCTTCTGACATGAAGGCTGATGCCG
TCACCCCCATACTCATGTTTGAAATTCTTCAATACCTTTAAGATAAATTCCCACCTC
CTTGGTGATGATGCAAGGTCACACATGACATAATCTCTCCAAGGCCCATTTCTT
CCACTCTCCTTGAGTGATATATGTGGCAGAAAATTTAAGGCTGCCTGGATATTATC
CACCTTACGTCCCAATACTTCCATCTGCCGCAAAGACCTTCTACCCAACCTTCCCATC
CTCAACGAATTCTTATTCTTTCTTTAAAAATAACCTCAAACCTTCAGACTAGACCTCT
GGTCCATAGGGCATTACAAATCTCTCAGTAAGTTGTACAGGATGAACACGCCCCCT
AAAACCTTTGTTTCAGATATTTCAATTTTTATTATTTATTATTATTATACTTTAA
GTTTTAGGGTACATGTGCACAATGTGCAGGTTAGTTACATATGTATACATGTGCCA
GATATTTTCAAGTGTTAAAGGTTTAATAATCACATTTACAGAAAAGGAATTAGCTACA
AAATGGTGGCACTGGTATACAAGTATGTAAAGATACAGTGCTTACAATTTAGGATT
ATTGTTGTGCGATGTTTTAATATTAATAATGGCTAATCATACAGCAAAGTCGAAAGAA
ATTTACGGTCAACATCTGTATACCCAGCACCTATACTTTGCCATTGAAATTTTACTA
TACTTGATTTATTACATATTCATCTATCCATCCCTCTTTCTGTGATCAATTTTTAAT
ATTCTAATACTCTTACCCTTAAATAATAAGTTATCTTTTCAAAAAATAATGTGTTTT
TACATAGATGAAGCAAATAAACTTGCCCTTGATAAAACAATATGCACTGTAGTG
CTTCTAATTCAGTGCAATTGAAGTATCCATTAACAATATAACCAGAGAATATAAAAC
ATGTTTATTAATATTCCACTGTACCTGATTAGATATAGACCATTAGGAAGAGTTAT
TATAATTAAGAATCTAGGTTTGTCAATATAGAAAAAACCTGTGTTTTTTATCCCA
CTGGAATGTCTTGTGAGGAATATTGTTCCCTTTTTCTAAAATTTAACTTTGACCTT
TATTTTGTTAATGCACCATGGGTTAAGCCACACTACGACATGTGCTAAATAGACCT
GGAAGTTTTCAAACCTAGGTTTTTAAAGTGATTTGACATTAAATCTTCATAACACC
TTATTGATTAATTTAAATCCATTACCATGGTAAGGAAAATTCGCAGACAGGCAGGT
GAAAATTAATAAGAAACAAAACAACATGGTAAGCAATCCTTCCCCCAAGCCAAT
CAGCATGTAGTCAGTGTCCTTTTAAATTAGCAAGGCGCAGCTTCCCATAAAGTC
CCAGCTTGATTTTATATGCTGCAATAGTATTGCTAAAATAAAGGAGAAGGCAACTT
TTCTCTATAATTTTTTTCTAGAAGTTTTTCACGCAGCTTAGTATACTGCAATGACCAC
ATTACTCAGTTCCAGAATTAGCAGCATTCCATTGTGAATGACTTAATTCACATTGT
GATTACTCATTTAACAACATTCTTGAGGGTTTACAATGTGCAAAGCATTACATTAA
GTCGTGTGTGGCAGAGGTTCTCAAATGCAGATGATCTGTGAAGAAGATTTCTCTAA
TAAGCAGAGAAATGAGAACTATAAGGACAGAAAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAAA
TTATTTAAGCTTGTAGCTTGTATCCTCCTTTCTTAGGACAGCCTACCATTTAGGCT
GAGACTATGTCTTTCTGATTATTTCTTGTGGTTGAAATACCCCTTCCTTAACAATAT
GATGGTAACAGTGGATGGTAAATCTTGTTTTGTTTTAATAGTTTACCTGGCAAAAG
TATCATTTTTATGTCTGTATCAGTTATATATAATAGTATATCAGTCCATTACCAAACC
GCCTCAAAACTCAGTAGCTTAAACAGTAGGTACTTCTTGAGTTCACTAATTTGTG
GGCTGATGGTTTACATTGGGTAGTTTATCTGCTCTGACTGGGCTCCCTTGGGAATC
TGGAGGGTAGCTGAGAGCTTAAGTGTCTGAAAGTGGCTGGGTCAACACAGCTCTAT
CGCTCACATCTTGAACATCCCTCCAGCAGGCTAACCAGCCCCGAGCAAGTCCTTTTT
GTGAAGGCTGAGGTGAAGAGTGGAAGTGCAAACATGTAAACAATTTGTTGAGCCCC
TGCTTCCATTAAGCCTGCAATATCCGATTGGCTAAAGCAAGTTTTATTTCCTCTGT
GGTAGGCAGAATCATGGGCCCTCGAAGATGTTAATCCCCAGAACCTGTGAATATG

10

20

30

40

50

CTGTGCTCCCTGGCAGTAGGGAATTAATATTCCAGACGGAATTAAGGTTGCTAAGC
AGGTGACTTTGAGATGGGGAGATTTTATGGACTATTCAGATGGGCCTAATCTAACC
ACAGGGTTTCATATAAGTGAAAATGGAAGCAGGAGAGTGGGAGTCAGAGAGATGAAG
ATAGCCCCTGCTGGCTTTGAAGATAGAGAAAGGGGCCATTAGCCAAACAATGTTGG
TAGCATCTAATGCTGGAAAAGGCAGGGAAATAGATTGTCCTCTAAGCTTCTTCAGA
AGGAGTATAGCCCTGCCAACACTTTTCAATTTTAAATCCATGAAACCCATTTCAAACCTT
CTGACTTCCAAAACCTATAAGATAATCAATTTGTGTTGTTTTAGGCCAGTAAGTTTA
TGGAATAATTGTCACAGAAGCAATAGGAAACAAATATACGCTCCATTGTTCAATCTT
TTGAATAACACATATACTATTATTTACTTAATGTTTTTCTTAAAATCAGCTCATTTT
GTTTTCTGCTTTTAGCCTTAAGTGATAATTTCCACAAAACCTGTAGTCTGATGTTGCA
GTGTTTTTTTTCTTAATACAGATAAACTAAATGAATATTAATAATTTAAACTATAA
GCTGTTTTATCTGTGTAACATGGTAAATTGGCTCCCTACCACTACTGTTTCAGCAAAC
CACATTTTGGGAAACAGCGATTTAGGTGGTTCAAAGGAGCAAGTGATTGTGCAAGA
ACAAGAATTTATTAGAGAAAGAAGCATTGCGCAATGGGTAGAATTGTTGGCAGAC
AAAGGTAGAAGAGAAAGACAAATTATTCAGTATGGCTCTAGCGAACTCTTTGCACT
TTTATCACACAATCTGAAGCTTGCTAATCTTGACATGTCTTAATGTTGTTGGATTGC
TCATTAAACTGGCTGAAATGTTACAAAGACTCTCACCTGTCTTCTGGCTTAAGCT
GAGATTTATCACACTTCTTGGAACATCTTCTGGTCTCCAGATCTCCCTCAGCTAAG
CTATACAGTCAGTCTGTTCTGTAAGAAAGCCCAAACCTTCTCTGCAGTGTTCCCTCAG
TCTTTTTGATATCATGATGAACAGATTAAGTTGATGTGTTTCATCATGATATCAGGT
AAGCTGGCCGAAGACTCTAAGCTGCCTAACCATCCAGGGCTGAGAGGGATCGATA
TCTGAAGTACCTATAACCCAATCAGGGCATGTGCCTTAGCATAACCCATTGGAAAGC
CCTGTTTTTAGAGCCTTTATCAGCTGTGAACCTTATTGAAGGCAATGATTTTGTCTGT
TAATCATTTCTATTCATAATTTTCAACAAGATACGTGGTTGTTGTTAATAATAATTGT
TGGTTGAAATGAAGTTAAATAAATAGCAATTGACTTTTCCAAGGTGACGCATTGCA
CAGATTTATTTATCTTCCCTTTGCTGCCCTGGAGTACCAGTTGTATCTACCAATAAG
CTTCATTTATAGGCCAGCCTCATCTTAGTTTCTGAATTAGTCTAAGTGGCTCTGGTA
GCGCATCAAAAATCTTGCTTTCTGATGGTCTTTGTAATTTGAATTCTGTGACTTACA
GACTTGGTATTCAATATGTCAGGAATAAACCTGGGGTGTGCCCAAATGGTTTGA
AAATCCCAGCCTTCTGATTTCTCTCTTCTCTTCTCTCCCTGGCCACCCTAATAGTC
TGATAGTTTTTGTATTTTGGATACTCCTAAACTCTTGGAATTTTTCTTACATCTGT
TCTCTACAGGCTGTCACAAGTGAGTGGAGGCAGGATGGCATGGGCTGCAGTGGAAA
GACCAAGAAAATAAGTTAAAGCCCTGGGTTCCAGTAAATGCTCTGTAGTGGGATT
TAGGGCAAGTCTCTTAACTTCTCTCAGCATCAATCTCCGCATCTGTGAAATAAGAT
TAATGACACCTGTCTTGCCCTATACTTCAAGGTTGTTTTGAGGTTACATGCATTTTC
CACCCCATATAGCCTATAAATCTCTGATGCCTACAGATAACCTATAATGTTCTCCA
GTAAGTTTAATATTTCCAGGATTTTAAACTCAATGACTAGCACTGCTCTGATCTA
ACATAACATATTGTGTCAATATGTGTGGGAGTCTCTCTGGTTGATGTTAATGGAAG
TTTGTATAGTTTACCTAAAATAGAATAAAGCTATAATATTAATATATCATCGAT
GTGTTTTAGGTGATTTTTTTCAATATAAAGGCAATTTTGGTTCAAATTAGGTTAGA
ACATTTAATTTTTACTAATTTACAAATAAAATGATAACATCAAAAGGGCCCCTTCT
TTTAAAGATAAGTTGTAACCTCTCACATTGATAGTAATCTGTCAATTTAGGACAGGGA
ATCCATGTAGTTTGAAAATTCATTGGCATCATGGAGCTAAAACAGTGGCTTTTTTA
ACATGTCGATTTTCAGTTTTCTTTGTTTTACAAGTCAAGTAGTGATATTACTGGGTAC
ATATGAAGCATACTGATTGACCAAAAAATAGTAACAAATTTTGTAACCCCTTCACT
TAACCATTATTACCTTTCCAGCCACATAAGAATCCTTTCTCTTTGTCCTTAGATT
AATTGCCTTTCTTTAACCTTTTCAATTCTAAGTCCAGACAAGCTGCTGTGGTTCTTT
AAAAGGCCACACAAAATAAGTATTGTCCAGTGCTAACACTCTGAAATGTGATATTG
TAATTACTACCAAGTGAACATTAATCACTACTAGATTAGAATGGAATTACCTGTTA
TATTCACATTAATAGCAAATGAGCTTTCCTGATTGATGTTGTTATAATGAATACA

10

20

30

40

50

AAAGGAATTAATAGTGATCTGGCACTCACCAAAAGAGGGGTAGTCATTAAGGACAT
GCCATCAAAAGGCGGGTAATACTTTACAAAAACAAGTATTAATTAAGTAATATC
ACAACGAATGCCTATTGAATAACTTATATCCACATTACAAAGATATTATATGGTTG
CGATTAATGTGATTGCAATACATTTTGTAAAAATTAATAATGACTAACCCTTTAAA
ATATTTAGGAAGCAGATATTTGTTTATATTTGCTAAATAGCTATGCCAACTCTTTA
GCTTTTGTGAGTGACTTCTAGCATAGGAACAGTGATGGATAATATGAAGCACTATA
TATAATAACTCATCGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG
GAGGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCGACACCATCCTGGCTAACAC
GGTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAACACAAAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGTGGGC
GCCTGTAGTCCCCTACTCAGGAGGCAGAGCTTGCAGTGAGCCAAGATTGCACCAC
TGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACTCTGTCAAAAAAAAACAACCTCATAT
ATTTTTACTTGAAAACATACATTTTGCCTTTAGGATTTTTACTTGTTAGAATATCCT
AAAGGACCTATAATTGTAAATGTAAATTGACTAATTTCTGGGTTTTAAAAAAAAG
TATTTGAAAGCTGATCTGCTGTGAACATTGAACCAGATGTTAAGAAAAATGCTAGT
AAGAAATGAGACTTGGGAGCAAAGAAGCAGAACTAACTTTTTCATATATGGTTTCT
ATGGAGTAATTGAGAACGTACATATTAACAGGGATACAAAGTCAGGCCCTCTCATT
CAAGATGCTTTCTGTCTTTAAAAAAAAGTAATTTTTGAAATTTTCTGTGG
CAACAGTCCCATAGCAGAAAGCAAAGAGTTTTGAATTAAGTGATCAGAATATCATT
CTTATAATTTTACTACACTGAACATTATTTAGAAAATTTTGAATGATATTAAAACC
GCTATAAAACATACTTGCCTACCATAAGACTTAGGATTTAAGCCAGATTAAAATAA
ATATTTATTTAGAAAGGATGTATGTAAGAACTGGTGAAATATAAATGAGGTCTGTAT
TTGAGTTAATAGTATTGTGCCAATGTCAGTTTCCTAGCTTTGATGATAATGTACTAT
GGGTATTTAAAATGCTATCATTGGGAGAAGCTGGGTAAAAGGTGCGTGAGAAGTCT
CTGTACTATATTTGCAAGTTTTGTGGTCTTAAACCATTTCAAAGTAAAGTTATTTA
GAAAATATCTAAATATATATTTTAGAAAGTATTATCTTTTTCTCTGTAAGTGTGG
CTAATTAGCTCAGTCTGAAAGAGTATGTAGAGGTGGAAGTCTAAATATATTTCTG
ATCTAGACTTACTTGATGATGCTTGAATTAGTAAGTGAATGTTATGTGCCAACATA
TGCTATGATACATATAAATATATAAGATTAAATGATAGGAGCTAATTATTTCTTGG
CATGTTGCAAGTGGGTCCATTTAAAACTGTTTTATGTAGGAACTACTGTAATTATAA
AAATGAGCACAGCCCAACAGCCAGTATATTAGTTGAAATATAAAAGGCGTTGTGT
CCAAGATTTGAAATGCCTTACAATAAGCTTGGCACTTACTTACCTTCACACAAAGC
AGACACATTTTATTGTGATTTTAGTGTTCCATATTATATGGTACAGTACCAAAGGA
AAACTCTAAAATATGTACTCAAATCCTGATGTGCCCTTCTTTCCAAACAGGTGGC
ACCACAATGAATATAACCTTTAGAGTTAATATCTGAGGACAAACCAGCAGTTACA
CCAGCATGATTTAGGTCCTGCTGTTACAATTATTATTATTGTATTTATTTTACAATT
AAGTTGCAGAGTTGAGCTCGATATAGTTCCAGCTGTGGCTTTTTTTTCAACTGTCTC
AATAGTTCATAGATATGGCCAAATGTTCAATAATAGTGAAAGCTTATAGTCCACAT
ATTATTTCTGTAGCACCAATTTTATGTGAAAAAATGATTTATCTAAATCTCAGAGA
ATTTCCATAACTAGTTTTTGTATACATCTACAAAATAAGTTAAAAGAACAGAGCA
GACTTTTTAAATAGCTAGATTGGCCAAATCCACCTCATTATCATCAAGAAGATACT
GAAACACCGTGTTTTATACAACAAGACCAGGCATTGTAAAAGAGGAGGAAAGGTAGA
GACAAAATTTATTTAGCCCTCAGGAATCTTTCATTCTGATAGTGTAATTTGACAA
CTTTAGAGGGACTTATTAACATGTATCTTATATATCTTGATACCGAATATATATTTT
GTGATTGCATTAGAGCCATGAAATATTACACAGGTCATTTGAACATAGCATTTTCA
TAGAGAAGGTGACATTTGCAAAAGATTAGGAGAAAAGTAACTACGATTAGAAAATC
GTAGTTTTATTTTGTCTCTTGAGAATGAATTGATGTTAATTTTATGTCTGATTTGGC
CAAATACGATGTGGAATTTGCTAAAGACTGAAAAAGAAGAGACATCAAATAGAGG
GTTGCAAGTTAACAGACCATGTTATAATTAATGAGGGAAAAAAAAGTAGAGTTGT
TAAACTCCCAGAGAAGTCATTTCCCCTTGGTTTGGTGCATTTCACTTTGGTGGTGA
AGTAAATGACCATATGGGCACTTTTCTAGCTCTGTCCGCAGGTAGCACTGGGTATT

10

20

30

40

50

TGTGGACAAATTACCTAGCTTTTCATAGCACTAGTTTCCTTGTTGATAGACTTCAG
AATTCTAAATTCCATTTTACATCCTTATTTCTATGTTTAACTTAAAGATAATCCTTT
GCAGCCGGGCACAGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCA
GGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCTGGCTAACATGGTGAAACCCCA
TCTCTACTGAAAATACAAAAAATCAGCCGGGTGTTGTGGTGGGCGCCTGTGGTCCC
AGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGGATGGCATGAATCCGGGAGGTGGAGCTTGC
GGTGAGCCGAGATCGAGTCACTGCACTCCAGCCCGGGCAACAGAGCCAGACTCTGC
CTCAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAACAGATCATCCTTTGCACTGGAA
TTATCCTGCAGTGGAGGATAGTAATGAAAGTGTAGACTCTGTTTCTGAACACTAGC
TATGTCACTTTCAAAGTGTGTGATTTTCTTCAAGTTTCTCAATCACTCCAGGTCTG
GTTTCTAAATAGAGGAATAGGAGTAGAGATTAATATTGTGAAGATTAAATGAGAAA
ACTTATATAAAGCACTTAGTACGGTGCCCTGCATATTGTGAAGGCTTGGTATGTTG
TTAGTAGATTCATTTTATTATCATTATTAATAATACTGAACCCTGGCTGTTGGGGG
AATTGGTTCTATCCTCCTGTCTCATAGTCAAAATAGGTTAAAGGGCCTTCTATCTCT
TATTTCTGGTGGTGCATTATAATTACTAATAGTAATGTGCTTCATTTGTATATGATC
CTTTATAGTTTACATGGCGCTGTTTTATGTAATCTTACTAAAATTTCAAAAATAATT
TTAAAAAGCCAGAATTCACAAGAATGTGACTCGGAGAAGAAGTAGATGTTTTTCTA
AGTAGATCTTTTCAAGTTTAACTGATTCAAATTTTCTCATGTTTCATATACATGATTAT
CATGTCTTTTGATAAACAGAATGTTAACCAGAGTACAACCTTGTATGAACATATTT
ATTCAGCTTAGAAAAGATCCAGAGGTACAAAATCTAGATCCCAGTGTAGAAGTTAG
CATACACAGTACAATTTCTAGTATGTCCATAAACAAATATGTTAAAGTATTAGTTTG
AGCCATATAGGATTGCCAATATCTGAGTGTTATAGAGCTACAAAATTAGTAGGAAA
TTTTGTTGCTTTAACCTAATCATTAAATTAGAATTGTGTGACTTAAAGTTACAAAT
GGTTTCCGAATATTTTGCAGTAAAAAAGTAGTGAGGAAAATAAATATAAATACTAA
ACTAGACCTGGGAAATTTAAGGCTATAAAGAATTCTAGCTTACAGAGAGAGGAGTC
TTTGTGTTGCAACCTCCCACTAGCTAAATTTAAATTATCACAAATTTATCCTCTCCT
TTACTTAACCCTTGACTCATGCAACTAGTCAAATGTCTTTTTCTTGCTAATTTTTTC
TTTCCATAGATCACTTATAGGGAGTTCTGGTTAAAAATGATGTCTCTT(配列番号21
57)

10

20

30

40

50

【0219】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン55標的配列1(NCBI参照配列:NG
_012232.1のヌクレオチド位置1716938~1716987)
GTAAGTCAGGCATTTCCGCTTTAGCACTCTTGTGGATCCAATTGAACAAT(配列番号
2158)

【0220】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン55標的配列2(NCBI参照配列:NG
_012232.1のヌクレオチド位置1716950~1717012)
TTTCCGCTTTAGCACTCTTGTGGATCCAATTGAACAATTCTCAGCATTTGTACTTGT
AACTGA(配列番号2159)

【0221】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン55標的配列3(NCBI参照配列:NG
_012232.1のヌクレオチド位置1717003~1717050)
TTGTAAGTACAAAGCCAGGGACAAAACAAAATAGTTGCTTTTATACAG(配列番号21
60)

【0222】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン55標的配列4(NCBI参照配列:NG
_012232.1のヌクレオチド位置1837063~1837116)
TTATTTATATTTTGCAATTCTCCAAATTCACATTCATCGCTTGTTTCTTTTGTT(配
列番号2161)

【0223】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン55標的配列5(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1837104~1837153)
TGTTTCTTTTGGTAATTCTGCACATATTCTTCTTCCTGCTGTCCTG(配列番号2162)

【0224】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、イントロン55標的配列6(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1836907~1837156)
CCAACATCATAATGGCAAGGAATAAATCTATTACAACATAAAGATGCCCATTTTAA
ATCTACATAATAACAGGAGAAGGCAATACGCCAAGAAAAGGGATTTGAGATGTATC
TTCTTGTTAGTTTAGCCTGATTGAAATGTCTTTTGAACATAAATTATTTATATTTT
GCAATTCTCCAAATTCACATTCATCGCTTGTTCCTTTTGTGGTAATTCTGCACAT
ATTCTTCTTCCTGCTGTCCTGTAG(配列番号2163)

10

【0225】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)イントロン55/エクソン56接合部(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1837127~1837186)
GCACATATTCTTCTTCCTGCTGTCCTGTAGGACCTCCAAGGTGAAATTGAAGCTCACACA(配列番号2164)

【0226】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、転写変異体Dp427m、エクソン56(NCBI参照配列のヌクレオチド位置8462~8634;NM_004006.2;NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1837157~1837329)

20

GACCTCCAAGGTGAAATTGAAGCTCACACAGATGTTTATCACAACCTGGATGAAAA
CAGCCAAAAAATCCTGAGATCCCTGGAAGGTTCCGATGATGCAGTCCTGTTACAAA
GACGTTTGGATAACATGAACTTCAAGTGGAGTGAACCTCGGAAAAAGTCTCTCAAC
ATTAG(配列番号2165)

【0227】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、エクソン56標的配列1(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1837157~1837281)

GACCTCCAAGGTGAAATTGAAGCTCACACAGATGTTTATCACAACCTGGATGAAAA
CAGCCAAAAAATCCTGAGATCCCTGGAAGGTTCCGATGATGCAGTCCTGTTACAAA
GACGTTTGGATAA(配列番号2166)

30

【0228】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、エクソン56標的配列2(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1837157~1837201)

GACCTCCAAGGTGAAATTGAAGCTCACACAGATGTTTATCACAAC(配列番号2167)

【0229】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、エクソン56標的配列3(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1837181~1837237)

CACACAGATGTTTATCACAACCTGGATGAAAACAGCCAAAAAATCCTGAGATCCCTG(配列番号2168)

40

【0230】

Homo sapiensジストロフィン(DMD)、エクソン56標的配列4(NCBI参照配列:NG_012232.1のヌクレオチド位置1837225~1837281)

CCTGAGATCCCTGGAAGGTTCCGATGATGCAGTCCTGTTACAAAGACGTTTGGATAA(配列番号2169)

【0231】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD配列(例として、DMDプレ-mRNA)のスプライシング特徴を標的化する。いくつかの態様において、DMD配列のスプライシング特徴は、DMD配列のエクソンスプライシングエンハンサー(ESE)、分岐点、スプライスド

50

ナー部位、またはスプライスアクセプター部位である。いくつかの態様において、ESEは、DMD配列(例として、DMDプレ-mRNA)のエクソン55内にある。いくつかの態様において、分岐点は、DMD配列(例として、DMDプレ-mRNA)のイントロン54またはイントロン55にある。いくつかの態様において、スプライスドナー部位は、DMD配列(例として、DMDプレ-mRNA)のエクソン54とイントロン54の接合部に跨って、イントロン54の中に、エクソン55とイントロン55の接合部に跨って、またはイントロン55の中に存在する。いくつかの態様において、スプライスアクセプター部位は、DMD配列(例として、DMDプレ-mRNA)のイントロン54の中に、イントロン54とエクソン55の接合部に跨って、イントロン55の中に、またはイントロン55とエクソン56の接合部に跨って存在する。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに有用なオリゴヌクレオチドは、DMD配列(例として、DMDプレ-mRNA)のスプライシング特徴(例として、ESE、分岐点、スプライスドナー部位、またはスプライスアクセプター部位)を標的化するなどによって、エクソン55のスキッピングを促進する。ESE、分岐点、スプライスドナー部位およびスプライスアクセプター部位の例を表9に示す。

10

【0232】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD配列中のエクソンスプライシングエンハンサー(ESE)を標的化する。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン55中のESE(例として、表9に列挙されたESE)を標的化する。

20

【0233】

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD転写物の1つ以上の完全なまたは部分的なESE(例として、表9に列挙された1つ以上の完全または部分的なESE)を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DMDエクソン55の1つ以上の完全なまたは部分的なESEを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2020~2027、2031~2061、および2064~2080のいずれか1つに示される1つ以上の完全なまたは部分的なESEを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2020~2027、2031~2061、および2064~2080のいずれか1つに示されるESEの少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2081~2088、2092~2122および2125~2141のいずれか1つに示されるESEアンチセンス配列の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む。

30

【0234】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DMDエクソン55の1つ以上のESE(例として、2、3、4つ、またはそれ以上の隣接するESE)の少なくとも6つ(例として、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれ以上)のヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2020~2027、2031~2061、および2064~2080のいずれか1つに示される1つ以上のESE(例として、2、3、4つ、またはそれ以上の隣接するESE)の少なくとも6つ(例として、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれ以上)のヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2081~2088、2092~2122および2125~2141のいずれか1つに示される1つ以上のESEアンチセンス配列(例として、2、3、4つ、またはそれ以上の隣接するESEのアンチセンス配列)の少なくとも6つ(例として、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれ以上)のヌクレオチドを含む。

40

【0235】

50

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、18~35ヌクレオチド長であり、配列番号2020~2027、2031~2061および2064~2080のいずれか1つに示されるESEの少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、20~30(例として、20、25、30)ヌクレオチド長であり、配列番号2020~2027、2031~2061および2064~2080のいずれか1つに示されるESEの少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、20~25(すなわち、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチド長であり、配列番号2020~2027、2031~2061および2064~2080のいずれか1つに示されるESEの少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、30ヌクレオチド長であり、配列番号2020~2027、2031~2061および2064~2080のいずれか1つに示されるESEの少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。

10

20

【0236】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD配列中の分岐点を標的化する。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMDイントロン54またはイントロン55における分岐点(例として、表9に列挙された分岐点)を標的化する。

【0237】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD転写物の完全または部分的分岐点(例として、表9に列挙された完全または部分的な分岐点)を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DMDイントロン54またはイントロン55の完全なまたは部分的な分岐点を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2029に示される完全または部分的な分岐点を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2029に示される分岐点の少なくとも4つ(例として、4、5、6、または7つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2090に示される分岐点アンチセンス配列の少なくとも4つ(例として、4、5、6、または7つ)の連続するヌクレオチドを含む。

30

【0238】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、18~35ヌクレオチド長であり、配列番号2029に示される分岐点の少なくとも4つ(例として、4、5、6、または7つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、20~30(例として、20、25、30)ヌクレオチド長であり、配列番号2029に示される分岐点の少なくとも4つ(例として、4、5、6、または7つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオ

40

50

チドは、20～25(すなわち、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチド長であり、配列番号2029に示される分岐点の少なくとも4つ(例として、4、5、6、または7つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、30ヌクレオチド長であり、配列番号2029に示される分岐点の少なくとも4つ(例として、4、5、6、または7つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。

【0239】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD配列中のスプライスドナー部位を標的化する。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、エクソン54とイントロン54との接合部に跨る、イントロン54の中の、エクソン55とイントロン55との接合部に跨る、またはイントロン55の中のスプライスドナー部位(例として、表9に列挙されるスプライスドナー部位)を標的化する。

【0240】

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD転写物の完全または部分的なスプライスドナー部位(例として、表9に列挙される完全または部分的なスプライスドナー部位)を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DMDのエクソン54とイントロン54の接合部に跨る、イントロン54において、エクソン55とイントロン55との接合部に跨る、またはイントロン55の中の完全なまたは部分的なスプライスドナー部位を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2028または2062に示される完全または部分的なスプライスドナー部位を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2028または2062に示されるスプライスドナー部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2089または2123に示されるスプライスドナー部位アンチセンス配列の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む。

【0241】

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、18～35ヌクレオチド長であり、配列番号2028または2062に示されるスプライスドナー部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、20～30(例として、20、25、30)ヌクレオチド長であり、配列番号2028または2062に示されるスプライスドナー部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、20～25(すなわち、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチド長であり、配列番号2028または2062に示されるスプライスドナー部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、30ヌクレオチド長であり、配列番号2028または2062に示されるスプライスドナー部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、または8つ)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。

10

20

30

40

50

【0242】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD配列中のスプライスアクセプター部位を標的化する。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、イントロン54の中の、イントロン54とエクソン55との接合部に跨る、イントロン55の中の、またはイントロン55とエクソン56の接合部に跨るスプライスアクセプター部位(例として、表9に列挙されるスプライスアクセプター部位)を標的化する。

【0243】

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD転写物の完全または部分的なスプライスアクセプター部位(例として、表9に列挙される完全または部分的なスプライスアクセプター部位)を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DMDのイントロン54の中の、イントロン54とエクソン55の接合部に跨る、イントロン55の中の、またはイントロン55とエクソン56の接合部に跨る完全なまたは部分的なスプライスアクセプター部位を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2030または2063に示される完全なまたは部分的なスプライスアクセプター部位を含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2030または2063に示されるスプライスアクセプター部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、8、9、10、または11個)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号2091または2124に示されるスプライスアクセプター部位アンチセンス配列の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、8、9、10、または11個)の連続するヌクレオチドを含む。

【0244】

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、18~35ヌクレオチド長であり、配列番号2030または2063に示されるスプライスアクセプター部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、8、9、10、または11個)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、20~30(例として、20、25、30)ヌクレオチド長であり、配列番号2030または2063に示されるスプライスアクセプター部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、8、9、10、または11個)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソン55のスキッピングなどのエクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、20~25(すなわち、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチド長であり、配列番号2030または2063に示されるスプライスアクセプター部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、8、9、10、または11個)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、30ヌクレオチド長であり、配列番号2030または2063に示されるスプライスアクセプター部位の少なくとも4つ(例として、4、5、6、7、8、9、10、または11個)の連続するヌクレオチドを含む標的配列に対する相補性領域を含む。

【0245】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNAのエクソンとイントロンの接合部(例として、配列番号2144、2151、2156および2164によって提供されるエクソン/イントロン接合部のいずれか1つ)に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DM

Dを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNAのエクソンとイントロンの接合部(例として、配列番号2144、2151、2156および2164によって提供されるエクソン/イントロン接合部のいずれか1つ)の少なくとも10個(例として、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個またはそれ以上)の連続するヌクレオシドに対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、配列番号2144、2151、2156および2164のいずれか1つに相補的である。

【0246】

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNAの標的配列(例として、配列番号2143、2146～2150、2153～2155、2158～2163および2166～2169のいずれか1つによって提供される標的配列)に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNAの標的配列(例として、配列番号2143、2146～2150、2153～2155、2158～2163および2166～2169のいずれか1つによって提供される標的配列)の少なくとも10個(例として、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個またはそれ以上)の連続するヌクレオシドに対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、配列番号2143、2146～2150、2153～2155、2158～2163および2166～2169のいずれか1つに相補的である。

【表9-1】

表9. 標的配列モチーフの例

DMD 内の位置	タイプ	配列番号	モチーフ配列 [†]	配列番号	モチーフアンチセンス配列 [†]
エクソン 54	ESE	2020	ATTCTGC	2081	GCAGAAT
エクソン 54	ESE	2021	CTGCAGA	2082	TCTGCAG
エクソン 54	ESE	2022	TGCAGA	2083	TCTGCA
エクソン 54	ESE	2023	CAGATGA	2084	TCATCTG
エクソン 54	ESE	2024	CCACATG	2085	CATGTGG
エクソン 54	ESE	2025	CACATGA	2086	TCATGTG
エクソン 54	ESE	2026	CAGAGAA	2087	TTCTCTG
エクソン 54	ESE	2027	TCAATGC	2088	GCATTGA
エクソン 54/イントロン 54 接合部に跨る	スプライスドナー	2028	AGGTATG	2089	CATACCT
イントロン 54	分岐点	2029	TTCTGAT	2090	ATCAGAA
イントロン 54/エクソン 55 接合部に跨る	スプライスアクセプター	2030	TCCTTTGCAGG	2091	CCTGCAAAGG A
エクソン 55	ESE	2031	CGAGAGG	2092	CCTCTCG
エクソン 55	ESE	2032	GGCTGCTT	2093	AAGCAGCC
エクソン 55	ESE	2033	GATTACTG	2094	CAGTAATC
エクソン 55	ESE	2034	TTACTGC	2095	GCAGTAA
エクソン 55	ESE	2035	TGCAAC	2096	GTTGCA
エクソン 55	ESE	2036	CCCCCTG	2097	CAGGGGG
エクソン 55	ESE	2037	CCCCTGG	2098	CCAGGGG
エクソン 55	ESE	2038	CCCTGGA	2099	TCCAGGG
エクソン 55	ESE	2039	GTTTCTTG	2100	CAAGAAAC
エクソン 55	ESE	2040	TTTCTTG	2101	CAAGAAA
エクソン 55	ESE	2041	TGCCTGG	2102	CCAGGCA
エクソン 55	ESE	2042	GGCTTACA	2103	TGTAAGCC
エクソン 55	ESE	2043	TTACAGA	2104	TCTGTAA

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

DMD 内の位置	タイプ	配列 番号	モチーフ配列 [†]	配列 番号	モチーフ アンチセンス 配列 [†]
エクソン 55	ESE	2044	TACAGA	2105	TCTGTA
エクソン 55	ESE	2045	ACAGAAG	2106	CTTCTGT
エクソン 55	ESE	2046	CTGCCAA	2107	TTGGCAG
エクソン 55	ESE	2047	TGCCAATG	2108	CATTGGCA
エクソン 55	ESE	2048	GTCCTACA	2109	TGTAGGAC
エクソン 55	ESE	2049	CTACAGG	2110	CCTGTAG
エクソン 55	ESE	2050	TACAGGA	2111	TCCTGTA
エクソン 55	ESE	2051	GGATGCTA	2112	TAGCATCC
エクソン 55	ESE	2052	CTACCCG	2113	CGGGTAG
エクソン 55	ESE	2053	TACCCGTA	2114	TACGGGTA
エクソン 55	ESE	2054	GGCTCCTA	2115	TAGGAGCC
エクソン 55	ESE	2055	CTAGAAG	2116	CTTCTAG
エクソン 55	ESE	2056	AGACTCC	2117	GGAGTCT
エクソン 55	ESE	2057	GACTCCAA	2118	TTGGAGTC
エクソン 55	ESE	2058	CTCCAAG	2119	CTTGGAG
エクソン 55	ESE	2059	CCAAGGG	2120	CCCTTGG
エクソン 55	ESE	2060	CTGATGA	2121	TCATCAG
エクソン 55	ESE	2061	ACAATGG	2122	CCATTGT
エクソン 55/イントロン 55 接合部に跨る	スプライス ドナー	2062	AAGTAAG	2123	CTTACTT
イントロン 55/エクソン 56 接合部に跨る	スプライス アクセプター	2063	TCCTGTAGG	2124	CCTACAGGA
エクソン 56	ESE	2064	GACCTCCA	2125	TGGAGGTC
エクソン 56	ESE	2058	CTCCAAG	2119	CTTGGAG
エクソン 56	ESE	2065	CCAAGGT	2126	ACCTTGG
エクソン 56	ESE	2066	TCACACA	2127	TGTGTGA
エクソン 56	ESE	2067	CACACAG	2128	CTGTGTG
エクソン 56	ESE	2068	ACACAGA	2129	TCTGTGT
エクソン 56	ESE	2069	CACAGA	2130	TCTGTG
エクソン 56	ESE	2070	CAGATGT	2131	ACATCTG
エクソン 56	ESE	2071	TCACAAC	2132	GTTGTGA
エクソン 56	ESE	2072	CAGCCAA	2133	TTGGCTG
エクソン 56	ESE	2073	AAATCCTG	2134	CAGGATTT
エクソン 56	ESE	2074	CTGAGAT	2135	ATCTCAG
エクソン 56	ESE	2075	GATCCCTG	2136	CAGGGATC
エクソン 56	ESE	2076	TCCCTGG	2137	CCAGGGA
エクソン 56	ESE	2038	CCCTGGA	2099	TCCAGGG
エクソン 56	ESE	2077	GGTTCCGA	2138	TCGGAACC
エクソン 56	ESE	2078	CCGATGA	2139	TCATCGG
エクソン 56	ESE	2079	TTACAAA	2140	TTTGTA
エクソン 56	ESE	2080	AAGACGT	2141	ACGTCTT

10

20

30

40

50

† 表9に示される配列のいずれか1つの各チミン塩基(T)は、独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置き換えられていてもよい。表9に列挙されるモチーフ配列およびアンチセンス配列はTを含むが、RNAおよび/またはDNAにおけるモチーフ配列の結合が企図される。

【0247】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドのいずれか1つは、ホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)である。

【0248】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、突然変異体DMD対立遺伝子、例えば、フレームシフトおよび不適当なRNAスプライシング/プロセッシングに繋がるヒト中DMDのエクソン1~79のいずれかにおける少なくとも1個の突然変異を伴うDMD対立遺伝子、と相補性のある領域を有してもよい。

【0249】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドのいずれか1つは、例として、ナトリウム、カリウム、またはマグネシウム塩としての塩形態であり得る。

【0250】

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか1つの5'または3'ヌクレオシド(例として、末端ヌクレオシド)は、任意にスパーサーを介してアミン基に抱合される。いくつかの態様において、スパーサーは脂肪族部分を含む。いくつかの態様において、スパーサーはポリエチレングリコール部分を含む。いくつかの態様において、ホスホジエステル連結がスパーサーとオリゴヌクレオチドの5'または3'ヌクレオシドとの間に存在する。いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれかの5'または3'ヌクレオシド(例として、末端ヌクレオシド)はスパーサーに抱合され、これが置換もしくは非置換の脂肪族、置換もしくは非置換のヘテロ脂肪族、置換もしくは非置換のカルボシクリレン、置換もしくは非置換のヘテロシクリレン、置換もしくは非置換のアリーレン、置換もしくは非置換のヘテロアリーレン、 $-O-$ 、 $-N(R^A)-$ 、 $-S-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^A-$ 、 $-NR^AC(=O)-$ 、 $-NR^AC(=O)R^A-$ 、 $-C(=O)R^A-$ 、 $-NR^AC(=O)O-$ 、 $-NR^AC(=O)N(R^A)-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)N(R^A)-$ 、 $-S(O)_2NR^A-$ 、 $-NR^AS(O)_2-$ 、またはそれらの組み合わせであり;各 R^A は独立して水素または置換もしくは非置換のアルキルである。ある種の態様において、スパーサーは置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクリレン、置換もしくは非置換のヘテロアリーレン、 $-O-$ 、 $-N(R^A)-$ 、または $-C(=O)N(R^A)_2$ 、あるいはそれらの組み合わせである。

10

20

【0251】

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか1つの5'または3'ヌクレオシドは、式 $-NH_2-(CH_2)_n-$ の化合物に抱合され、 n は1~12の整数である。いくつかの態様において、 n は6、7、8、9、10、11、または12である。いくつかの態様において、ホスホジエステル連結が式 $NH_2-(CH_2)_n-$ の化合物とオリゴヌクレオチドの5'または3'ヌクレオシドとの間に存在する。いくつかの態様において、式 $NH_2-(CH_2)_6-$ の化合物は6-アミノ-1-ヘキサノール($NH_2-(CH_2)_6-OH$)とオリゴヌクレオチドの5'リン酸との間の反応によってオリゴヌクレオチドに抱合される。

【0252】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、標的化薬剤、例として抗TfR1抗体などの筋標的化剤に、例としてアミン基を介して抱合される。

30

【0253】

a.オリゴヌクレオチドのサイズ/配列

オリゴヌクレオチドは、例としてフォーマットに応じて、様々な異なる長さのものであってもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、または以上のヌクレオチド長である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、8から50ヌクレオチド長、8から40ヌクレオチド長、8から30ヌクレオチド長、10から15ヌクレオチド長、10から20ヌクレオチド長、15から25ヌクレオチド長、21から23ヌクレオチド長、20から25ヌクレオチド長などである。

40

【0254】

いくつかの態様において、本開示の目的のためのオリゴヌクレオチドの核酸配列は、標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能である場合、標的核酸に「相補的」である。いくつかの態様において、標的核酸(例として、mRNAまたはプレ-mRNA分子)にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、標的の活性または発現の調節(例として、mRNA翻訳の減少、プレ-mRNAスプライシングの変化、エクソンスキッピング、標的mRNA分解など)をもたらす。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドの核酸配列は、その標的核酸に対して、非特異的結合の回避が望まれる条件下、例として生理学的条件下で非標的配列

50

にハイブリダイズしないように、充分な程度の相補性を有する。よって、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の連続したヌクレオチドに少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的であり得る。いくつかの態様において、相補的なヌクレオチド配列は、標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能であるか、または標的核酸に特異的であるその標的の配列に100%相補的である必要はない。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸に対して1つ以上のミスマッチ核酸塩基を含む。特定の態様において、標的に関連する活性は、そのようなミスマッチによって低下するが、非標的に関連する活性は、より大きく低下する(すなわち、標的核酸に対する選択性が増加し、標的外効果が減少する)。

10

【0255】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、8から15、8から30、8から40、または10から50、または5から50、15から20、20から25、または5から40ヌクレオチド長の範囲にある標的核酸と相補性のある領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドの、標的核酸と相補性のある領域は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、相補性のある領域は、標的核酸の少なくとも連続した8ヌクレオチドと相補的である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の一部の連続したヌクレオチドと比較して1、2または3塩基ミスマッチを含有していてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、15塩基にわたり最大3ミスマッチまで、または10塩基にわたり最大2ミスマッチまで有していてもよい。

20

【0256】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド(例として、表8に列挙されるオリゴヌクレオチド)のいずれか1つの標的配列に対して相補的である(例として、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的である)。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号780~2019によって提供されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つの標的配列に対して相補的である(例として、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的である)。いくつかの態様において、かかる標的配列は表8に列挙されるオリゴヌクレオチドに対して100%相補的である。いくつかの態様において、かかる標的配列は配列番号780~2019によって提供されるオリゴヌクレオチドに対して100%相補的である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、本明細書で提供される標的配列(例として、表8に列挙される標的配列)に対して相補的である(例として、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的である)。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号160~779のいずれか1つに相補的(例として、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的)である。

30

40

【0257】

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNAの標的配列(例として、配列番号160~779のいずれか1つによって提供される標的配列)に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNAの標的配列(例として、配列番号160~779のいずれか1つによって提供される標的配列)の少なくとも8つ(例として、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個、またはそれ以上)の連続するヌクレオチドに対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌ

50

クレオチドは、配列番号160～779のいずれか1つに相補的である。

【0258】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、本明細書で提供されるDMD標的化配列(例として、表8に列挙されるアンチセンス配列)の少なくとも8つ(例として、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個、またはそれ以上)の連続する核酸塩基を含む配列を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号780～2019のいずれか1つの少なくとも8つ(例として、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個、またはそれ以上)の連続する核酸塩基を含む配列を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号780～2019のいずれか1つの配列を含む。

10

【0259】

いくつかの態様において、DMDを標的化するのに(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNAの標的配列(例として、配列番号160、162～166、168、169、173、178～180、243～251、253、255、256、262～266、268、270～272、274、282～284、289～291、294、295、319、343、347、351、356～358、364、366、367、398、401、453～455、462、463、526、573、748、および755のいずれか1つによって提供される標的配列)に対する相補性領域を含む。いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、DMD RNAの標的配列(例として、配列番号160、162～166、168、169、173、178～180、243～251、253、255、256、262～266、268、270～272、274、282～284、289～291、294、295、319、343、347、351、356～358、364、366、367、398、401、453～455、462、463、526、573、748、および755のいずれか1つによって提供される標的配列)の少なくとも8つ(例として、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個、またはそれ以上)の連続するヌクレオチドに対する相補性領域を含む。いくつかの態様においてDMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、配列番号160、162～166、168、169、173、178～180、243～251、253、255、256、262～266、268、270～272、274、282～284、289～291、294、295、319、343、347、351、356～358、364、366、367、398、401、453～455、462、463、526、573、748、および755のいずれか1つに相補的である。

20

30

【0260】

いくつかの態様において、DMDを標的化するために(例として、エクソンスキッピングのために)有用なオリゴヌクレオチドは、本明細書で提供されるDMD標的化配列(例として、配列番号1400、1402～1406、1408、1409、1413、1418～1420、1483～1491、1493、1495、1496、1502～1506、1508、1510～1512、1514、1522～1524、1529～1531、1534、1535、1559、1583、1587、1591、1596、1597、1598、1604、1606、1607、1638、1641、1693～1695、1702、1703、1766、1813、1988、および1995のいずれか1つの配列)の少なくとも8つ(例として、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個、またはそれ以上)の連続する核酸塩基を含む配列を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、本明細書で提供されるDMD標的化配列(例として、配列番号1400、1402～1406、1408、1409、1413、1418～1420、1483～1491、1493、1495、1496、1502～1506、1508、1510～1512、1514、1522～1524、1529～1531、1534、1535、1559、1583、1587、1591、1596、1597、1598、1604、1606、1607、1638、1641、1693～1695、1702、1703、1766、1813、1988、および1995のいずれか1つの配列)の少なくとも8つ(例として、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個、またはそれ以上)の連続するヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、オリゴ

40

50

ヌクレオチドは、配列番号1400、1402～1406、1408、1409、1413、1418～1420、1483～1491、1493、1495、1496、1502～1506、1508、1510～1512、1514、1522～1524、1529～1531、1534、1535、1559、1583、1587、1591、1596、1597、1598、1604、1606、1607、1638、1641、1693～1695、1702、1703、1766、1813、1988、および1995のいずれか1つの配列を含む。

【0261】

いくつかの態様において、当然のことながら、C5位での核酸塩基ウラシルのメチル化がチミンを形成する。したがって、いくつかの態様において、C5メチル化ウラシル(または5-メチル-ウラシル)を有するヌクレオチドまたはヌクレオシドは、チミンヌクレオチドまたはヌクレオシドとして同等に同定されてもよい。

【0262】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチド(例として、表8に列挙されるオリゴヌクレオチド)のいずれか1つのチミン塩基(T)のいずれか1つ以上は、独立しておよび任意に、ウラシル塩基(U)であってもよく、かつ/または本明細書で提供されるオリゴヌクレオチド中のUのいずれか1つ以上は、独立しておよび任意に、Tであってもよい。いくつかの態様において、配列番号1400～2019によって提供されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つの中の、または配列番号160～779のいずれか1つに相補的なオリゴヌクレオチドの中のチミン塩基(T)のいずれか1つ以上は、任意にウラシル塩基(U)であってもよく、かつ/またはオリゴヌクレオチドの中のUのいずれか1つ以上は、任意にTであってもよい。いくつかの態様において、配列番号780～1399によって提供されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つの中の、または配列番号160～779のいずれか1つに相補的なオリゴヌクレオチドの中のウラシル塩基(U)のいずれか1つ以上は、任意にチミン塩基(T)であってもよく、かつ/またはオリゴヌクレオチドの中のTのいずれか1つ以上は、任意にUであってもよい。

【0263】

b.オリゴヌクレオチド修飾:

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、修飾されていてもよく、例として、修飾された糖部、修飾されたヌクレオシド間連結、修飾ヌクレオチドもしくはヌクレオシド、および/または(例として、および)それらの組み合わせを含む。加えて、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、以下の特性の1つ以上を呈してもよい:選択的スプライシングを媒介しない;免疫刺激性ではない;ヌクレアーゼ抵抗性である;非修飾オリゴヌクレオチドと比較して改善された細胞取り込みを有する;細胞または哺乳動物への毒性がない;改善されたエンドソームの内部への出口を細胞中に有する;TLR刺激を最小限に抑える;または、パターン認識受容体を回避する。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの修飾された化学的性質またはフォーマットのいずれも、互いに組み合わせられ得る。例えば、1、2、3、4、5、またはこれより多くの異なるタイプの修飾が、同じオリゴヌクレオチド内に包含され得る。

【0264】

いくつかの態様において、それらが組み込まれているオリゴヌクレオチドを、天然のオリゴデオキシヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチド分子よりもヌクレアーゼ消化に対して耐性にする特定のヌクレオチドまたはヌクレオシド修飾を使用することができ、これらの修飾されたオリゴヌクレオチドは、修飾されていないオリゴヌクレオチドよりも長期間インタクトに存続する。修飾されたオリゴヌクレオチドの特定例としては、修飾された主鎖、例えば、ホスホロチオアート、ホスホトリエステル、メチルホスホナート、短鎖アルキルもしくはシクロアルキル糖間連結、または短鎖ヘテロ原子のもしくは複素環式の糖間連結などの修飾されたヌクレオシド間連結を含むものが挙げられる。したがって、本開示のオリゴヌクレオチドは、修飾、例として、ヌクレオチドまたはヌクレオシド修飾の組み込みなどによる核酸分解に対して安定化され得る。

【0265】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、最大50ヌクレオチド長または最大

100ヌクレオチド長であり得、オリゴヌクレオチドの2~10、2~15、2~16、2~17、2~18、2~19、2~20、2~25、2~30、2~40、2~45個、またはそれ以上のヌクレオチドもしくはヌクレオシドは修飾ヌクレオチド/ヌクレオシドである。オリゴヌクレオチドは、8から30ヌクレオチド長であり得、オリゴヌクレオチドの2~10、2~15、2~16、2~17、2~18、2~19、2~20、2~25、2~30個のヌクレオチドまたはヌクレオシドは修飾ヌクレオチド/ヌクレオシドである。オリゴヌクレオチドは、8~15ヌクレオチド長であり得、オリゴヌクレオチドの2~4、2~5、2~6、2~7、2~8、2~9、2~10、2~11、2~12、2~13、2~14個のヌクレオチドまたはヌクレオシドは修飾ヌクレオチド/ヌクレオシドである。任意に、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のヌクレオチド/ヌクレオシドを除くすべてのヌクレオチドまたはヌクレオシドが修飾され得る。オリゴヌクレオチド修飾は本明細書にさらに記載されている。

10

【0266】

c. 修飾ヌクレオシド

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、糖の2'位において修飾された少なくとも1つのヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの2'修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチド上のヌクレオシドのすべては2'修飾ヌクレオシドである。

【0267】

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、1以上の非二環式2'-修飾ヌクレオチド、例として、2'-デオキシ、2'-フルオロ(2'-F)、2'-O-メチル(2'-O-Me)、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)の修飾ヌクレオシドを包含する。

20

【0268】

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の2'-4'二環式ヌクレオシドを含むが、ヌクレオシド中リボース環は、その環中2個の原子を接続する(例として、メチレン(LNA)架橋、エチレン(ENA)架橋、または(S)-拘束エチル(cEt)架橋を介して、2'-O原子を4'-C原子へ接続する)架橋部分を含む。LNAの例は、2008年4月17日公開の「RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9」と題する国際公開第2008/043753号に記載されており、この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ENAの例は、2005年5月12日に公開され「APP/ENA Antisense」と題する国際公開第2005/042777号、Morita et al., Nucleic Acid Res., Suppl 1:241-242, 2001; Surono et al., Hum. Gene Ther., 15:749-757, 2004; Koizumi, Curr. Opin. Mol. Ther., 8:144-149, 2006、および Horie et al., Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf), 49:171-172, 2005に提供されており、これらの開示はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。cEtの例は、米国特許7,101,993; 7,399,845および7,569,686に提供されており、これら各々はそれら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0269】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、以下の米国特許または特許出願公開: 米国特許第7,399,845号、2008年7月15日発行、表題「6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs」、米国特許第7,741,457号、2010年6月22日発行、表題「6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs」、米国特許第8,022,193号、2011年9月20日発行、表題「6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs」、米国特許第7,569,686号、2009年8月4日発行、表題「Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs」、米国特許第7,335,765号、2008年2月26日発行、表題「Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues」、米国特許第7,314,923号、2008年1月1日発行、表題「Novel Nucleoside And Oli

50

gonucleotide Analogues」、米国特許第7,816,333号、2010年10月19日発行、表題「Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same」、および米国特許出願公開第2011/0009471号であって、現在は米国特許第8,957,201号、2015年2月17日発行、表題「Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same」(あらゆる目的のために、こ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)のうちの1つに開示された修飾ヌクレオシドを含む。

【0270】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の修飾ヌクレオシドも有さないオリゴヌクレオチドと比較して、1℃、2℃、3℃、4℃、または5℃の範囲にあるオリゴヌクレオチドのT_mの増大をもたらす少なくとも1個の修飾ヌクレオシドを含む。オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシドを有さないオリゴヌクレオチドと比較して、合計で2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、またはこれを超える温度の範囲にあるオリゴヌクレオチドのT_mの増大をもたらす複数の修飾ヌクレオシドを有していてもよい。

10

【0271】

オリゴヌクレオチドは、異なる種類のヌクレオシドのミックスを含み得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、2'-デオキシリボヌクレオシドまたはリボヌクレオシドおよび2'-フルオロ修飾ヌクレオシドのミックスを含み得る。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオシドまたはリボヌクレオシドおよび2'-O-Me修飾ヌクレオシドのミックスを含み得る。オリゴヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾ヌクレオシドおよび2'-O-Me修飾ヌクレオシドのミックスを含み得る。オリゴヌクレオチドは、2'-4'二環式ヌクレオシドおよび2'-MOE、2'-フルオロ、または2'-O-Me修飾ヌクレオシドのミックスを含み得る。オリゴヌクレオチドは、非二環式2'修飾ヌクレオシド(例として、2'-MOE、2'-フルオロ、または2'-O-Me)および2'-4'二環式ヌクレオシド(例として、LNA、ENA、cEt)のミックスを含み得る。

20

【0272】

オリゴヌクレオチドは、異なる種類の交互のヌクレオシドを含み得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、交互の2'-デオキシリボヌクレオシドまたはリボヌクレオシドおよび2'-フルオロ修飾ヌクレオシドを含み得る。オリゴヌクレオチドは、交互のデオキシリボヌクレオシドまたはリボヌクレオシドおよび2'-O-Me修飾ヌクレオシドを含み得る。オリゴヌクレオチドは、交互の2'-フルオロ修飾ヌクレオシドおよび2'-O-Me修飾ヌクレオシドを含み得る。オリゴヌクレオチドは、交互の2'-4'二環式ヌクレオシドおよび2'-MOE、2'-フルオロ、または2'-O-Me修飾ヌクレオシドを含み得る。オリゴヌクレオチドは、交互の非二環式2'修飾ヌクレオシド(例として、2'-MOE、2'-フルオロ、または2'-O-Me)および2'-4'二環式ヌクレオシド(例として、LNA、ENA、cEt)を含み得る。

30

【0273】

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、5'-ビニルホスホン酸修飾、1以上の無塩基残基、および/または1以上の逆向きの無塩基残基を含む。

【0274】

d.ヌクレオシド間連結/主鎖

40

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートまたは他の修飾ヌクレオシド間連結を含有していてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結を、少なくとも2個のヌクレオシド間を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結を、すべてのヌクレオシド間を含む。例えば、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシド間連結を、ヌクレオチド配列の5'または3'末端の、第1の、第2の、および/または(例として、および)、第3のヌクレオシド間連結にて含む。

【0275】

50

使用されてもよい、リンを含有する連結は、これらに限定されないが、正常な3'-5'連結、これらの2'-5'連結類似体を有する、ホスホロチオアート、キラルのホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、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、メチルおよび他のアルキルホスホナート(3'アルキレンホスホナートおよびキラルのホスホナートを含む)、ホスフィナート、ホスホロアミダート(3'-アミノホスホロアミダートおよびアミノアルキルホスホロアミダートを含む)、チオノホスホロアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびにボラノホスファートと、逆方向の極性を有するこれら(ここでヌクレオシド単位の隣接する対は3'-5'から5'-3'へまたは2'-5'から5'-2'へ連結されている)とを包含する;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5,177,196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5,541,306号;第5,550,111号;第5,563,253号;第5,571,799号;第5,587,361号;および第5,625,050号を参照されたい。

10

【0276】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、メチレン(メチルイミノ)またはMMI主鎖、アミド主鎖(De Mesmaeker et al. *Ace. Chem. Res.* 1995, 28:366-374を参照されたい)、モルホリノ主鎖(SummertonおよびWeller、米国特許第5,034,506号を参照されたい)、またはペプチド核酸(PNA)主鎖(ここでオリゴヌクレオチドのホスホジエステル主鎖がポリアミド主鎖に置き換えられており、ヌクレオチドがポリアミド主鎖のアザ窒素原子へ直接的または間接的に結合されている、Nielsen et al., *Science* 1991, 254, 1497を参照されたい)などのヘテロ原子主鎖を有していてもよい。

20

【0277】

e. 立体特異的オリゴヌクレオチド

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間のリン原子はキラルであり、およびオリゴヌクレオチドの特性はキラルのリン原子の立体配置に基づき調整される。いくつかの態様において、適切な方法は、立体制御されたやり方(例として、Oka N, Wada T, *Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms*, *Chem Soc Rev.* 2011 Dec; 40(12):5829-43に記載のとおり)でP-キラルオリゴヌクレオチド類似体を合成するために使用されてもよい。いくつかの態様において、実質的にすべてのSpホスホロチオアート糖間連結または実質的にすべてのRpホスホロチオアート糖間連結のいずれかによって互いに結合されたヌクレオシド単位を含む、ホスホロチオアート含有オリゴヌクレオチドが提供される。いくつかの態様において、実質的にキラル純粋な糖間連結を有するかかるホスホロチオアートオリゴヌクレオチドは、例えば、1996年12月12日に発行された米国特許第5,587,261号(この内容は全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる)に記載されるように、酵素合成または化学合成によって調製される。いくつかの態様において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、標的核酸の選択的切断パターンを提供する。例えば、いくつかの態様において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、例えば、2017年2月2日に公開された表題「CHIRAL DESIGN」の米国特許出願公開20170037399号(この内容は全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる)に記載のとおり、核酸の相補的な配列内に単一の切断部位を提供する。

30

40

【0278】

f. モルホリノ

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、モルホリノをベースとした化合物であってもよい。モルホリノをベースとしたオリゴマー化合物は、Dwayne A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510、Genesis, volume 30, issue 3, 2001、Heasman, J., *Dev. Biol.*, 2002, 243, 209-214、Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26, 216-220、Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2

50

000,97,9591-9596、および1991年7月23日発行の米国特許第5,034,506号に記載されている。いくつかの態様において、モルホリノをベースとしたオリゴマー化合物は、ホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)である(例として、Iverson, Curr. Opin. Mol. Ther., 3:235-238, 2001、およびWang et al., J. Gene Med., 12:354-364, 2010に記載のとおり。これらの開示はこれら全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0279】

g. ペプチド核酸(PNA)

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位の糖とヌクレオシド間連結(主鎖)との両方とも、新規な基に置き換えられている。いくつかの態様において、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ている。かかるオリゴマー化合物の1つである、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物中のオリゴヌクレオチドの糖-主鎖は、アミド含有主鎖、例えば、アミノエチルグリシン主鎖に置き換えられている。核酸塩基は保持されており、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子へ直接的または間接的に結合されている。PNA化合物の調製を報告する代表的な刊行物は、これらに限定されないが、米国特許第5,539,082号;第5,714,331号;および第5,719,262号(これら各々は参照により本明細書に組み込まれる)を包含する。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に見出され得る。

【0280】

h. Mixmer

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、mixmerであってもよく、またはmixmer配列パターンを含んでいてもよい。一般に、mixmerは、天然に存在するヌクレオシドと天然に存在しないヌクレオシドとの両方を含むオリゴヌクレオチドであるか、または2つの異なるタイプの天然に存在しないヌクレオシドを、典型的には互い違いなパターンで含むオリゴヌクレオチドである。Mixmerは一般に、非修飾オリゴヌクレオチドより高い結合親和性を有し、標的分子に特異的に結合する、例として、標的分子上の結合部位を遮断するために使用されてもよい。一般に、mixmerは、RNaseを標的分子へ動員させず、よって標的分子の切断を促進しない。RNase Hを動員することが可能ではない、かかるオリゴヌクレオチドは記載されており、例えば、国際公開第2007/112754号または国際公開第2007/112753号を参照されたい。

【0281】

いくつかの態様において、mixmerは、ヌクレオシド類似体と天然に存在するヌクレオシドとの反復パターン、もしくはあるタイプのヌクレオシド類似体と別のタイプのヌクレオシド類似体との反復パターンを含むか、またはこれらからなる。しかしながら、mixmerは、反復パターンを含む必要がなく、その代わりに、修飾ヌクレオシドと天然に存在するヌクレオシドとのいずれの配置も、または1タイプの修飾ヌクレオシドともう1タイプの修飾ヌクレオシドとのいずれの配置も含むことができる。反復パターンは、実例として、2ヌクレオシド毎または3ヌクレオシド毎に、LNAなどの修飾ヌクレオシドであってもよく、残りのヌクレオシドは、DNAなどの天然に存在するヌクレオシドであるか、あるいは2'MOEもしくは2'フルオロ類似体などの2'置換ヌクレオシド類似体、または本明細書に記載のいずれの他の修飾ヌクレオシドである。LNA単位などの修飾ヌクレオシドの反復パターンが、固定された位置にて-例として5'末端または3'末端にて、修飾ヌクレオシドと組み合わせられてもよいことが確認されている。

【0282】

いくつかの態様において、mixmerは、6つ以上、5つ以上、4つ以上、または3つ以上連続した、DNAヌクレオシドなどの天然に存在するヌクレオシドの領域を含まない。いくつかの態様において、mixmerは、少なくとも2つの連続したLNAなどの、少なくとも2つの連続した修飾ヌクレオシドからなる領域を少なくとも含む。いくつかの態様におい

て、mixmerは、少なくとも3つの連続したLNAなどの、少なくとも3つの連続した修飾ヌクレオシドからなる領域を少なくとも含む。

【0283】

いくつかの態様において、mixmerは、8つ以上の、7つ以上の、6つ以上の、5つ以上の、4つ以上の、または3つ以上の連続した、LNAなどのヌクレオシド類似体の領域を含まない。いくつかの態様において、LNA単位は、本明細書に言及されたヌクレオシド類似体などの他のヌクレオシド類似体に置き換えられていてもよい。

【0284】

Mixmerは、非限定例におけるLNAヌクレオシドおよび2'-O-Meヌクレオシドなどの親和性増強修飾ヌクレオシドの混合物を含むよう設計されていてもよい。いくつかの態様において、mixmerは、修飾ヌクレオシド間連結(例として、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結または他の連結)を、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、またはこれより多くのヌクレオシド間に含む。

【0285】

mixmerは、いずれの好適な方法を使用しても産生されてよい。mixmerの調製を教示する代表的な米国特許、米国特許公開、およびPCT公開は、米国特許公開第US20060128646号、US20090209748号、US20090298916号、US20110077288号、およびUS20120322851号、および米国特許第7687617号を包含する。

【0286】

いくつかの態様において、mixmerは、1以上のモルホリノヌクレオシドを含む。例えば、いくつかの態様において、mixmerは、1つ以上の他のヌクレオシド(例として、DNA、RNAヌクレオシド)または修飾ヌクレオシド(例として、LNA、2'-O-Meヌクレオシド)と(例として、交互に)ミックスされたモルホリノヌクレオシドを含んでいてもよい。

【0287】

いくつかの態様において、mixmerは、例えば、Touznik A., et al., LNA/DNA mixmer-based antisense oligonucleotides correct alternative splicing of the SMN2 gene and restore SMN protein expression in type 1 SMA fibroblasts Scientific Reports, volume 7, Article number: 3672 (2017), Chen S. et al., Synthesis of a Morpholino Nucleic Acid (MNA)-Uridine Phosphoramidite, and Exon Skipping Using MNA/2'-O-Methyl Mixmer Antisense Oligonucleotide, Molecules 2016, 21, 1582 (これら各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる)に報告されたとおり、スプライシングの修正またはエクソンスキッピングに有用である。

【0288】

i. マルチマー

いくつかの態様において、分子ペイロードは、リンカーによって接続された2以上のオリゴヌクレオチドのマルチマー(例として、コンカテマー)を含んでいてもよい。このように、いくつかの態様において、複合体のオリゴヌクレオチドの負荷(loadings)は、標的化剤上の利用可能な連結部位(例として、抗体上の利用可能なチオール部位)を超えて増大され得るか、または具体的なペイロード負荷量に達するよう別様に整え得る。マルチマー中のオリゴヌクレオチドは、同じかまたは異なり得る(例として、異なる遺伝子、もしくは同じ遺伝子上の異なる部位、またはそれらの産物を標的化する)。

【0289】

いくつかの態様において、マルチマーは、切断可能なリンカーによって一緒に連結された2以上のオリゴヌクレオチドを含む。しかしながら、いくつかの態様において、マルチマーは、切断不能なリンカーによって一緒に連結された2以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、マルチマーは、一緒に連結された2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはこれより多くのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、マルチマーは、一緒に連結された2から5、2から10、または4から20オリゴヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0290】

いくつかの態様において、マルチマーは、(線状配置において)末端間(end-to-end)で連結された2以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、マルチマーは、オリゴヌクレオチドベースのリンカー(例として、ポリ-dTリンカー、塩基性リンカー)を介して、末端間で連結された2以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、マルチマーは、別のオリゴヌクレオチドの3'末端に連結された1つのオリゴヌクレオチドの5'末端を含む。いくつかの態様において、マルチマーは、別のオリゴヌクレオチドの3'末端に連結された1つのオリゴヌクレオチドの3'末端を含む。いくつかの態様において、マルチマーは、別のオリゴヌクレオチドの5'末端に連結された1つのオリゴヌクレオチドの5'末端を含む。またさらに、いくつかの態様において、マルチマーは、分枝リンカーによって一緒に連結された複数のオリゴヌクレオチドを含む分枝構造を含み得る。

10

【0291】

本明細書で提供される複合体に使用されてもよいマルチマーのさらなる例は、例えば、2015年11月5日に公開され、Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkersと題する米国特許出願第2015/0315588号、2015年9月3日に公開され、Multimeric Oligonucleotide Compoundsと題する米国特許出願第2015/0247141号、2011年6月30日に公開され、Immunostimulatory Oligonucleotide Multimersと題する米国特許出願第2011/0158937号、および1997年12月2日に発行され、Triplex-Forming Antisense Oligonucleotides Having Abasic Linkers Targeting Nucleic Acids Comprising Mixed Sequences Of Purines And Pyrimidinesと題する米国特許第5,693,773号に開示されており、これら各々の内容はそれら全体が参照されることにより本明細書に組み込まれる。

20

【0292】

C. リンカー

本明細書に記載の複合体は一般に、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれか1つを分子ペイロードに共有結合的に連結するリンカーを含む。リンカーは、少なくとも1つの共有結合を含む。いくつかの態様において、リンカーは、抗TfR1抗体を分子ペイロードに共有結合的に連結する単結合、例として、ジスルフィド結合またはジスルフィド架橋であり得る。しかしながら、いくつかの態様において、リンカーは、複数の共有結合を介して、本明細書に記載の抗TfR1抗体のいずれか1つを分子ペイロードに共有結合的に連結し得る。いくつかの態様において、リンカーは、切断可能なリンカーであってもよい。しかしながら、いくつかの態様において、リンカーは、切断不能なリンカーであってもよい。リンカーは、典型的には、in vitroおよびin vivoで安定しており、特定の細胞環境において安定し得る。加えて、典型的にリンカーは、抗TfR1抗体または分子ペイロードのいずれかの機能特性に負の影響を及ぼさない。リンカー合成の例および方法は、当該技術分野において知られている(例として、Kline, T. et al. 「Methods to Make Homogeneous Antibody Drug Conjugates」 Pharmaceutical Research, 2015, 32:11, 3480-3493.; Jain, N. et al. 「Current ADC Linker Chemistry」 Pharm Res. 2015, 32:11, 3526-3540.; McCombs, J. R. and Owen, S. C. 「Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry」 AAPS J. 2015, 17:2, 339-351.を参照されたい)。

30

40

【0293】

リンカーは、典型的には、抗TfR1抗体と分子ペイロードとの両方へ付着できる2つの異なる反応性の高い種を含む。いくつかの態様において、2つの異なる反応性の高い種は、求核試薬および/または求電子試薬であってもよい。いくつかの態様において、リンカーは、2つの異なる求核剤または求電子剤に特異的な2つの異なる求電子剤または求核剤を含む。いくつかの態様において、リンカーは、抗TfR1抗体のリジン残基またはシステイン残基への抱合を介して、抗TfR1抗体に共有結合的に連結されている。いくつかの態

50

様において、リンカーは、マレイミド含有リンカーを介して抗TfR1抗体のシステイン残基に共有結合的に連結されており、任意に、マレイミド含有リンカーは、マレイミドカプロイルまたはマレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボキシラート基を含む。いくつかの態様において、リンカーは、3-アリールプロピオニトリル官能基を介して、抗TfR1抗体のシステイン残基またはチオール官能化分子ペイロードに共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、リンカーは、抗TfR1抗体のリジン残基に共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、リンカーは、独立して、アミド結合、カルバメート結合、ヒドラジド、トリアゾール、チオエーテル、および/またはジスルフィド結合を介して、抗TfR1抗体および/または分子ペイロード(例として、および)に共有結合的に連結されている。

10

【0294】

i. 切断可能なリンカー

切断可能なリンカーは、プロテアーゼ感受性リンカー、pH感受性リンカー、またはグルタチオン感受性リンカーであってもよい。これらのリンカーは典型的には、細胞内のみで切断可能であって、好ましくは、細胞外環境において、例として、筋細胞の細胞外において安定している。

【0295】

プロテアーゼ感受性リンカーは、プロテアーゼ酵素活性によって切断可能である。これらのリンカーは、典型的にはペプチド配列を含んでおり、2~10アミノ酸長、約2~5アミノ酸長、約5~10アミノ酸長、約10アミノ酸長、約5アミノ酸長、約3アミノ酸長、または約2アミノ酸長であってもよい。いくつかの態様において、ペプチド配列は、天然に存在するアミノ酸、例として、システイン、アラニン、または天然に存在しないかもしくは修飾されたアミノ酸を含んでいてもよい。天然に存在しないアミノ酸は、β-アミノ酸、ホモ-アミノ酸、プロリン誘導体、3-置換アラニン誘導体、線形コアアミノ酸、N-メチルアミノ酸、および当該技術分野において知られているその他のアミノ酸を包含する。いくつかの態様において、プロテアーゼ感受性リンカーは、バリン-シトルリンまたはアラニン-シトルリンの配列を含む。いくつかの態様において、プロテアーゼ感受性リンカーは、リソソームのプロテアーゼ、例として、カテプシンB、および/または(例として、および)エンドソームのプロテアーゼによって切断され得る。

20

【0296】

pH感受性リンカーは、高または低pH環境において容易に分解される共有結合の連結である。いくつかの態様において、pH感受性リンカーは、4~6の範囲にあるpHにて切断されてもよい。いくつかの態様において、pH感受性リンカーは、ヒドラゾンまたは環状アセタールを含む。いくつかの態様において、pH感受性リンカーは、エンドソームまたはリソソーム内で切断される。

30

【0297】

いくつかの態様において、グルタチオン感受性リンカーは、ジスルフィド部を含む。いくつかの態様において、グルタチオン感受性リンカーは、細胞内部でのグルタチオン種とのジスルフィド交換反応によって切断される。いくつかの態様において、ジスルフィド部はさらに、少なくとも1つのアミノ酸、例としてシステイン残基を含む。

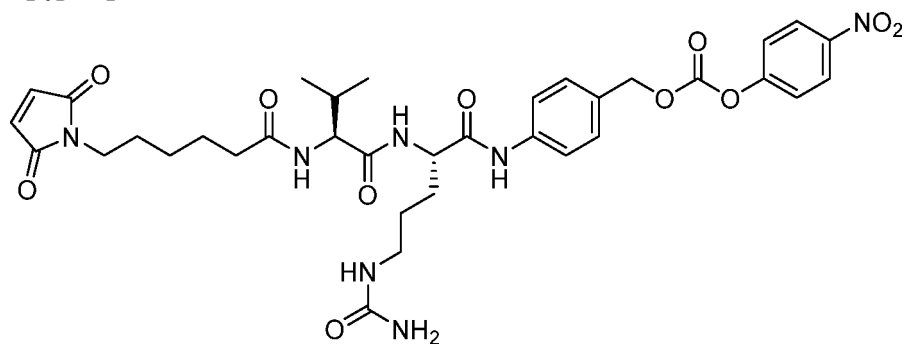
40

【0298】

いくつかの態様において、リンカーは、バリン-シトルリン配列を含む(例として、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,214,345号に記載されているように)。いくつかの態様において、抱合の前に、リンカーは、以下の構造を含む。

50

【化2】

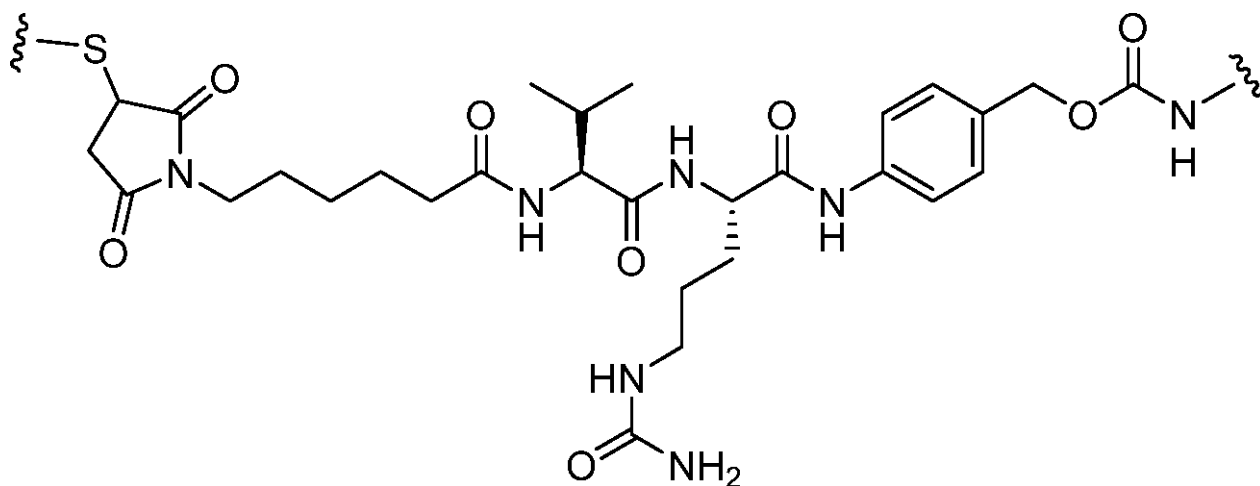


10

【0299】

いくつかの態様において、抱合後に、リンカーは、以下の構造を含む。

【化3】

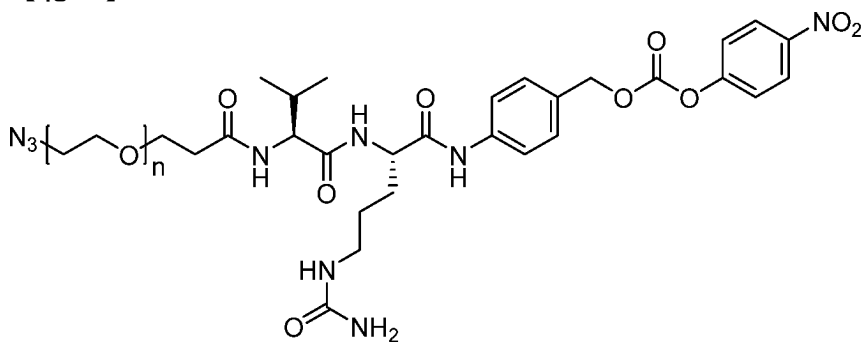


20

【0300】

いくつかの態様において、抱合の前に、リンカーは、以下の構造を含む。

【化4】



(A)

30

(式中、nは0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、nは3である。

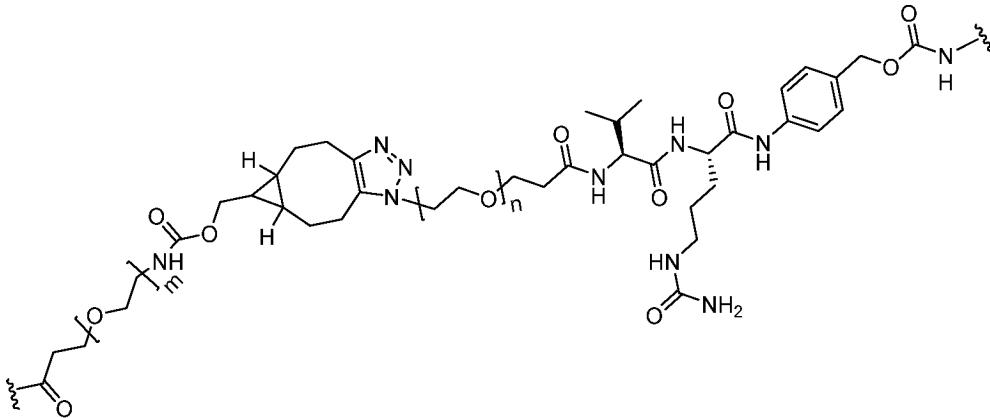
【0301】

いくつかの態様において、リンカーは、以下の構造を含む。

40

50

【化5】



10

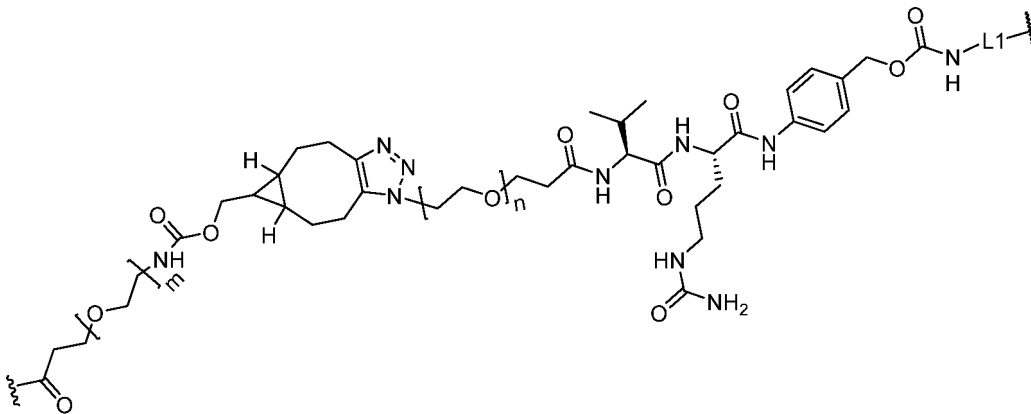
(H),

(式中、 n は0～10の任意の数であり、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3であり、および/または(例として、および) m は4である。

【0302】

いくつかの態様において、リンカーは、以下の構造を含む。

【化6】



20

(I),

30

(式中、 n は0～10の任意の数であり、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3であり、および/または(例として、および) m は4である。

【0303】

iii. 切断不能リンカー

いくつかの態様において、切断不能なリンカーが使用されてもよい。一般に、切断不能なリンカーは、細胞環境または生理環境において容易に分解され得ない。いくつかの態様において、切断不能なリンカーは、任意に置換されていてもよいアルキル基を含むが、ここで置換は、ハロゲン、ヒドロキシル基、酸素種、および他の一般的な置換を含んでいてもよい。いくつかの態様において、リンカーは、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアルキレン、任意に置換されていてもよいアリーレン、ヘテロアリーレン、少なくとも1個の非天然アミノ酸を含むペプチド配列、トランケートされたグリカン、酵素的に分解され得ない糖(単数もしくは複数)、アジド、アルキン-アジド、LPXT配列を含むペプチド配列、チオエーテル、ピオチン、ピフェニル、反復単位のポリエチレングリコールもしくは等価な化合物、酸エステル、酸アミド、スルファミド、および/または、アルコキシ-アミンリンカーを含んでいてもよい。いくつかの態様において、ソルターゼ媒介ライゲーションは、LPXT配列を含む抗TfR1抗体を、 $(G)_n$ 配列を含む分子ペイロードへ共有結合的に連結するために利用され得る(例として、Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. Biotechnol Lett. 2010, 32(1):1-10.を参照されたい)。

40

50

【0304】

いくつかの態様において、リンカーは、置換されたアルキレン、任意に置換されていてもよいアルケニレン、任意に置換されていてもよいアルキニレン、任意に置換されていてもよいシクロアルキレン、任意に置換されていてもよいシクロアルケニレン、任意に置換されていてもよいアリーレン、N、O、およびSから選択される少なくとも1個のヘテロ原子をさらに含む任意に置換されていてもよいヘテロアリーレン、N、O、およびSから選択される少なくとも1個のヘテロ原子をさらに含む任意に置換されていてもよいヘテロシクリレン、イミノ、任意に置換されていてもよい窒素種、任意に置換されていてもよい酸素種、任意に置換されていてもよい硫黄種、またはポリ(アルキレンオキシド)、例として、ポリエチレンオキシドまたはポリプロピレンオキシドを含んでいてもよい。いくつかの態様において、リンカーは、切断不能なN-ガンマ-マレイミドブチリル-オキシスクシンイミドエステル(GMBS)リンカーであり得る。

10

【0305】

iii. リンカーの抱合

いくつかの態様において、リンカーは、ホスファート、チオエーテル、エーテル、炭素-炭素、カルバマート、またはアミド結合を介して抗TfR1抗体および/または(例として、および)分子ペイロードに共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、リンカーは、ホスファートまたはホスホロチオアート基、例として、オリゴヌクレオチド主鎖の末端のホスファートを介してオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、リンカーは、抗TfR1抗体上に存在するリジン残基またはシステイン残基を介して、抗TfR1抗体に共有結合的に連結されている。

20

【0306】

いくつかの態様において、リンカーまたはその一部が、トリアゾールを形成するアジドとアルキンとの間のシクロ付加反応によって、抗TfR1抗体および/または(例として、および)分子ペイロードに共有結合的に連結されており、アジドまたはアルキンは、抗TfR1抗体、分子ペイロード、またはリンカー上に位置し得る。いくつかの態様において、アルキンは、環状アルキン、例としてシクロオクチンであってもよい。いくつかの態様において、アルキンは、ビスシクロノニン(またビスシクロ[6.1.0]ノニンまたはBCNとしても知られている)または置換ビスシクロノニンであってもよい。いくつかの態様において、シクロオクチンは、2011年11月3日に公開の国際特許出願公開WO2011136645号、表題「Fused Cyclooctyne Compounds And Their Use In Metal-free Click Reactions」に記載のとおりである。いくつかの態様において、アジドは、アジドを含む糖または炭水化物分子であってもよい。いくつかの態様において、アジドは、6-アジド-6-デオキシガラクトースまたは6-アジド-N-アセチルガラクトサミンであってもよい。いくつかの態様において、アジドを含む糖または炭水化物分子は、2016年10月27日公開の国際公開第2016170186号、表題「Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A β (1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase」に記載のとおりである。いくつかの態様において、トリアゾールを形成するアジドとアルキンとの間のシクロ付加反応(ここでアジドおよびアルキンは、抗TfR1抗体、分子ペイロード、またはリンカー上に位置し得る)は、2014年5月1日に公開の国際公開第2014065661号、表題「Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof」; または2016年10月27日に公開の国際公開第2016170186号、表題「Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A β (1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase」に記載のとおりである。

30

40

【0307】

いくつかの態様において、リンカーは、スペーサー、例として、ポリエチレングリコールスペーサーまたはアシル/カルバモイルスルファミドスペーサー、例として、HydraSpace(商標)スペーサーを含む。いくつかの態様において、スペーサーは、Verkade, J.

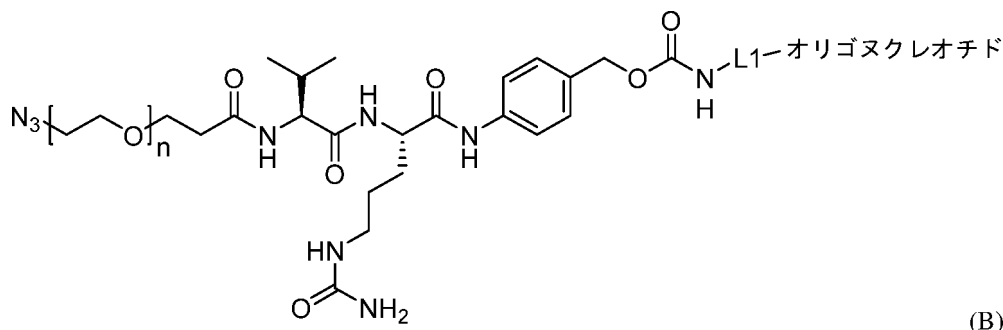
50

(式中、 n は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3である。

【0311】

いくつかの態様において、式(A)の構造を含むリンカーは、分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)に(例として、任意に追加の化学部分を介して)共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、式(A)の構造を含むリンカーは、例として、カルバメート結合を形成するアミン-L1-オリゴヌクレオチドによる求核置換を介して、オリゴヌクレオチドに共有結合的に連結され、以下の構造を含む化合物を生じる。

【化8】



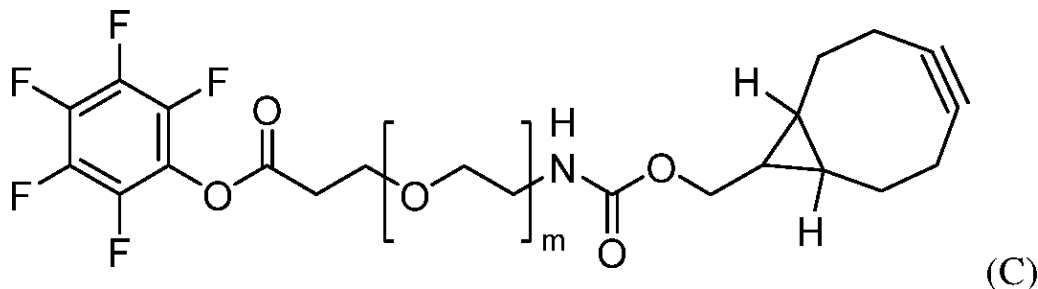
10

(式中、 n は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3である。

【0312】

いくつかの態様において、式(B)の化合物はさらに、トリアゾールを介してさらなる部分に共有結合的に連結され、トリアゾールは、式(A)または式(B)のアジドと、ビスクロノニン上に提供されるアルキンとの間のクリック反応によって形成される。いくつかの態様において、ビスクロノニンを含む化合物は、以下の構造を含む。

【化9】



30

(式中、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 m は4である。

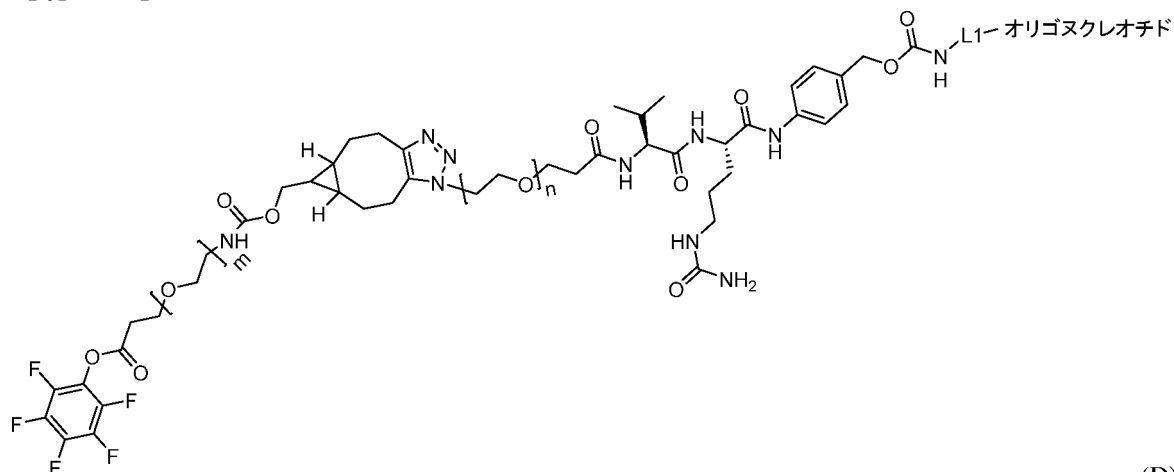
【0313】

いくつかの態様において、構造(B)の化合物のアジドは、構造(C)の化合物のアルキンとのクリック反応を介してトリアゾールを形成し、以下の構造を含む化合物を形成する。

40

50

【化 1 0】



10

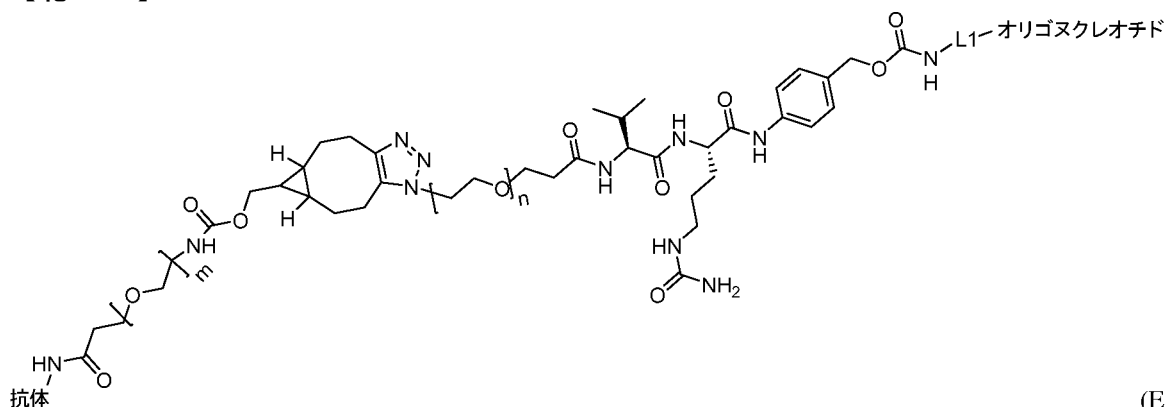
(D),

(式中、 n は0～10の任意の数であり、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3であり、 m は4である。

【0 3 1 4】

いくつかの態様において、構造(D)の化合物はさらに、抗TfR1抗体のリジンに共有結合的に連結され、以下の構造を含む複合体を形成する。

【化 1 1】



20

30

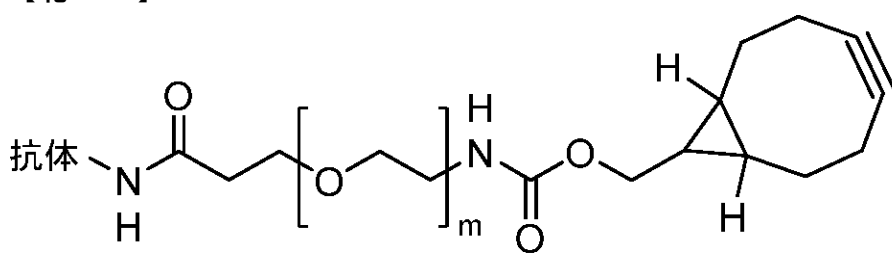
(E),

(式中、 n は0～10の任意の数であり、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3であり、および/または(例として、および) m は4である。当然のことながら、式(E)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

【0 3 1 5】

いくつかの態様において、式(C)の化合物はさらに、抗TfR1抗体のリジンに共有結合的に連結され、以下の構造を含む化合物を形成する。

【化 1 2】



40

(F),

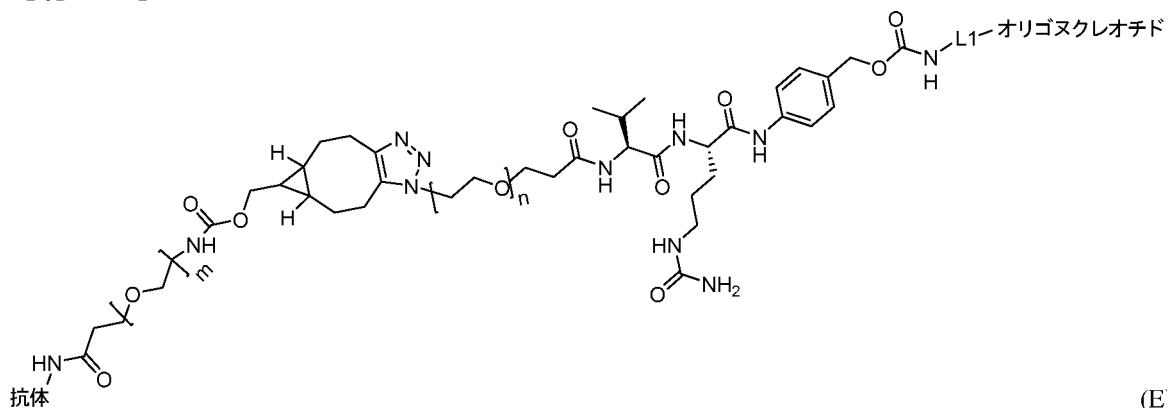
(式中、 m は0～15(例として、4)である。)当然のことながら、式(F)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

50

【0316】

いくつかの態様において、構造(B)の化合物のアジドは、構造(F)の化合物のアルキンとのクリック反応を介してトリアゾールを形成し、以下の構造を含む複合体を形成する。

【化13】



10

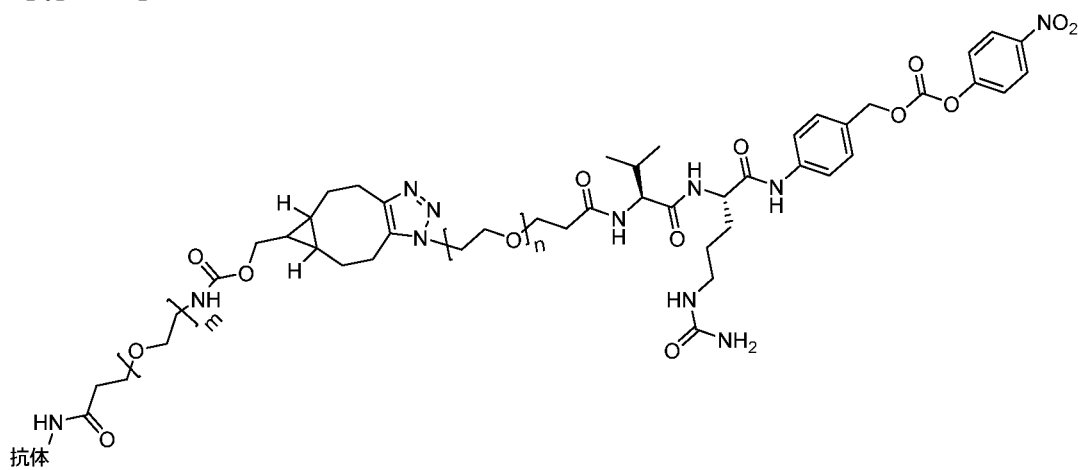
(式中、 n は0～10の任意の数であり、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3であり、および/または(例として、および) m は4である。当然のことながら、式(E)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

【0317】

20

いくつかの態様において、構造(A)の化合物のアジドは、構造(F)の化合物のアルキンとのクリック反応を介してトリアゾールを形成し、以下の構造を含む化合物を形成する。

【化14】



30

(式中、 n は0～10の任意の数であり、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3であり、および/または(例として、および) m は4である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、式(G)の構造を含む化合物に共有結合し、それにより、式(E)の構造を含む複合体を形成する。当然のことながら、式(G)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

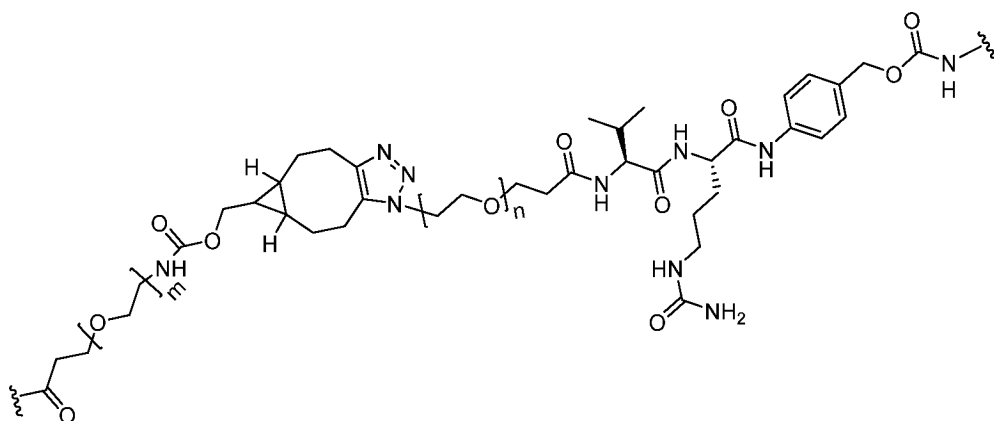
40

【0318】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体のいずれか1つにおいて、抗TfR1抗体は、抗TfR1抗体のリジンを介し、以下の構造を含むリンカーを介して分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)に共有結合的に連結されている。

50

【化 1 5】



10

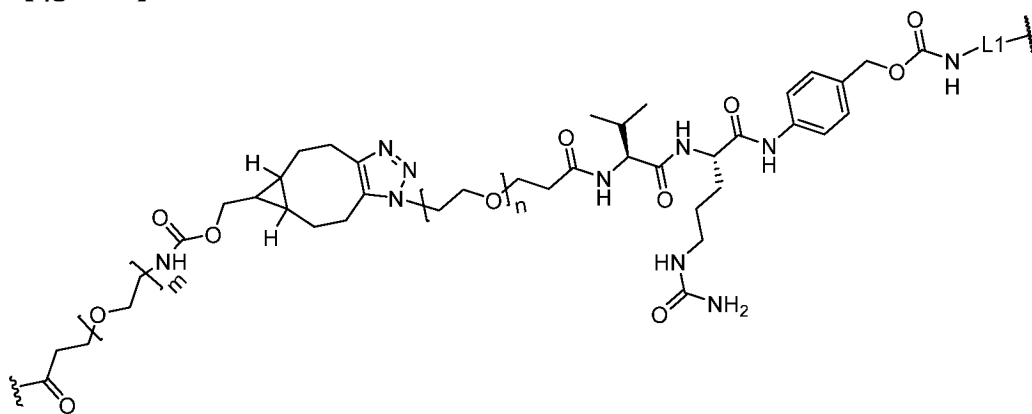
(H),

(式中、 n は0～10の任意の数であり、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3であり、および/または(例として、および) m は4である。

【0319】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体のいずれか1つにおいて、抗TfR1抗体は、抗TfR1抗体のリジンを介し、以下の構造を含むリンカーを介して分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)に共有結合的に連結されている。

【化 1 6】



20

30

(I),

(式中、 n は0～10の任意の数であり、 m は0～10の任意の数である。)いくつかの態様において、 n は3であり、および/または(例として、および) m は4である。

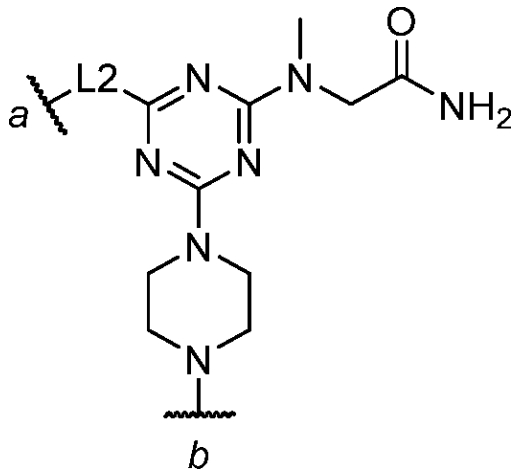
【0320】

いくつかの態様において、式(B)、(D)、(E)、および(I)中、 $L1$ は、いくつかの態様において、置換もしくは非置換の脂肪族、置換もしくは非置換のヘテロ脂肪族、置換もしくは非置換のカルボシクリレン、置換もしくは非置換のヘテロシクリレン、置換もしくは非置換のアリーレン、置換もしくは非置換のヘテロアリーレン、 $-O-$ 、 $-N(R^A)-$ 、 $-S-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^A-$ 、 $-NR^AC(=O)-$ 、 $-NR^AC(=O)R^A-$ 、 $-C(=O)R^A-$ 、 $-NR^AC(=O)O-$ 、 $-NR^AC(=O)N(R^A)-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)N(R^A)-$ 、 $-S(O)_2NR^A-$ 、 $-NR^AS(O)_2-$ 、またはそれらの組み合わせであるスペーサーであり、 R^A は、独立して、水素または置換もしくは非置換アルキルである。いくつかの態様において、 $L1$ は、

40

50

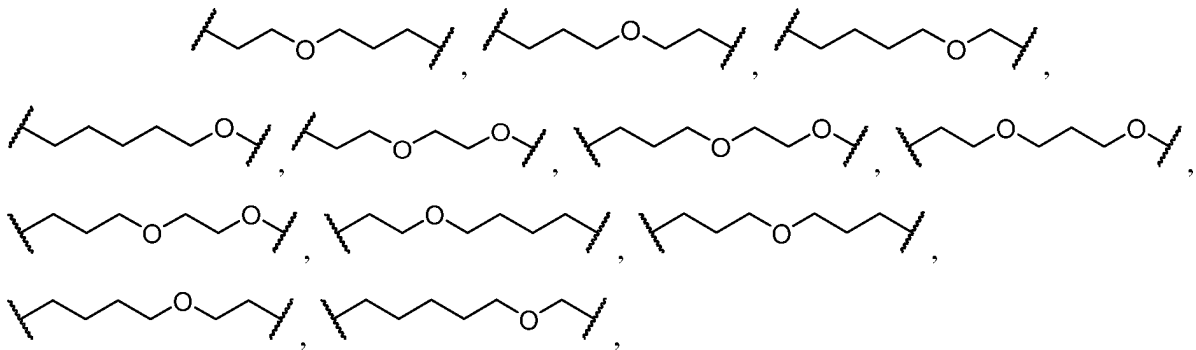
【化 1 7】



10

である。(式中、L2は、

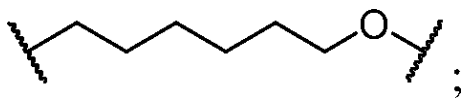
【化 1 8】



20

または

【化 1 9】



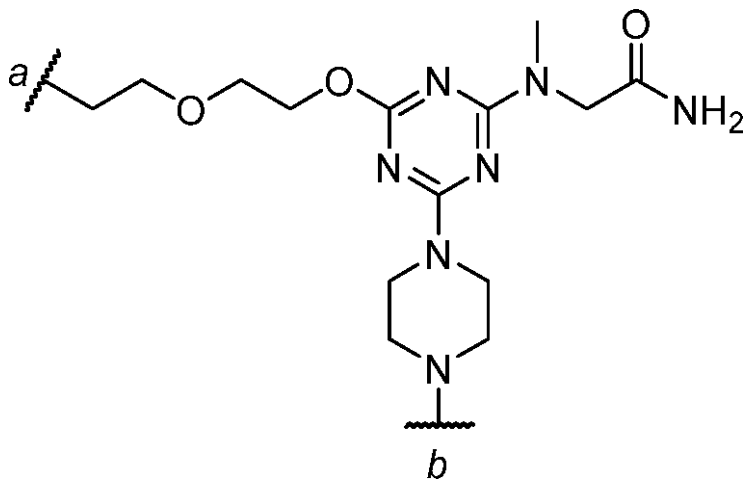
30

であり、aは、式(B)、(D)、(E)および(I)のカルバメート部分に直接結合した部位を表し、bは、オリゴヌクレオチドに(直接または追加の化学部分を介して)共有結合的に連結した部位を表す。)

【0 3 2 1】

いくつかの態様において、L1は、

【化 2 0】



40

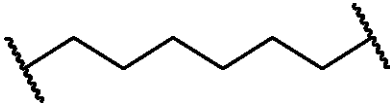
50

である。(式中、aは、式(B)、(D)、(E)、および(I)のカルバメート部分に直接連結された部位を表し、bは、オリゴヌクレオチドに(直接または追加の化学部分を介して)共有結合的に連結した部位を表す。)

【0322】

いくつかの態様において、L1は、

【化21】



10

である。

【0323】

いくつかの態様において、L1は、オリゴヌクレオチドの5'ホスファートに連結される。いくつかの態様において、リン酸塩はホスホジエステルである。いくつかの態様において、L1は、オリゴヌクレオチドの5'ホスホロチオアートに連結される。いくつかの態様において、L1は、オリゴヌクレオチドの5'ホスホロアミダートに連結される。いくつかの態様において、L1は、ホスホロジアミデート結合を介してオリゴヌクレオチドの5'末端に連結される。

【0324】

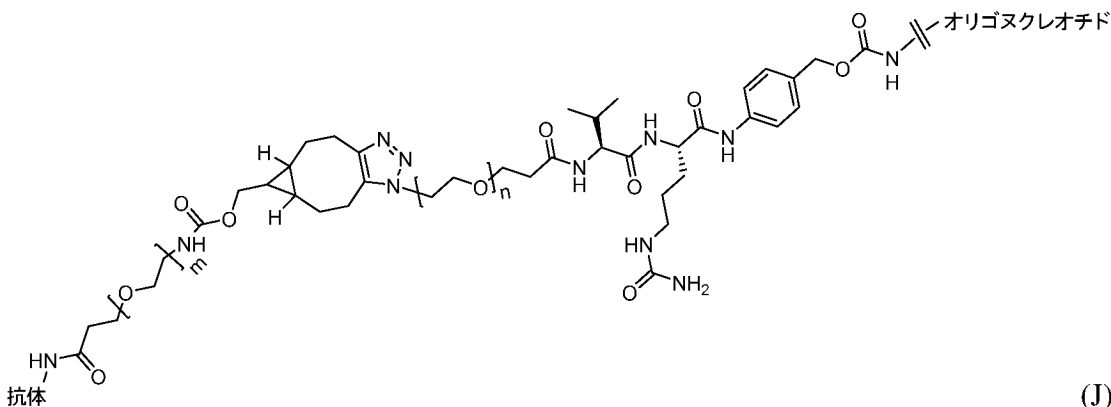
いくつかの態様において、L1は、任意である(例として、存在する必要はない)。

20

【0325】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体のいずれか1つは、以下の構造を有する。

【化22】



30

(式中、nは0~15(例として、3)であり、mは0~15(例として、4)である。)当然のことながら、式(J)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

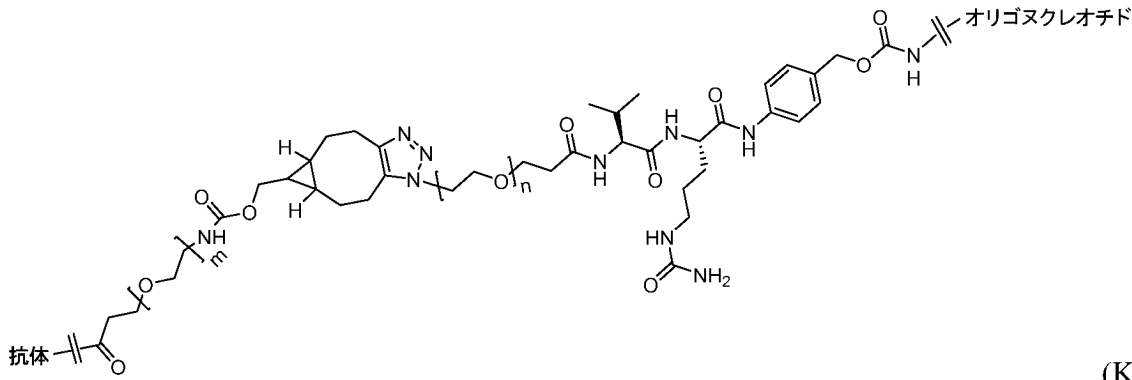
【0326】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体のいずれか1つは、以下の構造を有する。

40

50

【化 2 3】



(K),

(式中、 n は0～15(例として、3)であり、 m は0～15(例として、4)である。)

【0327】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、化合物、例として、式(A)または式(G)の化合物に連結する前に、5'末端もしくは3'末端に、または内部に(例として、アミン官能化核酸塩基として)アミン基を含むように修飾される。

【0328】

リンカー抱合は抗TfR1抗体およびオリゴヌクレオチド分子ペイロードに関連して説明されているが、当然のことながら、他の筋標的化抗体などの他の筋標的化剤および/または他の分子ペイロードに対するそのようなリンカー抱合の使用が企図される。

【0329】

D. 抗体-分子ペイロード複合体の例

本明細書に記載の分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)のいずれかへ共有結合的に連結された、本明細書に記載のいずれか1つの抗TfR1抗体を含む複合体の非限定的な例が、本明細書でさらに提供される。いくつかの態様において、抗TfR1抗体(例として、表2～7に示される抗TfR1抗体のいずれか1つ)は、リンカーを介して分子ペイロード(例として、表8に示されるオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチド)に共有結合的に連結されている。本明細書に記載のリンカーのいずれも、使用されてもよい。いくつかの態様において、分子ペイロードがオリゴヌクレオチドである場合、リンカーは、オリゴヌクレオチドの5'末端、オリゴヌクレオチドの3'末端、またはオリゴヌクレオチドの内部部位に連結される。いくつかの態様において、リンカーは、チオール反応性の連結を介して(例として、抗TfR1抗体中のシステインを介して)抗TfR1抗体へ連結されている。いくつかの態様において、リンカー(例として、バリン-シトルリン配列を含むリンカー)は、アミン基を介して(例として、抗体中のリジンを経由して)抗体(例として、本明細書に記載される抗TfR1抗体)に連結される。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780～2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160～779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0330】

リンカーを介して分子ペイロードに共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含む複合体の構造の例が、以下に提供される。

10

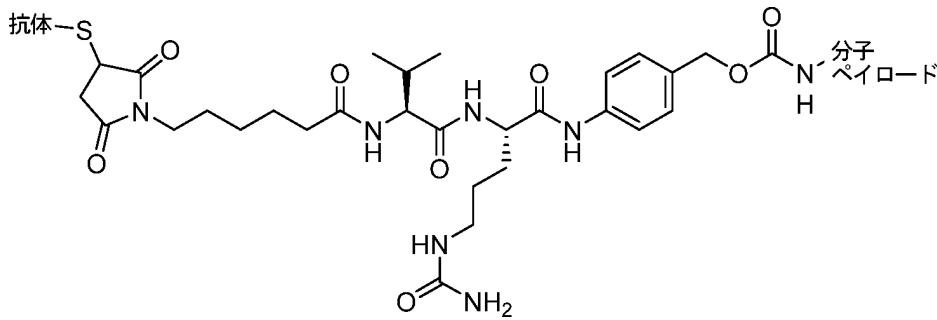
20

30

40

50

【化 2 4】



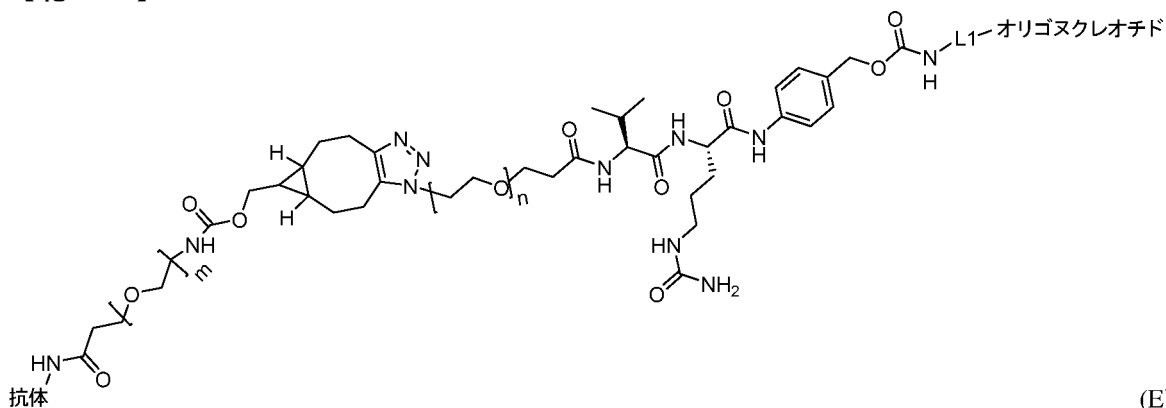
10

(式中、リンカーは、チオール反応性連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)抗体に連結されている。)いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780～2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160～779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0331】

リンカーを介して分子ペイロードに共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含む複合体の構造の別の例が、以下に提供される。

【化 2 5】



(E)

20

30

(式中、nは0～10の間の数であり、mは0～10の間の数であり、リンカーはアミン基(例として、リジン残基上)を介して抗体へ連結され、および/または(例として、および)リンカーはオリゴヌクレオチドへ(例として、5'末端、3'末端、または内部に)連結される。)いくつかの態様において、リンカーはリジンを介して抗体へ連結され、リンカーはオリゴヌクレオチドに5'末端にて連結され、nは3であり、mは4である。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780～2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160～779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。当然のことながら、式(E)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

40

【0332】

当然のことながら、抗体は、種々の化学量論で分子ペイロードへ連結され得ることが解されるはずであって、その特性は薬物抗体比(DAR)と称されてもよく、「薬物」は分子ペイロードである。いくつかの態様において、1つの分子ペイロードが抗体へ連結されている(DAR=1)。いくつかの態様において、2つの分子ペイロードが抗体へ連結されている(DAR=2)。いくつかの態様において、3つの分子ペイロードが抗体へ連結されている(DAR=3)。いくつかの態様において、4つの分子ペイロードが抗体へ連結されている(DAR=4)。いくつかの態様において、各々が異なるDARを有する異なる複合体の混合物が提供される。いくつかの態様において、かかる混合物中の複合体の平均DARは、1～3、1～4、1～5以上の範囲にあってもよい。混合物中の複合体の平均DARは整数値である必

50

要はない。DARは、分子ペイロードを抗体上の種々の部位へ抱合させることによって、および/または(例として、および)、マルチマーを抗体上の1以上の部位へ抱合させることによって、増大されてもよい。例えば、2のDARは、単一分子ペイロードを抗体上の2つの異なる部位へ抱合させることによって、または二量体分子ペイロードを抗体の単一位点へ抱合させることによって、達成されてもよい。

【0333】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードに共有結合的に連結した本明細書に記載の抗TfR1抗体(例として、表2〜7に示される抗体)を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、リンカー(例として、バリン-シトルリン配列を含むリンカー)を介して分子ペイロードに共有結合的に連結された本明細書に記載の抗TfR1抗体(例として、表2〜7に示される抗体)を含む。いくつかの態様において、リンカー(例として、バリン-シトルリン配列を含むリンカー)は、チオール反応性結合を介して(例として、抗体中のシステインを介して)抗体(例として、本明細書中に記載される抗TfR1抗体)に結合している。いくつかの態様において、リンカー(例として、バリン-シトルリン配列を含むリンカー)は、アミン基を介して(例として、抗体中のリジンを介して)抗体(例として、本明細書に記載される抗TfR1抗体)に連結される。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780〜2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160〜779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0334】

いくつかの態様において、本明細書に記載される複合体は、分子ペイロードに共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、表2に列挙される抗体のいずれか1つのCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780〜2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160〜779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0335】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号69、配列番号71または配列番号72のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号70のアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780〜2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160〜779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0336】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号73または配列番号76のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号74のアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780〜2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160〜779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0337】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号73または配列番号76のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号75のアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780〜2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160〜779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0338】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号77を含むVHおよび配列番号7

10

20

30

40

50

8のアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0339】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号77または配列番号79のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号80のアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

10

【0340】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号154を含むVHおよび配列番号155のアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0341】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号84、配列番号86または配列番号87のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

20

【0342】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号88または配列番号91のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

30

【0343】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号88または配列番号91のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

40

【0344】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号92または配列番号94のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0345】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号92のアミノ酸配列を含む重鎖

50

、および配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0346】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号156のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号157のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

10

【0347】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号97、配列番号98または配列番号99のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

【0348】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号100または配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

20

【0349】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号100または配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

30

【0350】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

40

【0351】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号102または配列番号103のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)である。

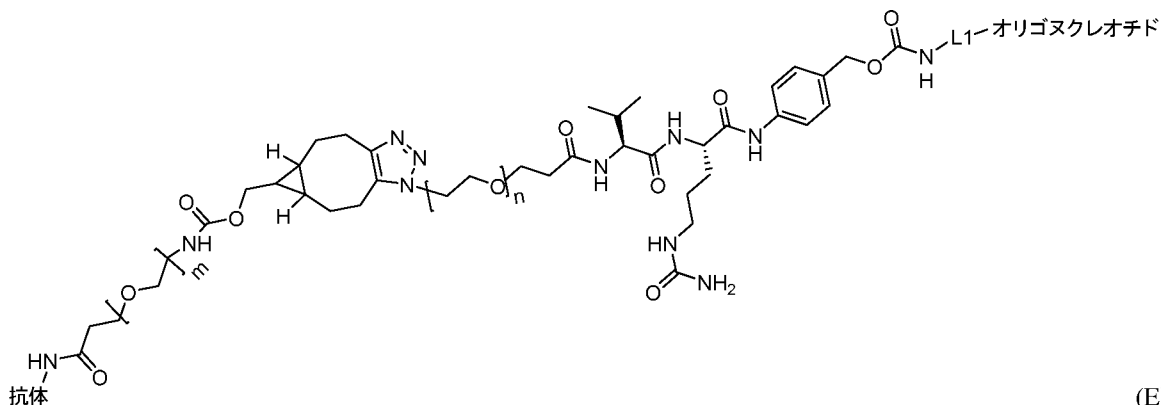
【0352】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、配列番号158または配列番号159のア

50

合体は以下の構造を有する。

【化 2 8】



10

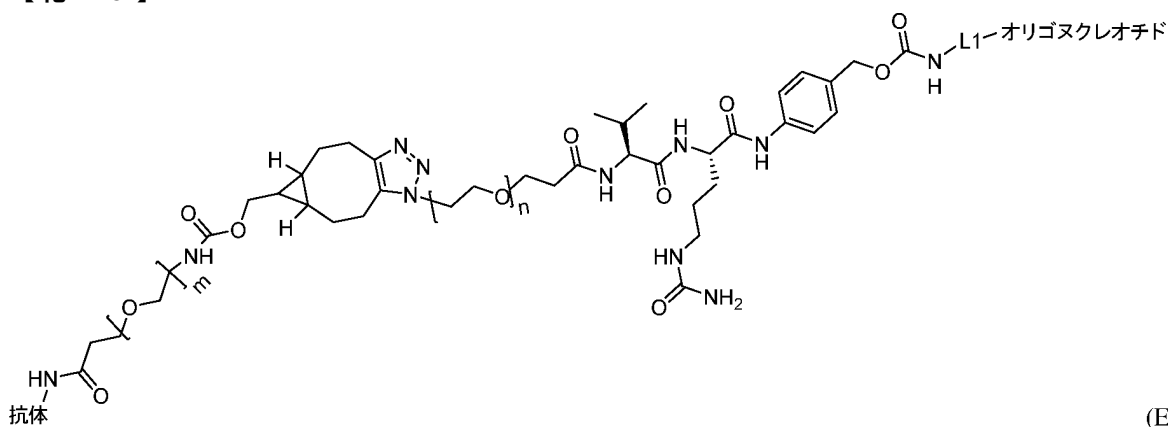
(式中、 n は3であり、 m は4である。)当然のことながら、式(E)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

【0356】

いくつかの態様において、本明細書に記載される複合体は、抗TfR1抗体のリジンを介してDMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)の5'末端に共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含み、抗TfR1抗体は、表4に列挙される抗体のいずれか1つの重鎖および軽鎖を含み、複合体は以下の構造を有する。

20

【化 2 9】



30

(式中、 n は3であり、 m は4である。)当然のことながら、式(E)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

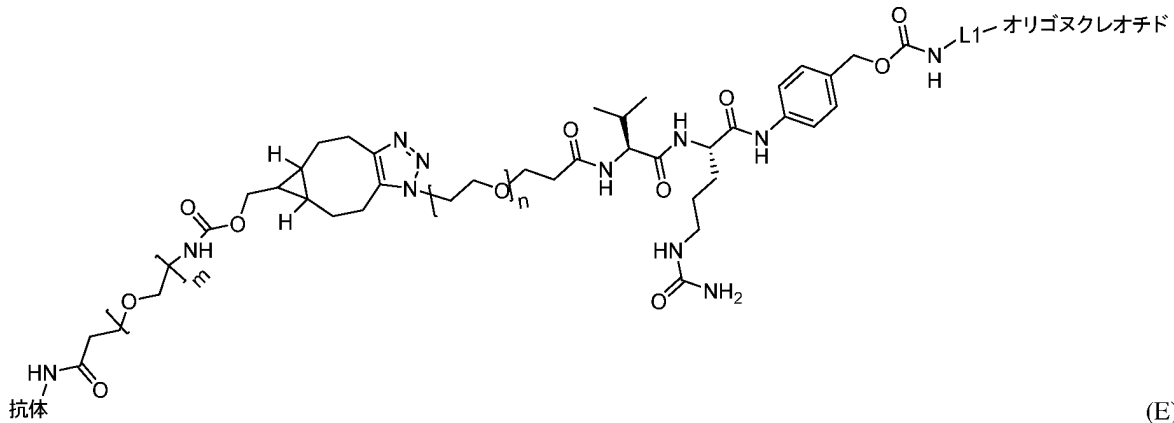
【0357】

いくつかの態様において、本明細書に記載される複合体は、抗TfR1抗体のリジンを介してDMD標的化オリゴヌクレオチド(例として、配列番号780~2019のいずれか1つによって提供されるか、または配列番号160~779のいずれか1つに相補的な、表8に列挙されるDMD標的化オリゴヌクレオチド)の5'末端に共有結合的に連結された抗TfR1 Fabを含み、抗TfR1 Fabは、表5に列挙される抗体のいずれか1つの重鎖および軽鎖を含み、複合体は以下の構造を有する。

40

50

【化 3 0】

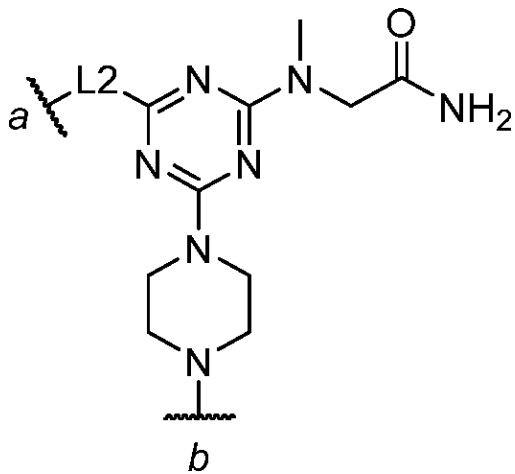


(式中、 n は3であり、 m は4である。)当然のことながら、式(E)において抗TfR1抗体に隣接して示されるアミドは、リジンイプシロンアミンなどの抗TfR1抗体のアミンとの反応から生じる。

【0358】

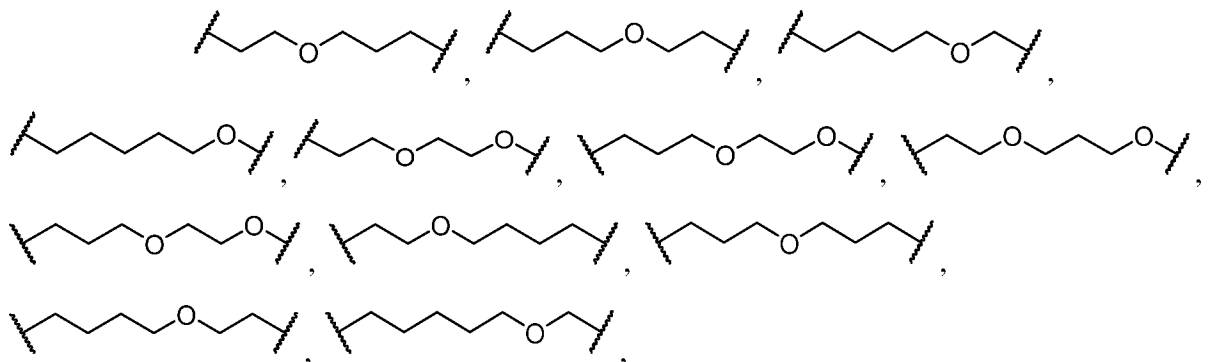
いくつかの態様において、本明細書に記載される複合体の例のいずれか1つにおいて、 $L1$ は、

【化 3 1】



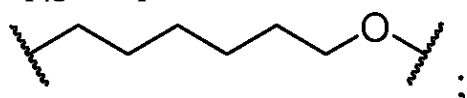
である。(式中、 $L2$ は、

【化 3 2】



または

【化 3 3】



10

20

30

40

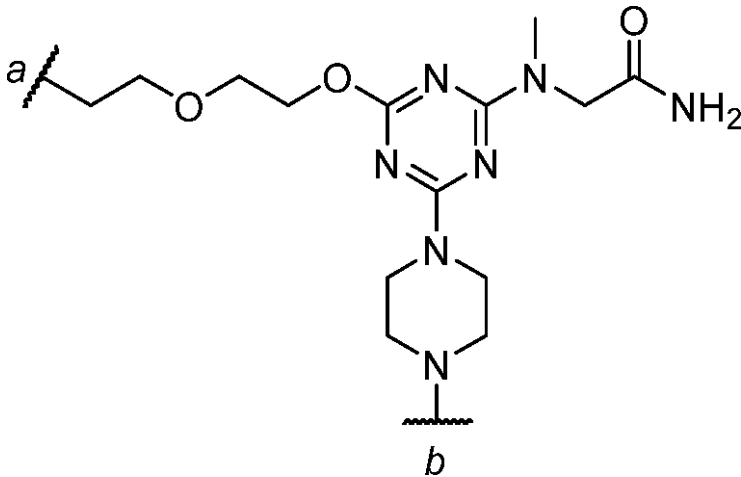
50

であり、aは、式(B)、(D)、(E)および(I)のカルバメート部分に直接結合した部位を表し、bは、オリゴヌクレオチドに(直接または追加の化学部分を介して)共有結合的に連結された部位を表す。)

【0359】

いくつかの態様において、L1は、

【化34】



10

である。(式中、aは、式(B)、(D)、(E)、および(I)のカルバメート部分に直接連結された部位を表し、bは、オリゴヌクレオチドに(直接または追加の化学部分を介して)共有結合的に連結した部位を表す。)

20

【0360】

いくつかの態様において、L1は、オリゴヌクレオチドの5'ホスファートに連結される。いくつかの態様において、リン酸塩はホスホジエステルである。いくつかの態様において、L1は、オリゴヌクレオチドの5'ホスホロチオアートに連結される。いくつかの態様において、L1は、オリゴヌクレオチドの5'ホスホロアミダートに連結される。いくつかの態様において、L1は、ホスホロジアミデート結合を介してオリゴヌクレオチドの5'末端に連結される。

【0361】

いくつかの態様において、L1は、任意である(例として、存在する必要はない)。

30

【0362】

III. 製剤

本明細書で提供される複合体は、いずれの好適なやり方でも製剤化されていてよい。一般に、本明細書で提供される複合体は、医薬への使用に好適なやり方で製剤化されている。例えば、複合体は、分解を最小限に抑え、送達および/または(例として、および)取り込みを容易にする製剤を使用して、対象へ送達され得るか、あるいは、製剤中の複合体へ別の有益な特性を提供する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるのは、複合体および薬学的に許容し得る担体を含む組成物である。かかる組成物は、対象の標的細胞周囲の環境中または対象の全身のいずれかへ投与されたとき充分量の複合体が標的筋細胞に侵入できるように、好適に製剤化され得る。いくつかの態様において、複合体は、リン酸緩衝生理食塩溶液などの緩衝溶液中、リポソーム中、ミセル構造体中、およびカプシド中に製剤化される。

40

【0363】

当然のことながら、いくつかの態様において、組成物が、本明細書で提供される複合体の1以上の構成要素(例として、筋標的化剤、リンカー、分子ペイロード、またはこれらのいずれか1つの前駆体分子)を個別に包含していてもよい。

【0364】

いくつかの態様において、複合体は、水中または水性溶液(例として、pH調整された水)中に製剤化される。いくつかの態様において、複合体は、塩基性緩衝水性溶液(例として

50

、PBS)中に製剤化される。いくつかの態様において、本明細書に開示のと通りの製剤は、賦形剤を含む。いくつかの態様において、賦形剤は、組成物へ、改善された安定性、改善された吸収、改善された可溶性、および/または(例として、および)、活性成分の治療増強を付与する。いくつかの態様において、賦形剤は、緩衝剤(例として、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、トリス塩基、もしくは水酸化ナトリウム)、またはビヒクル(例として、緩衝溶液、ワセリン、ジメチルスルホキシド、または鉱油)である。

【0365】

いくつかの態様において、複合体またはその構成要素(例として、オリゴヌクレオチドまたは抗体)は、その貯蔵寿命を延長するため凍結乾燥され、次いで使用(例として、対象への投与)前に溶液にさせられる。したがって、本明細書に記載の複合体またはその構成要素を含む組成物中の賦形剤は、凍結保護剤(例として、マンニトール、ラクトース、ポリエチレングリコール、もしくはポリビニルピロリドン)、または崩壊温度修飾因子(例として、デキストラン、フィコール、もしくはゼラチン)であってもよい。

10

【0366】

いくつかの態様において、医薬組成物は、その意図された投与ルートに適合するよう製剤化されている。投与経路の例としては、非経口投与、例として、静脈内投与、皮内投与、皮下投与が挙げられる。典型的には、投与ルートは、静脈内投与または皮下投与である。

【0367】

注射剤への使用に好適な医薬組成物は、滅菌水性溶液(ここで水に可溶性である)または分散溶液、および滅菌注射剤溶液または分散溶液の即時調製のための滅菌粉末を包含する。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、および好適なそれらの混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。いくつかの態様において、製剤は、組成物中に等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、および塩化ナトリウムを包含する。滅菌注射剤溶液は、要求量の複合体を、上に列挙された成分の1つまたはそれらの組み合わせとともに、選択された溶媒に組み込むこと、要求に応じ、これに続き濾過滅菌することによって調製され得る。

20

【0368】

いくつかの態様において、組成物は、少なくとも約0.1%の複合体またはその構成要素、またはそれ以上を含有し得るが、活性成分のパーセンテージは組成物全体の重量または体積の約1%~約80%、またはそれ以上であってもよい。可溶性、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与ルート、産物の貯蔵寿命などの因子、ならびに他の薬理学的留意事項は、かかる医薬製剤を調製する当業者によって企図されるであろう。そのため様々な投薬量および処置計画が所望されることもある。

30

【0369】

IV. 使用方法/処置方法

本明細書に記載の分子ペイロードに共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体は、ジストロフィノパチー、例として、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する対象の処置に有効である。いくつかの態様において、複合体は、オリゴヌクレオチド、例として、変異DMD対立遺伝子から発現されるプレ-mRNAのエクソンスキッピングを容易にするアンチセンスオリゴヌクレオチドである分子ペイロードを含む。

40

【0370】

いくつかの態様において、対象は、ヒト対象、霊長目の非ヒト動物対象、齧歯類動物対象、またはいずれの好適な哺乳動物対象であってもよい。いくつかの態様において、対象は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは他のジストロフィノパチーを有し得る。いくつかの態様において、対象は、フレームシフト変異を引き起こし、不適切なRNAスプライシング/プロセッシングをもたらすDMDエクソン中の少なくとも1つの変異を任意に含み得る変異DMD対立遺伝子を有する。いくつかの態様において、対象は、重度のジストロフィノパチーの症状、例として、筋萎縮または筋肉減少を患っている。いくつかの態様に

50

において、対象は、クレアチンホスホキナーゼ(CK)の血清濃度の無症候性増加および/または(例として、および)ミオグロビン尿症を伴う筋痙攣を有する。いくつかの態様において、対象は、デュシェンヌまたはベッカー型筋ジストロフィーまたはDMD関連拡張型心筋症(DCM)などの進行性筋疾患を有する。いくつかの態様において、対象は、ジストロフィノパチーの症状を患っていない。

【0371】

いくつかの態様において、対象は、エクソン55のスキッピングに適したDMD遺伝子の突然変異を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載の分子ペイロードに共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体は、エクソン55のスキッピングに適したDMD遺伝子の突然変異を有する対象の処置に有効である。いくつかの態様において、複合体は、オリゴヌクレオチド、例として、変異DMD遺伝子(例として、エクソン55のスキッピングに適した変異DMD遺伝子)からコードされるプレ-mRNAなどのプレ-mRNAのエクソン55のスキッピングを容易にするアンチセンスオリゴヌクレオチドである分子ペイロードを含む。

【0372】

本開示の側面は、本明細書に記載の有効量の複合体を対象へ投与することを伴う方法を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体を含む有効量の医薬組成物は、処置を必要とする対象へ投与され得る。いくつかの態様において、本明細書に記載のとおり複合体を含む医薬組成物は、静脈内投与を包含してもよい好適なルートによって、例として、ボラスとして、またはある期間にわたる連続注入によって、投与されてもよい。いくつかの態様において、投与は、筋肉内経路、腹腔内経路、脳脊髄内経路、皮下の、関節内経路、滑液嚢内経路、または髄腔内経路によって実施されてもよい。いくつかの態様において、医薬組成物は、固体形態、水性形態、または液体形態であってもよい。いくつかの態様において、水性または液体形態は、噴霧されてもよく、または凍結乾燥されてもよい。いくつかの態様において、噴霧形態または凍結乾燥形態は、水性または液体溶液で再構成されてもよい。

【0373】

静脈内投与のための組成物は、植物油、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、乳酸エチル、炭酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、エタノール、およびポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど)などの様々な担体を含いてもよい。静脈内注射のための水可溶性抗体は点滴法によって投与され得、これによって抗体および薬学的に許容し得る賦形剤を含有する医薬製剤が注入される。生理学的に許容し得る賦形剤は、例えば、5%デキストロース、0.9%生理食塩水、リンガー溶液、または他の好適な賦形剤を包含してもよい。筋肉内用調製物、例として、抗体の好適な可溶性の塩形態の滅菌製剤は、注射用水、0.9%生理食塩水、または5%グルコース溶液などの医薬賦形剤に溶解されて投与され得る。

【0374】

いくつかの態様において、分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物は、部位特異的または局所的な送達技法を介して投与される。これらの技法の例は、複合体の埋め込み型デポ供給源、局部送達カテーテル、部位特異的担体、直接注射、または直塗り(direct application)を包含する。

【0375】

いくつかの態様において、分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物は、治療効果を対象に付与する有効濃度にて投与される。有効量は、当業者によって認識されたとおり、疾患の重症度、処置される対象の特有な特徴、例として、年齢、体調、健康状態、または体重、処置期間、いずれの併用治療の性質、投与ルート、および関連因子に応じて変動する。これらの関連因子は当業者には公知であり、日常的な実験程度で対処し得る。いくつかの態様において、有効濃度は、患者に安全であると見なされる最大用量である。いくつかの態様において、有効濃度は、最大限の有効性を提供する、実行可能な最低濃度であろう。

10

20

30

40

50

【0376】

経験的考慮事項、例として、対象における複合体の半減期は一般に、処置のために使用される医薬組成物の濃度を決定するのに役立つであろう。投与頻度は、処置の有効性を最大化するために経験的に決定かつ調整されてもよい。

【0377】

処置の有効性は、いずれか好適な方法を使用して査定されてもよい。いくつかの態様において、処置の有効性は、ジストロフィノパチーに関連する症状、例として、筋萎縮、または筋力低下の観察の評価によって、対象の自己報告された転帰、例として運動性、セルフケア、通常の活動、疼痛/不快感、および不安/抑うつ/の尺度を通して、または生活の質の指標、例として寿命によって評価され得る。

10

【0378】

いくつかの態様において、本明細書に記載の分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物は、対照(例として、処置に先立つ遺伝子発現のベースラインレベル)と比べて、標的遺伝子の活性または発現を少なくとも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%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%調節するのに十分な有効濃度で対象へ投与される。

追加の態様

1. DMDプレ-mRNAにおいてエクソン55のスキッピングを誘導するように構成された分子ペイロードに共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体1(TfR1)抗体を含む複合体であって、抗TfR1抗体が、表2~7のいずれか1つにおいて特定される抗体である、複合体。

20

2. 抗TfR1抗体が、

(i) 配列番号33の重鎖相補性決定領域1(CDR-H1)、配列番号34の重鎖相補性決定領域2(CDR-H2)、配列番号35の重鎖相補性決定領域3(CDR-H3)、配列番号36の軽鎖相補性決定領域1(CDR-L1)、配列番号37の軽鎖相補性決定領域2(CDR-L2)および配列番号32の軽鎖相補性決定領域3(CDR-L3);

(ii) 配列番号7のCDR-H1、配列番号8のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

(iii) 配列番号7のCDR-H1、配列番号20のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

30

(iv) 配列番号7のCDR-H1、配列番号24のCDR-H2、配列番号9のCDR-H3、配列番号10のCDR-L1、配列番号11のCDR-L2および配列番号6のCDR-L3;

(v) 配列番号51のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3;

(vi) 配列番号64のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3;または

(vii) 配列番号67のCDR-H1、配列番号52のCDR-H2、配列番号53のCDR-H3、配列番号54のCDR-L1、配列番号55のCDR-L2および配列番号50のCDR-L3

を含む、態様1に記載の複合体。

40

3. 抗TfR1抗体が、

(i) 配列番号76と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH);および/または配列番号75と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL);

(ii) 配列番号69と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(iii) 配列番号71と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(iv) 配列番号72と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号70と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(v) 配列番号73と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番

50

号74と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(vi) 配列番号73と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号75と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(vii) 配列番号76と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号74と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(viii) 配列番号77と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号78と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;

(ix) 配列番号79と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号80と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL;または

(x) 配列番号77と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVH;および/または配列番号80と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むVL、を含む、態様1または態様2に記載の複合体。

10

4. 抗TfR1抗体が、

(i) 配列番号76のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号75のアミノ酸配列を含むVL;

(ii) 配列番号69のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;

(iii) 配列番号71のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;

(iv) 配列番号72のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号70のアミノ酸配列を含むVL;

(v) 配列番号73のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号74のアミノ酸配列を含むVL;

(vi) 配列番号73のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号75のアミノ酸配列を含むVL;

(vii) 配列番号76のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号74のアミノ酸配列を含むV

20

L;

(viii) 配列番号77のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号78のアミノ酸配列を含むV

L;

(ix) 配列番号79のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号80のアミノ酸配列を含むVL

;または

(x) 配列番号77のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号80のアミノ酸配列を含むVL、を含む、態様1から3のいずれか1つに記載の複合体。

5. 抗TfR1抗体が、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、sc Fv、Fv、または完全長IgGである、態様1から4のいずれか1つに記載の複合体。

6. 抗TfR1抗体がFabフラグメントである、態様5に記載の複合体。

30

7. 抗TfR1抗体が、

(i) 配列番号101と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号90と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ii) 配列番号97と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iii) 配列番号98と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iv) 配列番号99と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号85と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(v) 配列番号100と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号89と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

40

(vi) 配列番号100と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号90と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vii) 配列番号101と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号89と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(viii) 配列番号102と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号93と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ix) 配列番号103と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列番号95と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖;または

(x) 配列番号102と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む重鎖;および/または配列

50

番号95と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖、
を含む、態様6に記載の複合体。

8.抗TfR1抗体が、

(i)配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ii)配列番号97のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iii)配列番号98のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(iv)配列番号99のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号85のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(v)配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vi)配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(vii)配列番号101のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(viii)配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号93のアミノ酸配列を含む軽鎖;

(ix)配列番号103のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖;または

(x)配列番号102のアミノ酸配列を含む重鎖;および配列番号95のアミノ酸配列を含む軽鎖、

を含む、態様6または態様7に記載の複合体。

9.抗TfR1抗体が、トランスフェリン受容体1のトランスフェリン結合部位に特異的に結合せず、かつ/または抗TfR1抗体がトランスフェリン受容体1に対するトランスフェリンの結合を阻害しない、態様1から8のいずれか1つに記載の複合体。

10.分子ペイロードが、オリゴヌクレオチドを含む、態様1から9のいずれか1つに記載の複合体。

11.オリゴヌクレオチドが、DMDプレ-RNAにおいてアンチセンス媒介エクソンスキッピングを促進する、態様10に記載の複合体。

12.オリゴヌクレオチドが、DMDプレ-mRNAのスプライシング特徴に対する相補性領域を含む、態様10または11に記載の複合体。

13.スプライシング特徴が、DMDプレ-mRNAのエクソンスプライシングエンハンサー(ESE)である、態様12に記載の複合体。

14.スプライシング特徴がDMDプレ-mRNAのエクソン55にあり、任意にESEが配列番号2031~2061のいずれか1つの配列を含む、態様13に記載の複合体。

15.スプライシング特徴が、分岐点、スプライスドナー部位またはスプライスアクセプター部位である、態様12に記載の複合体。

16.スプライシング特徴が、DMDプレ-mRNAのエクソン54とイントロン54の接合部に跨って、イントロン54の中に、イントロン54とエクソン55の接合部に跨って、エクソン55とイントロン55の接合部に跨って、イントロン55の中に、またはイントロン55とエクソン56の接合部に跨って存在し、任意に、スプライシング特徴が、配列番号2028~2030、2062および2063のいずれか1つの配列を含む、態様15に記載の複合体。

17.相補性領域が、スプライシング特徴に相補的な少なくとも4つの連続するヌクレオチドを含む、態様12から16のいずれか1つに記載の複合体。

18.分子ペイロードが、配列番号160~779のいずれか1つに相補的な配列を含むか、または配列番号780~2019のいずれか1つの配列を含むオリゴヌクレオチドを含み、式中、各チミン塩基(T)が独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置換されていてもよく、各Uが独立しておよび任意にTで置換されていてもよい、態様1から9のいずれか1つに

10

20

30

40

50

記載の複合体。

19.オリゴヌクレオチドが少なくとも1つの修飾されたヌクレオシド間結合を含む、態様10から18のいずれか1つに記載の複合体。

20.少なくとも1つの修飾されたヌクレオシド間連結が、ホスホロチオアート連結である、態様19に記載の複合体。

21.オリゴヌクレオチドが、1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む、態様10から20のいずれか1つに記載の複合体。

22.1つ以上の修飾ヌクレオシドが2'修飾ヌクレオシドである、態様21に記載の複合体。

23.オリゴヌクレオチドが、1つ以上のホスホロジアミダートモルホリノを含み、任意に、オリゴヌクレオチドがホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)である、態様10から18のいずれか1つに記載の複合体。

24.抗TfR1抗体が、切断可能なリンカーを介して分子ペイロードに共有結合的に連結されている、態様1から23のいずれか1つに記載の複合体。

25.切断可能なリンカーがバリン-シトルリン配列を含む、態様24に記載の複合体。

26.抗TfR1抗体が、抗体のリジン残基またはシステイン残基への抱合を介して分子ペイロードに共有結合的に連結されている、態様1から25のいずれか1つに記載の複合体。

27.DMDプレ-mRNAにおいてエクソン55のスキッピングを誘導するように構成されたオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含む複合体であって、オリゴヌクレオチドが配列番号160~779のいずれか1つに対する相補性領域を含む、複合体。

28.抗TfR1抗体が、表2~7のいずれか1つにおいて特定される抗体である、態様27に記載の複合体。

29.DMDプレ-mRNAにおいてエクソン55のスキッピングを誘導するように構成されたオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含む複合体であって、オリゴヌクレオチドが、DMDプレ-mRNAのスプライシング特徴に対する相補性領域を含む、複合体。

30.DMDを標的とするオリゴヌクレオチドであって、オリゴヌクレオチドが配列番号160~779のいずれか1つに対する相補性領域を含む、オリゴヌクレオチド。

31.相補性領域が、配列番号160~779のいずれか1つに相補的な少なくとも15個の連続するヌクレオシドを含む、態様30に記載のオリゴヌクレオチド。

32.オリゴヌクレオチドが配列番号780~2019のいずれか1つの少なくとも15個の連続するヌクレオシドを含み、任意にオリゴヌクレオチドが配列番号780~2019のいずれか1つの配列を含み、式中、各チミン塩基(T)が独立しておよび任意にウラシル塩基(U)で置換されていてもよく、各Uが独立しておよび任意にTで置換されていてもよい、態様30または31に記載のオリゴヌクレオチド。

33.細胞に分子ペイロードを送達する方法であって、方法が細胞を態様1から26のいずれか1つに記載の複合体と接触させることを含む、方法。

34.オリゴヌクレオチドを細胞に送達する方法であって、方法が細胞を態様27から29のいずれか1つに記載の複合体と接触させることを含む方法。

35.細胞におけるジストロフィンタンパク質の発現または活性を促進する方法であって、方法が分子ペイロードの細胞への内在化を促進するのに有効な量で、細胞を態様1から26のいずれか1つに記載の複合体と接触させることを含む、任意に細胞が筋細胞である、方法。

36.細胞におけるジストロフィンタンパク質の発現または活性を促進する方法であって、方法がオリゴヌクレオチドの細胞への内在化を促進するのに有効な量で細胞を態様27から29のいずれか1つに記載の複合体と接触させることを含む、任意に細胞が筋細胞である、方法。

37.細胞がin vitroである、態様35または36に記載の方法。

38.細胞が対象内にある、態様35または36に記載の方法。

10

20

30

40

50

39.対象がヒトである、態様38に記載の方法。

40.対象が、エクソン55のスキッピングに適したDMD遺伝子を有する、態様39に記載の方法。

41.ジストロフィンタンパク質が切断型ジストロフィンタンパク質である、態様35から40のいずれか1つに記載の方法。

42.ジストロフィノパチーに関連する変異DMD対立遺伝子を有する対象を処置する方法であって、方法が有効量の態様1から29のいずれか1つに記載の複合体を対象に投与することを含む、方法。

43.細胞におけるDMDプレ-mRNA転写物のエクソン55のスキッピングを促進する方法であって、方法が細胞を態様1から29のいずれか1つに記載の有効量の複合体と接触させることを含む、方法。

44.ジストロフィノパチーに関連する変異DMD対立遺伝子を有する対象を処置する方法であって、方法が有効量の態様1から29のいずれか1つに記載の複合体を対象に投与することを含む、方法。

【0379】

例

例1.デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の筋管における抗TfR1抗体抱合体のエクソンスキッピング活性

本実験では、DMDエクソン51スキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)に共有結合的に連結された抗TfR1 Fab(3M12 VH4/Vκ3)を含む抗TfR1抗体抱合体のエクソンスキッピング活性を評価した。ASOをスキッピングするDMDエクソン51は、30ヌクレオチド長のホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)であり、配列TG GAGGT(配列番号131)を有するDMDエクソン51中のESEを標的とする。DMD遺伝子にエクソン52欠失を有する不死化ヒト筋芽細胞を解凍し、Promocell骨格筋細胞成長培地(5%FBSおよび1×Pen-Strepを含む)に1e6細胞/フラスコの密度で播種し、コンフルエントになるまで成長させた。ひとたびコンフルエントになると、細胞をトリプシン処理し、遠心によってペレット化し、新鮮なPromocell骨格筋細胞成長培地に再懸濁した。細胞数をカウントし、細胞をマトリゲルコーティング96ウェルプレートに50000細胞/ウェルの密度で播種した。細胞が24時間にわたって回復することを許した。増殖培地を吸引し、血清を含まない分化培地で置換することによって、細胞を筋管に分化するように誘導した。次いで、細胞を、10 μM ASOのDMDエクソン51スキッピングオリゴヌクレオチド(抗体に共有結合的に連結されていない-「ネイキッド」)または10 μM ASO当量のDMDエクソン51スキッピングオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された抗TfR1 Fab(3M12 VH4/Vκ3)で処理した。細胞を試験物と10日間インキュベートし、次いで、全RNAを96ウェルプレートから回収した。75ngの全RNAを用いてcDNA合成を行い、変異特異的PCRを行って細胞内におけるエクソン51のスキッピングの程度を評価した。突然変異特異的PCR産物を4%アガロースゲルに流し、SYBR goldを使用して視覚化した。デンシメトリーが使用されて、スキップされたおよびスキッピングされなかったアンプリコンの相対量を計算し、エクソンスキッピングは、存在するアンプリコンの全量によって除算された、エクソン51がスキップされたアンプリコンの比として決定された。

【数2】

$$\text{エクソンスキッピング(\%)} = \frac{\text{スキップされたアンプリコン}}{(\text{スキップされたアンプリコン} + \text{スキップされていないアンプリコン})} * 100$$

【0380】

これらの結果は、抱合体が、患者の筋管においてネイキッドDMDエクソン51スキッピングオリゴヌクレオチドと比較して、エクソンスキッピングを増進したことを実証している(図1)。これは、抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3が、筋細胞への抱合体の細胞内在化を可能にして、筋細胞中のオリゴヌクレオチドをスキッピングするエクソン51の活性をもたらしたことを示す。同様に、抗TfR1抗体(例として、抗TfR1 Fab 3M12 VH4/V

κ3)は、他のエクソンスキッピングオリゴヌクレオチド(例として、本明細書で提供されるエクソンスキッピングオリゴヌクレオチド、例えば、エクソン55スキッピングオリゴヌクレオチド)に共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含む抱合体の筋細胞への内在化を可能にし、筋細胞におけるエクソンスキッピングオリゴヌクレオチドの活性を促進することができる。

【0381】

例2. カニクイザルにおけるin vivoでの抗TfR1 Fab-ASO抱合体のエクソンスキッピング活性

抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3を、例1で使用したアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)をスキッピングするDMDエクソン51に共有結合的に連結させた。抱合体のエクソンスキッピング活性は、健康な非ヒト霊長類においてin vivoで試験された。ナীব雄性的カニクイザル(n=4~5/群)に、2用量のビヒクル、30mg/kgネイキッドASO(すなわち、抗体に共有結合していない)、またはDMDエクソン51スキッピングオリゴヌクレオチド(30mg/kg ASO当量)に共有結合的に連結された122mg/kg抗TfR1 Fab(3M12 VH4/Vκ3)を、静脈内注入によって1日目および8日目に投与した。最初の用量が投与された2週間後または4週間後に動物は 殺され、組織が採取された。Promega Maxwell(登録商標)RSC装置を使用して組織サンプルから全RNAを収集し、qScript cDNA SuperMixを使用してcDNA合成が行われた。エクソン51スキッピングの評価は、エンドポイントPCRを使用して行われた。

【0382】

PCR産物のキャピラリー電気泳動を使用してエクソンスキッピングを評価し、以下の式を使用してエクソン51スキッピング%が計算された。

【数3】

$$\text{エクソンスキッピング(\%)} = \frac{\text{スキップされたバンドのモル濃度}}{\text{スキップされたバンドのモル濃度} + \text{スキップされていないバンドのモル濃度}} * 100$$

計算されたエクソン51スキッピング結果は表10に示される。

【表10】

表10. カニクイザルにおける DMD mRNA のエクソン 51 スキッピング

時間	2 週間			4 週間	
群	ビヒクル	ネイキッド ASO ^a	抱合体	ネイキッド ASO ^a	抱合体
抱合体の用量 ^b	0	n/a	122	n/a	122
ASO の用量 ^c	0	30	30	30	30
四頭筋 ^d	0.00 (0.00)	1.216 (1.083)	4.906 (3.131)	0.840 (1.169)	1.708 (1.395)
横隔膜 ^d	0.00 (0.00)	1.891 (2.911)	7.315 (1.532)	0.717 (1.315)	9.225 (4.696)
心臓 ^d	0.00 (0.00)	0.043 (0.096)	3.42 (1.192)	0.00 (0.00)	4.525 (1.400)
二頭筋 ^d	0.00 (0.00)	0.607 (0.615)	3.129 (0.912)	1.214 (1.441)	4.863 (3.881)
前脛骨筋 ^d	0.00 (0.00)	0.699 (0.997)	1.042 (0.685)	0.384 (0.615)	0.816 (0.915)
腓腹筋 ^d	0.00 (0.00)	0.388 (0.573)	2.424 (2.329)	0.00 (0.00)	5.393 (2.695)

^aASO = アンチセンスオリゴヌクレオチド。

^b抱合体の用量は抗 TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3-ASO 抱合体の mg/kg として列挙している。

^cASO の用量は ASO の mg/kg または抗 TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3-ASO の用量の ASO 当量として列挙している。

^dエクソンスキッピングの値はエクソン 51 スキッピングの平均 %であり、括弧内は標準偏差(n=5)である。

【0383】

組織ASO蓄積も、ASO配列に相補的なプローブを用いたハイブリダイゼーションELISAを用いて定量された。標準曲線が作成され、標準曲線の線形回帰からASOレベル(ng/g

が導出された。ASOは、ネイキッドASOの投与と比較して、抗TfR1 Fab VH4/Vκ3-ASO 抱合体の投与後により高いレベルで評価したすべての組織に分布していた。ネイキッドASOの静脈内投与は、最初の投与の2週間および4週間後に評価したすべての組織においてバックグラウンドレベルに近いASOレベルをもたらした。抗TfR1 Fab VH4/Vκ3-ASO 抱合体の投与は、最初の投与の2週間後に、心臓>横隔膜>二頭筋>四頭筋>腓腹筋>前脛骨筋の順位で評価した組織の至るところにASOの分布をもたらした。組織濃度の持続時間も評価された。四頭筋、二頭筋および横隔膜のASOの濃度は、評価した期間(2~4週間)にわたって50%未満減少したが、心臓、前脛骨筋および腓腹筋のASOのレベルは、実質的に変化しないままであった(表11)。これは、抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3が、in vivoで筋細胞への抱合体の細胞内在化を可能にし、筋細胞中のエクソンスキッピングオリゴヌクレオチドの活性をもたらすことを示している。同様に、抗TfR1抗体(例として、抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3)は、in vivoで、他のエクソンスキッピングオリゴヌクレオチド(例として、本明細書で提供されるエクソンスキッピングオリゴヌクレオチド、例えば、エクソン55スキッピングオリゴヌクレオチド)に共有結合的に連結された抗TfR1抗体を含む抱合体の筋細胞への内在化を可能にし、筋細胞におけるエクソンスキッピングオリゴヌクレオチドの活性を促進することができる。

10

【表 1 1】

表 11. カニクイザルにおける DMD エクソン 51 スキッピング ASO の組織分布

時間	2 週間			4 週間	
群	ビヒクル	ネイキッド ASO ^a	抱合体	ネイキッド ASO ^a	抱合体
抱合体の用量 ^b	0	n/a	122	n/a	122
ASO の用量 ^c	0	30	30	30	30
四頭筋 ^d	0 (59.05)	696.8 (868.15)	2436 (954.0)	197 (134)	682 (281)
横隔膜 ^d	0± (144.3)	580.02 (360.11)	6750 (2256)	60 (120)	3131 (1618)
心臓 ^d	0 (396.03)	1449 (1337)	27138 (6315)	943 (1803)	30410 (9247)
二頭筋 ^d	0 (69.58)	615.63 (335.17)	2840 (980.31)	130 (80)	1326 (623)
前脛骨筋 ^d	0 (76.31)	564.71 (327.88)	1591 (253.50)	169 (110)	1087 (514)
腓腹筋 ^d	0 (41.15)	705.47 (863.75)	2096 (474.04)	170 (69)	1265 (272)

20

30

^aASO = アンチセンスオリゴヌクレオチド。

^b抱合体の用量は抗 TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3-ASO 抱合体の mg/kg として列挙している。

^cASO の用量は ASO の mg/kg または抗 TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3-ASO 抱合体の用量の ASO 当量として列挙している。

^dASO の値は ASO の組織中の平均濃度 ng/g であり、括弧内は標準偏差 (n=5) である。

【 0 3 8 4 】

例 3. DMD 患者の筋管における抗 TfR1 抱合体のエクソンスキッピング活性

本実験では、DMD エクソン 55 スキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) に共有結合的に連結された抗 TfR1 Fab (3M12 VH4/Vκ3) を含む抗 TfR1 抗体抱合体のエクソンスキッピング活性を評価する。ASO をスキッピングする DMD エクソン 55 は、ホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー (PMO) であり、DMD エクソン 55 スプライシング特徴を標的とする。不死化ヒト筋芽細胞を解凍し、1e6 細胞/フラスコの密度で Promocell 骨格筋細胞成長培地 (5% FBS および 1× Pen-Strep あり) に播種し、コンフルエントまで成長させる。ひとたびコンフルエントになると、細胞をトリプシン処理し、遠心によってペレット化し、新鮮な Promocell 骨格筋細胞成長培地に再懸濁する。細胞数をカウントし、細胞をマトリゲルコーティング 96 ウェルプレートに 50000 細胞/ウェルの密度で播種する。細胞を 24 時間回復させる。増殖培地を吸引し、血清を含まない分化培地で置換することによって、細胞を筋管に分化するように誘導する。次いで、細胞を、1

40

50

0 μM ASOのDMDエクソン55スキッピングオリゴヌクレオチド(抗体に共有結合的に連結されていない「ネイキッド」)または10 μM ASO当量のDMDエクソン55スキッピングオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された抗TfR1 Fab(3M12 VH4/Vκ3)で処理する。細胞を試験物と10日間インキュベートし、次いで、全RNAを96ウェルプレートから回収した。75 ngの全RNAを用いてcDNA合成を行い、変異特異的PCRを行って細胞内におけるエクソン55のスキッピングの程度を評価する。PCR産物は、UV検出を伴うキャピラリー電気泳動を使用して測定される。モル濃度を計算し、スキップされたアンプリコンおよびスキッピングされていないアンプリコンの相対量を求める。エクソンスキッピングは、以下の式に従って、存在するアンプリコンの総量で割ったエクソン55スキッピングアンプリコンの比として求められる。

10

【数4】

$$\text{エクソンスキッピング(\%)} = \frac{\text{スキップされたアンプリコン}}{(\text{スキップされたアンプリコン} + \text{スキップされていないアンプリコン})} * 100$$

【0385】

これら結果は、抱合体が、患者の筋管においてネイキッドDMDエクソン55スキッピングオリゴヌクレオチドと比較して、エクソンスキッピングの増進を促進することを示している。これは、抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3が、筋細胞への抱合体の細胞内在化を可能にして、筋細胞中のオリゴヌクレオチドをスキッピングするエクソン55の活性をもたらしたことを示す。

20

【0386】

均等物および用語

例証的に本明細書に記載された開示は、好適には、本明細書に具体的には開示されないいずれかの要素(単数または複数)、限定(単数または複数)の非存在下において実施され得る。それゆえに、例えば、本明細書の各事例において、用語「含む」、「から本質的になる」、「および」のいずれかは、他の2つの用語のどちらかによって置き換えられ得る。採用された用語および表現は、限定ではなく記載の用語として使用され、かかる用語および表現の使用には、示されるおよび記載される特徴のいずれかの均等物またはそれらの部分を排除する意図はなく、種々の改変が本開示の範囲内で可能であることが認識される。それゆえに、本開示は好ましい態様によって具体的に開示されたが、本明細書に開示される概念の任意の特徴、改変、および変形が当業者によって頼られ得ることと、かかる改変および変形は本開示の範囲内であると考慮されることとは理解されるべきである。

30

【0387】

加えて、本開示の特徴または態様がマーカッシュ群または代替物の他の群分けとして記載されるところでは、当業者は、本開示がそれによってマーカッシュ群または他の群のいずれかの個々の構成員または構成員のサブグループとしてもまた記載されることを認識するであろう。

【0388】

当然のことながら、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドまたは他の核酸の構造を記載する際には、配列表で提示される配列が参照され得る。かかる態様では、実際のオリゴヌクレオチドまたは他の核酸は、指定された配列と本質的に同じかまたは類似の相補的な特性を保持しながら、指定された配列と比較して、1つ以上の代替的なヌクレオチドまたはヌクレオシド(例として、DNAヌクレオシドのRNAカウンターパート、またはRNAヌクレオシドのDNAカウンターパート)および/または(例として、および)1つ以上の修飾ヌクレオチド/ヌクレオシドおよび/または(例として、および)1つ以上の修飾されたヌクレオシド間連結および/または(例として、および)1つ以上の他の改変を有し得る。

40

【0389】

本発明を記載する文脈における(特に次の請求項の文脈における)用語「a」および「an」および「the」ならびに類似のレファレントの使用は、本明細書に別段の指示がないか

50

または文脈と明らかに矛盾しない限り、単数および複数両方をカバーすると解釈されるべきである。用語「備える」、「有する」、「含む」、および「含有する」は、特に断りのない限り、オープンエンドの用語として解釈されるべきである(すなわち、「含むが、それらに限定されない」を意味する)。本明細書における値の範囲の記載は、本明細書に別段の指示がない限り、単に、範囲内に収まる各別個の値を個々に参照する簡略な方法として働くことが意図され、各別個の値は、それがあたかも本明細書に個々に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に別段の指示がないかまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、本明細書に記載のすべての方法は任意の好適な順序で行われ得る。別様の主張がなされない限り、本明細書で提供されるありとあらゆる例または例示的な文言(例として、「などの」)の使用は、単に本発明をより良く解き明かすことが意図され、本発明の範囲に限定を課さない。本明細書のいかなる文言も、いずれかの請求されない要素を本発明の実施にとって必須であると指し示すものと解釈されるべきではない。

10

【0390】

本発明の態様が本明細書に記載されている。それらの態様の変形は、先述の記載を読むことによって当業者には明らかになり得る。

【0391】

本発明者は当業者がかかる変形を適当に採用することを予期し、本発明者は本発明が本明細書に具体的に記載されるとおりとは別様に実施されることを意図する。したがって、本発明は、然るべき法律によって許可される本明細書に添付される請求項に記載される主題のすべての改変および均等物を包含する。その上、それらのすべての可能な変形における上に記載された要素のいずれかの組み合わせは、本明細書に別段の指示がないかまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって包摂される。当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の態様の多くの均等物を認識するか、またはせいぜい慣例的な実験作業を用いて確かめることができるであろう。かかる均等物は次の請求項によって包摂されることが意図される。

20

【図面】

【図1】

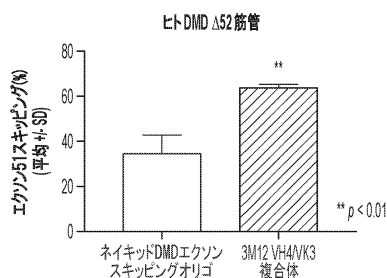


図1

30

【配列表】

2024525611000001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/73527
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 31/713; A61P 21/00; A61K 47/68; C07K 16/28 (2022.01) ADD. A61P 9/00; C12N 15/113 (2022.01) CPC - INV. A61K 31/713; A61P 21/00; A61K 47/6849; C07K 16/28 ADD. A61K 47/6807; A61K 2039/505; A61P 9/00; C12N 15/1137; C12N 2310/11; C12N 2310/315; C12N 2310/3513 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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2020/0282074 A1 (AVIDITY BIOSCIENCE INC et. al) 10 September 2020; paragraph [0004] [0047] [0079] [0131] [0134] [0155] [0196] [0314] [0335]	1, 3/1, 18, 19
Y	US 2018/0142245 A1 (NIPPON SHINYAKU CO LTD et. al) 24 May 2018; paragraph [0095] [0096] [0097]	1, 3/1, 18-19
Y	WO 2012/087962 A2 (GENENTECH INC et. al) 28 June 2012; page 5, lines 23-24	3/1
A	WO 2013/026832 A1 (ROCHE GLYCART AG et. al) 28 February 2013; page 2, line 30; page 3, lines 4, 8-9	2 and 3/2
A	US 2019/0119383 A1 (HOFFMANN LA ROCHE INC et. al) 25 April 2019; paragraph [0018] [0021]	2 and 3/2
A	US 2008/0177045 A1 (LEE ET AL. et. al) 24 July 2008; paragraph [0147]	2 and 3/2
A	US 2015/0266954 A1 (ELI LILLY & CO et. al) 24 September 2015; paragraph [0008]	2 and 3/2
A	US 2008/0025913 A1 (BOWDISH ET AL. et. al) 31 January 2008; paragraph [0301]	2 and 3/2
A	NGUYEN, "Antisense Oligonucleotides for the Treatment of Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy" 1202-1218. American Journal of Translational Research. Web. 30 March 2019; Entire Document	1-3, 18-19
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 07 November 2022 (07.11.2022)		Date of mailing of the international search report NOV 23 2022
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/73527

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.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/73527

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.: 4-17, 20-21
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:
-***Please See Supplemental Page-***

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 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.:
Groups I+, Claims 1-3 and 18-19, SEQ ID NO: 33 (CDR-H1), SEQ ID NO: 34 (CDR-H2), SEQ ID NO: 35 (CDR-H3), SEQ ID NO: 36 (CDR-L1), SEQ ID NO: 37 (CDR-L2), SEQ ID NO: 32 (CDR-L3), SEQ ID NO: 76 (VH), SEQ ID NO: 75 (VL), SEQ ID NO: 160 (region of complementarity), SEQ ID NO: 780 (oligonucleotide sequence).

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 SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/73527

-----Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-----

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-3 and 18-19, SEQ ID NO: 33 (CDR-H1), SEQ ID NO: 34 (CDR-H2), SEQ ID NO: 35 (CDR-H3), SEQ ID NO: 36 (CDR-L1), SEQ ID NO: 37 (CDR-L2), SEQ ID NO: 32 (CDR-L3), SEQ ID NO: 76 (VH), SEQ ID NO: 75 (VL), SEQ ID NO: 160 (region of complementarity), SEQ ID NO: 780 (oligonucleotide sequence); are directed to complexes comprising an anti-transferrin receptor 1 (TfR1) antibody covalently linked to an oligonucleotide configured for inducing skipping of exon 55 in a DMD pre-mRNA, wherein the oligonucleotide comprises a region of complementarity with at least 8 consecutive nucleotides; and an oligonucleotide that targets DMD.

The complexes and oligonucleotides of Claims 1-3 (each in-part) and 18-19 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise an antibody encompassing SEQ ID NOs: 33-37 and 32 (first exemplary CDRs H1-H3 and L1-L3, respectively), SEQ ID NO: 76 (first exemplary VH), SEQ ID NO: 75 (first exemplary VL); and an oligonucleotide complementary to at least 8 consecutive nucleotides of SEQ ID NO: 160 (first exemplary region of complementarity) and comprising at least 15 consecutive nucleotides of SEQ ID NO: 780 (first exemplary oligonucleotide sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each the genera found in claims 1-3 and 18-19 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect one or more additional antibody sequences, including a set of CDRs and variable region sequences, or an oligonucleotide, including a region of complementarity and an oligonucleotide sequence, to be searched. Additional polypeptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected polypeptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention. If different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. Exemplary elections include SEQ ID NO: 7 (CDR-H1), SEQ ID NO: 8 (CDR-H2), SEQ ID NO: 9 (CDR-H3), SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2), SEQ ID NO: 6 (CDR-L3), SEQ ID NO: 69 (VH), and SEQ ID NO: 70 (VL); or SEQ ID NO: 161 (region of complementarity) and SEQ ID NO: 781 (oligonucleotide sequence).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

No technical features are shared between the distinct polypeptide and oligonucleotide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of: an anti-transferrin receptor 1 (TfR1) antibody covalently linked to an oligonucleotide configured for inducing skipping of exon 55 in a DMD pre-mRNA, and an oligonucleotide that targets DMD; this shared technical feature is previously disclosed by the publication entitled "Generation and functional characterization of the anti-transferrin receptor single-chain antibody-GAL4 (TfRscFv-GAL4) fusion protein" by Ye, et al. (hereinafter "Ye") in view of the publication entitled "Exons 45-55 Skipping Using Mutation-Tailored Cocktails of Antisense Morpholinos in the DMD Gene" by Echigoya, et al. (hereinafter "Echigoya").

Ye discloses an anti-TfR1 single-chain variable fragments of immunoglobulin (scFv) which were cloned from hybridoma cell line producing antibody against TfR linked to a Gal4 domain with affinity for a particular oligonucleotide sequence (Abstract; page 2, column 2, paragraph 2; page 10, column 1, paragraph 3).

Echigoya discloses antisense oligonucleotides targeting the DMD gene enabling skipping of exon 55 to ameliorate Duchenne muscular dystrophy, a neuromuscular disorder caused by mutations (Abstract; Introduction).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the disclosure of Ye to incorporate an oligonucleotide targeting DMD gene to ameliorate a neuromuscular disorder, as taught by Echigoya, as Ye discloses an antibody targeting transferrin receptor, a receptor appearing on muscle cells. Echigoya discloses treatment of a muscular disorder with oligonucleotides, and this combination would provide the capability of targeting the oligonucleotides to muscle cells.

Additionally, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to modify the oligonucleotide-antibody junction from an affinity binding (via Gal4) to a covalent binding in order to strengthen their attachment.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the combination of the Ye and Echigoya references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

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,
CV,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,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02451、ウォルサム、トラペツロ ロード 1560

(72)発明者 タン, キム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02451、ウォルサム、トラペツロ ロード 1560

(72)発明者 マックスウィージェン, ジェイムズ

アメリカ合衆国 コロラド州 80007、アーヴァダ、ウェスト 94ス アヴェニュー 19395

(72)発明者 サブラマニアン, ロメシュ, アール.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01701、フラミンガム、アラン ストリート 9

(72)発明者 ウィーデン, ティモシー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02451、ウォルサム、トラペツロ ロード 1560

(72)発明者 カタナニ, モハマド, ティー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02451、ウォルサム、トラペツロ ロード 1560

(72)発明者 クイン, ブレンダン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02118、ボストン、イースト ニュートン ストリート
45、#320

(72)発明者 ナジム, ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02451、ウォルサム、トラペツロ ロード 1560

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 CA19 CA25 CA44

4H045 AA10 AA30 BA54 CA40 DA76 EA20