



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109112126 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 14

(21) 申请号 201810329748.4

(22) 申请日 2011.06.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109112126 A

(43) 申请公布日 2019.01.01

(30) 优先权数据
61/357,774 2010.06.23 US

(62) 分案原申请数据
201180035731.4 2011.06.23

(73) 专利权人 库尔纳公司
地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 J·克拉德 O·霍克瓦舍曼
B·德里昂 C·科伊托 J·H·萧

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313
专利代理师 郗名悦 张波

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 3/12 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 15/10 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 25/06 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2004203024 A1, 2004.10.14
US 2009118333 A1, 2009.05.07

审查员 于地美

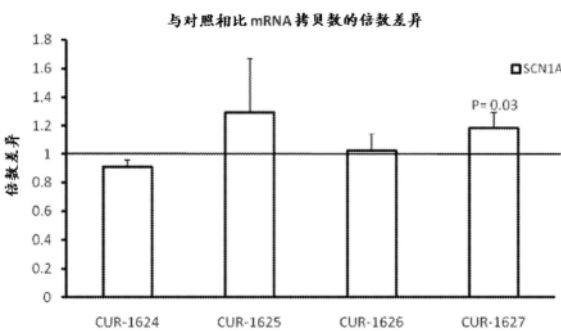
权利要求书1页 说明书55页
序列表99页 附图12页

(54) 发明名称

通过抑制电压门控钠通道 α 亚基 (SCNA) 的天然反义转录物而治疗 SCNA 相关疾病

(57) 摘要

本发明涉及调节电压门控钠通道 α 亚基 (SCNA) 的表达和/或功能的反义寡核苷酸, 尤其是通过靶向电压门控钠通道 α 亚基 (SCNA) 的天然反义多核苷酸。本发明还涉及这些反义寡核苷酸的鉴定和它们在治疗 SCNA 表达相关的疾病和病症中的用途。



1. 长度为26个核苷酸的至少一种反义寡核苷酸在制备用于预防或治疗与SCN1A突变相关的Dravet综合征的药物中的用途,所述至少一种反义寡核苷酸结合至少一种I型电压门控钠通道 α 亚基(SCN1A)多核苷酸的天然反义转录物并且上调所述至少一种SCN1A多核苷酸的表达,其中所述至少一种反义寡核苷酸的核苷酸序列为GAGCCAGUCACAAAUTCAGATCACCC。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述至少一种反义寡核苷酸包括选自以下的一种或多种修饰:至少一种修饰的糖部分、至少一种修饰的核苷间键合、至少一种修饰的核苷酸及其组合。

3. 如权利要求2所述的用途,其中所述一种或多种修饰包括选自以下的至少一种修饰的糖部分:2'-O-甲氧基乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、二环的糖部分、2'-氟修饰的糖部分及其组合。

4. 如权利要求2所述的用途,其中所述一种或多种修饰包括选自以下的至少一种修饰的核苷间键合:硫代磷酸酯、磷酸烷基酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酯、羧甲基酯及其组合。

5. 如权利要求2所述的用途,其中所述一种或多种修饰包括选自以下的至少一种修饰的核苷酸:肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、阿拉伯糖-核酸(ANA)、肽核酸(PNA)类似物、锁核酸(LNA)类似物、阿拉伯糖-核酸(ANA)类似物及其组合。

6. 如权利要求1所述的用途,其中所述至少一种反义寡核苷酸包括至少一种硫代磷酸酯核苷酸间键合。

7. 如权利要求1所述的用途,其中所述至少一种反义寡核苷酸包括硫代磷酸酯核苷酸间键合的主链。

通过抑制电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的天然反义转录物而治疗SCNA相关疾病

[0001] 本申请为申请日是2011年6月23日、申请号是2011800357314 (PCT/US2011/041664)、发明名称为“通过抑制电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的天然反义转录物而治疗SCNA相关疾病”的中国申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本申请要求2010年6月23日提交的美国临时专利申请No.61/357,774的优先权,其通过引用整体并入本文。

[0003] 本发明的实施方案包括调节SCNA和相关分子的表达和/或功能的寡核苷酸。

[0004] 背景

[0005] DNA-RNA和RNA-RNA杂交对于核酸功能的许多方面是重要的,包括DNA复制、转录和翻译。杂交对于检测特定核酸或改变其表达的多种技术也是关键的。反义核苷酸,例如通过与靶RNA杂交从而干扰RNA剪接、转录、翻译和复制来破坏基因表达。反义DNA具有额外的特性,即DNA-RNA杂交物作被核糖核酸酶H消化的底物,这是在大多数细胞类型中存在的活性。反义分子可被递送到细胞中,如寡脱氧核苷酸(ODN)的情形,或反义分子可从内源基因表达为RNA分子。FDA最近批准了一种反义药物VITRAVENETM(用于治疗巨细胞病毒视网膜炎),反映了反义药物具有治疗效用。

[0006] 概述

[0007] 提供本概述以展示本发明的概述,以简要地指出本发明的性质和实质。提交本概述应理解的是,其不会用来解释或限制权利要求书的范围或含义。

[0008] 在一个实施方案中,本发明提供通过利用靶向天然反义转录物任何区域的反义寡核苷酸而导致相应有益基因的上调来抑制天然反义转录物作用的方法,其中所述有益基因选自SCNA基因家族的至少一个成员及其变体。本文还预期,天然反义转录物的抑制可由siRNA、核酶和小分子实现,认为这些在本发明的范围中。

[0009] 一个实施方案提供体内或体外调节患者细胞或组织中SCNA多核苷酸的功能和/或表达的方法,包括将所述细胞或组织与长度为5至30个核苷酸的反义寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸与包括SEQ ID NO:12的核苷酸1至1123和SEQ ED NO:13的1至2352、SEQ ED NO:14的1至267、SEQ ID NO:15的1至1080、SEQ ID NO:16的1至173、SEQ ID NO:17的1至618、SEQ ID NO:18的1至871、SEQ ID NO:19的1至304、SEQ ID NO:20的1至293、SEQ ID NO:21的1至892、SEQ ED NO:22的1至260、SEQ ED NO:23的1至982、SEQ ED NO:24的1至906、SEQ ED NO:25的1至476、SEQ ED NO:26的1至285、SEQ ED NO:27的1至162和SEQ ID NO:28的1至94中的5至30个连续核苷酸的多核苷酸的反向互补序列具有至少50%序列同一性,从而体内或体外调节患者细胞或组织中SCNA多核苷酸的功能和/或表达。

[0010] 在实施方案中,寡核苷酸靶向SCNA多核苷酸的天然反义序列,例如,SEQ ID NO:12至28所列的核苷酸及其任何变体、等位基因、同系物、突变体、衍生物、片段及其互补序列。反义寡核苷酸的实例如SEQ ID NO:29至94所列。

[0011] 另一实施方案提供体内或体外调节患者细胞或组织中SCNA多核苷酸的功能和/或表达的方法,包括将所述细胞或组织与长度为5至30个核苷酸的反义寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸与SCNA多核苷酸的反义的反向互补序列具有至少50%序列同一性;从而体内或体外调节患者细胞或组织中SCNA多核苷酸的功能和/或表达。

[0012] 另一实施方案提供体内或体外调节患者细胞或组织中SCNA多核苷酸的功能和/或表达的方法,包括将所述细胞或组织与长度为5至30个核苷酸的反义寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸具有与SCNA天然反义转录物互补的至少50%序列;从而体内或体外调节患者细胞或组织中SCNA多核苷酸的功能和/或表达。

[0013] 在实施方案中,组合物包括一种或多种结合有义和/或反义SCNA多核苷酸的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸选自SCNA至SCN12A及其变体组成的组。在优选的实施方案中,靶多核苷酸选自SCNA。

[0014] 在实施方案中,寡核苷酸包括一种或多种修饰或取代的核苷酸。

[0015] 在实施方案中,寡核苷酸包括一种或多种修饰的键。

[0016] 在又一实施方案中,修饰的核苷酸包括包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯、肽核酸、2'-O-甲基、氟-或碳、亚甲基或其它锁核酸(LNA)分子的修饰的碱基。优选地,修饰的核苷酸是锁核酸分子,包括 α -L-LNA。

[0017] 在实施方案中,将寡核苷酸皮下、肌内、静脉内或腹膜内施用给患者。

[0018] 在实施方案中,寡核苷酸以药物组合物施用。治疗方案包括向患者施用反义化合物至少一次;然而,可修改该治疗以包括经一段时间的多个剂量。该治疗可与一种或多种其它类型的治疗联合。

[0019] 在实施方案中,将寡核苷酸封装在脂质体中或连接于载体分子(例如,胆固醇、TAT肽)。

[0020] 其它方面在以下描述。

[0021] 附图简述

[0022] 图1是实时PCR结果的图,显示用利用Lipofectamine 2000引入的硫代磷酸酯寡核苷酸处理HepG2细胞后,与对照相比,SCN1A mRNA的倍数变化+标准差。实时PCR结果显示,用针对SCN1A反义BG724147的反义寡核苷酸之一处理48h后,SCN1A mRNA在HepG2细胞中的水平显著增加。标为CUR-1624至CUR-1627的条柱对应于分别用SEQ ID NO:30至33处理的样品。

[0023] 图2是实时PCR结果的图,显示用利用Lipofectamine 2000引入的硫代磷酸酯寡核苷酸处理HepG2细胞后,与对照相比,SCN1A mRNA的倍数变化+标准差。标为CUR-1628至CUR-1631的条柱对应于分别用SEQ ED NO:34至37处理的样品。

[0024] 图3是实时PCR结果的图,显示用利用Lipofectamine 2000引入的硫代磷酸酯寡核苷酸处理HepG2细胞后,与对照相比,SCN1A mRNA的倍数变化+标准差。标为CUR-1632至CUR-1636的条柱对应于分别用SEQ ED NO:38至42处理的样品。

[0025] 图4显示SCN1A mRNA在携带Dravet综合征相关的突变的原代人皮肤成纤维细胞中的剂量依赖性上调。CUR-1916、CUR-1740、CUR-1764和CUR-1770对应于分别用SEQ ID NO:70、45、52和57处理的样品。

[0026] 图5显示SCN1A mRNA在SK-N-AS细胞中的剂量依赖性上调。CUR-1916、CUR-1740、

CUR-1764和CUR-1770对应于分别用SEQ ID NO:70、45、52和57处理的样品。

[0027] 图6显示SCN1A mRNA在Vero76细胞中的剂量依赖性上调。CUR-1916、CUR-1740、CUR-1764和CUR-1770对应于分别用SEQ ID NO:70、45、52和57处理的样品。

[0028] 图7显示SCN1A mRNA的上调不是由反义寡核苷酸的非特异性毒性引起的。A-CUR-1916引起的上调;B-由CUR-1770引起的上调。CUR-1462是具有类似化学的失活对照寡核苷酸。

[0029] 图8显示SCN8A和SCN9A通道在携带Dravet相关的突变的人成纤维细胞中的表达未被用针对SCN1A天然反义转录物靶向的反义寡核苷酸的处理显著影响。A-用CUR-1770的处理;B-用CUR-1916的处理。

[0030] 图9显示靶向SCN1A特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸的稳定性。如实施例2中所述地用于2010年8月和2011年3月合成的两个不同批次的CUR-1916处理Vero 76细胞。于2010年8月合成的寡核苷酸以1mM水溶液贮存于4℃。于2011年3月合成的寡核苷酸以冻干形式装运并且在到达后直接进行测试。

[0031] 图10显示SCN1A蛋白在用与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理的携带Dravet综合征突变的成纤维细胞中的上调。使成纤维细胞生长于24孔板中并且用20nM(小图c:CUR-1740;d:CUR-1770;e:CUR-1916)和0nM(b)的与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理。通过使用抗-SCN1A抗体(Abeam cat#ab24820)的间接免疫组织化学以及用抗生物素蛋白/生物素方法(Vector Laboratories cat#SP-2001;Vector Laboratories cat#PK-6101;Vector Laboratories cat#SK-4105)的二级抗体染色/扩增对细胞的SCN1A进行染色(b-c);小图a-阴性对照,兔抗-小鼠抗体用作一级抗体,然后进行与小图b-e相同的染色规程。

[0032] 图11显示SCN1A蛋白在用与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理的SK-N-AS细胞中的上调。使SK-N-AS细胞生长于24孔板中并且用20nM(c:CUR-1740;d:CUR-1764;e:CUR-1770;f:CUR-1916)和(b:0nM)的寡核苷酸处理。通过使用抗-SCN1A抗体(Abeam cat#ab24820)的间接免疫组织化学和使用抗生物素蛋白/生物素方法(Vector Laboratories cat#SP-2001;Vector Laboratories cat#PK-6101;Vector Laboratories cat#SK-4105)的二级抗体染色/扩增对SK-N-AS细胞的SCN1A进行染色(b-f);作为阴性对照,兔抗-小鼠抗体用作一级抗体,然后进行与小图b-f相同的染色规程(小图a)。

[0033] 图12显示SCN1A蛋白在用与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理的Vero 76细胞中的上调。使Vero 76细胞生长于24孔板中并且用20nM(c:CUR-1740;d:CUR-1945;e:CUR-1770;f:CUR-1916;g:CUR-1924)和0nM(b)的与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理。通过使用抗-SCN1A抗体(Abeam cat#ab24820)的间接免疫组织化学和用抗生物素蛋白/生物素方法(Vector Laboratories cat#SP-2001;Vector Laboratories cat#PK-6101;Vector Laboratories cat#SK-4105)的二级抗体染色/扩增对Vero 76细胞的SCN1A进行染色(b-f);小图a-作为阴性对照,兔抗-小鼠抗体用作一级抗体,然后进行与小图b-g相同的染色规程。

[0034] 图13显示上调SCN1A mRNA的靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调Vero76细胞中的肌动蛋白。测试实施例5和12中显示上调SCN1A mRNA和蛋白的靶向SCN1A特异性天然反义转录物的相同反义寡核苷酸(CUR-1740、CUR-1838、CUR-1924)对Vero 76细胞

中的 β -肌动蛋白mRNA表达的影响。数据证实,靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调非相关基因例如肌动蛋白。标为CUR-1740、CUR-1838和CUR-1924的条柱对应于分别用SEQ ID NO:45、62和78处理的样品。

[0035] 图14显示上调SCN1A mRNA和蛋白的靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调携带Dravet相关的突变的成纤维细胞中的肌动蛋白。测试实施例2和7中所示的上调SCN1A mRNA和蛋白的靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸(CUR-1916、CUR-1945)对肌动蛋白mRNA在携带Dravet相关的突变的成纤维细胞中的表达的影响。下面的数据证实,靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调非相关基因例如肌动蛋白。标为CUR-1916和CUR-1945的条柱对应于分别用SEQ ID NO:70和93处理的样品。

[0036] 图15显示上调SCN1A mRNA和蛋白的靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调SK-N-AS细胞中的肌动蛋白。测试实施例中显示上调SCN1A mRNA和蛋白的相同反义寡核苷酸(CUR-1740、CUR-1770、CUR-1916、CUR-1764、CUR-1838)对SK-N-AS细胞中的肌动蛋白mRNA表达的影响。数据证实,靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调非相关基因例如肌动蛋白。标为CUR-1740、CUR-1770、CUR-1916、CUR-1764、CUR-1838的条柱对应于分别用SEQ ID NO:45、57、70、52和62处理的样品。

[0037] 图16显示肌动蛋白在用与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理的SK-N-AS细胞中的染色。使SK-N-AS细胞生长于24孔板中并且用20nM(b:CUR-1740;c:CUR-1764;d:CUR-1770;e:CUR-1916)和0nM(a)的寡核苷酸处理。通过使用抗-肌动蛋白抗体(Abeam cat#ab1801)的间接免疫组织化学和使用抗生物素蛋白/生物素方法(Vector Laboratories cat#SP-2001;Vector Laboratories cat#PK-6101;Vector Laboratories cat#SK-4105)的二级抗体染色/扩增对SK-N-AS细胞的肌动蛋白进行染色(a-e)。

[0038] 图17显示用与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理的Vero 76细胞中肌动蛋白的染色。使Vero 76细胞生长于24孔板并且用20nM(b:CUR-1740;c:CUR-1770;d:CUR-1916;e:CUR-1924;f:CUR-1945)和0nM(a)的与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理。通过使用抗-肌动蛋白抗体(Abeam cat#ab1801)的间接免疫组织化学和用抗生物素蛋白/生物素方法(Vector Laboratories cat#SP-2001;Vector Laboratories cat#PK-6101;Vector Laboratories cat#SK-4105)的二级抗体染色扩增对Vero 76细胞的肌动蛋白进行染色(b-f);小图a-阴性对照,兔抗-小鼠抗体用作一级抗体,然后进行与小图b-g相同的染色规程。

[0039] 图18显示肌动蛋白在用与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理的携带Dravet综合征突变的成纤维细胞中的上调。使成纤维细胞生长于24孔板中并且用20nM(小图b:CUR-1740;c:CUR-1764;d:CUR-1770;e:CUR-1838和f:CUR-1916)和0nM(a)与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理。通过使用抗-肌动蛋白抗体(Abeam cat#ab1801)的间接免疫组织化学和用抗生物素蛋白/生物素方法(Vector Laboratories cat#SP-2001;Vector Laboratories cat#PK-6101;Vector Laboratories cat#SK-4105)的二级抗体染色/扩增对细胞的肌动蛋白进行染色(a-f)。

[0040] 图19显示SCN1A蛋白在用与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理的携带Dravet综合征的成纤维细胞中的上调,使用ELISA来定量。成纤维细胞用0或80nM的与SCN1A天然反义互补的寡核苷酸处理。48h后,将细胞转移至96孔板达24h,然后固定并用于SCN1A

和肌动蛋白ELISA。将SCN1A信号的OD读数对相同实验条件的肌动蛋白信号标准化。用0nM寡核苷酸给药的细胞中的标准化SCN1A信号用作基线(100%)。标为CUR-1740、CUR-1770和CUR-1916的条柱对应于分别用SEQ ID NO:45、57和70处理的样品。

[0041] 图20显示SCN1A蛋白在用与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理的Vero76细胞中的上调,使用ELISA来定量。Vero76细胞用0或80nM的与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理。48h后,将细胞转移至96孔板达24h,然后固定并用于SCN1A和肌动蛋白ELISA。将SCN1A信号的OD读数对相同实验条件的肌动蛋白信号标准化。用0nM寡核苷酸给药的细胞中的标准化SCN1A信号用作基线(100%)。标为CUR-1740、CUR-1770、CUR-1916、CUR-1924、CUR-1945的条柱对应于分别用SEQ ID NO:45、57、70、78和93处理的样品。

[0042] 图21显示SCN1A蛋白在用与SCN1A天然反义互补的寡核苷酸处理的SK-N-AS细胞中的上调,使用ELISA来定量。SK-N-AS细胞用0或20nM的与SCN1A天然反义互补的反义寡核苷酸处理。48h后,将细胞转移至96孔板达24h,然后固定并用于SCN1A和肌动蛋白ELISA。将SCN1A信号的OD读数对相同实验条件的肌动蛋白信号标准化。用0nM寡核苷酸给药的细胞中的标准化SCN1A信号用作基线(100%)。标为CUR-1740、CUR-1770、CUR-1924、CUR-1945的条柱对应于分别用SEQ ID NO:45、57、78和93处理的样品。

[0043] 图22显示来自SCN1A天然反义转录物BG724147的3'RACE的第二PCR循环的产物。对以下进行3'RACE:a)来自具有添加的腺苷的HepG2细胞的总RNA;b)从HepG2细胞分离的多聚腺苷酸RNA;c)来自具有添加的腺苷的携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞的总RNA;d)从携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞分离的多聚腺苷酸RNA。图表示用GelRed (GenScript, cat#M00120)染色的1%琼脂糖凝胶/1xTAE的阴性。箭头显示HepG2细胞和携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞常见的条带,表明这些细胞中BG724147天然反义转录物的存在。

[0044] 序列表描述SEQ ID NO:1:智人I型电压门控钠通道 α 亚基(SCN1A),转录变体1,mRNA(NCBI登记号:NM_001165963);SEQ ID NO:2:智人II型电压门控钠通道 α 亚基(SCN2A),转录变体1,mRNA(NCBI登记号:NM_021007);SEQ ID NO:3:智人III型电压门控钠通道 α 亚基(SCN3A),转录变体1,mRNA(NCBI登记号:NM_006922);SEQ ID NO:4:智人IV型电压门控钠通道 α 亚基(SCN4A),mRNA(NCBI登记号:NM_000334);SEQ ID NO:5:智人V型电压门控钠通道 α 亚基(SCN5A),转录变体1,mRNA(NCBI登记号:NM_198056);SEQ ID NO:6:智人VII型电压门控钠通道 α 亚基(SCN7A),mRNA(NCBI登记号:NM_002976);SEQ ID NO:7:智人VIII型电压门控钠通道 α 亚基(SCN8A),转录变体1,mRNA(NCBI登记号:NM_014191);SEQ ID NO:8:智人IX型电压门控钠通道 α 亚基(SCN9A),mRNA(NCBI登记号:NM_002977);SEQ ID NO:9:智人X型电压门控钠通道 α 亚基(SCN10A),mRNA(NCBI登记号:NM_006514);SEQ ID NO:10:智人XI型电压门控钠通道 α 亚基(SCN11A),mRNA(NCBI登记号:NM_014139);SEQ ID NO:11:智人电压门控钠通道 α 亚基SCN12A(SCN12A)mRNA,完整cds(NCBI登记号:AF109737);SEQ ID NO:12:天然SCN1A反义序列(BG724147扩展型);SEQ ID NO:13:天然SCN1A反义序列(Hs.662210);SEQ ID NO:14:天然SCN1A反义序列(AA383040);SEQ ID NO:15:天然SCN1A反义序列(BC029452);SEQ ID NO:16:天然SCN1A反义序列(AA630035);SEQ ID NO:17:天然SCN1A反义序列(BE566126);SEQ ID NO:18:天然SCN1A反义序列(BF673100);SEQ ID NO:19:天然SCN1A反义序列(BG181807);SEQ ID NO:20:天然SCN1A反义序列(BG183871);SEQ ID NO:

21:天然SCN1A反义序列(BG215777);SEQ ID NO:22:天然SCN1A反义序列(BG227970);SEQ ID NO:23:天然SCN1A反义序列(BM905527);SEQ ID NO:24:天然SCN1A反义序列(BUI 80772);SEQ ID NO:25:小鼠天然SCN1A反义序列(BG724147Ext小鼠);SEQ ID NO:26:小鼠天然SCN1A反义序列(Hs.662210小鼠AS1);SEQ ID NO:27:小鼠天然SCN1A反义序列(Hs.662210小鼠AS2);SEQ ID NO:28:小鼠天然SCN1A反义序列(Hs.662210小鼠AS3);SEQ ID NO:29至94:反义寡核苷酸。SEQ ID NO:95和96分别为反义寡核苷酸SEQ ID NO:58和59的反向互补序列。*指示硫代磷酸酯键,+指示LNA,'r'指示RNA且'm'指示寡核苷酸的指定糖部分的2'氧原子上的甲基。

[0045] 详述

[0046] 下面参考用于示例的实例应用来描述本发明的多个方面。应理解的是,列出许多具体细节、关联和方法以提供对本发明的完全理解。然而,相关领域普通技术人员将容易认识到,可没有一种或多种具体细节地实践本发明或以其它方法实践本发明。本发明不限于行为或事件的顺序,因为一些行为可以不同顺序进行和/或与其它行为或事件同时进行。而且,并非所有列举的行为或事件都是实施根据本发明的方法所需的。

[0047] 本文公开的所有基因、基因名称和基因产物预期对应来自本文公开的组合物和方法可适用的任何物种的同系物。因此,这些术语包括但不限于来自人和小鼠的基因和基因产物。应理解的是,当公开来自具体物种的基因或基因产物时,这一公开仅旨在示例,不应解释为限制,除非在其存在的上下文清楚地指明。因此,例如,对于本文公开的基因,其在一些实施方案中涉及哺乳动物核酸和氨基酸序列,预期涵盖来自其它动物的同源和/或直系同源基因和基因产物,所述其它动物包括但不限于其它哺乳动物、鱼、两栖类、爬行动物和鸟类。在优选实施方案中,基因或核酸序列是人的。

[0048] 定义

[0049] 本文所用的术语仅是为了描述具体实施方案的目的,并不旨在限制本发明。除非上下文另外清楚地指明,否则本文所用的单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“该(the)”预期包括复数形式。而且,就详述和/或权利要求书中使用术语“包括(including)”、“包括(includes)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“带有(with)”或其变化形式来说,这些术语预期以类似于术语“包含(comprising)”的方式被包括。

[0050] 术语“约”或“大约”是指在由本领域普通技术人员确定的特定数值的可接受误差范围内,其将部分地取决于如何测量或确定该数值,即,测量系统的限度。例如,按照本领域中的实践,“约”可表示在1个或多于1个标准差内。可选地,“约”可表示给定数值的达20%、优选地达10%、更优选地达5%、仍更优选地达1%的范围。可选地,尤其是有关生物系统或方法,术语可表示在数值的数量级内,优选地在5倍内,更优选地在2倍内。当在本申请和权利要求书中描述特定数值时,除非另外指明,否则应假设术语“约”表示在特定数值可接受的误差范围内。

[0051] 本文所用的术语“mRNA”是指靶基因的目前已知的mRNA转录物和可能说明的任何进一步的转录物。

[0052] “反义寡核苷酸”或“反义化合物”是指结合另一RNA或DNA(靶RNA、DNA)的RNA或DNA分子。例如,如果其是RNA寡核苷酸,其借助于RNA-RNA相互作用结合另一RNA靶并且改变靶RNA的活性。反义寡核苷酸可上调或下调特定多核苷酸的表达和/或功能。该定义意为包括

从治疗、诊断或其它观点来说有用的任何外来RNA或DNA分子。这种分子包括,例如,反义RNA或DNA分子、干扰RNA(RNAi)、微RNA、诱饵RNA分子、siRNA、酶促RNA、治疗性编辑RNA和激动剂与拮抗剂RNA、反义寡聚化合物、反义寡核苷酸、外部指导序列(EGS)寡核苷酸、可选剪接体、引物、探针以及与靶核酸的至少一部分杂交的其它寡聚化合物。因此,这些化合物可以单链、双链、部分单链或环状寡聚化合物的形式引入。

[0053] 在本发明的范畴中,术语“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)或其模拟物的寡聚物或聚合物。术语“寡核苷酸”还包括天然和/或修饰的单体或键合的线性或环状寡聚物,包括脱氧核糖核苷、核糖核苷、其取代形式和其 α -异头形式、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、硫代磷酸酯、磷酸甲酯和类似物。寡核苷酸能够经由规则方式的单体与单体间的相互作用,例如Watson-Crick型碱基配对、Hoögsteeen或逆Hoögsteeen型碱基配对或类似物特异性结合靶多核苷酸。

[0054] 寡核苷酸可以是“嵌合的”,即,包括不同区域。在本发明的范畴中,“嵌合”化合物是寡核苷酸,其包含两个或更多个化学区域,例如,DNA区域、RNA区域、PNA区域等等。每个化学区域由至少一个单体单位构成,在寡核苷酸化合物的情形中所述单体单位即为核苷酸。这些寡核苷酸通常包括至少一个区域,其中寡核苷酸经修饰以表现一种或多种期望特性。寡核苷酸的期望特性包括但不限于,例如,对核酸酶降解增加的耐受性、增加的细胞摄取和/或对靶核酸增加的结合亲和力。因此,寡核苷酸的不同区域可具有不同特性。如上所述,本发明的嵌合寡核苷酸可形成为两种或更多种寡核苷酸的混合结构、修饰的寡核苷酸、寡核苷和/或寡核苷酸类似物。

[0055] 寡核苷酸可由可被“成行”地连接(即当单体被连续地连接时,如在天然DNA中)的区域或经由间隔物连接的区域构成。预期间隔物构成区域之间的共价“桥”,在优选情形中具有不超过约100个碳原子的长度。间隔物可携带不同功能性,例如,具有正电荷或负电荷,携带特殊的核酸结合特性(嵌入剂、槽沟结合物、毒素、荧光团等等),为亲脂性的,诱导特殊的二级结构,如例如,诱导 α -螺旋的含丙氨酸的肽。

[0056] 本文所用的“SCN1A”包括所有家族成员、突变体、等位基因、片段、种类(species)、编码和非编码序列、有义和反义多核苷酸链等等。类似地,SCN2A-SCN12A包括所有突变体、等位基因、片段等。

[0057] 本文所用的词语‘I型电压门控钠通道 α 亚基’、SCN1A、FEB3、FEB3A、GEFSP2、HBSCI、NAC1、Nav1.1、SCN1、SMEI、钠通道蛋白脑I亚基 α 、钠通道蛋白型1亚基 α 、钠通道蛋白型I亚基 α 和电压门控钠通道亚基 α Nav1.1被认为在文献中是相同的,且在本申请中可交换地使用。

[0058] 本文所用的术语“对…有特异性的寡核苷酸”或“靶向…的寡核苷酸”是指具有(i)能够与靶基因的一部分形成稳定复合体,或(ii)能够与靶基因的mRNA转录物的一部分形成稳定双链体的序列的寡核苷酸。复合体和双链体的稳定性可通过理论计算和/或体外测定来确定。用于确定杂交复合体和双链体的稳定性的示例性测定在以下实施例中描述。

[0059] 本文所用的术语“靶核酸”涵盖DNA、从这种DNA转录的RNA(包括前体mRNA和mRNA)、还有从这种RNA衍生的cDNA、编码序列、非编码序列、有义或反义多核苷酸。寡聚化合物与其靶核酸的特异性杂交干扰核酸的正常功能。特异性地与靶核酸杂交的化合物对靶核酸功能的这一调节通常称为“反义”。待干扰的DNA功能包括,例如复制和转录。待干扰的RNA功能包括所有重要功能,例如,RNA向蛋白翻译位置的移位,从RNA翻译为蛋白,剪接RNA以产生一种

或多种mRNA种类以及可能由RNA参与或促进的催化活性。这种干扰靶核酸功能的总效果是调节编码的产物或寡核苷酸的表达。

[0060] RNA干扰“RNAi”由对其“靶”核酸序列具有序列特异性的同源性的双链RNA(dsRNA)分子介导。在本发明的某些实施方案中,介导物是5-25个核苷酸的“小干扰”RNA双链体(siRNA)。siRNA来源于称为Dicer的RNA酶对dsRNA的加工。siRNA双链体产物被募集到称为RISC(RNA诱导沉默复合体)的多蛋白siRNA复合体中。不希望受任何特定理论束缚,认为随后RISC被引导至靶核酸(适当地为mRNA),在那里siRNA双链体以序列特异性方式相互作用来以催化方式介导裂解。根据本发明可使用的小干扰RNA可根据本领域公知并且本领域普通技术人员熟悉的方案合成和使用。用于本发明方法的小干扰RNA适当地包括约1至约50个核苷酸(nt)。在非限制性实施方案的实例中,siRNA可包括约5至约40nt、约5至约30nt、约10至约30nt、约15至约25nt或约20-25个核苷酸。

[0061] 通过利用自动比对核酸序列并指明同一性或同源性的区域的计算机程序来便于选择适当的寡核苷酸。这种程序用来比较获得的核酸序列,例如通过搜寻数据库例如GenBank或通过对PCR产物测序。比较来自一系列物种的核酸序列允许选择在物种之间展示适当的同一性程度的核酸序列。在未被测序的基因的情形中,进行DNA印迹以允许确定靶物种与其它物种的基因之间的同一性程度。如本领域所熟知的,通过以不同的严格性程度进行DNA印迹,可能获得近似的同一性测量。这些方案允许选择展现与待控制的受治疗者中的靶核酸序列的高程度互补性和与其它物种中的相应核酸序列的较低程度互补性的寡核苷酸。本领域技术人员将认识到,在选择用于本发明的基因的适当区域方面存在相当大的自由。

[0062] “酶促RNA”是指具有酶促活性的RNA分子(Cech,(1988)J.American.Med.Assoc.260,3030-3035)。酶促核酸(核酶)通过首先结合靶RNA来作用。这种结合经由被保持在邻近用于裂解靶RNA的分子的酶促部分处的酶促核酸的靶结合部分来进行。因此,酶促核酸首先识别靶RNA然后经由碱基配对结合靶RNA,结合到正确位置时,酶促地作用以切割靶RNA。

[0063] “诱饵RNA”是指模拟配体的天然结合结构域的RNA分子。因此,诱饵RNA与天然结合靶竞争结合特定配体。例如,已经显示HIV反式激活响应(TAR)RNA的过表达可作为“诱饵”起作用并有效地结合HIV tat蛋白,从而阻止其结合HIV RNA中编码的TAR序列。这表示一个特定的实例。本领域技术人员将认识到,这仅是一个实例,利用本领域通常已知的技术可容易地产生其它实施方案。

[0064] 本文所用的术语“单体”通常是指由磷酸二酯键或其类似物连接以形成大小从数个单体单位例如约3-4个至约数百个单体单位范围的寡核苷酸的单体。磷酸二酯键合的类似物包括:硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、硒代磷酸酯、氨基磷酸酯和类似物,如下更充分地描述。

[0065] 术语“核苷酸”涵盖天然存在的核苷酸以及非天然存在的核苷酸。本领域技术人员应清楚的是,此前被认为是“非天然存在的”各种核苷酸后来已在自然界中发现。因此,“核苷酸”不仅包括已知的含嘌呤和嘧啶杂环的分子,还包括其杂环类似物和互变异构体。其它类型的核苷酸的示例性实例是含腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、嘌呤、黄嘌呤、二氨基嘌呤、8-氧代-N6-甲基腺嘌呤、7-脱氮杂黄嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤、N4,N4-桥亚乙基

胞嘧啶、N6,N6-桥亚乙基-2,6-二氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-(C3-C6)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、假异胞嘧啶、2-羟基-5-甲基-4-三唑并吡啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、肌苷的分子以及Benner等,美国专利No.5,432,272中描述的“非天然存在的”核苷酸。术语“核苷酸”预期涵盖这些实例的每一种和所有以及其类似物和互变异构体。尤其关注的核苷酸是包含腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶的那些,它们被认为是与在人的治疗和诊断应用有关的天然存在的核苷酸。核苷酸包括天然2'-脱氧糖和2'-羟基糖,例如在Kornberg和Baker,DNA Replication,第2版.(Freeman, San Francisco, 1992)中描述的,以及它们的类似物。

[0066] 提及核苷酸的“类似物”包括具有修饰的碱基部分和/或修饰的糖部分的合成的核苷酸(参见例如,通常描述于Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier&Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443, Toulmé, J. J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489: 117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery&Development, 3:203-213, Herdewin P., (2000) Antisense&Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); 2'-O, 3'-C-连接的[3.2.0]二环阿拉伯糖核苷。这种类似物包括经设计以增强结合特性,例如,双链体或三链体稳定性、特异性或类似特性的合成的核苷酸。

[0067] 本文所用的“杂交”是指寡聚化合物的大致互补链的配对。配对的一种机制包括寡聚化合物的链的互补核苷或核苷酸碱基(核苷酸)之间的氢键合,其可以是Watson-Crick、Hoögsteen或逆Hoögsteen氢键合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是经由氢键形成而配对的互补核苷酸。杂交可在不同情况下发生。

[0068] 当反义化合物与靶核酸的结合干扰靶核酸的正常功能以导致功能和/或活性的调节时,该化合物是“可特异性杂交的”,且在期望特异性结合的条件下(即,在体内测定或治疗性治疗的情形中的生理条件下和在体外测定的情形中进行测定的条件下)存在足够程度的互补性以避免反义化合物与非靶核酸序列的非特异性结合。

[0069] 本文所用的短语“严格杂交条件”或“严格条件”是指本发明化合物将与其靶序列杂交,但与最小数目的其它序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的且在不同情况中将是不一样的,并且在本发明范畴中,寡聚化合物与靶序列杂交的“严格条件”由寡聚化合物的性质和组成以及研究它们的测定决定。通常,严格杂交条件包括低浓度(<0.15M)的带无机阳离子例如Na⁺⁺或K⁺⁺的盐(即,低离子强度)、高于20°C-25°C低于寡聚化合物:靶序列复合体的T_m的温度、和存在变性剂例如甲酰胺、二甲基甲酰胺、二甲亚砜或去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)。例如,对于每种1%甲酰胺,杂交率降低1.1%。高严格杂交条件的实例是在60°C下0.1×氯化钠-柠檬酸钠缓冲液(SSC)/0.1%(w/v)SDS进行30分钟。

[0070] 本文所用的“互补”是指一条或两条寡聚链上的两个核苷酸之间准确配对的能力。例如,如果在反义化合物某一位置的核碱基能够与在靶核酸某一位置的核碱基氢键结合,所述靶核酸为DNA、RNA或寡核苷酸分子,则认为寡核苷酸与靶核酸之间的氢键结合位置是互补位置。当每个分子的足够数目的互补位置由可彼此成氢键的核苷酸占据时,寡聚化合物和另外的DNA、RNA或寡核苷酸分子是彼此互补的。因此,“可特异性杂交”和“互补”是用来表示经足够数目的核苷酸足够程度的准确配对或互补性,从而在寡聚化合物和靶核酸之间

发生稳定和特异性结合的术语。

[0071] 本领域应理解的是,寡聚化合物的序列不必与待可特异性杂交的其靶核酸的序列100%互补。而且,寡核苷酸可经一个或多个区段杂交,从而其间的或相邻区段不牵涉在杂交事件中(例如,环结构、错配或发夹结构)。本发明的寡聚化合物包括与其所靶向的靶核酸序列中靶区域具有至少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约99%序列互补性。例如,其中反义化合物的20个核苷酸中的18个与靶区域互补从而将特异性杂交的反义化合物将表示90%互补性。在这一实例中,其余非互补核苷酸可成串或散布于互补核苷酸,不必彼此连续或与互补核苷酸连续。因此,具有侧翼为与靶核酸具有完全互补性的两个区域的4(四)个非互补核苷酸的长度为18个核苷酸的反义化合物将与靶核酸具有77.8%总互补性,因此属于本发明的范围中。反义化合物与靶核酸的区域的互补性百分比可常规地利用本领域已知的BLAST程序(基本局部比对搜索工具)和PowerBLAST程序来确定。同源性、序列同一性或互补性的百分比可通过例如使用Smith和Waterman的算法(Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489)的Gap程序(Wisconsin序列分析软件包,用于Unix的版本8, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)确定,并使用默认设置。

[0072] 本文所用的术语“热熔点(T_m)”是指在指定的离子强度、pH和核酸浓度下,与靶序列互补的寡核苷酸的50%平衡地与靶序列杂交的温度。通常,严格条件将是其中盐浓度为至少约0.01至1.0M Na离子浓度(或其它盐)、pH 7.0至8.3,且对于短寡核苷酸(例如,10至50个核苷酸)温度为至少约30°C的条件。严格条件还可通过加入去稳定剂例如甲酰胺来实现。

[0073] 本文所用的“调节”是指基因表达的增加(刺激)或减少(抑制)。

[0074] 术语“变体”当在多核苷酸序列的上下文中使用时,可涵盖与野生型基因相关的多核苷酸序列。这一定义还可包括,例如,“等位”、“剪接”、“物种”或“多态”变体。剪接变体可与参考分子具有显著的同一性,但由于在mRNA加工期间外显子的可选剪接通常将具有更大数目或更小数目的多核苷酸。相应的多肽可具有另外的功能结构域或缺少结构域。物种变体是在物种之间不同的多核苷酸序列。本发明中特别有用的是野生型基因产物的变体。变体可来源于核酸序列中至少一种突变,并可产生改变的mRNA或产生结构或功能可能改变或可能不改变的多肽。任何给定的天然或重组基因可具有0种、一种或多种等位基因形式。产生变体的常见突变改变通常归因于核苷酸的天然缺失、添加或取代。在给定序列中,这些类型改变的每一种可单独发生,或组合其它类型改变发生一次或多次。

[0075] 所得的多肽通常将具有相对于彼此显著的氨基酸同一性。多态变体是给定物种的个体之间特定基因的多核苷酸序列的变化。多态变体还可涵盖“单核苷酸多态性”(SNP)或其中多核苷酸序列差异为一个碱基的单碱基突变。SNP的存在可指示,例如,具有疾病状态的倾向的某一群体,所述倾向相比于耐受性为易感性。

[0076] 衍生的多核苷酸包括经受化学修饰(例如以烷基、酰基或氨基代替氢)的核酸。衍生物例如,衍生物寡核苷酸,可包括非天然存在的部分,例如改变的糖部分或糖间键合。其中示例的有硫代磷酸酯和本领域已知的其它含硫物质。衍生的核酸还可包含标记,包括放射性核苷酸、酶、荧光剂、化学发光剂、显色剂、底物、辅因子、抑制剂、磁性粒子和类似物。

[0077] “衍生物”多肽或肽是例如通过糖基化、聚乙二醇化、磷酸化、硫酸化、还原/烷基

化、酰化、化学偶合或适度福尔马林处理修饰的多肽或肽。还可修饰衍生物以直接或间接包含可检测的标记,包括但不限于,放射性同位素、荧光和酶标记。

[0078] 本文所用的术语“动物”或“患者”意为包括,例如人、绵羊、麋鹿、鹿、长耳鹿、貂、哺乳动物、猴、马、牛、猪、山羊、犬、猫、大鼠、小鼠、鸟类、鸡、爬行动物、鱼、昆虫和蛛形纲动物。

[0079] “哺乳动物”涵盖通常处于医疗护理下的温血哺乳动物(例如,人和驯养的动物)。实例包括猫科动物、犬科动物、马科动物、牛科动物和人,以及仅仅人。

[0080] “治疗(Treating)”或“治疗(treatment)”涵盖治疗哺乳动物的疾病状态,并包括:(a)防止疾病状态在哺乳动物中发生,尤其是当所述哺乳动物倾向于疾病状态但还未被诊断为患有其的时候;(b)抑制疾病状态,例如阻止其发展;和/或(c)缓解疾病状态,例如导致疾病状态消退,直到达到期望端点。治疗还包括疾病症状的改善(例如,减轻疼痛或不适),其中所述改善可或不可直接影响疾病(例如起因、传染、表达等等)。

[0081] 本文所用的“神经病学疾病或病症”是指神经系统和/或视觉系统的任何疾病或病症。“神经病学疾病或病症”包括牵涉中枢神经系统(脑、脑干和小脑)、外周神经系统(包括颅神经)和自主神经系统(其部分位于中枢神经系统和外周神经系统两者中)的疾病或病症。神经病学病症包括但不限于,获得性癫痫样失语症;急性播散性脑脊髓炎;脑白质肾上腺萎缩症;年龄相关的黄斑变性;胼胝体发育不全;失认症;艾卡迪综合征;亚力山大病;阿尔佩斯病;交替性偏瘫;阿尔茨海默氏病;血管性痴呆;肌萎缩性侧索硬化;无脑;Angelman综合征;血管瘤病;缺氧症;失语症;失用症;蛛网膜囊肿;蛛网膜炎;阿-基氏脑畸形;动静脉畸形;阿斯佩各综合征;共济失调毛细血管扩张;注意力缺乏过动症;孤独症;自主神经失调;背痛;巴滕病;白塞病;贝耳麻痹;良性自发性睑痉挛;良性局灶性肌萎缩;良性颅内高压;宾斯旺格氏病;睑痉挛;Bloch Sulzberger综合征;臂丛损伤;脑脓肿;脑损伤;脑肿瘤(包括多形性胶质母细胞瘤);脊髓肿瘤;布朗-塞卡尔综合征;卡纳万病;腕管综合征;灼痛;中枢性疼痛综合征;脑桥中部髓鞘溶解;头部障碍;脑动脉瘤;脑动脉硬化;脑萎缩;大脑性巨人症;大脑性麻痹;夏-马-图三氏病;化疗引起的神经病和神经性疼痛;基氏脑畸形;舞蹈症;慢性炎症性脱髓鞘多神经病;慢性痛;慢性局部疼痛综合征;科-勒二氏综合征;昏迷,包括持续性植物人状态;先天性面瘫;皮质基底节变性;颅动脉炎;颅缝早闭;克雅氏病;累积性损伤错乱;柯兴综合征;巨细胞包涵体病;巨细胞病毒感染;眼舞蹈-足舞蹈综合征;丹-沃二氏综合征;Dawson病;德摩西埃氏综合征;下臂丛麻痹;痴呆;皮炎;糖尿病性神经病;弥漫性硬化症;Dravet's,家族性自主神经异常;书写困难;阅读困难;张力障碍;早期幼儿癫痫性脑病;空蝶鞍综合征;脑炎;脑膨出;脑三叉神经血管瘤病;癫痫;欧勃氏麻痹;特发性震颤;法布里氏病;法尔氏综合征;昏厥;家族性痉挛麻痹症;热性癫痫发作;菲希尔综合征;弗里德赖希氏共济失调;额颞痴呆和其它“tau病变”;高歌病;格斯特曼氏综合征;巨细胞性动脉炎;巨细胞性包涵体病;球样细胞脑白质营养不良;格-巴二氏综合征;HTLV-1相关的骨髓病;哈-斯二氏病;头部损伤;头痛;半面痉挛;遗传性痉挛性截瘫;多神经炎型遗传性共济失调;耳部带状疱疹;带状疱疹;Hirayama综合征;HIV相关的痴呆和神经病(也是AIDS的神经病学表现);前脑无裂畸形;亨廷顿氏舞蹈病和其它多谷氨酰胺重复序列病;积水性无脑畸形;脑积水;皮质醇过多症;低氧;免疫介导的脑脊髓炎;包涵体肌炎;色素失调症;婴儿植烷酸贮积病;婴儿雷夫叙姆病;婴儿痉挛;炎性肌病;颅内囊肿;颅内高压;Joubert综合征;卡恩斯-塞尔综合征;Kennedy病;金斯布林纳综合征;克-费二氏综合征;克拉贝病;库-韦二氏

病;库鲁病;拉福拉病;Lambert-Eaton肌无力综合征;Landau-Kleffner综合征;侧髓(瓦伦伯格氏)综合征;学习障碍;利氏病;Lennox-Gustaut综合征;莱-蔡二氏综合征;脑白质病变;路易体痴呆;无脑回症;闭锁综合征;Lou Gehrig病(即,运动神经元病或肌萎缩性侧索硬化);椎间盘退变;莱姆病-神经病学后遗症;Machado-Joseph病;巨头;巨脑;梅-罗二氏综合征;美尼尔症;脑膜炎;门克斯病;异染性脑白质营养不良;头小畸形;偏头痛;Miller Fisher综合征;小中风;线粒体肌病;默比厄斯氏综合征;单肢肌萎缩;运动神经元病;Moyamoya病;粘多糖贮积症;多发梗塞性痴呆;多灶性运动神经病;多发性硬化和其它脱髓鞘病症;伴有体位性低血压的多系统萎缩症;肌肉萎缩症;重症肌无力;脑脱髓鞘弥散性硬化;婴儿肌阵挛性脑病;肌阵挛;肌病;先天性肌强直;嗜睡病;神经纤维瘤病;抗精神病药的恶性综合征;AIDS的神经病学表现;狼疮的神经病学后遗症;神经性肌强直;神经元蜡样脂褐质沉积症;神经元移行异常;尼-皮二氏病;O'Sullivan-McLeod综合征;枕神经痛;隐性脊柱神经管闭合不全序列征;大田原综合征;橄榄体脑桥小脑萎缩;眼阵挛-肌阵挛;视神经炎;直立性低血压;过度使用综合征;感觉异常;神经变性疾病或病症(帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、痴呆、多发性硬化和与神经元细胞死亡相关的其它疾病和病症);先天性肌强直病;副肿瘤性疾病;突发性癫痫;帕-罗二氏综合征;佩-梅氏病;周期性麻痹;外周神经病;痛性神经病和神经性疼痛;持续性植物人状态;全身性发育迟缓;光喷嚏反射;植烷酸贮积病;皮克氏病;神经挟捏;垂体肿瘤;多肌炎;孔洞脑;小儿麻痹症后期综合征;带状疱疹后神经痛;感染后脑脊髓炎;体位性低血压;帕-魏二氏综合征;原发性脊髓侧索硬化;朊病毒病;进行性面偏侧萎缩症;进行性多灶性白质脑病;进行性硬化性灰质萎缩;进行性核上性麻痹;假性脑瘤;Ramsay-Hunt综合征(I型和II型);Rasmussen脑炎;反射性交感神经营养不良综合征;雷夫叙姆病;重复性运动损伤;重复性压力损伤;多动腿综合征;逆转录病毒相关的脊髓病;Rett综合征;雷依氏综合征;圣维特斯舞蹈病;桑德霍夫病;谢耳德氏病;脑裂;视隔发育不全;摇晃婴儿综合征;带状疱疹;希-德二氏综合征;斯耶格伦氏综合征;睡眠窒息;Soto综合征;僵直;脊柱裂;脊髓损伤;脊髓肿瘤;脊髓性肌萎缩;僵人综合征;中风;斯特奇-韦伯综合征;亚急性硬化全脑炎;动脉硬化性皮层下脑病;西德纳姆舞蹈;晕厥;脊髓空洞症;迟发性运动障碍;泰-萨二氏病;颞动脉炎;脊髓拴系综合征;肌强直性白内障;胸部出口综合征;三叉神经痛;托德氏麻痹;图雷特综合征;暂时性缺血性发作;传染性海绵状脑病;横贯性脊髓炎;外伤性脑损伤;震颤;三叉神经痛;热带痉挛性轻截瘫;结节性脑硬化;血管性痴呆(多发梗塞性痴呆);血管炎(包括颞动脉炎);希-林二氏病;瓦伦伯格氏综合征;韦-霍二氏病;韦斯特综合征;鞭抽式损伤(whiplash);威廉斯综合征;Wildon病和泽韦格综合征、以及本文所述的其它神经病学病症。

[0082] 心血管疾病或病症包括可导致缺血或由心脏再灌注引起的那些病症。实例包括但不限于,动脉硬化、冠状动脉病、肉芽肿性心肌炎、慢性心肌炎(非肉芽肿性)、原发性肥大型心肌病、外周动脉病(PAD)、周围血管疾病、静脉血栓栓塞、肺栓塞、中风、心绞痛、心肌梗塞、心搏停止造成的心血管组织损伤、心脏搭桥造成的心血管组织损伤、心源性休克和本领域技术人员已知的相关疾患或包括心脏或脉管系统的功能障碍或组织损伤的相关疾患,尤其是但不限于,SCNA活化相关的组织损伤。CVS疾病包括但不限于,动脉硬化、肉芽肿性心肌炎、心肌梗塞、瓣膜性心脏病继发性心肌纤维化、无梗塞的心肌纤维化、原发性肥大性心肌

病和慢性心肌炎(非肉芽肿性)。

[0083] 与钠通道功能障碍相关的疾病或病症的实例包括但不限于恶性高热、肌无力、周期性共济失调、神经病性和炎症性疼痛、阿尔茨海默氏病、帕金森病、精神分裂症、过度惊骇、肌强直例如低血糖和血糖过低的周期性瘫痪、先天性副肌强直和钾加重性肌强直以及心律失常例如长QT综合征。

[0084] 多核苷酸和寡核苷酸组合物和分子

[0085] 靶:在一个实施方案中,靶包括电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的核酸序列,包括但不限于SCNA相关的有义和/或反义的非编码和/或编码序列。

[0086] 电压敏感性离子通道是为细胞兴奋性和通过离子生成性膜电位传输信息的能力提供基础的一类跨膜蛋白。响应于膜电位的变化,这些分子介导通过细胞膜中的选择性通道的快速离子通量。如果通道密度足够高,再生性去极化产生,其称为动作电位。

[0087] 电压门控钠通道在大多数电可兴奋性细胞(包括神经元、心细胞和肌肉)中负责动作电位的产生和传导。电活性通过膜的去极化触发,其打开对钠离子具有高选择性的穿过膜的通道。然后通过电化学梯度细胞内驱使离子穿过开放通道。尽管不同组织中基于钠的动作电位是类似的,但是电生理学研究已证明,存在多个结构上且功能上不同的钠通道,并且编码钠通道的很多基因已被克隆。SCNA基因属于电压门控钠通道的基因家族。

[0088] 电压门控钠通道可根据Goldin等人(2000)Neuron 28:365-368中概述的标准化命名法形式来命名。根据该系统,将电压门控钠通道分组成一个家族,来自该家族的九个哺乳动物同工型已被鉴定并表达。这九个同工型被给予名称Nav1.1至Nav1.9。同时,各种同工型的剪接变体通过使用跟在数字后的小写字母(例如,“Nav1.1a”)来区分。

[0089] 电压门控钠通道在产生神经细胞和肌肉的动作电位中起重要的作用。 α 亚基(SCNA)是通道的主要组分,并且当在细胞中体外表达时将足以产生有效通道。进而, β -1和2亚基需要 α 亚基以给予有效通道。这些亚基的作用将用于改进通道的动力学性质,主要通过钠电流的快速失活。GEFS综合征中发现的在SCN1B基因上的突变与正常SCNB1相比,当与 α 亚基共表达时显示减少钠通道的快速失活。

[0090] 在优选的实施方案中,反义寡核苷酸用于预防或治疗与SCNA家族成员相关的疾病或病症。示例性的可用由使用反义化合物获得的干细胞再生的细胞/组织处理的I型电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)介导的疾病和病症包括:与SCNA的异常功能和/或表达相关的疾病或病症、神经学疾病或病症、抽搐、疼痛(包括慢性疼痛)、涉及钠通道功能障碍的受损电兴奋性、与钠通道功能障碍相关的疾病或病症、与电压门控钠通道 α 亚基活性失调相关的疾病或病症(例如,麻痹、高钾性周期性麻痹、先天性副肌强直、钾加重性肌强直、长Q-T综合征3、运动终板疾病、共济失调等)、由于肠神经系统功能障碍引起的胃肠道疾病(例如,大肠炎、回肠炎、炎症性肠综合征等)、心血管疾病或病症(例如,高血压、充血性心力衰竭等);涉及交感神经和副交感神经支配的泌尿生殖道的疾病或病症(例如,良性前列腺增生、阳痿);与神经肌肉系统相关的疾病或病症(例如,肌营养不良症、多发性硬化、癫痫、自闭症、偏头痛(例如,散发性和家族性偏瘫型偏头痛等)、小儿重度肌阵挛型癫痫(SMEI或Dravet's综合征)、全面性癫痫伴热性惊厥附加症(GEFS+)等)和SCNA相关性癫痫病症。

[0091] 本发明进一步涉及药物组合物,其包含靶向至少一个或多个靶的天然反义转录物的寡核苷酸中的至少一个,所述靶选自由以下组成的组:SCN1A至SCN12A基因或mRNA或其同

工型或变体。本发明进一步涉及治疗神经病学疾病或病症的方法,其包括施用靶向至少一个或多个靶的天然反义转录物的寡核苷酸,所述靶选自由以下组成的组:mRNA SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN4A、SCN5A、SCN6A、SCN7A、SCN8A、SCN9A、SCN10A、SCN11A和SCN12A或其变体。在优选的实施方案中,选择寡核苷酸上调所述SCNA家族的完全功能表达产物的表达。在优选的实施方案中,本发明的寡核苷酸上调基因的SCNXA家族的mRNA中的任何一个的转录和/或翻译以提供在需要其治疗的患者中的完全功能钠通道。在患有与电压门控钠通道的突变形式相关的疾病或病症的患者中,在优选的实施方案中用药物组合物(包含靶向电压门控钠通道 α 基因或此类基因的mRNA的天然反义转录物的寡核苷酸)的施用或治疗上调完全功能表达产物的比率比上调源自该基因的突变形式的表达产物更高。在另一个实施方案中,本发明涉及靶向至少两个SCNXA家族成员(其中X选自1-12)的至少一个天然反义转录物的寡核苷酸的组合。例如,在治疗Dravett's综合征中,寡核苷酸的组合可用于上调例如SCN1A和SCN9A的表达产物。在另一个实施方案中,可选择至少一个寡核苷酸以靶向至少两个基因的天然反义转录物,所述基因选自SCN1A至SCN12A中的任何一个。本发明的优选寡核苷酸为约5至约30个核苷酸长度并且与NAT的5至约30个核苷酸区段至少50%互补。SCNA基因或其转录产物中的任何一个的优选NAT为当由本发明的寡核苷酸靶向时干扰并且调节mRNA和/或所述mRNA的翻译产物的表达的那些NAT。在优选的实施方案中,寡核苷酸上调靶的功能蛋白的表达以治疗或缓和SCNA相关疾病。在优选的实施方案中,这种“上调”不与疾病如癌症的病因或升级相关。

[0092] SCNA基因的改变可包括或涵盖很多或所有形式的基因突变,包括基因的编码和/或非编码区域的插入、缺失、重排和/或点突变。缺失可以是整个基因或该基因的一部分。点突变可导致氨基酸置换、移码或终止密码子。点突变也可发生在SCNA基因的调控区域,例如启动子,导致mRNA的表达的损失或减少或可导致此类mRNA的不适当加工,引起稳定性或翻译效率的降低。人中的此类改变可导致各种疾病形式并且有很多描述SCNA基因的改变与例如癫痫或SMEI的相关性的出版物。此类改变可以是“新生的”或可以是遗传的。本发明并不限于治疗与SCNA基因的变化相关的疾病并且还包含SCNA相关的疾病或疾患的治疗,其中患者不具有或不一定具有SCNA基因的改变或突变。据信功能性电压门控钠通道表达产物的任何调节或上调将导致在需要其治疗的患者中相关SCNA疾病或疾患的缓和或治疗。此类缓和还可包括临床改善的至少一种可测量的标记,包括很少的癫痫发作、不太频繁的癫痫发作、不太严重的癫痫发作、很少的癫痫发作类型的进展、神经病学进展的改善或任何其他治疗益处。

[0093] 在实施方案中,将一种或多种反义寡核苷酸对SCNA的调节向需要其的患者施用以预防或治疗与正常对照相比的SCNA异常表达、功能、活性相关的任何疾病或病症。

[0094] 在实施方案中,寡核苷酸是对SCNA多核苷酸有特异性,该多核苷酸包括但不限于非编码区。SCNA靶包括SCNA的变体;SCNA的突变体,包括SNP;SCNA的非编码序列;等位基因、片段和类似物。优选地寡核苷酸是反义RNA分子。

[0095] 根据本发明的实施方案,靶核酸分子不限于仅SCNA多核苷酸,还延伸到SCNA的任何同种型、受体、同系物、非编码区和类似物。

[0096] 在实施方案中,寡核苷酸靶向SCNA靶的天然反义序列(与编码区和非编码区天然反义),包括但不限于,其变体、等位基因、同系物、突变体、衍生物、片段及其互补序列。优选

地寡核苷酸是反义RNA或DNA分子。

[0097] 在实施方案中,本发明的寡聚化合物还包括变体,其中在化合物中一个或多个核苷酸位置存在不同碱基。例如,如果第一个核苷酸是腺嘌呤,可产生在这一位置包含胸苷、鸟苷、胞苷或其它天然或非天然核苷酸的变体。这可在反义化合物的任何位置进行。随后利用本文所述的方法测定这些化合物以确定它们抑制靶核酸表达的能力。

[0098] 在一些实施方案中,反义化合物与靶之间的同源性、序列同一性或互补性是从约50%至约60%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约60%至约70%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约70%至约80%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约80%至约90%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是约90%、约92%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%。

[0099] 当反义化合物与靶核酸的结合干扰靶核酸的正常功能以导致活性的丧失时,该化合物是可特异性杂交的,且在期望特异性结合的条件下存在足够程度的互补性以避免反义化合物与非靶核酸序列的非特异性结合。这种条件包括,即,在体内测定或治疗性治疗的情形中的生理条件以及在体外测定中进行测定的条件。

[0100] 当反义化合物(无论是DNA、RNA、嵌合、取代的等等)与靶DNA或RNA分子的结合干扰靶DNA或RNA的正常功能以导致效用的丧失时,该化合物是可特异性杂交的,且在期望特异性结合的条件下(即,在体内测定或治疗性治疗的情形中的生理条件下以及在体外测定中进行测定的条件下)存在足够程度的互补性以避免反义化合物与非靶序列的非特异性结合。

[0101] 在实施方案中,SCNA的靶向包括但不限于,利用例如PCR、杂交等鉴定和扩展的反义序列、一种或多种如SEQ ID NO:12至28所列的序列和调节SCNA表达或功能的类似物。在一个实施方案中,与对照相比表达或功能被上调。在实施方案中,与对照相比表达或功能被下调。

[0102] 在实施方案中,寡核苷酸包括如SEQ ID NO:29至94所列的核酸序列,包括利用例如PCR、杂交等鉴定和扩展的反义序列。这些寡核苷酸可包括一种或多种修饰的核苷酸、更短或更长的片段、修饰的键和类似物。修饰的键或核苷酸间键合的实例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或类似物。在实施方案中,核苷酸包括磷衍生物。可附加于本发明的修饰的寡核苷酸中的糖或糖类似物部分的磷衍生物(或修饰的磷酸酯基团)可以是单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、磷酸烷基酯、磷酸烷烃酯、硫代磷酸酯和类似物。上述磷酸酯类似物的制备和将其向核苷酸、修饰的核苷酸和寡核苷酸的并入本身是已知的,不必在此描述。

[0103] 反义的特异性和灵敏性还由本领域技术人员利用以用于治疗用途。反义寡核苷酸已在动物和人的疾病状态的治疗中用作治疗部分。反义寡核苷酸已经安全且有效地施用于人,目前正在进行许多临床试验。因此已经确定,寡核苷酸可以有用的治疗形态,可被配置以用于治疗细胞、组织和动物(尤其是人)的治疗方案。

[0104] 在本发明的实施方案中,寡聚反义化合物,尤其是寡核苷酸,结合靶核酸分子并调节靶基因编码的分子的表达和/或功能。待干扰的DNA的功能包括,例如复制和转录。待干扰的RNA功能包括所有重要功能,例如RNA向蛋白翻译位置的移位,从RNA翻译为蛋白,剪接RNA以产生一种或多种mRNA种类以及可由RNA参与或促进的催化活性。取决于期望的功能,功能可被上调或抑制。

[0105] 反义化合物包括反义寡聚化合物、反义寡核苷酸、外部指导序列 (EGS) 寡核苷酸、可选剪接体、引物、探针以及与靶核酸的至少一部分杂交的其它寡聚化合物。因此,这些化合物可以单链、双链、部分单链或环状寡聚化合物的形式引入。

[0106] 在本发明范畴中,将反义化合物靶向特定核酸分子可以是多步骤的过程。该过程通常开始于鉴定待调节其功能的靶核酸。这一靶核酸可以是,例如,其表达与特定病症或疾病状态相关的细胞基因(或从基因转录的mRNA)或来自感染物的核酸分子。在本发明中,靶核酸编码电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)。

[0107] 靶向过程通常还包括确定靶核酸中发生反义相互作用从而产生期望作用例如调节表达的至少一个靶区域、区段或位置。在本发明范畴中,术语“区域”定义为具有至少一种可鉴定结构、功能或特征的靶核酸的一部分。靶核酸区域中是区段。“区段”定义为靶核酸中较小区域或区域的亚部分。本发明中使用的“位置”定义为靶核酸中的位置。

[0108] 在实施方案中,反义寡核苷酸结合电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的天然反义序列并调节SCNA(SEQ ID NO:1至11)的表达和/或功能。天然反义序列的实例包括SEQ ID NO:12至28。反义寡核苷酸的实例包括SEQ ID NO:29至94。

[0109] 在实施方案中,反义寡核苷酸结合电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)多核苷酸的一个或多个区并调节SCNA的表达和/或功能。区段包括SCNA的有义或反义多核苷酸的至少五个连续核苷酸。

[0110] 在实施方案中,反义寡核苷酸是对SCNA的天然反义序列有特异性,其中寡核苷酸对SCNA的天然反义序列的结合调节SCNA的表达和/或功能。

[0111] 在实施方案中,寡核苷酸化合物包括如SEQ ID NO:29至94所列的序列、利用例如PCR、杂交等鉴定和扩展的反义序列。这些寡核苷酸可包括一种或多种修饰的核苷酸、更短或更长的片段、修饰的键和类似物。修饰的键或核苷酸间键合的实例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或类似物。在实施方案中,核苷酸包括磷衍生物。可附加于本发明的修饰的寡核苷酸中的糖或糖类似物部分的磷衍生物(或修饰的磷酸酯基团)可以是单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、磷酸烷基酯、磷酸烷基酯、硫代磷酸酯和类似物。上述磷酸酯类似物的制备和将其向核苷酸、修饰的核苷酸和寡核苷酸的并入本身是已知的,不必在此描述。

[0112] 如本领域已知的,因为翻译起始密码子通常是5'-AUG(在转录的mRNA分子中;在相应DNA分子中是5'-ATG),翻译起始密码子也称为“AUG密码子”、“起始密码子”或“AUG起始密码子”。少数基因具有具有RNA序列5'-GUG、5'-UUG或5'-CUG的翻译起始密码子;且5'-AUA、5'-ACG和5'-CUG已显示在体内起作用。因此,术语“翻译起始密码子”和“起始密码子”可涵盖许多密码子序列,尽管每种情形中的起始氨基酸通常是甲硫氨酸(真核细胞中)或甲酰甲硫氨酸(原核细胞中)。真核基因和原核基因可具有两个或更多个替代性起始密码子,其中的任何一个可在特定细胞类型或组织中或在特定条件设置下优先地用于翻译起始。在本发明范畴中,“起始密码子”和“翻译起始密码子”是指体内用于起始从编码电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的基因转录的mRNA的翻译的一种或多种密码子,而不论这种密码子的序列。基因的翻译终止密码子(或“终止密码子”)可具有三种序列即5'-UAA、5'-UAG和5'-UGA之一(相应的DNA序列分别是5'-TAA、5'-TAG和5'-TGA)。

[0113] 术语“起始密码子区”和“翻译起始密码子区”是指这种mRNA或基因的一部分,涵盖以任一方向(即,5'或3')从翻译起始密码子的约25至约50个连续核苷酸。类似地,术语“终

止密码子区”和“翻译终止密码子区”是指这种mRNA或基因的一部分,涵盖以任一方向(即,5'或3')从翻译终止密码子的约25至约50个连续核苷酸。因此,“起始密码子区”(或“翻译起始密码子区”)和“终止密码子区”(或“翻译终止密码子区”)都是可用本发明的反义化合物有效地靶向的区域。

[0114] 本领域已知开放读码框(ORF)或“编码区”是指翻译起始密码子与翻译终止密码子之间的区域,也是可被有效地靶向的区域。在本发明范畴中,靶向的区域是涵盖基因开放读码框(ORF)的翻译起始或终止密码子的基因内区域。

[0115] 另一靶区域包括5'非翻译区(5'UTR),本领域已知是指mRNA以5'方向从翻译起始密码子的部分,因此包括mRNA的5'帽位置与翻译起始密码子之间的核苷酸(或基因上相应的核苷酸)。又一靶区域包括3'非翻译区(3'UTR),本领域已知是指mRNA以3'方向从翻译终止密码子的部分,因此包括mRNA的翻译终止密码子与3'端之间的核苷酸(或基因上相应的核苷酸)。mRNA的5'帽位置包括经由5'-5'三磷酸酯键合与mRNA的最5'残基连接的N7-甲基化鸟苷残基。认为mRNA的5'帽区域包括5'帽结构本身以及与帽位置相邻的前50个核苷酸。本发明的另一靶区域是5'帽区域。

[0116] 尽管一些真核mRNA转录物被直接翻译,但是许多包含一个或多个称为“内含子”的区域,在翻译前从转录物切除。其余(因此被翻译的)区域称为“外显子”,被剪接在一起以形成连续的mRNA序列。在一个实施方案中,靶向剪接位置,即,内含子-外显子结点或外显子-内含子结点在其中疾病中牵涉异常剪接的情形或其中疾病中牵涉特定剪接产物的过度产生的情形尤其有用。由于重排或缺失的异常融合结点是靶位置的另一形式。由剪接来自不同基因来源的两个(或更多个)mRNA的过程产生的mRNA转录物称为“融合转录物”。利用靶向例如DNA或前体mRNA的反义化合物可有效地靶向内含子。

[0117] 在实施方案中,反义寡核苷酸结合靶多核苷酸的编码区和/或非编码区并调节靶分子的表达和/或功能。

[0118] 在实施方案中,反义寡核苷酸结合天然反义多核苷酸并调节靶分子的表达和/或功能。

[0119] 在实施方案中,反义寡核苷酸结合有义多核苷酸并调节靶分子的表达和/或功能。

[0120] 可从DNA的相同基因组区域产生可选RNA转录物。这些可选转录物通常称为“变体”。更具体地,“前体mRNA变体”是从相同基因组DNA产生的转录物,在其起始或终止位置与从相同基因组DNA产生的其它转录物不同,并包含内含子序列和外显子序列两者。

[0121] 在剪接期间切除一个或多个外显子或内含子区域或其部分后,前体mRNA变体产生更小的“mRNA变体”。因此,mRNA变体是加工的前体mRNA变体,且每个独特的前体mRNA变体必定因为剪接而产生独特的mRNA变体。这些mRNA变体还称为“可选剪接变体”。如果不进行前体mRNA变体的剪接,则前体mRNA变体与mRNA变体相同。

[0122] 变体可经由使用可选信号产生以起始或终止转录。前体mRNA和mRNA可具有多于一个起始密码子或终止密码子。来源于使用可选起始密码子的前体mRNA或mRNA的变体称为该前体mRNA或mRNA的“可选起始变体”。使用可选终止密码子的那些转录物称为该前体mRNA或mRNA的“可选终止变体”。一种特定类型的可选终止变体是“聚腺苷酸变体”,其中产生的多个转录物由“聚腺苷酸终止信号”之一被转录机制可选选择所致,从而产生在独特聚腺苷酸位点终止的转录物。在本发明范畴中,本文所述的变体类型也是靶核酸的实施方案。

[0123] 靶核酸上与反义化合物杂交的位置定义为活性反义化合物靶向的靶区域的至少5-核苷酸长的部分。

[0124] 尽管本文列出了某些示例性靶区段的具体序列,但是本领域技术人员将理解这些用于阐释和描述于本发明范围中的具体实施方案。本领域普通技术人员考虑到本公开内容可容易地鉴定另外的靶区段。

[0125] 认为包括选自示例性优选的靶区段中的至少五(5)个连续核苷酸的段的长度为5-100个核苷酸的靶区段也适合于靶向。

[0126] 靶区段可包括包括从示例性优选的靶区段之一的5'-末端的至少5个连续核苷酸的DNA或RNA序列(其余核苷酸为从靶区段5'-末端的紧邻上游开始的相同DNA或RNA的连续段并延伸直到DNA或RNA包含约5至约100个核苷酸)。类似地优选的靶区段由包括从示例性优选的靶区段之一的3'-末端的至少5个连续核苷酸的DNA或RNA序列代表(其余核苷酸为从靶区段3'-末端的紧邻下游开始的相同DNA或RNA的连续段并延伸直到DNA或RNA包含约5至约100个核苷酸)。借助本文所示例的靶区段的本领域技术人员将能够鉴定另外的优选的靶区段而不需过度试验。

[0127] 已经鉴定出一种或多种靶区域、区段或位置后,选择与靶足够地互补,即,充分良好并以足够特异性杂交的反义化合物以获得期望作用。

[0128] 在本发明的实施方案中,寡核苷酸结合特定靶的反义链。寡核苷酸长度为至少5个核苷酸并可合成以使每个寡核苷酸靶向重叠序列,从而寡核苷酸被合成以覆盖靶多核苷酸的整个长度。靶还包括编码区以及非编码区。

[0129] 在一个实施方案中,将反义寡核苷酸靶向特定核酸是优选的。将反义化合物靶向特定核酸是多步骤的过程。该过程通常开始于鉴定待调节其功能的核酸序列。这一核酸序列可以是,例如,其表达与特定病症或疾病状态相关的细胞基因(或从基因转录的mRNA)、或非编码多核苷酸,例如非编码RNA(ncRNA)。

[0130] RNA可分为(1)信使RNA(mRNA),其被翻译为蛋白,和(2)非蛋白编码RNA(ncRNA)。ncRNA包括微RNA、反义转录物和包含高密度终止密码子和缺少任何广泛的“开放读码框”的其它转录单位(TU)。许多ncRNA表现为从蛋白-编码基因座的3'非翻译区(3'UTR)中的起始位点开始。ncRNA通常是罕见的,已被FANTOM财团测序的ncRNA的至少一半似乎不是多腺苷酸化的。出于明显的原因,大多数研究者集中于被加工并输出到细胞质的多腺苷酸化mRNA。最近,显示非多腺苷酸化的核RNA的组可能是非常大的,且许多这样的转录物来源于所谓的基因间区。ncRNA可调节基因表达的机制是通过与靶转录物的碱基配对。通过碱基配对起作用的RNA可分为(1)顺式编码的RNA,其在它们所作用的RNA的相同遗传位置但在相对链上被编码,因此与其靶展示极佳的互补性,和(2)反式编码的RNA,其在不同于它们所作用的RNA的染色体位置被编码,通常不与其靶展示极佳的碱基-配对可能。

[0131] 不希望受限于理论,反义多核苷酸被本文所述的反义寡核苷酸的扰动可改变相应义信使RNA的表达。然而,这一调节可以是不一致的(反义敲低导致信使RNA升高)或一致的(反义敲低导致相伴的信使RNA减少)。在这些情形中,反义寡核苷酸可靶向于反义转录物的重叠或非重叠部分,导致其敲低或隔离。编码以及非编码反义可以相同方式靶向,任一种类能够调节相应的有义转录物-以一致的或不一致的方式。鉴定针对靶使用的新寡核苷酸中采用的策略可基于反义RNA转录物被反义寡核苷酸的敲低或调节期望靶的任何其它手

段。

[0132] 策略1:在不一致调节的情形下,敲低反义转录物升高常规(有义)基因的表达。如果后者基因编码已知或推测的药物靶,则其反义对应物的敲低能够可设想地模拟受体激动剂或酶刺激剂的作用。

[0133] 策略2:在一致调节的情形下,人们可以协同地敲低反义转录物和有义转录物两者,从而实现常规(有义)基因表达的协同减少。例如,如果反义寡核苷酸用来实现敲低,则这一策略可用来施加靶向有义转录物的一种反义寡核苷酸和靶向相应反义转录物的另一反义寡核苷酸,或同时靶向重叠的有义转录物和反义转录物的单个有力地对称的反义寡核苷酸。

[0134] 根据本发明,反义化合物包括反义寡核苷酸、核酶、外部指导序列(EGS)寡核苷酸、siRNA化合物、单链或双链RNA干扰(RNAi)化合物例如siRNA化合物以及杂交于靶核酸的至少一部分并调节其功能的其它寡聚化合物。因此,它们可以是DNA、RNA、DNA-样、RNA-样或其混合物,或可以是一种或多种这些的模拟物。这些化合物可以是单链、双链、环状或发夹寡聚化合物,并可包含结构元件,例如内部凸出或末端凸出、错配或环。常规线性地制备反义化合物,但可被连接或以其它方式制备为环状和/或分支的。反义化合物可包括构建体,例如,两条链杂交以形成完全或部分双链的化合物或者具有足够自互补性的单链以允许杂交和形成完全或部分双链的化合物。两条链可在内部被连接,留下游离的3'或5'末端,或可被连接以形成连续的发夹结构或环。发夹结构可包含在5'或3'末端的突出,产生单链特征的延伸段。双链化合物任选地可包括在末端的突出。进一步的修饰可包括附加于末端之一、所选的核苷酸位置、糖位置或核苷间键合之一的缀合物基团。可选地,两条链可经由非核酸部分或接头基团连接。当仅由一条链形成时,dsRNA可采取自互补发夹型分子的形式,其与自身对折以形成双链体。因此,dsRNA可以是完全或部分双链的。基因表达的特异性调节可通过在转基因细胞系中稳定表达dsRNA发夹来实现,然而,在一些实施方案中,基因表达或功能被上调。当由两条链或采取与自身对折以形成双链体的自互补发夹型分子形式的单链形成时,两条链(或单链的双链体形成区)是以Watson-Crick方式碱基配对的互补RNA链。

[0135] 被引入系统中后,本发明的化合物可引发一种或多种酶或结构蛋白的作用以实现靶核酸的裂解或其它修饰,或可经由基于占位性的机制作用。通常,核酸(包括寡核苷酸)可描述为“DNA-样”(即,通常具有一个或多个2'-脱氧糖,且通常具有T而不是U碱基)或“RNA-样”(即,通常具有一个或多个2'-羟基或2'-修饰的糖,且通常具有U而不是T碱基)。核酸螺旋可采用多于一种类型的结构,最通常是A-和B-形式。通常认为,具有B-形式-样结构的寡核苷酸是“DNA-样”,且具有A-形式样结构的是“RNA-样”。在一些(嵌合)实施方案中,反义化合物可包含A-形式区域和B-形式区域两者。

[0136] 在实施方案中,期望寡核苷酸或反义化合物包括以下至少一种:反义RNA、反义DNA、嵌合反义寡核苷酸、包括修饰的键合的反义寡核苷酸、干扰RNA(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、微干扰RNA(miRNA)、时序调节小RNA(stRNA)或短发夹RNA(shRNA)、小RNA-诱导的基因活化(RNAa)、小活化RNA(saRNA)或其组合。

[0137] dsRNA还可活化基因表达,这是已被称为“小RNA-诱导的基因活化”或RNAa的机制。dsRNA靶向基因启动子诱导相关基因的有效的转录活化。RNAa在人细胞中利用合成的dsRNA证实,称为“小活化RNA”(saRNA)。目前未知RNAa在其它生物体中是否是保守的。

[0138] 已发现小双链RNA(dsRNA),例如小干扰RNA(siRNA)和微RNA(miRNA)是称为RNA干扰(RNAi)的进化保守机制的触发物。RNAi不变性经由重建染色质导致基因沉默,从而阻遏转录、降解互补mRNA或阻断蛋白翻译。然而在以下实施例部分详细描述的情况中,寡核苷酸显示增加电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)多核苷酸和其编码的产物的表达和/或功能。dsRNA还可作为小活化RNA(saRNA)作用。不希望受理论束缚,通过靶向基因启动子中的序列,saRNA将以称为dsRNA-诱导的转录活化(RNAa)的现象诱导靶基因表达。

[0139] 在进一步的实施方案中,本文鉴定的“优选的靶区段”可用于筛选调节电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)多核苷酸表达的另外的化合物。“调节剂”是减少或增加编码SCNA的核酸分子表达的那些化合物,且包括与优选的靶区段互补的至少5-核苷酸部分。筛选方法包括以下步骤:将编码SCNA的有义或天然反义多核苷酸的核酸分子的优选的靶区段与一种或多种候选调节剂接触,并选择减少或增加编码SCNA多核苷酸的核酸分子(例如SEQ ID NO:29至94)的表达的一种或多种候选调节剂。显示一种或多种候选调节剂能够调节(例如,减少或增加)编码SCNA多核苷酸的核酸分子的表达后,随后调节剂可用于SCNA多核苷酸功能的进一步研究性研究,或用作根据本发明的研究剂、诊断剂或治疗剂。

[0140] 靶向天然反义序列优选地调节靶基因的功能。例如,SCNA基因(例如,登录号NM_001165963、NM_021007、NM_006922、NM_000334、NM_198056、NM_002976、NM_014191、NM_002977、NM_006514、NM_014139、AF109737)。在实施方案中,靶是SCNA基因的反义多核苷酸。在实施方案中,反义寡核苷酸靶向SCNA多核苷酸(例如,登录号NM_001165963、NM_021007、NM_006922、NM_000334、NM_198056、NM_002976、NM_014191、NM_002977、NM_006514、NM_014139、AF109737)的有义和/或天然反义序列、变体、等位基因、同种型、同系物、突变体、衍生物、片段及其互补序列。优选地寡核苷酸是反义分子且靶包括反义和/或有义SCNA多核苷酸的编码区和非编码区。

[0141] 本发明优选的靶区段还可与本发明的其各自的互补反义化合物组合以形成稳定的双链(双链体)寡核苷酸。

[0142] 在本领域中,这种双链寡核苷酸部分已显示经由反义机制调节靶表达和调节翻译以及RNA加工。而且,可对双链部分进行化学修饰。例如,这种双链部分已经显示通过双链体的反义链与靶经典杂交,从而触发靶的酶促降解来抑制靶。

[0143] 在实施方案中,反义寡核苷酸靶向电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)多核苷酸(例如,登录号NM_001165963、NM_021007、NM_006922、NM_000334、NM_198056、NM_002976、NM_014191、NM_002977、NM_006514、NM_014139、AF109737)、变体、等位基因、同种型、同系物、突变体、衍生物、片段及其互补序列。优选地寡核苷酸是反义分子。

[0144] 根据本发明的实施方案,靶核酸分子不限于仅SCNA,还延伸到SCNA分子的同种型、受体、同系物和类似物的任一种。

[0145] 在实施方案中,寡核苷酸靶向SCNA多核苷酸的天然反义序列,例如,如SEQ ID NO:12至28所列的多核苷酸,和任何变体、等位基因、同系物、突变体、衍生物、片段及其互补序列。反义寡核苷酸的实例列在SEQ ID NO:29至94。

[0146] 在一个实施方案中,寡核苷酸与SCNA反义的核酸序列互补或结合,包括但不限于SCNA多核苷酸相关的非编码有义和/或反义序列,并调节SCNA分子的表达和/或功能。

[0147] 在实施方案中,寡核苷酸与如SEQ ID NO:12至28所列的SCNA天然反义的核酸序列

互补或结合,并调节SCNA分子的表达和/或功能。

[0148] 在实施方案中,寡核苷酸包括SEQ ID NO:29至94的至少5个连续核苷酸的序列,并调节SCNA分子的表达和/或功能。

[0149] 多核苷酸靶包括SCNA,包括其家族成员、SCNA的变体;SCNA的突变体,包括SNP;SCNA的非编码序列;SCNA的等位基因;物种变体、片段和类似物。优选地寡核苷酸是反义分子。

[0150] 在实施方案中,靶向SCNA多核苷酸的寡核苷酸包括:反义RNA、干扰RNA (RNAi)、短干扰RNA (siRNA);微干扰RNA (miRNA);时序调节小RNA (stRNA);或短发夹RNA (shRNA);小RNA诱导的基因活化 (RNAa);或小活化RNA (saRNA)。

[0151] 在实施方案中,靶向电压门控钠通道 α 亚基 (SCNA) 多核苷酸 (例如SEQ ID NO:1至11) 调节这些靶的表达或功能。在一个实施方案中,与对照相比表达或功能被上调。在实施方案中,与对照相比表达或功能被下调。在进一步的实施方案中,靶向天然翻译转录物 (例如SEQ ID NO:12至28) 和此类靶多核苷酸的任何其他靶NAT导致所述靶mRNA和相应蛋白的上调。

[0152] 在实施方案中,反义化合物包括如SEQ ID NO:29至94所列的序列。这些寡核苷酸可包括一种或多种修饰的核苷酸、更短或更长片段、修饰的键和类似物。

[0153] 在实施方案中,SEQ ID NO:29至94包括一种或多种LNA核苷酸。表1示出可用于本发明方法中的示例性反义寡核苷酸。

[0154] 表1:

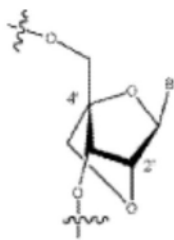
序列 ID	反义序列名称	序列
Seq_29	CUR-1462	mC*mC*mU*mA*mU*mC*T*T*T*C*C*C*C*C*C*T*mA*mC*mC*mU*mU*mU
Seq_30	CUR-1624	T*C*G*G*T*G*T*C*A*C*T*C*T*G*G*A*C*A*G*T
Seq_31	CUR-1625	T*G*C*A*A*C*T*G*T*G*G*A*G*C*T*G*T*C*T
Seq_32	CUR-1626	G*T*A*G*C*A*C*T*G*T*G*G*A*A*C*A*T*C*G*G*C
Seq_33	CUR-1627	G*T*A*G*A*A*G*A*A*C*A*G*C*C*G*T*A*G*T*G
Seq_34	CUR-1628	G*T*G*G*T*C*T*C*T*G*C*A*T*T*T*C*T*G*T*C*A
Seq_35	CUR-1629	G*T*G*G*T*A*T*A*G*G*A*A*C*T*G*G*C*A*G*C*A
Seq_36	CUR-1630	G*T*C*C*A*A*T*C*A*A*T*A*A*C*A*G*C*A*G*A*A
Seq_37	CUR-1631	G*T*G*A*C*T*G*T*A*C*C*A*A*T*T*G*C*T*G*T
Seq_38	CUR-1632	A*C*T*T*C*T*T*T*C*C*A*A*C*T*C*C*T*T*C*C*T
Seq_39	CUR-1633	G*A*T*G*T*C*C*C*T*T*T*C*C*T*G*C*G*T*T*G*T
Seq_40	CUR-1634	T*G*T*G*G*A*T*G*A*C*T*G*G*G*T*G*T*C*T*C*T*C
Seq_41	CUR-1635	T*C*C*C*A*G*T*G*A*C*T*C*C*G*A*T*G*C*T
Seq_42	CUR-1636	A*G*T*C*T*C*A*G*T*T*G*T*C*A*G*T*A*C*T*C
Seq_43	CUR-1738	G*T*T*A*T*T*G*A*A*T*G*C*C*C*T*G*G*T*G*T
Seq_44	CUR-1739	T*C*G*G*A*T*C*A*A*T*C*A*G*G*G*T*T*G*T*A*G*T
Seq_45	CUR-1740	G*T*G*G*T*A*T*A*G*G*A*A*C*T*G*G*C*A*G*C*A
Seq_46	CUR-1741	T*C*T*G*C*T*T*C*T*T*C*C*C*T*A*C*A*T*T*G*G
Seq_47	CUR-1742	G*T*A*A*T*C*T*G*C*T*C*T*T*T*C*C*C*T*A*A*C
Seq_48	CUR-1743	G*G*G*A*G*A*A*A*C*T*T*G*A*G*A*G*C*A*A*A*G
Seq_49	CUR-1744	G*C*C*A*G*T*C*A*A*A*A*A*T*T*C*A*G*A*T*C*A
Seq_50	CUR-1762	+G*+T*A*T*A*G*G*A*A*C*T*G*+G*+C*+A
Seq_51	CUR-1763	+G*+T*G*G*T*A*+T*A*G*G*A*A*+C*+T*+G
Seq_52	CUR-1764	mG*mU*mG*G*mU*A*mU*A*G*G*A*A*mC*T*G*G*mC*A*mG*mC*mA
Seq_53	CUR-1766	+A*+G*A*A*C*T*T*G*A*G*A*G*+C*+A*+A
Seq_54	CUR-1767	mG*mG*mG*A*G*A*A*mC*T*mU*G*A*G*A*G*mC*A*A*mC*mA*mG
Seq_55	CUR-1768	+G*+C*A*G*+T*C*A*+C*A*A*A*+T*+T*+C
Seq_56	CUR-1769	+C*+A*A*A*A*T*T*C*A*G*A*+T*+C*+A

[0155]

Seq_57	CUR-1770	mG*mC*mC*A*G*T*mC*A*C*A*A*mU*T*mC*A*G*A*mU*mC*mA
Seq_58	CUR-1798	rArUrUrArArArCrArCrGrArArGrArCrUrUrArGrUrArGrUrG
Seq_59	CUR-1799	rUrCrArCrArArUrUrCrArGrArUrCrArCrCrArUrCrUrCrUrA
Seq_60	CUR-1836	+G*+T*GGTA+T*AGGAA+C*+T*+G
Seq_61	CUR-1837	mG*mU*mG*GmU*AmU*AGGAAmC*TGmC*AmG*mC*mA
Seq_62	CUR-1838	+G*+C*AGT*C*A+C*AAA+T*+T*+C
Seq_63	CUR-1839	+C*+A*CAAATTCAGA+T*+C*+A
Seq_64	CUR-1891	mG*mG*mU*A*mU*A*G*G*mA*A*A*C*mU*G*G*mC*A*G*mC*A*G*mU*G*mU*mU*mG
Seq_65	CUR-1892	mU*mG*mG*T*A*mU*A*G*mG*A*A*mC*T*G*G*mC*A*G*C*mA*mG*mU
Seq_66	CUR-1895	mG*G*T*A*mU*A*G*G*A*A*mC*T*G*G*mC*A*G*mC*A*G*T*G*T*T*mG
Seq_67	CUR-1896	mA*mA*G*mC*G*G*mU*A*T*A*G*G*A*A*mC*T*G*G*mC*A*G*mC*A*mG
Seq_68	CUR-1900	G*T*G*G*C*A*T*A*G*G*G*A*A*C*G*G*G*C*A*G*C*A
Seq_69	CUR-1901	mG*mU*mG*G*mC*A*mU*A*G*mG*G*A*mC*G*G*mC*A*mG*mC*mA
Seq_70	CUR-1916	mG*mA*mG*C*C*A*G*mU*C*A*mC*A*A*A*mU*T*C*A*G*mA*T*C*A*mC*mC*mC
Seq_71	CUR-1917	mA*A*mU*G*G*G*A*G*A*A*mC*mU*mU*G*A*G*A*G*mC*mA*mA
Seq_72	CUR-1918	mA*mC*mA*mA*mG*mU*G*G*C*A*T*A*G*G*G*A*A*G*G*mG*mC*mA*mG*mC*mA
Seq_73	CUR-1919	mA*mC*A*A*G*mU*G*G*mC*A*T*A*mG*G*G*A*mC*G*G*G*mC*A*G*mC*mA
Seq_74	CUR-1920	mA*A*G*mU*G*G*mC*A*mU*A*G*mG*G*A*mC*G*G*G*mC*A*G*mC*A*G*mU
Seq_75	CUR-1921	mA*mA*mG*mU*mG*G*C*A*T*A*G*G*G*A*G*G*G*C*A*mG*mC*mA*mG*mU
Seq_76	CUR-1922	G*T*G*ACTGTGCCATTG+C*T*G
Seq_77	CUR-1923	G*C*C*ACTT*GATGAT*CTA*A*A*C
Seq_78	CUR-1924	G*T*G*GAC*AGGAT*GCAC*AAAG*G
Seq_79	CUR-1925	mG*TGACmU*GTGCCmC*ATTGCTmG
Seq_80	CUR-1926	mG*TGACTGTGCCATTGCTmG
Seq_81	CUR-1927	mC*CTCmU*TTTmU*GGCmC*TTGmC*TTmC
Seq_82	CUR-1928	mG*ACAAmC*CTTmC*AGCCAmC*TGAmU*GATGmA
Seq_83	CUR-1929	T*G*G*T*A*T*A*G*G*A*A*C*T*G*G*C*A*G*C*A
Seq_84	CUR-1930	mU*mG*G*mU*A*mU*A*G*G*A*A*mC*T*G*G*mC*A*mG*mC*mA
Seq_85	CUR-1931	mC*mC*A*G*T*mC*A*A*A*A*mU*T*mC*A*G*A*mU*mC*mA
Seq_86	CUR-1932	mU*mG*GmU*AmU*AGGAAmC*TGmC*AmG*mC*mA
Seq_87	CUR-1933	mA*mG*C*C*A*G*mU*C*A*mC*A*A*A*mU*T*C*A*G*mA*T*C*A*mC*mC*mC
Seq_88	CUR-1940	mG*niC*A*G*mU*C*A*niC*A*A*A*mU*T*C*mA*mG
Seq_89	CUR-1941	mG*mC*C*A*G*mU*C*A*mC*A*A*A*mU*mU*mC
Seq_90	CUR-1942	+G*+C*C*A*G*mU*C*A*mC*A*A*A*mU*+T*+C
Seq_91	CUR-1943	+G*C*C*A*G*+T*C*A*+C*A*A*A*T*+T*+C
Seq_92	CUR-1944	+G*+C*mC*A*G*mU*C*A*mC*A*A*+A*+T
Seq_93	CUR-1945	+G*+C*C*A*G*T*C*A*C*A*+A*+A*+T
Seq_94	CUR-1946	+G*C*C*A*G*T*C*A*+C*+A*+A

[0156] *指示硫代磷酸酯键,+指示LNA,'r'指示RNA且'm'指示寡核苷酸的指定糖部分的2'氧原子上的甲基。为了避免产生歧义,该LNA具有下式:

[0157]



[0158] 其中B是特定的指定碱基。

[0159] 表2:SCN1A mRNA在用靶向SCN1A特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸处理的细胞中的相对表达。Avg-与模拟转染对照相比SCN1A表达的平均倍数差异;Std-标准差,P-所处理的样品与模拟对照无异的可能性。N-复制总数。

[0160] 表2:

ID#	SCN1A成纤维细胞			SK-N-AS			Vero76			3T3			HepG2			CHP-212		
	Avg	Std	N	Avg	Std	N	Avg	Std	N	Avg	Std	N	Avg	Std	N	Avg	Std	N
CUR-1462				1.0	0.2	4	1.2	0.3	8	0.8	0.1	5						
CUR-1624							2.9	1.1	5				0.9	0.0	5			
CUR-1625	0.7	0.7	4										1.3	0.4	4			
CUR-1626													1.0	0.1	5			
CUR-1627													1.2	0.1	4			
CUR-1628													0.9	0.1	5			
CUR-1629				12.6	1.5	5							0.9	0.1	4			
CUR-1630													1.0	0.1	5			
CUR-1631	4.0	2.8	1							1.3	0.1	14	1.1	0.1	3			
CUR-1632							1.2	0.7	4				1.0	0.1	5			
CUR-1633													1.0	0.2	4			
CUR-1634							2.9	1.1	5				1.2	0.1	4			
CUR-1635													1.1	0.3	4			
CUR-1636													1.1	0.1	4			
CUR-1719							1.2	0.3	4									
CUR-1738	0.8	0.6	7															
CUR-1739	0.9	0.4	7															
CUR-1740	8.2	2.0	27	18.2	2.0	16	4.3	1.1	12	1.7	0.5	10	1.1	0.3	9	8.8	1.7	5
CUR-1741	1.8	1.3	5															
CUR-1742	1.9	0.8	5				5.5	1.0	12									
CUR-1743	3.3	1.1	5				5.6	1.7	5									
CUR-1744	2.7	1.4	5				6.8	1.3	6									
CUR-1762	2.8	1.6	5	0.9	0.1	4	1.1	0.5	2									
CUR-1763	2.9	1.5	6	1.2	0.1	11	1.5	0.5	10									
CUR-1764	15.0	5.1	12	2.3	0.5	20	1.3	0.5	18	0.8	0.2	5	0.7	0.2	4			
CUR-1766	0.6	0.3	5	0.7	0.1	3	1.5	0.6	6									
CUR-1767							1.3	0.8	5									
CUR-1768	1.1	0.5	3	1.5	0.3	5	1.5	0.6	5							1.9	0.7	5
CUR-1769	0.8	0.7	10	1.0	0.1	3	2.6	0.8	7									
CUR-1770	22.9	4.1	25	6.7	2.0	12	2.7	1.0	20									
CUR-1798																1.0	0.3	5
CUR-1799							34									1.1	0.2	5
CUR-1836				1.1	0.3	8	1.3	0.6	5				1.1	0.3	5			
CUR-1837	3.2	0.6	9	2.4	0.3	11	4.2	1.0	24	1.0	0.1	9	1.2	0.5	10			
CUR-1838	2.0	0.6	6	1.7	0.2	5	34.1	4.0	14				1.3	0.3	5			

[0161]

[0162]

ID#	SCN1A成纤维细胞			SK-N-AS			Vero76			3T3			HepG2			CHP-212		
	Avg	Std	N	Avg	Std	N	Avg	Std	N	Avg	Std	N	Avg	Std	N	Avg	Std	N
CUR-1839				1.3	0.2	9	1.3	0.5	5				1.0	0.2	4			
CUR-1891							1.0	0.1	4									
CUR-1892							1.2	0.1	5									
CUR-1895							0.9	0.2	4				0.9	0.1	7			
CUR-1896							2.0	0.9	8				0.9	0.2	10			
CUR-1900										1.1	0.2	8						
CUR-1901	0.9	1.2	4							1.5	0.4	24						
CUR-1916	17.3	3.0	27	10.0	1.5	9	2.2	0.7	21				1.4	0.2	8			
CUR-1917							0.6	0.3	3				1.0	0.1	9			
CUR-1918										1.1	0.4	8						
CUR-1919										1.0	0.3	10						
CUR-1920										1.0	0.2	10						
CUR-1921										1.0	0.1	10						
CUR-1922							1.0	0.2	4	1.5	0.4	4						
CUR-1923							0.5	0.1	3	1.3	0.3	4						
CUR-1924							3.7	1.6	8	1.3	0.1	4						
CUR-1925	0.7	0.7	5				1.4	0.5	5	1.2	0.2	3						
CUR-1926							0.8	0.3	5	1.1	0.1	5						
CUR-1927							0.7	0.3	5	1.1	0.1	2						
CUR-1928	3.0	2.6	4				0.9	0.2	2	1.4	0.2	3						
CUR-1929	1.3	0.2	3	1.5	0.4	5												
CUR-1930	2.5	0.9	5															
CUR-1931	2.3	1.4	5															
CUR-1932	1.0	0.6	3															
CUR-1933	4.7	0.8	9				8.8	2.4	3									
CUR-1940	1.2	0.5	4															
CUR-1941	1.1	0.2	4															
CUR-1942	4.5	2.0	5															
CUR-1943	3.8	1.3	5															
CUR-1944	3.0	2.3	9															
CUR-1945	64.9	8.2	5															
CUR-1946	11.1	1.4	5															

[0163] 期望靶核酸的调节可以本领域已知的多种方式进行。例如,反义寡核苷酸、siRNA等。酶促核酸分子(例如,核酶)是能够催化多种反应的一种或多种的核酸分子,包括以核苷酸碱基序列特异性方式重复地裂解其它单独核酸分子的能力。这种酶促核酸分子可用于例如靶向几乎任何RNA转录物。

[0164] 由于其序列特异性,反式裂解酶促核酸分子显示用作人疾病的治疗剂的希望。可设计酶促核酸分子以裂解细胞RNA背景中的特定RNA靶。这种裂解事件使得mRNA无功能并消除从该RNA的蛋白表达。以这种方式,可选择性地抑制疾病状态相关的蛋白的合成。

[0165] 通常,具有RNA裂解活性的酶促核酸通过首先结合靶RNA来作用。这种结合经由被保持在邻近用于裂解靶RNA的分子的酶促部分的酶促核酸的靶结合部分来进行。因此,酶促核酸首先识别靶RNA然后经由互补碱基配对结合靶RNA,结合到正确位置时,酶促地作用以切割靶RNA。对这种靶RNA的关键裂解将破坏其指导编码蛋白合成的能力。在酶促核酸已结合和裂解其RNA靶后,其从该RNA释放以搜寻另一靶并可重复地结合和裂解新的靶。

[0166] 多种方法例如体外选择(进化)策略(Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435)已经用于进化能够催化多种反应(例如磷酸二酯键合和酰胺键合的裂解和连接)的新核酸催化剂。

[0167] 催化活性最佳的核酶的开发将显著有助于为了调节基因表达的目的采用RNA-裂

解核酶的任何策略。例如,锤头状核酶在饱和(10mM)浓度的 Mg^{2+} 辅因子存在下以约 1min^{-1} 的催化速率(kcat)作用。人工的“RNA连接酶”核酶已经显示以约 100min^{-1} 的速率催化相应的自修饰反应。此外,已知具有DNA制成的底物结合臂的某些修饰的锤头状核酶以接近 100min^{-1} 的多倍周转率催化RNA裂解。最后,用某些核苷酸类似物代替锤头的催化核心中的特定残基获得显示催化速率改进多达10倍的修饰的核酶。这些发现证明,核酶可促进化学转化,伴随催化速率显著大于大多数天然自裂解核酶体外展示的催化速率。那么可能可优化某些自裂解核酶的结构以获得最大催化活性,或可能可制备对于RNA磷酸二酯裂解展示显著更快速率的完全新的RNA基序。

[0168] 符合“锤头”模型的RNA催化剂对RNA底物的分子间裂解首次在1987年显示(Uhlenbeck, O.C. (1987) *Nature*, 328:596-600)。回收RNA催化剂并与多种RNA分子反应,证实其真正是催化性的。

[0169] 通过在催化性RNA中进行适当的碱基改变以保持与靶序列必需的碱基配对,基于“锤头”基序设计的催化性RNA已用于裂解特定靶序列。这已经允许使用催化性RNA来裂解特定靶序列并指示,按照“锤头”模型设计的催化性RNA可能可体内裂解特定底物RNA。

[0170] RNA干扰(RNAi)已经变成在哺乳动物和哺乳动物细胞中调节基因表达的强有力工具。这一方法要求利用表达质粒或病毒和被加工为siRNA的小发夹RNA的编码序列递送作为RNA本身或作为DNA的小干扰RNA(siRNA)。这一系统使得能够有效地运输前体siRNA到细胞质,在那里它们是活性的,并允许使用用于基因表达的受控型启动子和组织特异性启动子。

[0171] 在实施方案中,寡核苷酸或反义化合物包括核糖核酸(RNA)和/或脱氧核糖核酸(DNA)的寡聚物或聚合物或其模拟物、嵌合体、类似物或同系物。这一术语包括包括天然存在的核苷酸、糖和共价核苷间(主链)键的寡核苷酸以及具有类似地起作用的非天然存在的部分的寡核苷酸。因为期望的特性,例如对增加的细胞摄取、对靶核酸增加的亲和力和在核酸酶存在下增加的稳定性,这种修饰的或取代的寡核苷酸通常相比于天然形式是期望的。

[0172] 根据本发明,寡核苷酸或“反义化合物”包括反义寡核苷酸(例如, RNA、DNA、其模拟物、嵌合体、类似物或同系物)、核酶、外部指导序列(EGS)寡核苷酸、siRNA化合物、单链或双链RNA干扰(RNAi)化合物例如siRNA化合物、saRNA、aRNA和与靶核酸的至少一部分杂交并调节其功能的其它寡聚化合物。因此,它们可以是DNA、RNA、DNA-样、RNA-样或其混合物,或可以是一种或多种这些的模拟物。这些化合物可以是单链、双链、环状或发夹寡聚化合物,并可包含结构元件,例如内部凸出或末端凸出、错配或环。常规线性地制备反义化合物,但可被连接或以其它方式制备为环状和/或分支的。反义化合物可包括构建体,例如,两条链杂交以形成完全或部分双链的化合物,或具有足够自互补性的单链以允许杂交和形成完全或部分双链的化合物。两条链可在内部被连接,留下游离的3'或5'末端,或可被连接以形成连续的发夹结构或环。发夹结构可包含在5'或3'末端的突出,产生单链特征的延伸段。双链化合物任选地可包括在末端的突出。进一步的修饰可包括附加于末端之一、所选的核苷酸位置、糖位置或核苷间键合之一的缀合物基团。可选地,两条链可经由非核酸部分或接头基团连接。当仅由一条链形成时,dsRNA可采取自互补发夹型分子的形式,其与自身对折以形成双链体。因此,dsRNA可以是完全或部分双链的。基因表达的特异性调节可通过在转基因细胞系中稳定表达dsRNA发夹来实现。当由两条链或采取与自身对折以形成双链体的自互补发夹型分子形式的单链形成时,两条链(或单链的双链体形成区)是以Watson-Crick方式碱

基配对的互补RNA链。

[0173] 被引入系统中后,本发明的化合物可引发一种或多种酶或结构蛋白的作用以实现靶核酸的裂解或其它修饰,或可经由基于占位性的机制作用。通常,核酸(包括寡核苷酸)可描述为“DNA-样”(即,通常具有一个或多个2'-脱氧糖,且通常具有T而不是U碱基)或“RNA-样”(即,通常具有一个或多个2'-羟基或2'-修饰的糖,且通常具有U而不是T碱基)。核酸螺旋可采用多于一种类型的结构,最通常是A-和B-形式。通常认为,具有B-形式-样结构的寡核苷酸是“DNA-样”,且具有A-形式样结构的是“RNA-样”。在一些(嵌合)实施方案中,反义化合物可包含A-形式区域和B-形式区域两者。

[0174] 根据本发明的反义化合物可包括长度为从约5至约80个核苷酸(即,从约5至约80个连接的核苷)的反义部分。这是指反义化合物的反义链或部分的长度。换言之,本发明的单链反义化合物包括从5至约80个核苷酸,且本发明的双链反义化合物(例如dsRNA)包括长度为5至约80个核苷酸的有义和反义链或部分。本领域普通技术人员将理解,这包括长度为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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80个核苷酸或其中的任何范围的反义部分。

[0175] 在一个实施方案中,本发明的反义化合物具有长度为10至50个核苷酸的反义部分。本领域普通技术人员将理解,这包括具有长度为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或50个核苷酸或其中的任何范围的反义部分的寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸长度为15个核苷酸。

[0176] 在一个实施方案中,本发明的反义或寡核苷酸化合物具有长度为12或13至30个核苷酸的反义部分。本领域普通技术人员将理解,这包括具有长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸或其中的任何范围的反义部分的反义化合物。

[0177] 在实施方案中,本发明的寡聚化合物还包括变体,其中在化合物中一个或多个核苷酸位置存在不同碱基。例如,如果第一个核苷酸是腺嘌呤,可产生在这一位置包含胸苷、鸟苷或胞苷的变体。这可在反义或dsRNA化合物的任何位置进行。随后利用本文所述的方法测定这些化合物以确定它们抑制靶核酸表达的能力。

[0178] 在一些实施方案中,反义化合物与靶之间的同源性、序列同一性或互补性是从约40%至约60%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约60%至约70%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约70%至约80%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约80%至约90%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是约90%、约92%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%。

[0179] 在实施方案中,反义寡核苷酸,例如SEQ ID NO:29至94所列的核酸分子,包括一种或多种取代或修饰。在一个实施方案中,核苷酸是用锁核酸(LNA)取代的。

[0180] 在实施方案中,寡核苷酸靶向与SCNA和如SEQ ID NO:1至28所列的序列相关的编码和/或非编码序列的有义和/或反义的核酸分子的一个或多个区域。寡核苷酸还靶向于SEQ ID NO:1至28的重叠区域。

[0181] 本发明某些优选的寡核苷酸是嵌合寡核苷酸。在本发明范畴中,“嵌合寡核苷酸”或“嵌合体”是包含两个或更多个化学不同区域的寡核苷酸,每个区域由至少一个核苷酸组成。这些寡核苷酸通常包含赋予一种或多种有益特性(例如,增加的核酸酶耐受性、增加的摄取入细胞、增加的对靶的结合亲和力)的修饰的核苷酸的至少一个区域和为能够裂解RNA:DNA或RNA:RNA杂交物的酶的底物的区域。例如,RNA酶H是裂解RNA:DNA双链体的RNA链的细胞核酸内切酶。因此,RNA酶H的活化导致RNA靶的裂解,从而大大增强基因表达的反义调节的效力。因此,与杂交于相同靶区域的硫代磷酸酯脱氧寡核苷酸相比,当使用嵌合寡核苷酸时以较短寡核苷酸通常可获得可比较的结果。RNA靶的裂解可常规地通过凝胶电泳来检测,如果需要,通过本领域已知的相关核酸杂交技术来检测。在一个实施方案中,嵌合寡核苷酸包括经修饰以增加靶结合亲和性的至少一个区域和通常作为RNA酶H底物作用的区域。寡核苷酸对其靶(在这一情形中是编码ras的核酸)的亲合性常规地通过测量寡核苷酸/靶配对的 T_m 来确定, T_m 是寡核苷酸与靶解离的温度;分光光度地检测解离。 T_m 越高,寡核苷酸对靶的亲合性越大。

[0182] 本发明的嵌合反义化合物可形成两种或更多种寡核苷酸、如上所述的修饰的寡核苷酸、寡核苷和/或寡核苷酸模拟物的复合结构。这种化合物在本领域中也已称为杂交物或间隙体(gapmer)。教导这种杂交物结构的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No.5,013,830、5,149,797、5,220,007、5,256,775、5,366,878、5,403,711、5,491,133、5,565,350、5,623,065、5,652,355、5,652,356和5,700,922,其每一个通过引用并入本文。

[0183] 在实施方案中,经修饰的寡核苷酸的区域包括在糖的2'位置修饰的至少一个核苷酸,最优选地2'-O-烷基、2'-O-烷基-O-烷基或2'-氟-修饰的核苷酸。在其它实施方案中,RNA修饰包括在RNA 3'端的嘧啶、脱碱基残基或反向碱基的核糖上的2'-氟、2'-氨基和2'-O-甲基修饰。这种修饰常规地并入寡核苷酸,且这些寡核苷酸已经显示对给定靶具有比2'-脱氧寡核苷酸更高的 T_m (即,更高的靶结合亲和性)。这种增加的亲和性的作用是大大增强基因表达的RNAi寡核苷酸抑制。RNA酶H是裂解RNA:DNA双链体的RNA链的细胞核酸内切酶;因此该酶的活化导致RNA靶的裂解,从而可大大增强RNAi抑制的效力。RNA靶的裂解可常规地通过凝胶电泳来证实。在实施方案中,还修饰嵌合寡核苷酸以增强核酸酶的耐受性。细胞包含多种可降解核酸的核酸外切酶和核酸内切酶。多种核苷酸和核苷修饰已经显示使得它们并入的寡核苷酸比天然寡脱氧核苷酸对核酸酶消化更耐受。核酸酶耐受性常规地通过如下测量:培养寡核苷酸与细胞提取物或分离的核酸酶溶液,并随着时间测量剩余的完整寡核苷酸的量,通常通过凝胶电泳测量。经修饰以增强其核酸酶耐受性的寡核苷酸比未修饰的寡核苷酸保持完整更长时间。多种寡核苷酸修饰已证实增强或赋予核酸酶耐受性。包含至少一种硫代磷酸酯修饰的寡核苷酸目前是更优选的。在一些情形中,增强靶结合亲和性的寡核苷酸修饰也独立地能够增强核酸酶耐受性。

[0184] 本发明预期的一些优选的寡核苷酸的具体实例包括包括修饰的主链的那些,例如,硫代磷酸酯、磷酸三酯、磷酸甲基酯、短链烷基或环烷基糖间键合或短链杂原子或杂环糖间键合。更优选的是具有硫代磷酸酯主链的寡核苷酸和具有杂原子主链的那些,尤其是 $\text{CH}_2\text{--NH--O--CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$ [称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链]、 $\text{CH}_2\text{--O--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ 和 $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--CH}_2$ 主链,其中天然磷酸二酯主链表示为 O--P--O--CH_2 。由De Mesmaeker等(1995)Acc.Chem.Res.28:366-374公开的酰胺

主链也是优选的。还优选的是具有吗啉代主链结构的寡核苷酸(Summerton和Weller,美国专利No.5,034,506)。在其它实施方案中,例如肽核酸(PNA)主链,寡核苷酸的磷酸二酯主链被聚酰胺主链代替,核苷酸被直接或间接地结合于聚酰胺主链的氮杂氮原子。寡核苷酸还可包括一种或多种取代的糖部分。优选的寡核苷酸在2'位置包括以下之一:OH、SH、SCH₃、F、OCN、OCH₃OCH₃、OCH₃O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nNH₂或O(CH₂)_nCH₃,其中n是1至约10;C₁至C₁₀低级烷基、烷氧基烷氧基、取代的低级烷基、烷芳基或芳烷基;Cl;Br;CN;CF₃;OCF₃;O--、S--或N-烷基;O--、S--或N-烯基;SOCH₃;SO₂CH₃;ON₂;N₂;N₃;NH₂;杂环烷基;杂环烷芳基;氨基烷基氨基;聚烷基氨基;取代的甲硅烷基;RNA裂解基团;报告基团;嵌入剂;用于改善寡核苷酸药代动力学特性的基团;或用于改善寡核苷酸药效学特性的基团和具有类似特性的其它取代基。优选的修饰包括2'-甲氧基乙氧基[2'-O-CH₂CH₂OCH₃,还称为2'-O-(2-甲氧基乙基)]。其它优选的修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH₃)、2'-丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₃)和2'-氟(2'-F)。还可在寡核苷酸上的其它位置进行类似修饰,尤其是3'末端核苷酸上糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物例如环丁基来代替戊呋喃糖基。

[0185] 另外或可选地,寡核苷酸还可包括核碱基(本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。本文所用的“未修饰”或“天然”核苷酸包括腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核苷酸包括天然核酸中仅仅罕见或短暂出现的核苷酸,例如,次黄嘌呤、6-甲基腺嘌呤、5-Me嘧啶、尤其是5-甲基胞嘧啶(也称为5-甲基-2'脱氧胞嘧啶,本领域中通常称为5-Me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶(HMC)、糖基HMC和龙胆二糖基HMC以及合成的核苷酸,例如,2-氨基腺嘌呤、2-(甲基氨基)腺嘌呤、2-(咪唑基烷基)腺嘌呤、2-(氨基烷基氨基)腺嘌呤或其它杂取代的烷基腺嘌呤、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基甲基尿嘧啶、8-氮杂鸟嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤、N₆(6-氨基己基)腺嘌呤和2,6-二氨基嘌呤。可包括本领域中已知的“通用”碱基,例如肌苷。5-Me-C取代已显示增加核酸双链体的稳定性0.6-1.2℃,是目前优选的碱基取代。

[0186] 本发明寡核苷酸的另一修饰包括与该寡核苷酸化学连接增强寡核苷酸的活性或细胞摄取的一个或多个部分或缀合物。这种部分包括但不限于脂质部分例如胆固醇部分、胆固醇基部分、脂肪族链如十二烷二醇或十一烷基残基、聚胺或聚乙二醇链或金刚烷乙酸。包括亲脂部分的寡核苷酸和制备这种寡核苷酸的方法是本领域已知的,例如,美国专利No.5,138,045、5,218,105和5,459,255。

[0187] 给定的寡核苷酸中的所有位置不必一致地被修饰,事实上多于一个上述修饰可并入单个寡核苷酸中或甚至在寡核苷酸中的单个核苷中。本发明还包括为上文定义的嵌合寡核苷酸的寡核苷酸。

[0188] 在另一实施方案中,本发明的核酸分子缀合于另一部分,该另一部分包括但不限于脱碱基核苷酸、聚醚、聚胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、脂质或聚烃化合物。本领域技术人员将认识到,这些分子可在糖、碱基或磷酸酯基团上的多个位置连接于一种或多种任何核苷酸(包括核酸分子)。

[0189] 根据本发明使用的寡核苷酸可方便和常规地通过公知的固相合成技术制备。用于这种合成的设备由包括Applied Biosystems的多个供应商出售。还可采用用于这种合成的任何其它手段;寡核苷酸的实际合成完全在本领域普通技术人员的才能范围内。还公知的是使用类似技术来制备其它寡核苷酸例如硫代磷酸酯和烷基化衍生物。还公知的是使用类

似技术和市售可获得的修饰的亚酰胺化物 (amidite) 和可控孔度玻璃 (CPG) 产物例如生物素、荧光素、吡啶或补骨脂素-修饰的亚酰胺化物和/或CPG (可从Glen Research, Sterling VA获得) 来合成荧光标记的、生物素化的或其它修饰的寡核苷酸, 例如胆固醇-修饰的寡核苷酸。

[0190] 根据本发明, 使用修饰例如使用LNA单体来增强包括本发明化学性质例如MOE、ANA、FANA、PS等的寡核苷酸的效力、特异性和作用持续时间并增宽所述寡核苷酸施用途。这可通过以LNA单体取代本发明寡核苷酸中的一些单体来实现。LNA修饰的寡核苷酸可具有与亲本化合物相似的大小或可更大或优选地更小。优选地, 这种LNA-修饰的寡核苷酸包含少于约70%、更优选地少于约60%、最优选地少于约50%的LNA单体, 且其大小为约5至25个核苷酸, 更优选地约12至20个核苷酸。

[0191] 优选的修饰的寡核苷酸主链包括但不限于, 硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯、磷酸甲基酯和其它磷酸烷基酯 (包括磷酸3'亚烷基酯和手性磷酸酯)、亚磷酸酯、氨基磷酸酯 (包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰氨基磷酸酯、硫羰磷酸烷基酯、硫羰烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键合的硼磷酸酯、这些的2'-5'连接的类似物和具有倒转极性的那些, 其中相邻的核苷单元对是3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接的。还包括多种盐、混合盐和游离酸形式。

[0192] 教导以上含磷键合的制备的代表性美国专利包括但不限于, 美国专利No. 3,687,808、4,469,863、4,476,301、5,023,243、5,177,196、5,188,897、5,264,423、5,276,019、5,278,302、5,286,717、5,321,131、5,399,676、5,405,939、5,453,496、5,455,233、5,466,677、5,476,925、5,519,126、5,536,821、5,541,306、5,550,111、5,563,253、5,571,799、5,587,361和5,625,050, 其每一个通过引用并入本文。

[0193] 其中不包含磷原子的优选的修饰的寡核苷酸主链具有由短链烷基或环烷基核苷间键合、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键合或者一种或多种短链杂原子或杂环核苷间键合形成的主链。这些包括具有吗啉代键合 (部分地从核苷的糖部分形成) 的那些; 硅氧烷主链; 硫化物、亚砷和砷主链; 甲酰基 (formacetyl) 和硫代甲酰基主链; 亚甲基甲酰基和硫代甲酰基主链; 含链烯的主链; 氨基磺酸酯主链; 亚甲基亚胺基和亚甲基胍基主链; 磺酸酯和磺胺主链; 酰胺主链; 和具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的其它主链。

[0194] 教导以上寡核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于, 美国专利No. 5,034,506、5,166,315、5,185,444、5,214,134、5,216,141、5,235,033、5,264,562、5,264,564、5,405,938、5,434,257、5,466,677、5,470,967、5,489,677、5,541,307、5,561,225、5,596,086、5,602,240、5,610,289、5,602,240、5,608,046、5,610,289、5,618,704、5,623,070、5,663,312、5,633,360、5,677,437和5,677,439, 其每一个通过引用并入本文。

[0195] 在其它优选的寡核苷酸模拟物中, 核苷酸单元的糖和核苷间键合两者即主链被新的基团代替。碱基单元被保留用于与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物, 即已显示具有极佳的杂交特性的寡核苷酸模拟物称为肽核酸 (PNA)。在PNA化合物中, 寡核苷酸的糖-主链被包含酰胺的主链, 特别是氨基乙基甘氨酸主链代替。核碱基被保留, 并直接或间接与主链的酰胺部分的氮杂氮原子结合。教导PNA化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于, 美国专利No. 5,539,082、5,714,331和5,719,262, 其每一个通过引用并入本文。PNA化合物的进一步教导可见于Nielsen等 (1991) Science 254,1497-1500。

[0196] 在本发明的实施方案中,具有硫代磷酸酯主链的寡核苷酸和具有杂原子主链的寡核苷酸,尤其是-CH₂-NH-O-CH₂、称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链的-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂、-CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂和-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂,其中天然磷酸二酯主链表示为以上引用的美国专利No.5,489,677的-O-P-O-CH₂-和以上引用的美国专利No.5,602,240的酰胺主链。还优选的是具有以上引用的美国专利No.5,034,506的吗啉代主链结构的寡核苷酸。

[0197] 修饰的寡核苷酸还可包含一种或多种取代的糖部分。优选的寡核苷酸在2'位置包括以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。尤其优选的是O(CH₂)_nOmCH₃、O(CH₂)_n、OCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nNH₂和O(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂,其中n和m可以为1至约10。其它优选的寡核苷酸包括在2'位置包括以下之一:C至C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ON₂、N₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷基芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报告基团、嵌入剂、用于改善寡核苷酸药代动力学特性的基团或用于改善寡核苷酸药效学特性的基团和具有类似特性的其它取代基。优选的修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃,还称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)即,烷氧基烷氧基基团。另外优选的修饰包括如在本文以下实施例中描述的2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团,还称为2'-DMAOE,和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(本领域还称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即,2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂。

[0198] 其它优选的修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-O-CH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟(2'-F)。还可在寡核苷酸上的其它位置进行类似修饰,尤其是3'末端核苷酸或2'-5'连接的寡核苷酸上糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物例如环丁基部分来代替戊呋喃糖基糖。教导这种修饰的糖结构的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No.4,981,957、5,118,800、5,319,080、5,359,044、5,393,878、5,446,137、5,466,786、5,514,785、5,519,134、5,567,811、5,576,427、5,591,722、5,597,909、5,610,300、5,627,053、5,639,873、5,646,265、5,658,873、5,670,633和5,700,920,其每一个通过引用并入本文。

[0199] 寡核苷酸还可包括核碱基(本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。本文所用的“未修饰”或“天然”核苷酸包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)、和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核苷酸包括其它合成的和天然核苷酸例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假-尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫氢基、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代尤其是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤和7-脱氮杂腺嘌呤和3-脱氮杂鸟嘌呤和3-脱氮杂腺嘌呤。

[0200] 此外,核苷酸包括美国专利No.3,687,808中公开的那些、'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering',第858-859页,Kroschwitz,J.I.

编著. John Wiley&Sons, 1990中公开的那些、Englisch等, 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, 第613页中公开的那些以及Sanghvi, Y.S., 第15章, 'Antisense Research and Applications', 第289-302页, Crooke, S.T.和Lebleu, B.编著, CRC Press, 1993中公开的那些。这些核苷酸的某些尤其有助于增加本发明寡聚化合物的结合亲和性。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶、N-2、N-6和O-6取代的嘌呤, 包括2-氨基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已显示增加核酸双链体稳定性0.6-1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T.和Lebleu, B.编著, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp.276-278), 并且是目前优选的碱基取代, 甚至更尤其是当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0201] 教导上述修饰的核苷酸以及其它修饰的核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于, 美国专利No. 3,687,808以及4,845,205、5,130,302、5,134,066、5,175,273、5,367,066、5,432,272、5,457,187、5,459,255、5,484,908、5,502,177、5,525,711、5,552,540、5,587,469、5,596,091、5,614,617、5,750,692和5,681,941, 其每一个通过引用并入本文。

[0202] 本发明寡核苷酸的另一修饰包括将寡核苷酸化学连接于增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个部分或缀合物。

[0203] 这种部分包括但不限于, 脂质部分例如胆固醇部分、胆酸、硫醚例如己基-S-三苯甲基硫醇、硫胆固醇、脂肪族链例如十二烷二醇或十一烷基残基、磷脂例如二-十六烷基-rac-甘油或1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-H-磷酸三乙基铵、聚胺或聚乙二醇链、或金刚烷乙酸、棕榈酰基部分、或十八胺或己基氨基-羰基-t羟胆固醇部分。

[0204] 教导这种寡核苷酸缀合物的制备的代表性美国专利包括但不限于, 美国专利No. 4,828,979、4,948,882、5,218,105、5,525,465、5,541,313、5,545,730、5,552,538、5,578,717、5,580,731、5,580,731、5,591,584、5,109,124、5,118,802、5,138,045、5,414,077、5,486,603、5,512,439、5,578,718、5,608,046、4,587,044、4,605,735、4,667,025、4,762,779、4,789,737、4,824,941、4,835,263、4,876,335、4,904,582、4,958,013、5,082,830、5,112,963、5,214,136、5,082,830、5,112,963、5,214,136、5,245,022、5,254,469、5,258,506、5,262,536、5,272,250、5,292,873、5,317,098、5,371,241、5,391,723、5,416,203、5,451,463、5,510,475、5,512,667、5,514,785、5,565,552、5,567,810、5,574,142、5,585,481、5,587,371、5,595,726、5,597,696、5,599,923、5,599,928和5,688,941, 其每一个通过引用并入本文。

[0205] 药物发现: 本发明的化合物还可应用于药物发现和靶确认的领域。本发明涵盖本文鉴定的化合物和优选的靶区段在药物发现尝试中使用以阐明电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)多核苷酸与疾病状态、表型或疾患之间存在的关联。这些方法包括检测或调节SCNA多核苷酸, 包括将样品、组织、细胞或生物体与本发明化合物接触, 在处理后的某一时间测量SCNA多核苷酸的核酸或蛋白水平和/或相关的表型或化学端点, 和任选地将测量值与未处理样品或用本发明另外化合物处理的样品比较。这些方法还可与其它试验平行或组合进行, 以为靶确认方法确定未知基因的功能, 或确定特定基因产物作为治疗或预防特定疾病、疾患或表型的靶的有效性。

[0206] 评价基因表达的上调或抑制:

[0207] 外源核酸向宿主细胞或生物体中的转移可通过直接检测细胞或生物体中该核酸

的存在来评价。这种检测可通过本领域公知的多种方法来实现。例如,外源核酸的存在可通过DNA印迹或利用特异性地扩增与该核酸相关的核苷酸序列的引物通过聚合酶链式反应(PCR)技术来检测。外源核酸的表达还可利用包括基因表达分析的常规方法测量。例如,从外源核酸产生的mRNA可利用RNA印迹和逆转录PCR(RT-PCR)来检测和定量。

[0208] RNA从外源核酸的表达还可通过测量酶促活性或报告蛋白活性来检测。例如,反义调节活性可间接地作为靶核酸表达的减少或增加来测量,靶核酸表达的减少或增加作为外源核酸在产生效应RNA的指示。基于序列保守性,可设计引物并用于扩增靶基因的编码区域。最初,来自每个基因的最高度表达的编码区域可用于构建模式对照基因,尽管可使用任何编码或非编码区域。通过在报告基因编码区域和其poly(A)信号之间插入每个编码区域来组装每个对照基因。这些质粒将产生报告基因在基因的上游部分且可能的RNAi靶在3'非编码区域的mRNA。单独反义寡核苷酸的效果将通过报告基因的调节来测定。可用于本发明方法的报告基因包括乙酰羟酸合酶(AHAS)、碱性磷酸酶(AP)、 β 半乳糖苷酶(LacZ)、 β 葡萄糖醛酸酶(GUS)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素酶(Luc)、胭脂碱合酶(NOS)、章鱼碱合酶(OCS)及其衍生物。赋予对氨基苄西林、博来霉素、氯霉素、庆大霉素、潮霉素、卡那霉素、林可霉素、甲氨蝶呤、草丁膦、嘌呤霉素和四环素抗性的多种选择标记是可得。确定报告基因的调节的方法是本领域公知的,包括但不限于,荧光方法(例如,荧光光谱学、荧光激活细胞分选术(FACS)、荧光显微镜检术)、抗生素抗性确定。

[0209] 靶核酸区段也可在基于细胞的测定中检测。进行实验以HepG2中、携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中以及还在人睾丸中检测Scn1a天然反义BG724147。对于HepG2以及携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞,使细胞生长并且提取RNA。对于人睾丸,购买并利用多聚腺苷酸分离的RNA。该实验称为RACE(cDNA末端的快速扩增)并且使用特异于BG724147RNA转录物的引物。

[0210] 来自HepG2的多聚腺苷酸分离的RNA和来自携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞的多聚腺苷酸分离的RNA非常类似的PCR产物被检测出,但是该产物未在来自人睾丸的多聚腺苷酸分离的RNA中检测出。而且,在来自HepG2细胞的总RNA和来自携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞的总RNA中未检测出(或以非常非常低的量)PCR产物。结果表明,Scn1a的天然反义(被称为BG724147)存在于HepG2细胞和携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中,而不是人睾丸中。

[0211] SCNA蛋白和mRNA表达可利用本领域技术人员已知和在本文别处描述的方法来测定。例如,免疫测定例如ELISA可用于测量蛋白水平。SCNA ELISA测定试剂盒是市售可获得的,如,从R&D Systems(Minneapolis,MN)。

[0212] 在实施方案中,利用本发明反义寡核苷酸处理的样品(例如,体内或体外的细胞或组织)中的SCNA表达(例如,mRNA或蛋白)通过与对照样品中的SCNA表达比较来评价。例如,蛋白或核酸的表达可利用本领域技术人员已知的方法与模拟处理或未处理样品中的比较。可选地,取决于期望的信息,可与以对照反义寡核苷酸(例如,具有改变的或不同序列的反义寡核苷酸)处理的样品进行比较。在另一实施方案中,处理样品与未处理样品中SCNA蛋白或核酸的表达差异可与处理样品与未处理样品中不同核酸(包括研究者认为适当的任何标准,例如,看家基因)的表达差异比较。

[0213] 观察到的差异可如期望地表示,例如,以比率或分数的形式,用于与对照比较。在实施方案中,以本发明反义寡核苷酸处理的样品中SCNA mRNA或蛋白的水平相对于未处理样品或以对照核酸处理的样品增加或减少约1.25倍至约10倍或更多。在实施方案中,SCNA mRNA或蛋白的水平增加或减少至少约1.25倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约1.6倍、至少约1.7倍、至少约1.8倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍、或至少约10倍或更多。

[0214] 试剂盒、研究试剂、诊断和治疗

[0215] 本发明的化合物可用于诊断、治疗和预防,及作为研究试剂和试剂盒的成分。而且,能够以强烈特异性抑制基因表达的反义寡核苷酸通常被本领域技术人员用来阐明特定基因的功能或区分生物途径的不同成员的功能。

[0216] 对于在试剂盒和诊断和不同生物系统中使用,本发明的化合物,单独地或与其它化合物或治疗组合地用作差异和/或组合分析中的工具来阐明细胞和组织中表达的基因的一部分或完全互补序列的表达模式。

[0217] 本文所用的术语“生物系统”或“系统”定义为表达或使成为感受态以表达电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)基因产物的任何生物体、细胞、细胞培养物或组织。这些包括但不限于,人、转基因动物、细胞、细胞培养物、组织、异种移植物、移植物及其组合。

[0218] 作为一个非限制性实例,将以一种或多种反义化合物处理的细胞或组织中的表达模式与未被反义化合物处理的对照细胞或组织比较,并按照其属于所检查的基因的例如疾病关联、信号传导途径、细胞定位、表达水平、大小、结构或功能分析所产生的模式的基因表达差异水平。这些分析可对刺激或未刺激的细胞进行,并在影响表达模式的其它化合物存在或不存在下。

[0219] 本领域已知的基因表达分析方法的实例包括DNA阵列或微阵列、SAGE(基因表达系列分析)、READS(消化的cDNA的限制性酶扩增)、TOGA(总基因表达分析)、蛋白阵列和蛋白质组学、表达的序列标签(EST)测序、消减RNA指纹技术(SuRF)、消减克隆、差异展示(DD)、比较基因组杂交、FISH(荧光原位杂交)技术和质谱方法。

[0220] 本发明的化合物可用于研究和诊断,因为这些化合物杂交于编码电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的核酸。例如,在本文公开的这种条件下以这种效力杂交的为有效的SCNA调节剂的寡核苷酸,在有利基因扩增或检测的条件下分别是有效的引物或探针。这些引物和探针可用于需要特异性检测编码SCNA的核酸分子的方法和可用于扩增用于检测或用于进一步研究SCNA的所述核酸分子。本发明的反义寡核苷酸,尤其是引物和探针与编码SCNA的核酸的杂交可通过本领域已知的手段检测。这种手段可包括将酶缀合于寡核苷酸、放射性标记寡核苷酸或任何其它适当的检测手段。还可制备利用这种检测手段来检测样品中SCNA水平的试剂盒。

[0221] 本领域技术人员还利用反义的特异性和灵敏性用于治疗用途。反义化合物已经在动物(包括人)的疾病状态的治疗中用作治疗部分。反义寡核苷酸药物已经安全且有效地施用于人,目前正在进行许多临床试验。因此已经确定,反义化合物可以有利的治疗形态,可被配置以用于治疗细胞、组织和动物(尤其是人)的治疗方案。

[0222] 对于治疗,通过施用根据本发明的反义化合物来治疗怀疑患有可通过调节SCNA多核苷酸的表达来治疗的疾病或病症的动物,优选地人。例如,在一个非限制性实施方案中,方法包括向需要治疗的动物施用治疗有效量的SCNA调节剂的步骤。本发明的SCNA调节剂有效地调节SCNA的活性或调节SCNA蛋白的表达。在一个实施方案中,与对照相比,动物中SCNA的活性或表达被抑制约10%。优选地,动物中SCNA的活性或表达被抑制约30%。更优选地,动物中SCNA的活性或表达被抑制50%或更多。因此,与对照相比,寡聚化合物调节电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)mRNA的表达至少10%、至少50%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%。

[0223] 在一个实施方案中,与对照相比,动物中电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的活性或表达增加约10%。优选地,动物中SCNA的活性或表达增加约30%。更优选地,动物中SCNA的活性或表达增加50%或更多。因此,与对照相比,寡聚化合物调节SCNA mRNA的表达至少10%、至少50%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%。

[0224] 例如,可测量动物的血清、血液、脂肪组织、肝脏或任何其它体液、组织或器官中电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)表达的减少。优选地,待分析的所述体液、组织或器官中包含的细胞包含编码SCNA肽和/或SCNA蛋白本身的核酸分子。

[0225] 本发明的化合物可用于药物组合物,通过向适当的药学上可接受的稀释剂或载体加入有效量的本发明化合物。本发明的化合物和方法的用途还可以是预防上有用的。

[0226] 缀合物

[0227] 本发明寡核苷酸的另一修饰包括将该寡核苷酸化学连接至增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个部分或缀合物。这些部分或缀合物可包括共价结合官能团例如伯羟基或仲羟基基团的缀合物基团。本发明的缀合物基团包括嵌入剂、报告分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、增强寡聚物药代动力学特性的基团、增强寡聚物药效学特性的基团。典型缀合物基团包括胆固醇、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、蒽醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。在本发明范畴中,增强药效学特性的基团包括改进摄取、增强对降解的耐受性和/或加强与靶核酸序列特异性杂交的基团。在本发明范畴中,增强药代动力学特性的基团包括改进本发明化合物的摄取、分布、代谢或排泄的基团。代表性缀合物基团公开在1992年10月23日提交的国际专利申请No. PCT/US92/09196和美国专利No. 6,287,860中,其通过引用并入本文。缀合物部分包括但不限于,脂质部分例如胆固醇部分、胆酸、硫醚例如己基-5-三苯甲基硫醇、硫胆固醇、脂肪族链例如十二烷二醇或十一烷基残基、磷脂例如二-十六烷基-rac-甘油或1,2-二-0-十六烷基-rac-甘油-3-H磷酸三乙基铵、聚胺或聚乙二醇链、或金刚烷乙酸、棕榈酰基部分或十八胺或己基氨基-羧基-羟胆固醇部分。本发明的寡核苷酸还可缀合于活性药物物质,例如,阿斯匹林、华法林、苯基丁氮酮、布洛芬、舒洛芬、芬布芬、酮洛芬、(S) - (+) - 普拉洛芬、卡洛芬、丹肌氨酸、2,3,5-三碘苯甲酸、氟灭酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮杂环庚三烯、吡啶美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺药物、抗糖尿病药、抗菌药或抗生素。

[0228] 教导这种寡核苷酸缀合物的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No. 4,828,979、4,948,882、5,218,105、5,525,465、5,541,313、5,545,730、5,552,538、5,

578,717、5,580,731、5,580,731、5,591,584、5,109,124、5,118,802、5,138,045、5,414,077、5,486,603、5,512,439、5,578,718、5,608,046、4,587,044、4,605,735、4,667,025、4,762,779、4,789,737、4,824,941、4,835,263、4,876,335、4,904,582、4,958,013、5,082,830、5,112,963、5,214,136、5,082,830、5,112,963、5,214,136、5,245,022、5,254,469、5,258,506、5,262,536、5,272,250、5,292,873、5,317,098、5,371,241、5,391,723、5,416,203、5,451,463、5,510,475、5,512,667、5,514,785、5,565,552、5,567,810、5,574,142、5,585,481、5,587,371、5,595,726、5,597,696、5,599,923、5,599,928和5,688,941。

[0229] 制剂

[0230] 为了辅助摄取、分布和/或吸收,本发明的化合物还可与其它分子、分子结构或化合物的混合物混合、包封、缀合或以其它方式关联,例如脂质体、受体靶向分子、口服、直肠、局部或其它制剂。教导这种摄取、分布和/或吸收辅助制剂的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No.5,108,921、5,354,844、5,416,016、5,459,127、5,521,291、5,543,165、5,547,932、5,583,020、5,591,721、4,426,330、4,534,899、5,013,556、5,108,921、5,213,804、5,227,170、5,264,221、5,356,633、5,395,619、5,416,016、5,417,978、5,462,854、5,469,854、5,512,295、5,527,528、5,534,259、5,543,152、5,556,948、5,580,575和5,595,756,其每一个通过引用并入本文。

[0231] 尽管反义寡核苷酸不必以载体的背景施用以便调节靶表达和/或功能,但是本发明的实施方案涉及用于表达反义寡核苷酸的表达载体构建体,包括启动子、杂合体启动子基因序列,并具备强的组成型启动子活性或在期望情形中可被诱导的启动子活性。

[0232] 在实施方案中,发明实践包括以适当的核酸递送系统施用至少一种上述反义寡核苷酸。在一个实施方案中,该系统包括可操作地连接于多核苷酸的非病毒载体。这种非病毒载体的实例包括单独寡核苷酸(例如,SEQ ID NO:29至94的任何一种或多种)或寡核苷酸与适当的蛋白、多糖或脂质制剂的组合。

[0233] 另外适当的核酸递送系统包括病毒载体,通常序列来自以下的至少一种:腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)、辅助病毒依赖型腺病毒、逆转录病毒或日本血凝病毒-脂质体(HVJ)复合体。优选地,病毒载体包括可操作地连接于多核苷酸的强的真核启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子。

[0234] 另外优选的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学缀合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼氏鼠白血病病毒和基于HIV的病毒。一种优选的基于HIV的病毒载体包括至少两种载体,其中gag和pol基因来自HIV基因组且env基因来自另一病毒。DNA病毒载体是优选的。这些载体包括痘病毒载体例如正痘病毒或禽痘病毒载体、疱疹病毒载体例如I型单纯疱疹病毒(HSV)载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。

[0235] 本发明的反义化合物涵盖任何药学上可接受的盐、酯或这种酯的盐、或当施用于动物(包括人)时能够提供(直接或间接)生物活性代谢物的任何其它化合物或其残留物。

[0236] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的生理上和药学上可接受的盐:即,保留亲本化合物的期望生物活性且不对其赋予不期望的毒理学作用的盐。对于寡核苷酸,药学上可接受的盐及其用途的优选的实例进一步描述于美国专利No.6,287,860,其通过引用并入本文。

[0237] 本发明还包括包含本发明反义化合物的药物组合物和制剂。取决于期望局部还是

系统治疗和待治疗的区域,本发明的药物组合物可以多种方式施用。施用可以是局部的(包括眼睛和向粘膜,包括阴道和直肠递送)、肺部,例如通过吸入或喷入粉末或气雾剂,包括通过喷雾器;气管内、鼻内、表皮和经皮)、口服或肠胃外。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;或颅内,例如鞘内或心室内的施用。

[0238] 对于治疗中枢神经系统中的组织,施用可通过例如注射或输注到脑脊液中进行。反义RNA向脑脊液的施用描述于例如美国专利申请公布No.2007/0117772“Methods for slowing familial ALS disease progression”中,通过引用整体并入本文。

[0239] 当预期本发明的反义寡核苷酸被施用于中枢神经系统中的细胞时,可以能够促进本发明反义寡核苷酸跨越血脑屏障的渗透的一种或多种试剂施用。注射可在例如内嗅皮质或海马中进行。通过向肌肉组织中的运动神经元施用腺病毒载体来递送神经营养因子描述于例如美国专利No.6,632,427“Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons”中,通过引用并入本文。向脑例如纹状体、丘脑、海马或黑质直接递送载体是本领域已知的,描述于例如美国专利No.6,756,523“Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain”中,通过引用并入本文。施用可以是快速的,如通过注射,或经一段时间进行,如通过缓慢输注或施用缓释制剂。

[0240] 本发明反义寡核苷酸可还连接或缀合于提供期望的药物或药效学特性的试剂。例如,反义寡核苷酸可偶联于本领域已知的促进跨血脑屏障渗透或运输的任何物质,例如转铁蛋白受体的抗体,并通过静脉内注射施用。反义化合物可连接于病毒载体,例如,使得反义化合物更有效和/或增加反义化合物跨血脑屏障的运输的病毒载体。渗透血脑屏障破坏还可通过例如输注以下物质来实现:糖包括但不限于,赤藓糖醇、木糖醇、D(+)半乳糖、D(+)乳糖、D(+)木糖、卫矛醇、肌醇、L(-)果糖、D(-)甘露醇、D(+)葡萄糖、D(+)阿拉伯糖、D(-)阿拉伯糖、纤维二糖、D(+)麦芽糖、D(+)棉子糖、L(+)鼠李糖、D(+)蜜二糖、D(-)核糖、侧金盏花醇、D(+)阿拉伯糖醇、L(-)阿拉伯糖醇、D(+)岩藻糖、L(-)岩藻糖、D(-)来苏糖、L(+)来苏糖和L(-)来苏糖,或氨基酸包括但不限于,谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、缬氨酸和牛磺酸。用于增强血脑屏障渗透的方法和材料描述于,例如,美国专利No.4,866,042“Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier”,美国专利No.6,294,520“Material for passage through the blood-brain barrier”和美国专利No.6,936,589“Parenteral delivery systems”,都通过引用整体并入本文。

[0241] 为了帮助摄取、分布和/或吸收,本发明反义化合物可与其它分子、分子结构或化合物混合物,例如,脂质体、受体靶向分子、口服、直肠、局部或其它制剂混合、包封、缀合或以其它方式关联。例如,阳离子脂质可被包括在制剂中以促进寡核苷酸摄取。显示促进摄取的一种这样的组合物是LIPOFECTIN(可从GIBCO-BRL, Bethesda, MD获得)。

[0242] 认为具有至少一种2'-O-甲氧基乙基修饰的寡核苷酸尤其可用于口服施用。用于局部施用的药物组合物和制剂可包括经皮贴片、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规药物载体、水性、粉状或油性基质、增稠剂和类似物可以是必需或期望的。涂覆的避孕套、手套和类似物也是可用的。

[0243] 可方便地以单位剂型呈现的本发明的药物制剂可按照制药工业中公知的常规技术制备。这种技术包括将活性成分与药物载体或赋形剂关联的步骤。通常,制剂通过以下制备:均匀且密切地将活性成分与液态载体或磨碎的固态载体或两者关联,然后,如果需要,将产品成型。

[0244] 本发明的组合物可配制为任何的许多可能剂型,例如但不限于,片剂、胶囊、凝胶、液体糖浆剂、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物还可配制为在含水、不含水或混合介质中的悬浮剂。含水悬浮剂可进一步包含增加悬浮剂粘度的物质,包括例如,羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮剂还可包含稳定剂。

[0245] 本发明的药物组合物包括但不限于,溶液、乳液、泡沫剂和含脂质体制剂。本发明的药物组合物和制剂可包括一种或多种渗透促进剂、载体、赋形剂或其它活性或无活性配料。

[0246] 乳剂通常是一种液体以直径通常超过 $0.1\mu\text{m}$ 的液滴形式分散在另一液体中的异质系统。除了分散相和可作为以水相、油相或本身作为单独相的溶液存在的活性药物以外,乳剂可包含另外的成分。包括微乳剂作为本发明的实施方案。乳剂及其用途是本领域公知的,进一步描述于美国专利No.6,287,860。

[0247] 本发明的制剂包括脂质体制剂。本发明所用的术语“脂质体”是指包括以一个或多个球形双层排列的两亲性脂质的囊泡。脂质体是单层或多层囊泡,具有从亲脂性材料形成的膜和包含待递送的组合物的含水内部。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,认为其与带负电荷的DNA分子相互作用形成稳定复合体。认为pH-敏感或带负电荷的脂质体捕获DNA而不是与其复合。阳离子和非阳离子脂质体两者已经用于向细胞递送DNA。

[0248] 脂质体还包括“空间上稳定的”脂质体,本文所用的该术语是指包括一种或多种特化的脂质的脂质体。当被并入脂质体时,这些特化的脂质产生相对于松散这种特化脂质的脂质体具有增强的循环生命周期的脂质体。空间上稳定的脂质体的实例是其中脂质体的形成囊泡的脂质部分的部分包括一种或多种糖脂或以一种或多种亲水性聚合物例如聚乙二醇(PEG)部分衍生化的脂质体。脂质体及其用途进一步描述于美国专利No.6,287,860中。

[0249] 本发明的药物制剂和组合物还可包括表面活性剂。表面活性剂在药物产品、制剂和乳剂中的使用是本领域公知的。表面活性剂及其用途进一步描述于美国专利No.6,287,860中,其通过引用并入本文。

[0250] 在一个实施方案中,本发明采用多种渗透促进剂来实现核酸尤其是寡核苷酸的有效递送。除了帮助非亲脂性药物跨细胞膜的扩散,渗透促进剂还增强亲脂性药物的渗透性。渗透促进剂可分为属于五个大类之一,即,表面活性剂、脂肪酸、胆酸、螯合剂和非螯合非表面活性剂。渗透促进剂及其用途进一步描述于美国专利No.6,287,860中,其通过引用并入本文。

[0251] 本领域技术人员将认识到,制剂常规地根据其预期用途即施用途来设计。

[0252] 用于局部施用的优选的制剂包括其中本发明的寡核苷酸与局部递送剂例如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的制剂。优选的脂质和脂质体包括中性(例如,二油酰基-磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性(例如,二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子(例如,二油酰基四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰基-磷脂酰乙醇胺DOTMA)。

[0253] 对于局部或其它施用,可将本发明的寡核苷酸封装于脂质体中或可与其形成复合体,尤其是阳离子脂质体。可选地,寡核苷酸可与脂质,尤其是阳离子脂质复合。优选的脂肪酸和酯、其药学上可接受的盐及其用途进一步描述于美国专利No.6,287,860中。

[0254] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末剂或颗粒剂、微颗粒、纳米颗粒、水或非水介质中的悬浮剂或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或小片剂。增稠剂、芳香剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可以是期望的。优选的口服制剂是其中本发明的寡核苷酸连同一种或多种渗透促进剂、表面活性剂和螯合剂一起施用的那些。优选的表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆酸和/或其盐。优选的胆酸/盐和脂肪酸及其用途进一步描述于美国专利No.6,287,860中,其通过引用并入本文。还优选的是渗透促进剂的组合,例如,脂肪酸/盐与胆酸/盐的组合。尤其优选的组合是月桂酸、癸酸和UDCA的钠盐。进一步的渗透促进剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-十六烷基醚。本发明的寡核苷酸可口服递送,以包括喷雾干燥颗粒的粒状形式或复合以形成微颗粒或纳米颗粒。寡核苷酸络合剂及其用途进一步描述于美国专利No.6,287,860中,其通过引用并入本文。

[0255] 用于肠胃外、鞘内或心室内施用的组合物和制剂可包括还可包含缓冲剂、稀释剂和其它适当的添加剂(例如但不限于渗透促进剂、载体化合物和其它药学上可接受的载体或赋形剂)的无菌水溶液。

[0256] 本发明的某些实施方案提供包含一种或多种寡聚化合物和通过非反义机制起作用的一种或多种其它化疗剂的药物组合物。这种化疗剂的实例包括但不限于,癌症化疗药物例如柔红霉素、道诺霉素、放线菌素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、依索比星、博来霉素、马磷酰胺、异环磷酰胺、阿糖胞苷、双氯乙亚硝基脲、白消安、丝裂霉素C、放线菌素D、光神霉素、泼尼松、羟孕酮、睾酮、他莫昔芬、达卡巴嗪、丙卡巴肼、六甲蜜胺、五甲蜜胺、米托蒽醌、安吡啶、苯丁酸氮芥、甲基环己亚硝基脲、氮芥、美法仑、环磷酰胺、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氮杂胞苷、羟基脲、脱氧柯福霉素、4-羟基过氧环磷酰胺、5-氟尿嘧啶(5-FU)、5-氟脱氧尿苷(5-FUdR)、甲氨蝶呤(MTX)、秋水仙碱、泰素、长春新碱、长春碱、依托泊苷(VP-16)、三甲曲沙、伊立替康、托泊替康、吉西他滨、替尼泊苷、顺铂和己烯雌酚(DES)。当与本发明的化合物一起使用时,这种化疗剂可单独地使用(例如,5-FU和寡核苷酸),顺序地使用(例如,5-FU和寡核苷酸持续一段时间,随后是MTX和寡核苷酸)或与一种或多种其它这种化疗剂组合使用(例如,5-FU、MTX和寡核苷酸,或5-FU、放疗和寡核苷酸)。包括但不限于非类固醇抗炎药物和皮质激素的抗炎药物及包括但不限于利巴韦林、阿糖腺苷、无环鸟苷和更昔洛韦的抗病毒药物也可组合在本发明的组合物中。反义化合物与其它非反义药物的组合也在本发明的范围中。两种或更多种组合的化合物可一起或顺序地使用。

[0257] 在另一相关实施方案中,本发明的组合物可包含靶向第一核酸的一种或多种反义化合物,尤其是寡核苷酸,和靶向第二核酸靶的一种或多种另外的反义化合物。例如,第一靶可以是电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的特定反义序列,第二靶可以是来自另一核苷酸序列的区域。可选地,本发明的组合物可包含靶向同一电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)核酸靶的不同区域的两种或更多种反义化合物。本文阐述了反义化合物的许多实例,其它的可选自本领域已知的适当的化合物。两种或更多种组合的化合物可一起或顺序地使用。

[0258] 给药:

[0259] 认为治疗性组合物的配制及其随后的施用(给药)在本领域技术人员的能力范围

内。给药依赖于待治疗的疾病状态的严重度和响应性,治疗的时期持续数天到数月,或直到实现治愈或实现疾病状态的减轻。最佳给药计划可从患者体内药物积累的测量来计算。本领域普通技术人员可容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。最佳剂量可根据单独寡核苷酸的相对效力而变化,通常可基于在有效的体外和体内动物模型中有效的EC50来估算。通常,剂量是每kg体重从0.01 μ g至100g,可每天、每周、每月或每年一次或多次,或甚至每2至20年一次地提供。本领域普通技术人员可基于测量的药物在体液或组织中的停留时间和浓度容易地估算重复率。在成功治疗之后,可能期望对患者进行维持疗法以阻止疾病状态复发,其中寡核苷酸以维持剂量施用,范围从每kg体重0.01 μ g至100g,每天一次或多次,至每20年一次。

[0260] 在实施方案中,患者以至少约1、至少约2、至少约3、至少约4、至少约5、至少约6、至少约7、至少约8、至少约9、至少约10、至少约15、至少约20、至少约25、至少约30、至少约35、至少约40、至少约45、至少约50、至少约60、至少约70、至少约80、至少约90或至少约100mg/kg体重的药物剂量治疗。反义寡核苷酸的某些注射剂量描述于,例如,美国专利No.7,563,884“Antisense modulation of PTP1B expression”,通过引用整体并入本文。

[0261] 尽管以上已经描述了本发明多种实施方案,应理解的是,它们仅以示例而非限制的方式呈现。可根据本公开内容对公开的实施方案进行多种改变而不偏离本发明的主旨或范围。因此,本发明的宽度和范围不应限于任何上述的实施方案。

[0262] 本文提及的所有文件通过引用并入本文。本申请中提及的所有出版物和专利文件为了所有目的通过引用并入本文,其程度如同每个单独出版物或专利文件被单独地提及。通过在本文件中提及多个参考文献,申请人不承认任何特定参考文献是本发明的“现有技术”。本发明组合物和方法的实施方案在以下实施例中阐述。

实施例

[0263] 以下非限制性实施例用于阐述本发明的选定实施方案。应理解的是,所示组分的成分的比例和其它选择方面的改变对于本领域技术人员是明显的,并且在本发明实施方案范围中。

[0264] 实施例1:对与电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)反义的核酸分子和/或SCNA多核苷酸的有义链有特异性的反义寡核苷酸的设计

[0265] 如上所述,术语“对…有特异性的寡核苷酸”或“寡核苷酸靶”是指具有(i)能够与靶向基因的一部分形成稳定双链体,或(ii)能够与靶基因的mRNA转录物的一部分形成稳定双链体的序列的寡核苷酸。

[0266] 通过利用自动鉴定每个给定序列中的与具有期望解链温度(通常50-60 $^{\circ}$ C)的靶多核苷酸序列形成杂交物且不形成自身二聚体或其它复杂的二级结构的19-25个核苷酸的子序列的计算机程序(例如IDT AntiSense Design, IDT OligoAnalyzer)来便于选择适当的寡核苷酸。

[0267] 通过利用自动比对核酸序列并指明同一性或同源性的区域的计算机程序来便于选择适当的寡核苷酸。这种程序用来比较获得的核酸序列,例如通过搜寻数据库例如GenBank或通过对PCR产物测序。比较来自一系列基因和给定基因组的基因间区域的核酸序列允许选择在物种之间展示适当的对目标基因的特异性程度的核酸序列。这些方案允许选

择展现与待控制的受治疗者中的靶核酸序列的高程度互补性和与其它给定基因组中的其它核酸序列的较低程度互补性的寡核苷酸。本领域技术人员将认识到,在选择用于本发明的基因的适当区域方面存在相当大的自由。

[0268] 当反义化合物与靶核酸的结合干扰靶核酸的正常功能以导致功能和/或活性的调节时,该化合物是“可特异性杂交的”,且在期望特异性结合的条件下(即,在体内测定或治疗性治疗的情形中的生理条件下,和在体外测定的情形中进行测定的条件下)存在足够程度的互补性以避免反义化合物与非靶核酸序列的非特异性结合。

[0269] 本文所述寡核苷酸的杂交特性可通过本领域已知的一种或多种体外测定来确定。例如,本文所述寡核苷酸的特性可利用解链曲线测定确定靶天然反义与可能的药物分子之间的结合强度来获得。

[0270] 靶天然反义与可能的药物分子(分子)之间的结合强度可利用测量分子间相互作用强度的任何已建立的方法例如解链曲线测定来估算。

[0271] 对于天然反义/分子复合体,解链曲线测定确定双链向单链构象的快速转变发生时的温度。这一温度被广泛接受作为两种分子之间相互作用强度的可靠量度。

[0272] 解链曲线测定可利用对应分子结合位置的实际天然反义RNA分子或合成的DNA或RNA核苷酸的cDNA拷贝进行。多种包含所有进行这一测定所必需的试剂的试剂盒是可获得的(例如,Applied Biosystems Inc.MeltDoctor试剂盒)。这些试剂盒包括包含双链DNA(dsDNA)结合染料之一(例如ABI HRM染料、SYBR Green、SYTO等等)的适当的缓冲溶液。dsDNA染料的特性是使得它们在游离形式几乎不发出荧光,但当结合dsDNA时是高度荧光的。

[0273] 为了进行测定,将cDNA或相应的寡核苷酸与由具体制造商的方案规定的浓度的分子混合。将混合物加热到95℃以使所有预形成的dsDNA复合体解离,然后缓慢冷却到室温或试剂盒制造商规定的其它较低温度以允许DNA分子退火。然后将新形成的复合体缓慢加热到95℃,同时连续收集反应产生的荧光的量的数据。荧光强度与反应中存在的dsDNA的量成反比。数据可利用与试剂盒相容的实时PCR仪器(例如ABI's StepOne Plus实时PCR系统或LightTyper instrument,Roche Diagnostics,Lewes,UK)来收集。

[0274] 利用适当的软件(例如LightTyper(Roche)或SDS Dissociation Curve,ABI)将荧光相对于温度的负导函数(y轴上的 $-d(\text{荧光})/dT$)对温度(x轴)绘图来构建熔融峰。分析数据以鉴定dsDNA复合体向单链分子快速转变的温度。这一温度称为 T_m ,与两种分子之间相互作用的强度成正比。通常, T_m 将超过40℃。

[0275] 实施例2:SCNA多核苷酸的调节

[0276] 以反义寡核苷酸处理HepG2细胞

[0277] 在37℃和5%CO₂下使来自ATCC(cat#HB-8065)的HepG2细胞在生长培养基(MEM/EBSS(Hyclone cat#SH30024,或Mediatech cat#MT-10-010-CV)+10%FBS(Mediatech cat#MT35-011-CV)+青霉素/链霉素(Mediatech cat#MT30-002-CI))中生长。实验前一天,将细胞以 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度重新铺板到6孔板中并且在37℃和5%CO₂下孵育过夜。在实验当天将6孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基。将所有反义寡核苷酸稀释到20μM的浓度。将此溶液的2μl与400μl Opti-MEM培养基(Gibco cat#31985-070)和4μl Lipofectamine2000(Invitrogen cat#11668019)在室温一起孵育20min,然后施加到带有HepG2细胞的6孔板中

的每个孔。代替寡核苷酸溶液的包括2 μ l水的类似混合物用于模拟转染的对照。在37℃和5%CO₂培养3-18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸48h后,去除培养基且利用来自Promega的SV总RNA分离系统(cat#Z3105)或来自Qiagen的RNeasy总RNA分离试剂盒(cat#74181)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600ng的RNA加入到利用来自Thermo Scientific的Verso cDNA试剂盒(cat#AB1453B)或高容量cDNA逆转录试剂盒(cat#4368813)如制造商的方案所述地进行的逆转录反应中。来自这一逆转录反应的cDNA用于利用ABI Taqman基因表达混合物(cat#4369510)和由ABI(人SCNA的Applied Biosystems Taqman基因表达测定:Hs00374696_m1、Hs00897350_m1或Hs00897341_m1,由Applied Biosystems Inc., Foster City CA)设计的引物/探针通过实时PCR监测基因表达。利用StepOne Plus Real Time PCR Machine(Applied Biosystems)使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。

[0278] 以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。

[0279] 结果:实时PCR结果显示,用针对SCN1A反义BG724147的反义寡核苷酸处理后48h, HepG2细胞中的SCN1AmRNA的水平显著增加(图1、4)。针对SCN1A反义BG724147和Hs.662210设计的其他寡核苷酸未增加SCN1A水平(图2、3)。

[0280] 实施例3:通过用靶向SCNA特异性天然反义转录物反义寡核苷酸处理的SCNA mRNA在不同不同系中的上调

[0281] 在实施例3中,在一组不同细胞系中以20nM的终浓度筛选靶向SCN1A特异性天然反义转录物的具有不同化学的反义寡核苷酸。所用的细胞系源自不同的器官和不同的动物种类。下面的数据证实,通过调节SCN1A特异性天然反义转录物的功能对SCN1A mRNA/蛋白的上调并不限于单个寡核苷酸、组织或种类并且因此表示一般现象。

[0282] 材料和方法

[0283] 原代人成纤维细胞携带Dravet综合征相关的突变。在37℃和5%CO₂下、使携带由N.Kenyon博士(University of Miami)引入到培养物中的Dravet综合征相关的突变E1099X的原代人皮肤成纤维细胞生长于由 α -MEM(Gibco, cat:12561-056)+10%FBS(Mediatech, cat:35-015CV)+1%抗真菌剂-抗生素(Gibco, cat:15240-062)组成的生长培养基中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法,实验前一天将生长培养基中的细胞以约2x10⁵/孔的密度重新铺板于6孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天,将6孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基(1.5ml/孔)并且将细胞以反义寡核苷酸给药。所有反义寡核苷酸由IDT Inc.(Coralville, IA)或Exiqon(Vedbaek, Denmark)制备。所有寡核苷酸的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20 μ M的溶液。为了向每孔给药,将此溶液的2 μ l与400 μ l Opti-MEM培养基(Gibco cat#31985-070)和4 μ l Lipofectamine 2000(Invitrogen cat#11668019)在室温一起孵育20min,然后逐滴施加至带有细胞的6孔板中的一个孔。代替寡核苷酸溶液的包括2 μ l水的类似混合物用于模拟转染的对照。此外,相同浓度的失活寡核苷酸CUR-1462用作对照。在37℃和5%CO₂下孵育约18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸后48h去除培养基,并且利用来自Promega的SV总RNA分离系统(cat#Z3105)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600毫微克纯化的总RNA加至利用来自Invitrogen的Superscript VILO cDNA Synthesis试

试剂盒(cat#11754-250)如制造商的方案所述地进行的逆转录反应中。来自该逆转录反应的cDNA用于通过利用ABI Taqman基因表达混合物(cat#4369510)和由ABI(人SCN1A的测定Hs00374696_m1、Hs00897350_m1或Hs00897341_m1)设计的引物/探针通过实时PCR监测基因表达。使用所有三个测定获得的结果是非常类似的。利用StepOne plus实时PCR系统(Applied Biosystems)使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。18S的测定通过ABI来生产(cat#4319413E)。以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。对于替代性同一天方法,类似地进行所有程序,但是第一天在将细胞分配到6孔板后即刻以反义寡核苷酸向细胞给药。

[0284] SK-N-AS细胞系。在37℃和5%CO₂下使来自ATCC的SK-N-AS人成神经细胞瘤细胞(cat#CRL-2137)生长于生长培养基(DMEM(Mediatech cat#10-013-CV)+10%FBS(Mediatech cat#MT35-011-CV)+青霉素/链霉素(Mediatech cat#MT30-002-CI)+非必需氨基酸(NEAA)(HyClone SH30238.01))中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法,实验前一天将生长培养基中的细胞以约3x10⁵/孔的密度重新铺板于6孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天,将6孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基(1.5ml/孔)并且将细胞以反义寡核苷酸给药。所有反义寡核苷酸由IDT Inc.(Coralville, IA)或Exiqon(Vedbaek, Denmark)制备。所有寡核苷酸的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20μM的溶液。为了向每孔给药,将此溶液的2μl与400μl Opti-MEM培养基(Gibco cat#31985-070)和4μl Lipofectamine 2000(Invitrogen cat#11668019)在室温一起孵育20min,然后逐滴施加至带有细胞的6孔板中的一个孔。代替寡核苷酸溶液的包括2μl水的类似混合物用于模拟转染的对照。此外,相同浓度的失活寡核苷酸CUR-1462用作对照。在37℃和5%CO₂下孵育约18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸后48h去除培养基,并且利用来自Promega的SV总RNA分离系统(cat#Z3105)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600毫微克纯化的总RNA加至利用来自Invitrogen的Superscript VILO cDNA Synthesis试剂盒(cat#11754-250)如制造商的方案所述地进行的逆转录反应中。来自该逆转录反应的cDNA用于通过利用ABI Taqman基因表达混合物(cat#4369510)和由ABI(人SCN1A的测定Hs00374696_m1、Hs00897350_m1或Hs00897341_m1)设计的引物/探针通过实时PCR监测基因表达。使用所有三个测定获得的结果是非常类似的。利用StepOne plus实时PCR系统(Applied Biosystems)使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。18S的测定由ABI制备(cat#4319413E)。以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。对于替代性同一天方法,类似地进行所有程序,但是第一天在将细胞分配到6孔板后即刻以反义寡核苷酸向细胞给药。

[0285] CHP-212细胞系。在37℃和5%CO₂下使来自ATCC的CHP-212人成神经细胞瘤细胞(cat#CRL-2273)生长于生长培养基(1:MEM和F12(分别ATCC cat#30-2003和Mediatech cat#10-080-CV)+10%FBS(Mediatech cat#MT35-011-CV)+青霉素/链霉素(Mediatech cat#MT30-002-CI)的混合物)中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法,实验前一天将生长培养基中的细胞以约2x10⁵/孔的密度重新铺板于6孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天,将6孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基(1.5ml/孔)

并且将细胞以反义寡核苷酸给药。所有反义寡核苷酸由IDT Inc. (Coralville, IA) 或Exiqon (Vedbaek, Denmark) 制备。所有寡核苷酸的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20 μ M的溶液。为了向每孔给药,将此溶液的2 μ l与400 μ l Opti-MEM培养基 (Gibco cat#31985-070) 和4 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat#11668019) 在室温一起孵育20min,然后逐滴施加至带有细胞的6孔板中的一个孔。代替寡核苷酸溶液的包括2 μ l水的类似混合物用于模拟转染的对照。此外,相同浓度的失活寡核苷酸CUR-1462用作对照。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育约18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸后48h去除培养基,并且利用来自Promega的SV总RNA分离系统 (cat#Z3105) 按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600毫微克纯化的总RNA加至利用来自Invitrogen的Superscript VIL0 cDNA Synthesis试剂盒 (cat#11754-250) 如制造商的方案所述地进行的逆转录反应中。来自该逆转录反应的cDNA用于通过利用ABI Taqman基因表达混合物 (cat#4369510) 和由ABI (人SCN1A的测定Hs00374696_m1、Hs00897350_m1或Hs00897341_m1) 设计的引物/探针通过实时PCR监测基因表达。使用所有三个测定获得的结果是非常类似的。利用StepOne plus实时PCR系统 (Applied Biosystems) 使用以下PCR循环:50 $^{\circ}$ C持续2min、95 $^{\circ}$ C持续10min、40个循环的(95 $^{\circ}$ C持续15秒、60 $^{\circ}$ C持续1min)。18S的测定通过ABI来生产 (cat#4319413E)。以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。对于替代性同一天方法,类似地进行所有程序,但是第一天在将细胞分配到6孔板后即刻以反义寡核苷酸向细胞给药。

[0286] Vero76细胞系。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下使来自ATCC的Vero76African绿猴胚胎肾细胞 (cat#CRL-1587) 生长于生长培养基 (达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (Cellgrow 10-013-CV) +5%FBS (Mediatech cat#MT35-011-CV)+青霉素/链霉素 (Mediatech cat#MT30-002-CI)) 中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法,实验前一天将生长培养基中的细胞以约105/孔的密度重新铺板于6孔板中并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育过夜。第二天,将6孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基 (1.5ml/孔) 并且将细胞以反义寡核苷酸给药。所有反义寡核苷酸由IDT Inc. (Coralville, IA) 或Exiqon (Vedbaek, Denmark) 制备。所有寡核苷酸的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20 μ M的溶液。为了向每孔给药,将此溶液的2 μ l与400 μ l Opti-MEM培养基 (Gibco cat#31985-070) 和4 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat#11668019) 在室温一起孵育20min,然后逐滴施加至带有细胞的6孔板中的一个孔。代替寡核苷酸溶液的包括2 μ l水的类似混合物用于模拟转染的对照。此外,相同浓度的失活寡核苷酸CUR-1462用作对照。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育约18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸后48h去除培养基,并且利用来自Promega的SV总RNA分离系统 (cat#Z3105) 按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600毫微克纯化的总RNA加至利用来自Invitrogen的Superscript VIL0 cDNA Synthesis试剂盒 (cat#11754-250) 如制造商的方案所述地进行的逆转录反应中。来自该逆转录反应的cDNA用于通过利用ABI Taqman基因表达混合物 (cat#4369510) 和由ABI (人SCN1A的测定Hs00374696_m1、Hs00897350_m1或Hs00897341_m1) 设计的引物/探针通过实时PCR监测基因表达。利用StepOne plus实时PCR系统 (Applied Biosystems) 使用以下PCR循环:50 $^{\circ}$ C持续2min、95 $^{\circ}$ C持续10min、40个循环的(95 $^{\circ}$ C持续15秒、60 $^{\circ}$ C持续1min)。18S的测定通过ABI来生产 (cat#4319413E)。以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样

品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。对于替代性同一天方法,类似地进行所有程序,但是第一天在将细胞分配到6孔板后即刻以反义寡核苷酸向细胞给药。

[0287] 3T3细胞系。在37℃和5%CO₂下使来自ATCC的3T3小鼠胚胎成纤维细胞(cat#CRL-1658)生长于生长培养基(达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Cellgrow 10-013-CV)+10%胎牛血清(Cellgrow 35-22-CV)+青霉素/链霉素(Mediatech cat#MT30-002-CI))中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法,实验前一天将生长培养基中的细胞以约105/孔的密度重新铺板于6孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天,将6孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基(1.5ml/孔)并且将细胞以反义寡核苷酸给药。所有反义寡核苷酸由IDT Inc. (Coralville, IA) 或Exiqon (Vedbaek, Denmark) 制备。所有寡核苷酸的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20μM的溶液。为了向每孔给药,将此溶液的2μl与400μl Opti-MEM培养基(Gibco cat#31985-070)和4μl Lipofectamine 2000(Invitrogen cat#11668019)在室温一起孵育20min,然后逐滴施加至带有细胞的6孔板中的一个孔。代替寡核苷酸溶液的包括2μl水的类似混合物用于模拟转染的对照。此外,相同浓度的失活寡核苷酸CUR-1462用作对照。在37℃和5%CO₂下孵育约18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸后48h去除培养基,并且利用来自Promega的SV总RNA分离系统(cat#Z3105)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600毫微克纯化的总RNA加至利用来自Invitrogen的Superscript VILO cDNA Synthesis试剂盒(cat#11754-250)如制造商的方案所述地进行的逆转录反应中。来自该逆转录反应的cDNA用于通过利用ABI Taqman基因表达混合物(cat#4369510)和由ABI(人SCN1A的测定Hs00374696_m1、Hs00897350_m1或Hs00897341_m1)设计的引物/探针通过实时PCR监测基因表达。使用所有三个测定获得的结果是非常类似的。利用StepOne plus实时PCR系统(Applied Biosystems)使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。18S的测定通过ABI来生产(cat#4319413E)。以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。对于替代性同一天方法,类似地进行所有程序,但是第一天在将细胞分配到6孔板后即刻以反义寡核苷酸向细胞给药。

[0288] HepG2细胞系。在37℃和5%CO₂下使来自ATCC的HepG2人肝细胞癌细胞(cat#HB-8065)生长于生长培养基(MEM EBSS(Hyclone cat#SH30024,或Mediatech cat#MT-10-010-CV)+10%FBS(Mediatech cat#MT35-011-CV)+青霉素/链霉素(Mediatech cat#MT30-002-CI))中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法,实验前一天将生长培养基中的细胞以约3x105/孔的密度重新铺板于6孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天,将6孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基(1.5ml/孔)并且将细胞以反义寡核苷酸给药。所有反义寡核苷酸由IDT Inc. (Coralville, IA) 或Exiqon (Vedbaek, Denmark) 制备。所有寡核苷酸的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20μM的溶液。为了向每孔给药,将此溶液的2μl与400μl Opti-MEM培养基(Gibco cat#31985-070)和4μl Lipofectamine 2000(Invitrogen cat#11668019)在室温一起孵育20min,然后逐滴施加至带有细胞的6孔板中的一个孔。代替寡核苷酸溶液的包括2μl水的类似混合物用于模拟转染的对照。此外,相同浓度的失活寡核苷酸CUR-1462用作对照。在37℃和5%CO₂下孵育约18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸

后48h去除培养基,并且利用来自Promega的SV总RNA分离系统(cat#Z3105)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600毫微克纯化的总RNA加至利用来自Invitrogen的Superscript VILO cDNA Synthesis试剂盒(cat#11754-250)如制造商的方案所述地进行的逆转录反应中。来自该逆转录反应的cDNA用于通过利用ABI Taqman基因表达混合物(cat#4369510)和由ABI(人SCN1A的测定Hs00374696_m1、Hs00897350_m1或Hs00897341_m1)设计的引物/探针通过实时PCR监测基因表达。使用所有三个测定获得的结果是非常类似的。利用StepOne plus实时PCR系统(Applied Biosystems)使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。18S的测定通过ABI来生产(cat#4319413E)。以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。对于替代性同一天方法,类似地进行所有程序,但是第一天在将细胞分配到6孔板后即刻以反义寡核苷酸向细胞给药。

[0289] 结果。与模拟转染的对照相比,用20nM反义寡核苷酸处理后不同细胞系中的SCN1A mRNA水平示于表2中。如由数据可见,一些寡核苷酸当以20nM施用时在上调SCN1A mRNA水平方面具有高度活性并且显示在若干物种(人、非洲绿猴和小鼠)中、在源自不同器官/细胞类型(肝、肾、脑、胚胎成纤维细胞)的细胞系和携带SCN1A突变的原代皮肤成纤维细胞中一贯地上调。SCN1A蛋白在携带Dravet突变的细胞中的上调证明了用于治疗与SCN1A基因中的突变相关的疾病的方法的适合性。一些针对天然反义序列设计的寡核苷酸不影响或仅略微影响所有或一些所测试的细胞系中的SCN1A mRNA水平。这些差异与指示寡核苷酸的结合可依赖于寡核苷酸的靶序列的二级和三级结构的文献数据是一致的。特别是,用与SCN1A天然反义序列无同源性但具有类似化学的寡核苷酸(CUR-1462)处理的细胞中的SCN1A水平与模拟转染的对照无显著差异,这证实靶向寡核苷酸的作用不依赖于这些分子的非特异性毒性。

[0290] 实施例4:通过用靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸处理的不同细胞系中SCNA mRNA上调的剂量依赖性

[0291] 在实施例4中,在一组不同细胞系中以5至80nM的终浓度筛选靶向SCN1A特异性天然反义转录物的具有不同化学的反义寡核苷酸。所用的细胞系源自不同的器官和不同的动物种类。下面的数据证实,通过调节SCN1A特异性天然反义转录物的功能对SCNA mRNA的上调的程度可通过施加不同量的活性寡核苷酸来改变。

[0292] 材料和方法。SK-N-AS、Vero 76和携带Dravet突变的原代人成纤维细胞如实施例2中所述地用反义寡核苷酸处理,除了使用寡核苷酸和Lipofectamine 2000浓度处理每个孔。调节寡核苷酸和Lipofectamine 2000浓度以确保5、10、20、40和80nM的终寡核苷酸浓度以及Lipofectamine 2000和20μM寡核苷酸储备溶液2:1的比率(v:v)。

[0293] 结果。剂量响应实验的结果已证实,针对SCN1A特异性天然反义RNA靶向的反义寡核苷酸可诱导SCN1A mRNA的剂量依赖性上调(图1-3)。在某些情况下,这种上调在较高剂量下是非常有效的(最高为60倍)(图1-3)。不同细胞系中的由相同核苷酸诱导的上调的程度看似不同,例如原代成纤维细胞中的以40nM达到的上调为10-40倍的水平,而Vero 76细胞中的由相同寡核苷酸以相同浓度引起的上调为2-6倍(图1 vs图3)。这些差异可归因于不同细胞系的不同转染效率和/或由它们表达的各种反馈途径。大多数寡核苷酸的作用在约40nM下达到稳定水平,除了SCN1A成纤维细胞中的CUR-1764和CUR-1770以及在Vero 76细胞中测试的所有寡核苷酸,其在所测试的最高浓度下也未达到稳定水平(图1-3)。

[0294] 实施例5:通过靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸的SCNA mRNA上调的序列特异性

[0295] 在实施例5中,在所设计的实验中测试靶向SCN1A特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸以证实由寡核苷酸引起的SCN1A上调独立于与所用的寡核苷酸化学相关的非特异性毒性。下面的数据证实,通过调节SCN1A特异性天然反义转录物的功能对SCN1A mRNA的上调的程度仅取决于活性寡核苷酸的量,并且不依赖于具有类似化学的分子的总量。

[0296] 材料和方法。Vero 76和携带Dravet突变的原代人成纤维细胞如实施例2中所述地用反义寡核苷酸处理,除了用于处理每孔的寡核苷酸浓度。活性寡核苷酸与失活寡核苷酸(CUR-1462)共施用,所述失活寡核苷酸具有类似化学但在人基因组中没有已知靶并且对所测试的多个基因的表达没有影响(数据未示出)。寡核苷酸的总量以及Lipofectamine 2000的量保持不变,而活性寡核苷酸在混合物中的比例是变化的。调节寡核苷酸浓度以确保5、10、20和40nM的终活性寡核苷酸浓度和40nM的总寡核苷酸浓度(活性+非活性)。

[0297] 如由数据可见(图7),针对SCN1A天然反义靶向的寡核苷酸的剂量依赖性效应不是由与此类分子潜在相关的非特异性毒性引起的。SCN1A mRNA水平取决于用于处理它们的活性寡核苷酸的剂量(图7)。

[0298] 实施例6:通过靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸的SCNA mRNA上调的靶特异性

[0299] 在实施例6中,在所设计的实验中测试靶向SCN1A特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸以证实其靶(即SCN1A)的特异性。下面的数据证实,通过调节SCN1A特异性天然反义转录物的功能对SCN1A mRNA的上调受限于SCN1A mRNA并且不影响相关钠通道SCN9A、SCN8A、SCN7A、SCN3A和SCN2A。

[0300] 材料和方法。Vero 76和携带Dravet突变的原代人成纤维细胞如实施例3中所述地用反义寡核苷酸处理。如实施例2中所述地对分离的RNA的后处理进行分析,除了用于运行实时PCR的Taqman基因表达测定检测SCN9A、SCN8A、SCN7A、SCN3A和SCN2A通道的mRNA。用于人SCN9A、SCN8A、SCN7A、SCN3A和SCN2A通道的 α 亚基的测定获自ABI Inc. (分别为cat# Hs00161567_m1、Hs00274075_m1、Hs00161546_m1、Hs00366902_m1和Hs00221379_m1)。

[0301] 结果。如示于图8,用寡核苷酸CUR-1916和CUR-1770的处理未显著影响SCN8A和SCN9A通道在携带Dravet突变的人成纤维细胞中的表达。处理之前或之后在这些细胞中未检测出SCN7A、SCN3A和SCN2A通道的表达(数据未示出)。数据证实了使用针对给定基因的天然反义RNA的寡核苷酸的基因表达调节具有特异性。

[0302] 实施例7:靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸的稳定性

[0303] 在实施例7中,在所设计的实验中测试两批靶向SCN1A特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸以检查其于4℃在稀(1mM)水溶液中贮存后的稳定性。下面的数据显示寡核苷酸可在这些条件下稳定至少6个月的时间而没有显著的活性损失。

[0304] 材料和方法。Veto 76细胞如实施例2中所述地用不同的两批反义寡核苷酸处理。于2010年8月和2011年3月合成该批次。于2010年8月合成的寡核苷酸以1mM水溶液贮存于4℃。于2011年3月合成的寡核苷酸在合成后3天内以冻干形式装运并且在到达后直接进行测试。

[0305] 结果:如示于图9,在4℃下寡核苷酸在水溶液中贮存6个月后生物活性没有显著损

失。

[0306] 实施例8:用靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸处理的携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中的SCNA蛋白上调

[0307] 该实验的目的是为了排序反义寡核苷酸CUR-1740、CUR-1770和CUR-1916,根据其上调在携带Dravet综合征相关的突变的成纤维细胞中的SCNA蛋白表达的能力。

[0308] 材料和方法。在37℃和5%CO₂下、使携带由N.Kenyon博士 (University of Miami) 引入到培养物中的Dravet综合征相关的突变的成纤维细胞生长于由a-MEM (Gibco, cat: 12561-056) +10% FBS (Mediatech, cat: 35-015CV) +1% 抗真菌剂-抗生素 (Gibco, cat: 15240-062) 组成的生长培养基中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法,实验前一天将生长培养基中的细胞以约4x10⁴/孔的密度重新铺板于24孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天,将24孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基 (1ml/孔) 并且将细胞以反义寡核苷酸CUR-1740、CUR-1770和CUR-1916给药。所有反义寡核苷酸由 IDT Inc. (Coralville, IA) 或 Exiqon (Vedbaek, Denmark) 制备。寡核苷酸CUR-1740、CUR-1770和CUR-1916的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20μM的溶液。为了向每孔以20nM的终浓度给药,在室温下将1μl 20uM寡核苷酸储备溶液用200μl Opti-MEM培养基 (Gibco cat#31985-070) 和2μl Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat#11668019) 孵育20min,然后逐滴施加至带有细胞的24孔板中的一个孔。为了实现5、10、40和80nM的终浓度,相应地调节所用的20μM寡核苷酸储备液的体积。20μM寡核苷酸储备溶液与Lipofectamine2000的比率为1:2(v:v)。包括8μl水而不是寡核苷酸溶液以及相应体积的Lipofectamine 2000的类似混合物用于模拟转染的对照。在37℃和5%CO₂下孵育约18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸后48h去除培养基,将细胞用不含钙和镁的达尔伯克氏磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (Mediatech.cat#21-031-CV) 洗涤3次。然后弃去PBS,在-20℃使用300μl 100%甲醇将细胞在24孔板中固定15min。除去甲醇并用PBS洗涤后,在21℃将细胞用3%过氧化氢 (Fisher Chemical cat#H325-100) 孵育5min。将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后在21℃用300μl牛血清蛋白 (BSA) (Sigma cat#A-9647) 在0.1%的PBS溶液中孵育30min。将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后在21℃用300μl抗生物素蛋白溶液 (Vector Laboratories cat#SP-2001) 孵育30min。将细胞用PBS短暂漂洗3次,然后在21℃用生物素溶液 (Vector Laboratories cat#SP-2001) 孵育30min。将细胞用PBS洗涤3次,然后在4℃孵育过夜,用每孔300μl抗人SCN1A兔抗体 (Abeam cat#ab24820) 以1:250在PBS BSA 0.1%中稀释。在21℃将板平衡5min后,将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后在21℃用以1:200稀释于PBS BSA 0.1%中的山羊抗-兔抗体孵育30min。将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后用300μl Vectastain Elite ABC试剂A+B溶液 (Vector Laboratories cat#PK-6101) 孵育30min;在21℃制备Vectastain Elite ABC试剂A+B溶液,30min后通过相继添加和混合2滴试剂A至5ml PBS中、接着2滴试剂B与细胞一起孵育。在21℃将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后用二氨基联苯胺 (DAB) 过氧化物酶底物溶液 (Vector Laboratories cat#SK-4105) 孵育直至细胞染色;重构DAB过氧化物酶底物溶液,然后将其加至细胞,通过混合具有30μl ImmPACT™ DAB Chromogen浓缩物的1ml ImmPACT™D AB稀释剂。同时,将细胞用PBS短暂洗涤3次并将300μl PBS留于每孔中。在24-孔板的孔内直接分析细胞的染色,使用与Dell Latitude D630膝上型计算机的屏幕上的Nikon Digital-Sight

装置偶联的配备有Nikon DS-R1照相机的倒置Nikon Eclipse TS100显微镜。使用Nikon照相机所提供的软件(NIS-Elements D 3.0)制作各个孔的照片。

[0309] 结果。测试的所有反义寡核苷酸有效地上调SCN1A蛋白,CUR-1770和CUR-1916为最好的两个(图10)。

[0310] 实施例9:用靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸处理的SK-N-AS细胞中的SCNA蛋白上调

[0311] 该实验的目的是为了排序反义寡核苷酸CUR-1740、CUR-1764、CUR-1770和CUR-1916,根据其上调SK-N-AS细胞中的SCN1A蛋白表达的能力。SK-N-AS为人成神经细胞瘤细胞系。

[0312] 材料和方法。在37℃和5%CO₂下、使来自ATCC的SK-N-AS人成神经细胞瘤细胞(cat#CRL-2137)生长于生长培养基(DMEM(Mediatech cat#10-013-CV)+10%FBS(Mediatech cat#MT35-011-CV)+青霉素链霉素(Mediatech cat#MT30-002-CI)+非必需氨基酸(NEAAXHyClone SH30238.01))中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法,实验前一天将生长培养基中的细胞以约5x10⁴/孔的密度重新铺板于24孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天,将24孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基(1ml/孔)并且将细胞以反义寡核苷酸CUR-1740、CUR-1764、CUR-1770和CUR-1916给药。所有反义寡核苷酸由IDT Inc. (Coralville, IA) 或Exiqon (Vedbaek, Denmark) 制备。寡核苷酸CUR-1740、CUR-1764、CUR-1770和CUR-1916的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20μM的溶液。为了向每孔以20nM的终浓度给药,在室温下将1μl 20uM寡核苷酸储备溶液用200μl Opti-MEM培养基(Gibco cat#31985-070)和2μl Lipofectamine 2000(Invitrogen cat#11668019)孵育20min,然后逐滴施加至带有细胞的24孔板中的一个孔。为了实现5、10、40和80nM的终浓度,相应地调节所用的20μM寡核苷酸储备液的体积。20μM寡核苷酸储备溶液与Lipofectamine 2000的比率为1:2(v:v)。包括8μl水而不是寡核苷酸溶液以及相应体积的Lipofectamine 2000的类似混合物用于模拟转染的对照。在37℃和5%CO₂下孵育约18h后,将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸后48h去除培养基,将细胞用不含钙和镁的达尔伯克氏磷酸盐缓冲盐水(PBS)(Mediatech.cat#21-031-CV)洗涤3次。然后弃去PBS,在-20℃使用300μl 100%甲醇将细胞在24孔板中固定15min。除去甲醇并用PBS洗涤后,在21℃将细胞用3%过氧化氢(Fisher Chemical cat#H325-100)孵育5min。将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后在21℃用300μl牛血清蛋白(BSA)(Sigma cat#A-9647)在0.1%的PBS溶液中孵育30min。将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后在21℃用300μl抗生物素蛋白溶液(Vector Laboratories cat#SP-2001)孵育30min。将细胞用PBS短暂漂洗3次,然后在21℃用生物素溶液(Vector Laboratories cat#SP-2001)孵育30min。将细胞用PBS洗涤3次,然后在4℃孵育过夜,用每孔300μl抗人SCN1A兔抗体(Abeam cat#ab24820)以1:250在PBS/BSA0.1%中稀释。在21℃将板平衡5min后,将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后在21℃用以1:200稀释于PBS/BSA 0.1%中的山羊抗-兔抗体孵育30min。将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后用300μl Vectastain Elite ABC试剂A+B溶液(Vector Laboratories cat#PK-6101)孵育30min;在21℃制备Vectastain Elite ABC试剂A+B溶液,30min后通过相继添加和混合2滴试剂A至5ml PBS中、接着2滴试剂B与细胞一起孵育。在21℃将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后用二氨基联苯胺(DAB)过氧化

物酶底物溶液 (Vector Laboratories cat#SK-4105) 孵育直至细胞染色; 重构DAB过氧化物酶底物溶液, 然后将其加至细胞, 通过混合具有30 μ l ImmPACT™ DAB Chromogen浓缩物的1ml ImmPACT™D AB稀释剂。同时, 将细胞用PBS短暂洗涤3次并将300 μ l PBS留于每孔中。在24-孔板的孔内直接分析细胞的染色, 使用与Dell Latitude D630膝上型计算机的屏幕上的Nikon Digital-Sight装置偶联的配备有Nikon DS-R1照相机的倒置Nikon Eclipse TS100显微镜。使用Nikon照相机所提供的软件 (NIS-Elements D 3.0) 制作各个孔的照片。

[0313] 结果: 测试的所有反义寡核苷酸上调SCN1A蛋白, CUR-1764和CUR-1770为最好的两个 (图11)。

[0314] 实施例10: 用靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸处理的Vero 76细胞中的SCNA蛋白上调

[0315] 该实验的目的是为了排序反义寡核苷酸CUR-1740、CUR-1770、CUR-1916、CUR-1924和CUR-1945, 根据其上调Vero 76细胞中的SCN1A蛋白表达的能力。Vero76为草原猴 (vervet 或非洲绿猴) 肾细胞系。

[0316] 材料和方法。在37℃和5%CO₂下、使来自ATCC的Vero76非洲绿猴胚胎肾细胞 (cat# CRL-1587) 生长于生长培养基 (达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (Cellgrow 10-013-CV) +5% FBS (Mediatech.cat#MT35-011-CV) +青霉素/链霉素 (Mediatech.cat#MT30-002-CI)) 中。使用下列方法之一将细胞用反义寡核苷酸处理。对于第二天方法, 实验前一天将生长培养基中的细胞以约4x10⁴/孔的密度重新铺板于24孔板中并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天, 将24孔板中的培养基改变为新鲜生长培养基 (1ml/孔) 并且将细胞以反义寡核苷酸CUR-1740、CUR-1770和CUR-1916给药。所有反义寡核苷酸由IDT Inc. (Coralville, IA) 或Exiqon (Vedbaek, Denmark) 制备。寡核苷酸CUR-1740、CUR-1770、CUR-1916、CUR-1924和CUR-1945的序列均列于表1中。将寡核苷酸的储备溶液在不含DNA酶/RNA酶的无菌水中稀释至20 μ M的溶液。为了向每孔以20nM的终浓度给药, 在室温下将1 μ l 20 μ M寡核苷酸溶液用200 μ l Opti-MEM培养基 (Gibco cat#31985-070) 和2 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat# 11668019) 孵育20min, 然后逐滴施加至带有细胞的24孔板中的一个孔。为了实现5、10、40和80nM的终浓度, 相应地调节所用的20 μ M寡核苷酸储备液的体积。20 μ M寡核苷酸储备溶液与Lipofectamine2000的比率为1:2 (v:v)。包括8 μ l水而不是寡核苷酸溶液以及相应体积的Lipofectamine 2000的类似混合物用于模拟转染的对照。在37℃和5%CO₂下孵育约18h后, 将培养基改变为新鲜生长培养基。加入反义寡核苷酸后48h去除培养基, 将细胞用不含钙和镁的达尔伯克氏磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (Mediatech.cat#21-031-CV) 洗涤3次。然后弃去PBS, 在-20℃使用300 μ l 100%甲醇将Vero 76细胞在24孔板中固定15min。除去甲醇并用PBS洗涤细胞后, 在21℃将细胞用3%过氧化氢 (Fisher Chemical cat#H325-100) 孵育5min。将细胞用PBS洗涤3次, 各5min, 然后在21℃用300 μ l牛血清蛋白 (BSA) (Sigma cat#A-9647) 在0.1%的PBS溶液中孵育30min。将细胞用PBS洗涤3次, 各5min, 然后在21℃用300 μ l抗生物素蛋白溶液 (Vector Laboratories cat#SP-2001) 孵育30min。将细胞用PBS短暂漂洗3次, 然后在21℃用生物素溶液 (Vector Laboratories cat#SP-2001) 孵育30min。将细胞用PBS洗涤3次, 然后在4℃孵育过夜, 用每孔300 μ l抗人SCN1A兔抗体 (Abeam cat#ab24820) 以1:250在PBS BSA0.1%中稀释。在21℃将板平衡5min后, 将细胞用PBS洗涤3次, 各5min, 然后在21℃用以1:200稀释于PBS BSA 0.1%中的山羊抗-兔抗体孵育30min。将细胞用PBS洗

涤3次,各5min,然后用300 μ l Vectastain Elite ABC试剂A+B溶液 (Vector Laboratories cat#PK-6101) 孵育30min;在21 $^{\circ}$ C制备Vectastain Elite ABC试剂A+B溶液,30min后通过相继添加和混合2滴试剂A至5ml PBS中、接着2滴试剂B与细胞一起孵育。在21 $^{\circ}$ C将细胞用PBS洗涤3次,各5min,然后用二氨基联苯胺 (DAB) 过氧化物酶底物溶液 (Vector Laboratories cat#SK-4105) 孵育直至细胞染色;重构DAB过氧化物酶底物溶液,然后将其加至细胞,通过混合具有30 μ l ImmPACTTM DAB Chromogen浓缩物的1ml ImmPACTTM D AB稀释剂。同时,将细胞用PBS短暂洗涤3次并将300 μ l PBS留于每孔中。在24-孔板的孔内直接分析细胞的染色,使用与Dell Latitude D630膝上型计算机的屏幕上的Nikon Digital-Sight装置偶联的配备有Nikon DS-R1照相机的倒置Nikon Eclipse TS100显微镜。使用Nikon照相机所提供的软件 (NIS-Elements D 3.0) 制作各个孔的照片。

[0317] 结果。测试的所有反义寡核苷酸上调SCN1A蛋白,CUR-1764和CUR-1770产生最高的上调(图12)。

[0318] 实施例11:在上调SCNA tnRNA方面强势的靶向SCNA特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调Vero76细胞中的肌动蛋白mRNA

[0319] 该实验的目的是为了检查显示上调SCN1A mRNA和蛋白的靶向SCN1A特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸 (CUR-1924、CUR-1740、CUR-1838) 是否能够调节Vero76非洲绿猴胚胎肾细胞中的其他非相关基因例如肌动蛋白的mRNA。

[0320] 材料和方法。如实施例2中所述地在相同条件下给药来自ATCC的Vero76非洲绿猴胚胎肾细胞系 (cat#CRL-1587)。如实施例2中所述地通过实时PCR定量肌动蛋白mRNA,除了由ABI设计的该时间引物/探针对肌动蛋白特异 (cat#Hs99999903_m1)。数据示出图13中。

[0321] 结果。如示于图13,测试在实施例3和10中显示上调Vero76细胞中的SCN1A mRNA和蛋白的靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸 (CUR-1924、CUR-1740、CUR-1838) 对Vero 76细胞中的肌动蛋白mRNA表达的影响。图13中的数据证实,靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调非相关基因例如肌动蛋白。因此,这些寡核苷酸在上调SCN1A方面具有特异性。

[0322] 实施例12:显示上调SCNA mRNA和蛋白的靶向SCNA特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调携带Dravet相关的突变的原代成纤维细胞中的肌动蛋白mRNA

[0323] 该实验的目的是为了检查显示上调SCN1A mRNA和蛋白的靶向SCN1A特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸 (CUR-1916、CUR-1945) 是否调节在携带Dravet综合征相关的突变E1099X的原代人皮肤成纤维细胞中的其他非相关基因例如肌动蛋白的mRNA。

[0324] 材料和方法。如实施例3中所述地在相同条件下给药携带由N. Kenyon博士 (University of Miami) 引入到培养物中的Dravet综合征相关的突变E1099X的原代人皮肤成纤维细胞。如实施例3中所述地通过实时PCR定量肌动蛋白mRNA,除了由ABI设计的该时间引物/探针对肌动蛋白特异 (cat#Hs99999903_m1)。数据示出图14中。

[0325] 结果:如示于图14中,靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调非相关基因例如肌动蛋白。因此这些寡核苷酸在上调SCN1A方面具有特异性。

[0326] 实施例13:显示上调SCNA mRNA和蛋白的靶向SCNA特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调SK-N-AS细胞中的肌动蛋白mRNA

[0327] 该实验的目的是为了检查显示上调SCN1A mRNA和蛋白的靶向SCN1A特异性天然反

义转录物的反义寡核苷酸 (CUR-1740、CUR-1764、CUR-1770、CUR-1838、CUR-1916) 是否能够调节SK-N-AS人成神经细胞瘤细胞中的其他非相关基因例如肌动蛋白的mRNA。

[0328] 材料和方法。如实施例2中所述地在相同条件下给药来自ATCC的SK-N-AS人成神经细胞瘤细胞 (cat#CRL-2137)。如实施例2中所述地通过实时PCR定量肌动蛋白mRNA,除了由ABI设计的该时间引物/探针对肌动蛋白特异 (cat#Hs99999903_m1)。数据示出图15中。

[0329] 结果。如示于图15,靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸不上调非相关基因例如肌动蛋白。因此这些寡核苷酸在上调SCN1A方面具有特异性。

[0330] 实施例14:肌动蛋白蛋白在用靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸处理的SK-N-AS细胞中不上调

[0331] 该实验的目的是为了确定靶向SCN1A特异性天然反义转录物并且能够上调SCN1A蛋白的寡核苷酸 (CUR-1740、CUR-1764、CUR-1770和CUR-1916) 是否也能够调节表达非相关蛋白例如肌动蛋白在SK-N-AS细胞中的表达。SK-N-AS为人成神经细胞瘤细胞系。

[0332] 材料和方法。如实施例9中所述地在相同条件下使来自ATCC的SK-N-AS人成神经细胞瘤细胞 (cat#CRL-2137) 生长。如实施例8中所述地在相同条件下将细胞固定并且正确地染色,除了第一抗体为以1:500的稀释度使用的兔抗-肌动蛋白 (Abeam cat#ab1801)。使用如实施例9中所述的相同过程在24孔板的孔内直接分析细胞的染色。

[0333] 结果:如示于图16,所测试的反义寡核苷酸中没有有一个上调肌动蛋白蛋白。因此,这些寡核苷酸在上调SCN1A方面具有特异性。

[0334] 实施例15:肌动蛋白蛋白不在用靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸处理的Vero 76细胞中上调

[0335] 该实验的目的是为了确定特异性靶向SCN1A特异性天然反义转录物并且能够上调SCN1A蛋白的反义寡核苷酸 (CUR-1740、CUR-1770、CUR-1916、CUR-1924和CUR-1945) 是否也能够调节非相关基因例如肌动蛋白在Vero76细胞中的蛋白表达。Vero76为草原猴 (vervet 或非洲绿猴) 肾细胞系。

[0336] 材料和方法。如实施例10中所述地在相同条件下使来自ATCC的Vero76非洲绿猴胚胎肾细胞系 (cat#CRL-1587) 生长。如实施例10中所述地在相同条件下将细胞固定并且正确地染色,除了第一抗体为以1:500的稀释度使用的兔抗-肌动蛋白 (Abeam cat#ab1801)。使用如实施例10中所述的相同过程在24孔板的孔内直接分析细胞的染色。

[0337] 结果。如示于图17,所测试的反义寡核苷酸中没有有一个上调肌动蛋白蛋白。因此,这些寡核苷酸在上调SCN1A方面具有特异性。

[0338] 实施例16:肌动蛋白蛋白在用靶向SCNA特异性天然反义转录物的反义寡核苷酸处理的携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中不上调

[0339] 该实验的目的是为了确定靶向SCN1A特异性天然翻译转录物并且能够上调SCNA蛋白的寡核苷酸 (CUR-1740、CUR-1764、CUR-1770、CUR-1838和CUR-1916) 是否也能够调节非相关基因例如肌动蛋白在携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中的蛋白表达。

[0340] 材料和方法。如实施例8中所述地在相同条件下使携带由N. Kenyon博士 (University of Miami) 引入到培养物中的Dravet综合征相关的突变的成纤维细胞生长,除了第一抗体为以1:500的稀释度使用的兔抗-肌动蛋白 (Abeam cat#ab1801)。使用如实施

例8中所述的相同过程在24孔板的孔内直接分析细胞的染色。

[0341] 结果:如示于图18,所测试的反义寡核苷酸中没有有一个上调肌动蛋白蛋白。因此,这些寡核苷酸在上调SCN1A方面具有特异性。

[0342] 实施例17:利用ELISA对在用靶向SCNA特异性天然反义转录物的寡核苷酸处理的携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中的SCNA蛋白的定量

[0343] 该实验的目的是利用ELISA来定量在携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中由于用靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸(CUR-1740、CUR-1770和CUR-1916)的处理而产生的SCN1A蛋白上调的水平。

[0344] 材料和方法。如实施例8中所述地在相同条件下使携带由N. Kenyon博士(University of Miami)引入到培养物中的Dravet综合征相关的突变的成纤维细胞生长但是仅0和80nM浓度的寡核苷酸用于给药。然后对细胞计数并且重新铺板于96孔板中。24小时后,如实施例8和16中所述地在相同条件下正确地固定细胞,除了将所有300 μ l体积减至100 μ l。如实施例8中所述地复制孔用肌动蛋白和SCN1A抗体染色,除了以100 μ l体积进行所有反应。抗-肌动蛋白抗体稀释度为1:500,抗-SCN1A稀释度为1:250且抗-小鼠稀释度为1:250。此外,使用四甲基联苯胺(TMB)过氧化物酶底物溶液(Thermo Scientific cat#N301)代替二氨基联苯胺(DAB)过氧化物酶底物溶液。上清液变成蓝色后,将其转移至新96孔板(Greiner bio one cat#65121)并且加入1M硫酸。使用Multiskan Spectrum分光光度计(Thermo Scientific)在450nm对吸光度读数。背景信号(用作为一级抗体的抗-小鼠染色的孔的读数)从所有SCN1A和肌动蛋白读数扣除。然后对于每种条件将SCN1A信号对肌动蛋白信号标准化。

[0345] 结果:图19显示,测试的所有反义寡核苷酸(CUR-1740、CUR-1770和CUR-1916)在上调SCN1A蛋白方面是有效的,最高上调40%。

[0346] 实施例18:利用ELISA对在用靶向SCNA特异性天然反义转录物的寡核苷酸处理的Vero76细胞中的SCNA蛋白的定量

[0347] 该实验的目的是利用ELISA来定量在携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中由于用靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸(CUR-1740、CUR-1770、CUR-1916、CUR-1924、CUR-1945)处理而产生的SCN1A蛋白上调的水平

[0348] 材料和方法。实施例10中所述地在相同条件下使Vero76非洲绿猴胚胎肾细胞生长但是仅0和80nM浓度的寡核苷酸用于给药。然后对细胞计数并且重新铺板于96孔板中。24小时后,如实施例8中所述地在相同条件下正确地固定细胞,除了将所有300 μ l体积减至100 μ l。如实施例10和15中所述地复制孔用肌动蛋白和SCN1A抗体染色,除了以100 μ l体积进行所有反应。抗-肌动蛋白抗体稀释度为1:500,抗-SCN1A稀释度为1:250且抗-小鼠稀释度为1:250。此外,使用四甲基联苯胺(TMB)过氧化物酶底物溶液(Thermo Scientific cat#N301)代替二氨基联苯胺(DAB)过氧化物酶底物溶液。上清液变成蓝色后,将其转移至新96孔板(Greiner bio one cat#65121)并且加入1M硫酸。使用Multiskan Spectrum分光光度计(Thermo Scientific)在450nm对吸光度读数。背景信号(用作为一级抗体的抗-小鼠染色的孔的读数)从所有SCN1A和肌动蛋白读数扣除。然后对于每种条件将SCN1A信号对肌动蛋白信号标准化。

[0349] 结果:图20显示,测试的所有反义寡核苷酸(CUR-1740、CUR-1770、CUR-1916、CUR-

1924、CUR-1945) 在上调SCN1A蛋白方面是有效的,最高上调300%。

[0350] 实施例19:利用ELISA对在靶向SCNA特异性天然反义转录物的寡核苷酸处理的SK-N-AS细胞中的SCNA蛋白的定量

[0351] 该实验的目的是利用ELISA来定量SK-N-AS细胞中由于靶向SCN1A特异性天然反义转录物的寡核苷酸(CUR-1740、CUR-1770、CUR-1924和CUR-1945)处理而产生的SCN1A蛋白上调的水平。

[0352] 材料和方法。实施例10中所述地在相同条件下使来自ATCC的SK-N-AS人成神经细胞瘤细胞(cat#CRL-2137)生长但是仅0和20nM浓度的寡核苷酸用于给药。然后对细胞计数并且重新铺板于96孔板中。24小时后,如实施例9中所述地在相同条件下正确地固定细胞,除了将所有300 μ l体积减至100 μ l。如实施例9和13中所述地复制孔用肌动蛋白和SCN1A抗体染色,除了以100 μ l体积进行所有反应。抗-肌动蛋白抗体稀释度为1:500,抗-SCN1A稀释度为1:250且抗-小鼠稀释度为1:250。此外,使用四甲基联苯胺(TMB)过氧化物酶底物溶液(Thermo Scientific cat#N301)代替二氨基联苯胺(DAB)过氧化物酶底物溶液。上清液变成蓝色后,将其转移至新96孔板(Greiner bio one cat#65121)并且加入1M硫酸。使用Multiskan Spectrum分光光度计(Thermo Scientific)在450nm对吸光度读数。背景信号(用作为一级抗体的抗-小鼠染色的孔的读数)从所有SCN1A和肌动蛋白读数扣除。然后对于每种条件将SCN1A信号对肌动蛋白信号标准化。

[0353] 结果:图21显示,测试的所有反义寡核苷酸(CUR-1740、CUR-1770、CUR-1924和CUR-1945)在上调SK-N-AS细胞中的SCN1A蛋白方面是有效的,最高上调500%。

[0354] 实施例20:在HepG2细胞和携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中的天然反义BG724147的检测

[0355] 该实验的目的是确定天然反义BG724147是否存在于人肝细胞癌HepG2细胞系和携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞中。为了实现其,使用从每种细胞类型分离的两种不同的RNA(多聚腺苷酸RNA和总RNA)。在凝胶上对在使用两种细胞类型的连续两轮PCR后获得的PCR产物进行分析。使用BG724147特异性引物类似大小的条带的扩增证实BG724147在两种细胞类型中的存在。

[0356] 材料和方法。RNA的分离。在75cm²培养瓶中以80%融合生长的HepG2细胞或携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞用PBS AccuGENE IX洗涤两次(Lonza Rockeland Inc., Rockeland, ME)。弃去PBS后,将具有 β -巯基乙醇的5ml RLT缓冲液(QIAGEN Inc-USA, Valencia, CA)加至这些细胞并且在-80℃在微量离心管中将细胞溶解产物贮存于1ml等份试样中直至分离总RNA。按照制造商方案使用RNeasy midi试剂盒(QIAGEN Inc.-USA, Valencia, CA)进行来自这些细胞的总RNA分离。简言之,将细胞溶解产物以3000xg离心5min以使溶解产物澄清并且弃去任何沉淀。通过QIAshredder柱(在2ml微量离心管内)将澄清的细胞溶解产物以14800xg离心并且所得匀质化溶解产物与等体积的70%乙醇混合。将与乙醇混合的细胞溶解产物施加至RNeasy midi柱(在15ml锥形管内)并且以3000xg离心5min。将柱用4ml RW1缓冲液洗涤一次,然后用140 μ l在RDD缓冲液中的不含RNA酶的DNA酶经受15min柱上DNA酶消化。通过加入4ml RW1缓冲液并且以3000xg离心柱来终止DNA酶消化。将柱用RPE缓冲液洗涤两次并且与滤器结合的总RNA用150 μ l不含DNA酶和RNA酶的水洗脱。将总RNA贮存于-80℃直至下一步骤。

[0357] 多聚腺苷酸RNA从HepG2细胞的总RNA的分离。利用来自Ambion的磁珠试剂盒(Applied Biosystems/Ambion,Austin,TX),按照制造商方案使用多聚腺苷酸分离法进行多聚腺苷酸RNA从HepG2细胞和携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞的总RNA的分离。简言之,将100 μ l总RNA重新悬浮于不含DNA酶/RNA酶的水至600 μ g/ml的终浓度并且加入等体积的2X结合溶液。此时,将10 μ l寡核苷酸(dT)磁珠置于微量离心管中,通过将该管放置于磁力架上进行补货,并且弃去贮存缓冲液。将50 μ l洗涤液1加至珠子中并且从磁力架移去管,然后弃去洗涤液。此时,将IX结合缓冲液中的来自HepG2细胞的总RNA与磁力珠混合并且在70℃加热5min,然后在轻轻振荡下于室温孵育60min。与磁力珠的多聚腺苷酸RNA通过使用磁力架捕获5min。弃去上清液。用洗涤液1洗涤寡核苷酸(dT)磁珠两次,用洗涤液2洗涤1次以去除非特异性结合的RNA。用磁力架捕获磁力珠并且将200 μ l温热RNA贮备液(于70℃预热5min)加至珠子。通过磁力架捕获磁力珠,贮存上清液(多聚腺苷酸RNA的第一洗脱液)。然后将第二200 μ l温热RNA贮备液(于70℃预热5min)加至珠子。将多聚腺苷酸RNA的第二洗脱液加至第一洗脱液中。此时,在-20℃、使用5M醋酸铵、糖原和100%乙醇使洗脱的RNA沉淀过夜。在4℃将聚RNA以14800xg离心30min。弃去上清液,并且用1ml 70%乙醇洗涤RNA沉淀3次,每次通过在4℃离心10min来回收RNA沉淀。最后,使多聚腺苷酸RNA沉淀重新悬浮于RNA贮备液中,RNA贮备液经加热至70℃以更好地溶解。将多聚腺苷酸RNA贮存于-80℃。

[0358] 将腺苷添加至RNA转录物的3'端。来自HepG2细胞或携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞的总RNA(40g)与终反应体积为100 μ l的2单位的RNA多聚腺苷酸聚合酶(Ambion,Applied Biosystems,St.Austin TX)混合。多聚腺苷酸反应中所用的ATP来自Invitrogen。多聚腺苷酸化后,使用酚氯仿技术纯化RNA,然后进行糖原/醋酸钠沉淀。将该RNA重新悬浮于40 μ l不含DNA酶/RNA酶的水并且用于3'RACE反应(来自Ambion,Applied Biosystems,St.Austin TX的FirstChoice RLM-RACE试剂盒)。

[0359] SCN1A的BG724147天然反义转录物的3'延伸。使用来自Ambion,Applied Biosystems的FirstChoice RLM-RACE试剂盒(St.Austin,TX)进行两组不同的cDNA端3'快速扩增(RACE)反应。一组使用多聚腺苷酸RNA,另一组使用加入一个腺苷的总RNA,多聚腺苷酸RNA和总RNA来自HepG2细胞或携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞。进行连续的两轮PCR。使用在试剂盒中提供的3'外引物和对由OPKO CURNA设计的BG724147特异的5'引物(5'GATTCTCTACAGCAATTGGTA 3')进行第一PCR。在试剂盒中提供的3'外引物和对由OPKO CURNA设计的BG724147特异的5'引物(5'GACATGTAATCACTTTCATCAA 3')进行第二PCR循环。在1%琼脂糖-1xTAE凝胶上运行第二PCR反应。

[0360] 结果:图22显示来自3'RACE实验的第二轮PCR反应的产物,使用来自HepG2细胞的多聚腺苷酸RNA和加入腺苷的总RNA,以及来自携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞的多聚腺苷酸RNA和加入腺苷的总RNA。在来自HepG2细胞和携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞的多聚腺苷酸RNA中观察到完全相同的条带。

[0361] 结论:使用对SCN1A的BG724147天然反义转录物特异的引物的PCR扩增在不同细胞(HepG2细胞和携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞)中产生常见的PCR条带。此外,靶向SCN1A天然反义BG724147的反义寡核苷酸已显示在这些细胞中上调SCN1A mRNA和蛋白,如在实施例2、7和16中显示。该数据表明BG724147的确存在于这两种细胞(HepG2细胞和携带Dravet综合征相关的突变的原代人成纤维细胞)中。

[0362] 实施例21:SCNA天然反义序列BG724147的延伸

[0363] 该实验的目的是通过对所有其序列测序来延伸SCN1A天然反义BG724147的已知序列。原始BG724147RNA转录物获自由Miklos Palkovits获得的人睾丸。由Michael J. Brownstein (于NHGRI)、Shiraki Toshiyuki和Piero Carninci (于RIKEN) 在pBluescriptR载体中制备cDNA文库。cDNA文库由I.M.A.G.E. Consortium (或LLNL) 排列,且于2001年5月由Incyte Genomics, Inc. 对克隆测序。BG724147克隆可得自Open Biosystems (Open Biosystems Products, Huntsville, AL)。2001年,未对BG724147克隆中的cDNA插入物完全测序。OPKO-CURNA获得BG724147克隆并且对整个插入物测序。为了实现这个目的,含有具有BG724147插入物的质粒的细菌克隆获自Open Biosystems并且铺板于具有青霉素的Luria Bertani (LB) -琼脂板以分离单独的集落。然后在5ml LB肉汤中扩增集落。然后含有BG724147插入物的质粒从这些细菌中分离并且递送以供Davis测序法 (Davis, CA) 测序。

[0364] 材料和方法。离含有SCNA天然反义BG724147的cDNA的质粒并对其测序。含有BG724147质粒的冷冻细菌的悬浮液购自Open Biosystems (Open Biosystems Products, cat#4829512), 被稀释1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000倍,然后放置在具有100 μ g/ml青霉素 (Calbiochem, cat#171254) 的Luria Bertani (LB) (BD, cat#244520) -琼脂板 (Falcon, cat#351005) 上。15h后,从板分离以1:1 00000稀释度的20个单独集落的细菌并且单独地生长于5ml LB肉汤 (Fisher Scientific, cat#BP 1426-2) 达15h-24h。此时,将细菌沉淀并且使用来自Promega的PureYieldTM Plasmid Miniprep System试剂盒 (Promega, cat#A1222) 按照制造商的方案分离出质粒 (含有来自BG724147RNA转录物的cDNA)。将分离的DNA稀释至200ng/ml并且递送来自每个集落的12 μ l质粒以供Davis测序法 (Davis, CA) 测序。

[0365] 结果:由Davis测序法获得的序列提供BG724147扩展型 (SEQ ID NO:12)

[0366] 结论:抑制BG724147序列的成功延伸403个核苷酸用作设计对抗SCN1A天然反义转录物BG724147的反义寡核苷酸的基础。

[0367] 尽管已经参照一种或多种实现来说明和描述了本发明,本领域技术人员在阅读和理解说明书和附图后将进行等价的改变和修饰。此外,尽管仅关于多种实现之一公开了本发明的特定特征,这种特征可如所需地与其它实现的一种或多种其它特征组合,如对于任何给定或特定应用可能是期望和有利的。

[0368] 本公开内容的摘要将允许读者快速地确定技术公开内容的性质。应理解的是,提交其并不用于解释或限制所附权利要求书的范围或含义。

序列表

<110> 库尔纳公司

<120> 通过抑制电压门控钠通道 α 亚基(SCNA)的天然反义转录物而治疗 SCNA 相关疾病

<130> SCN1A

<150> US61/357,774

<151> 2010-06-23

<160> 96

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 8133

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

[0001]

aatgtgcagg atgacaagat ggagcaaaca gtgcttgatc caccaggacc tgacagcttc 60

aacttcttca ccagagaatc tcttgccggt attgaaagac gcattgcaga agaaaaggca 120

aagaatccca aaccagacaa aaaagatgac gacgaaaatg gcccaaagcc aatagtgac 180

ttggaagctg gaaagaacct tccattatt tatggagaca ttctccaga gatggtgtca 240

gagcccctgg aggacctgga cccctactat atcaataaga aaactttat agtattgaat 300

aaaggaagg ccattctccg gttcagtgcc acctctgcc tgtacattt aactccctc 360

aatcctctta ggaaaatagc tattaagatt ttgttacatt cattattcag catgctaatt 420

atgtgcacta ttttgacaaa ctgtgtgttt atgacaatga gtaacctcc tgattggaca 480

aagaatgtag aatacacctt cacaggaata tatactttg aatcattat aaaaattatt 540

gcaaggggat tctgtttaga agattttact ttcctcggg atccatggaa ctggctcgat 600

ttcactgtca ttacattgc gtacgtcaca gagtttgtgg acctgggcaa tgtctcggca 660

ttgagaacat tcagagttct ccgagcattg aagacgattt cagtcattcc aggctgaaa 720

	accattgtgg gagccctgat ccagtctgtg aagaagctct cagatgtaat gatcctgact	780
	gtgttctgtc tgagcgtatt tgctctaatt gggctgcagc tgttcattggg caacctgagg	840
	aataaatgta tacaatggcc tccaccaat gcttccttgg aggaacatag tatagaaaag	900
	aatataactg tgaattataa tggtagactt ataatgaaa ctgtctttga gtttgactgg	960
	aagtcataata tcaagattc aagatatcat ttttctctgg agggttttt agatgcacta	1020
	ctatgtggaa atagctctga tgcaggccaa tgtccagagg gatatatgtg tgtgaaagct	1080
	ggtagaaatc ccaattatgg ctacacaagc ttgatacct tcagttgggc tttttgtcc	1140
	ttgtttcgac taatgactca ggacttctgg gaaaatcttt atcaactgac attacgtgct	1200
	gctgggaaaa cgtacatgat atttttgta ttggtcattt tcttgggctc attctaccta	1260
	ataaatttga tcctggctgt ggtggccatg gcctacgagg aacagaatca ggccaccttg	1320
[0002]	gaagaagcag aacagaaaga ggccgaattt cagcagatga ttgaacagct taaaaagcaa	1380
	caggaggcag ctcagcaggc agcaacggca actgcctcag aacattccag agagcccagt	1440
	gcagcaggca ggctctcaga cagctcatct gaagcctcta agttgagttc caagagtgtc	1500
	aaggaaagaa gaaatcggag gaagaaaaga aaacagaaag agcagtctgg tggggaagag	1560
	aaagatgagg atgaattcca aaaatctgaa tctgaggaca gcatcaggag gaaaggtttt	1620
	cgcttctcca ttgaagggaa ccgattgaca tatgaaaaga ggtactctc cccacaccag	1680
	tctttgttga gcatccgtgg ctccctattt tcaccaaggc gaaatagcag aacaagcctt	1740
	ttcagcttta gagggcgagc aaaggatgtg ggatctgaga acgacttcgc agatgatgag	1800
	cacagcacct ttgaggataa cgagagccgt agagattcct tgtttgtgcc ccgacgacac	1860
	ggagagagac gcaacagcaa cctgagtcag accagtaggt catcccggat gctggcagtg	1920
	ttccagcga atgggaagat gcacagcact gtggattgca atgggtgtgg ttcttggtt	1980
	ggtggacctt cagttcctac atcgctgtt ggacagcttc tgccagaggt gataatagat	2040

	aagccagcta ctgatgacaa tggaacaacc actgaaactg aatgagaaa gagaaggta	2100
	agttctttcc acgtttccat ggactttcta gaagatcctt cccaaaggca acgagcaatg	2160
	agtatagcca gcattctaac aaatacagta gaagaacttg aagaatccag gcagaaatgc	2220
	ccaccctgtt ggtataaatt ttccaacata ttctaactct gggactgttc tccatattgg	2280
	ttaaaagtga aacatgttgt caacctgggt gtgatggacc catttgtga cctggccatc	2340
	accatctgta ttgtctaaa tactctttc atggccatgg agcactatcc aatgacggac	2400
	catttcaata atgtgcttac agtaggaaac ttggttttca ctgggatctt tacagcagaa	2460
	atgtttctga aaattattgc catggatcct tactattatt tccaagaagg ctggaatac	2520
	tttgacggtt ttattgtgac gcttagcctg gtagaacttg gactcgccaa tgtggaagga	2580
	ttatctgttc tccgttcatt tcgattgctg cgagttttca agttggcaaa atcttggcca	2640
[0003]	acgttaaata tgctaataaa gatcatcggc aattccgtgg gggctctggg aaatttaacc	2700
	ctcgtcttgg ccatcatcgt cttcattttt gccgtggctg gcatgcagct ctttggtaaa	2760
	agctacaaag attgtgtctg caagatcgcc agtgattgtc aactcccacg ctggcacatg	2820
	aatgacttct tccactcctt cctgattgtg ttccgcgtgc tgtgtgggga gtggatagag	2880
	accatgtggg actgtatgga ggttgctggt caagccatgt gccttactgt cttcatgatg	2940
	gtcatggtga ttgaaacct agtggctctg aatctctttc tggccttgct tctgagctca	3000
	tttagtgcag acaaccttgc agccactgat gatgataatg aatgaataa tctccaaatt	3060
	gctgtggata ggatgcacaa aggagtagct tatgtgaaaa gaaaaatata tgaattatt	3120
	caacagtcct tcattaggaa acaaaagatt ttagatgaaa ttaaaccact tgatgatcta	3180
	aacaacaaga aagacagttg tatgtccaat catacagcag aaattgggaa agatcttgac	3240
	tatcttaaag atgtaaatgg aactacaagt ggtataggaa ctggcagcag tgttgaaaaa	3300
	tacattattg atgaaagtga ttacatgtca ttcataaaca accccagtct tactgtgact	3360

	gtaccaattg ctgtaggaga atctgacttt gaaaatttaa acacggaaga cttagtagt	3420
	gaatcggatc tggaagaaag caaagagaaa ctgaatgaaa gcagtagctc atcagaaggt	3480
	agcactgtgg acatcggcgc acctgtagaa gaacagcccg tagtggaacc tgaagaaact	3540
	cttgaaccag aagcttgttt cactgaaggc tgtgtacaaa gattcaagtg ttgtcaaac	3600
	aatgtggaag aaggcagagg aaaacaatgg tggaacctga gaaggacgtg ttccgaata	3660
	gttgaacata actggtttga gaccttcatt gtttcatga ttctccttag tagtggtgct	3720
	ctggcatttg aagatatata tattgatcag cgaaagacga ttaagacgat gttggaatat	3780
	gctgacaagg ttctcactta cattttcatt ctggaaatgc ttctaaaatg ggtggcatat	3840
	ggctatcaaa catatttcac caatgcctgg tgttggctgg acttctaat tgttgatgtt	3900
	tcattggtca gtttaacagc aaatgccttg ggttactcag aactggagc catcaaatct	3960
[0004]	ctcaggacac taagagctct gagacctcta agagccttat ctcgatttga agggatgagg	4020
	gtggttgtga atgccctttt aggagcaatt ccatccatca tgaatgtgct tctggttgt	4080
	cttatattct ggctaatttt cagcatcatg ggcgtaaatt tgttgctgg caaattctac	4140
	cactgtatta acaccacaac tggtgacagg ttgacatcg aagacgtgaa taatcatact	4200
	gattgcctaa aactaataga aagaaatgag actgctcgat ggaaaaatgt gaaagtaaac	4260
	tttgataatg taggatttgg gtatctctct ttgcttcaag ttgccacatt caaaggatgg	4320
	atggatataa tgatgcagc agttgattcc agaaatgtgg aactccagcc taagtatgaa	4380
	gaaagtctgt acatgtatct ttactttgtt atttcatca tcttgggtc cttcttcacc	4440
	ttgaacctgt ttattggtgt catcatagat aatttcaacc agcagaaaaa gaagtttga	4500
	ggtcaagaca tctttatgac agaagaacag aagaaatact ataatgcaat gaaaaatta	4560
	ggatcgaaaa aaccgcaaaa gcctatacct cgaccaggaa acaaatttca aggaatgggtc	4620
	ttgacttcg taaccagaca agttttgac ataagcatca tgattctcat ctgtcttaac	4680

	atggtcacaa tgaatgggga aacagatgac cagagtgaat atgtgactac cattttgtca	4740
	cgcatcaatc tgggtgtcat tggctatctt actggagagt gtgtactgaa actcatctct	4800
	ctacgccatt attattttac cattggatgg aatatttttg attttgggt tgcattctc	4860
	tccattgtag gtatgtttct tgccgagctg atagaaaagt atttcgtgtc ccctaccctg	4920
	ttccgagtga tccgtcttgc taggattggc cgaatctac gtctgatcaa aggagcaaag	4980
	gggatccgca cgctgctctt tgcttggatg atgtcccttc ctgcgttgtt taacatcggc	5040
	ctctactct tctagtcat gttcatctac gccatctttg ggatgtcaa cttgcctat	5100
	gttaagaggg aagttgggat cgaatgacatg ttcaactttg agacctttgg caacagcatg	5160
	atctgcctat tccaaattac aacctctgct ggctgggatg gattgctagc accattctc	5220
	aacagtaagc caccgactg tgaccctaataaagtttaacc ctggaagctc agttaaggga	5280
[0005]	gactgtggga acccatctgt tggaaatttc tttttgtca gttacatcat catatccttc	5340
	ctggttggg tgaacatgta catcgcggtc atctggaga acttcagtgt tgctactgaa	5400
	gaaagtgcag agcctctgag tgaggatgac ttgagatgt tctatgaggt ttgggagaag	5460
	tttgatcccg atgcaactca gttcatggaa ttgaaaaat tatctcagtt tgcagctgcg	5520
	ctgaaccgc ctctcaatct gccacaacca aacaaactcc agctcattgc catggatttg	5580
	cccatggatg atgggtgaccg gatccactgt ctgtatatct tatttgctt tacaagcgg	5640
	gttctaggag agagtggaga gatggatgct ctacgaatac agatggaaga gcgattcatg	5700
	gcttcaatc ctccaaggt ctctatcag ccaatcacta ctactttaa acgaaaacaa	5760
	gaggaagtat ctgctgtcat tattcagcgt gttacagac gccaccttt aaagcgaact	5820
	gtaaaacaag cttcctttac gtacaataaa aacaaatca aaggtggggc taatctctt	5880
	ataaaagaag acatgataat tgacagaata aatgaaaact ctattacaga aaaaactgat	5940
	ctgaccatgt ccactgcagc ttgtccact tctatgacc gggtgacaaa gccattgtg	6000

	gaaaaacatg agcaagaagg caaagatgaa aaagccaaag ggaaataaat gaaaataaat	6060
	aaaaataatt ggggtgacaaa ttgtttacag cctgtgaagg tgatgtattt ttatcaacag	6120
	gactccttta ggaggtcaat gccaaactga ctgtttttac acaaatctcc ttaaggtcag	6180
	tgctacaat aagacagtga ccccttgta gcaaactgtg actctgtgta aaggggagat	6240
	gaccttgaca ggaggttact gttctcacta ccagctgaca ctgctgaaga taagatgcac	6300
	aatggctagt cagactgtag ggaccagttt caaggggtgc aaacctgtga tttgggggtt	6360
	gtttaacatg aaacacttta gtgtagtaat tgtatccact gtttgcattt caactgccac	6420
	attgtgcaca tttttatgga atctgttagt ggattcatct ttttgtaat ccatgtgttt	6480
	attatatgtg actatttttg taaacgaagt ttctgttgag aaataggcta aggacctcta	6540
	taacaggtat gccacctggg gggatatggca accacatggc cctcccagct acacaaagtc	6600
	gtgggttgca tgagggcatg ctgcacttag agatcatgca tgagaaaaag tcacaagaaa	6660
[0006]	aacaaattct taaatttcac catatttctg ggaggggtaa ttgggtgata agtggaggtg	6720
	ctttgttgat cttgttttgc gaaatccagc cctagacca agtagattat ttgtgggtag	6780
	gccagtaaat ctagcaggt gcaaacttca ttcaaagtgt tggagtcata aatgttatgt	6840
	ttcttttgt tgattaaaa aaaaaacctg aatagtgaat attgcccctc accctccacc	6900
	gccagaagac tgaattgacc aaaattactc ttataaatt tctgctttt cctgcacttt	6960
	gttagccat cttcggctct cagcaagggt gacactgtat atgttaatga aatgctattt	7020
	attatgaaa tagtcatttt accctgtggt gcacgttga gcaaacaat aatgacctaa	7080
	gcacagtatt tattgcatca aatatgtacc acaagaaatg tagagtgcaa gctttacaca	7140
	ggtaataaaa tgtattctgt accatttata gatagtttgg atgctatcaa tgcattgtta	7200
	tattaccatg ctgctgtatc tggtttctct cactgctcag aatctcattt atgagaaacc	7260
	atatgtcagt ggtaaagtca aggaaattgt tcaacagatc tcatttattt aagtcattaa	7320

	gcaatagttt gcagcacttt aacagctttt tggttatttt tacattttaa gtggataaca	7380
	tatggtatat agccagactg tacagacatg tttaaaaaaa cacactgctt aacctattaa	7440
	atatgtgttt agaattttat aagcaaatat aaatactgta aaaagtcact ttattttatt	7500
	tttcagcatt atgtacataa atatgaagag gaaattatct tcaggttgat atcacaatca	7560
	cttttcttac ttctgtcca tagtactttt tcatgaaaga aatttgctaa ataagacatg	7620
	aaaacaagac tgggtagttg tagatttctg cttttaaat tacatttgct aattttagat	7680
	tatttcacaa tttaaggag caaaataggt tcacgattca tatccaaatt atgctttgca	7740
	attggaaaag ggtttaaataa ttattttata ttctggttag tacctgcact aactgaattg	7800
	aaggtagtgc ttatgttatt ttgttcttt ttctgact tcggtttatg tttcatctc	7860
	tttgagtaa tgctgctcta gattgttcta aatagaatgt gggcttcata atttttttt	7920
[0007]	ccacaaaaac agagtagtca acttatatag tcaattacat caggacattt tgtgtttctt	7980
	acagaagcaa accataggct cctctttcc ttaaaactac ttagataaac tgtattcgtg	8040
	aactgcatgc tggaaaatgc tactattatg ctaaataatg ctaaccaaca tttaaatgt	8100
	gcaaaaactaa taaagattac attttttatt tta	8133
	<210> 2	
	<211> 8876	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 2	
	ggctgcttca gacatatgtc tgtgtgtacg ctgtgaagggt gtttctcttc acagttcccc	60
	gccctctagt ggtagttaca ataatgccat ttgtagtcc ctgtacagga aatgcctctt	120
	cttacttcag ttaccagaat ccttttacag gaagttaggt gtggctcttg aaggagaatt	180
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga ttttttttt tttaaagcat gatggaattt	240

	tagctgcagt cttcttggtg ccagcttatc aatcccaaac tctgggtgta aaagattcta	300
	cagggcactt tcttatgcaa ggagctaaac agtgattaaa ggagcaggat gaaaagatgg	360
	cacagtcagt gctggtaccg ccaggacctg acagcttccg cttcttacc agggaatccc	420
	ttgctgctat tgaacaacgc attgcagaag agaaagctaa gagaccctaaa caggaacgca	480
	aggatgagga tgatgaaaat ggcccaaagc caaacagtga ctggaagca ggaaaatctc	540
	ttccatttat ttatggagac attcctccag agatggtgtc agtgcccctg gaggatctgg	600
	accctacta tatcaataag aaaacgttta tagtattgaa taaagggaaa gcaatctctc	660
	gattcagtc caccctgcc ctttacattt taactcctt caaccctatt agaaaattag	720
	ctattaagat ttggtacat tctttattca atatgctcat tatgtgcacg attctacca	780
	actgtgtatt tatgaccatg agtaaccctc cagactggac aaagaatgtg gagtatacct	840
	ttacaggaat ttatactttt gaatcactta taaaatact tgcaaggggc tttgttttag	900
[0008]	aagatttcac atttttacgg gatccatgga attggttgga ttcacagtc attacttttg	960
	catatgtgac agagtttgtg gacctgggca atgtctcagc gttgagaaca ttcagagttc	1020
	tccgagcatt gaaaacaatt tcagtcattc caggcctgaa gaccattgtg ggggccctga	1080
	tccagtcagt gaagaagctt tctgatgtca tgatcttgac tgtgttctgt ctaagcgtgt	1140
	ttgcgcta ataggattgcag ttgtcatgg gcaacctacg aaataaatgt ttgcaatggc	1200
	ctccagataa ttctccttt gaaataaata tcacttcctt cttaacaat tcattggatg	1260
	ggaatggtac tactttcaat aggacagtga gcatatttaa ctgggatgaa tatattgagg	1320
	ataaaagtca cttttat ttagaggggc aaaatgatgc tctgctttgt ggcaacagct	1380
	cagatgcagg ccagtgtcct gaaggataca tctgtgtgaa ggctggtaga aacccaact	1440
	atggctacac gagcttgac accttagtt gggcctttt gtccttatt cgtctcatga	1500
	ctcaagactt ctgggaaaac ctttatcaac tgacactacg tgctgctggg aaaacgtaca	1560

	tgatatttt tgtgctggtc atttcttgg gctcattcta tctaataat ttgatcttgg	1620
	ctgtggtggc catggcctat gaggaacaga atcaggccac attggaagag gctgaacaga	1680
	aggaagctga atttcagcag atgctcgaac agttgaaaaa gcaacaagaa gaagctcagg	1740
	cggcagctgc agccgcatct gctgaatcaa gagacttcag tggtgctggg gggataggag	1800
	tttttcaga gagttcttca gtagcatcta agttgagctc caaaagtga aaagagctga	1860
	aaaacagaag aaagaaaaag aaacagaaag aacagtctgg agaagaagag aaaaatgaca	1920
	gagtccgaaa atcggaatct gaagacagca taagaagaaa aggtttccgt ttttcttgg	1980
	aaggaagtag gctgacatat gaaaagagat tttcttctcc acaccagtcc ttactgagca	2040
	tccgtggctc cttttctct ccaagacgca acagtagggc gagcctttc agcttcagag	2100
	gtcgagcaaa ggacattggc tctgagaatg actttgctga tgatgagcac agcaccttg	2160
[0009]	aggacaatga cagccgaaga gactctctgt tcgtgccgca cagacatgga gaacggcgcc	2220
	acagcaatgt cagccaggcc agccgtgcct ccagggtgct cccatcctg cccatgaatg	2280
	ggaagatgca tagcgctgtg gactgcaatg gtgtggtctc cctggtcggg ggcccttcta	2340
	ccctcacatc tgctgggcag ctctaccag agggcacaac tactgaaaca gaaataagaa	2400
	agagacggtc cagttctat catgtttcca tggattatt ggaagatcct acatcaaggc	2460
	aaagagcaat gagtatagcc agtatttga ccaacaccat ggaagaactt gaagaatcca	2520
	gacagaaatg cccaccatgc tggataaat ttgctaatat gtgtttgatt tgggactgtt	2580
	gtaaaccatg gttaaagggtg aaacaccttg tcaacctggt tgtaatggac ccatttgtg	2640
	acctggccat caccatctgc attgtcttaa atacactctt catggctatg gagcactatc	2700
	ccatgacgga gcagttcagc agtgactgt ctgttgaaa cctggtcttc acagggatct	2760
	tcacagcaga aatgtttctc aagataattg ccatggatcc atattattac ttcaagaag	2820
	gctggaatat tttgatggg tttattgtga gccttagttt aatggaactt ggtttgcaa	2880

	atgtggaagg attgtcagtt ctccgatcat tccggctgct ccgagtttc aagttggcaa	2940
	aatcttggcc aactctaaat atgctaatta agatcattgg caattctgtg ggggctctag	3000
	gaaacctcac cttggtattg gccatcatcg tcttcatttt tgctgtggtc ggcattgcagc	3060
	tctttggtaa gagctacaaa gaatgtgtct gcaagatttc caatgattgt gaactccac	3120
	gctggcacat gcatgacttt ttccactcct tctgatcgt gttccgcgtg ctgtgtggag	3180
	agtggataga gaccatgtgg gactgtatgg aggtcgctgg ccaaaccatg tgccttactg	3240
	tcttcatgat ggtcatgggtg attggaaatc tagtggttct gaacctcttc ttggccttgc	3300
	ttttgagttc cttcagttct gacaatcttg ctgccactga tgatgataac gaaatgaata	3360
	atctccagat tgctgtggga aggatgcaga aaggaatcga tttgttaaa agaaaaatac	3420
	gtgaatttat tcagaaagcc ttgttagga agcagaaagc tttagatgaa attaaaccgc	3480
	ttgaagatct aaataataaa aaagacagct gtatttccaa ccataccacc atagaaatag	3540
[0010]	gcaaagacct caattatctc aaagacggaa atggaactac tagtggcata ggcagcagtg	3600
	tagaaaaata tgctgtggat gaaagtgatt acatgtcatt tataaacaac cctagcctca	3660
	ctgtgacagt accaattgct gttggagaat ctgacttga aaatttaaat actgaagaat	3720
	tcagcagcga gtcagatatg gaggaaagca aagagaagct aaatgcaact agttcatctg	3780
	aaggcagcac ggttgatatt ggagctcccg ccgagggaga acagcctgag gttgaacctg	3840
	aggaatccct tgaacctgaa gcctgtttta cagaagactg tgtacggaag ttcaagtgtt	3900
	gtcagataag catagaagaa ggcaaaggga aactctggtg gaatttgagg aaaacatgct	3960
	ataagatagt ggagcacaat tggttcgaaa ctttcattgt cttcatgatt ctgctgagca	4020
	gtggggctct ggcctttgaa gatatatata ttgagcagcg aaaaaccatt aagaccatgt	4080
	tagaatatgc tgacaagggtt ttacttaca tattcattct ggaaatgctg ctaaagtggg	4140
	ttgcatatgg ttttcaagtg tattttacca atgcctggtg ctggctagac ttctgattg	4200

	ttgatgtctc actggttagc ttaactgcaa atgccttggg ttactcagaa cttggtgcca	4260
	tcaaatccct cagaacacta agagctctga ggccactgag agctttgtcc cggtttgaag	4320
	gaatgagggg tgtgttaa at gctcttttag gagccattcc atctatcatg aatgtacttc	4380
	tggtttgtct gatcttttgg ctaatatcca gtatcatggg agtgaatctc tttgctggca	4440
	agttttacca ttgtattaat tacaccactg gagagatgtt tgatgtaagc gtggtcaaca	4500
	actacagtga gtgcaaagct ctcatgaga gcaatcaaac tgccaggtgg aaaaatgtga	4560
	aagtaaactt tgataacgta ggacttgat atctgtctct acttcaagta gccacgttta	4620
	agggatggat ggatattatg tatgcagctg ttgattcacg aaatgtagaa ttacaacca	4680
	agtatgaaga caacctgtac atgtatctt attttgcac ctttattatt tttggtcat	4740
	tctttacctt gaatctttc attggtgtca tcatagataa cttcaacca cagaaaaaga	4800
[0011]	agtttgagg tcaagacatt tttatgacag aagaacagaa gaaatactac aatgcaatga	4860
	aaaaactggg ttcaaagaaa ccacaaaaac ccatacctcg acctgctaac aaattccaag	4920
	gaatggtctt tgattttgta accaaacaag tctttgatat cagcatcatg atcctcatct	4980
	gccttaacat ggtcaccatg atggtggaaa ccgatgacca gagtcaagaa atgacaaaca	5040
	ttctgtactg gattaatctg gtgtttattg ttctgtcac tggagaatgt gtgctgaaac	5100
	tgatctctct tcgttactac tatttacta ttggatggaa tattttgat tttgtggtgg	5160
	tcattctctc cattgtagga atgtttctgg ctgaactgat agaaaagtat tttgtgtccc	5220
	ctaccctgtt ccgagtgatc cgtcttgcca ggattggccg aatcctacgt ctgatcaaag	5280
	gagcaaaggg gatccgcacg ctgctctttg ctttgatgat gtcccttctc gcgttggtta	5340
	acatcggcct ccttctttc ctggtcatgt tcactacgc catctttggg atgtccaatt	5400
	ttgcctatgt taagaggggaa gttgggatcg atgacatgt caactttgag acctttggca	5460
	acagcatgat ctgcctgttc caaattacaa cctctgctgg ctgggatgga ttgctagcac	5520

	ctattcttaa tagtggacct ccagactgtg accctgacaa agatcacctt ggaagctcag	5580
	ttaaaggaga ctgtgggaac ccatctgttg ggattttctt tttgtcagt tacatcatca	5640
	tatccttctt ggttgtggtg aacatgtaca tcgcggtcat cctggagaac ttcagtgttg	5700
	ctactgaaga aagtgcagag cctctgagtg aggatgactt tgagatgttc tatgaggttt	5760
	gggagaagtt tgatcccgat gcgaccagct ttatagagtt tgccaaactt tctgattttg	5820
	cagatgcctt ggatcctctt cttctcatag caaaacccaa caaagtccag ctcatcgcca	5880
	tggatctgcc catggtgagt ggtgaccgga tccactgtct tgacatctta tttgctttta	5940
	caaagcgtgt tttgggtgag agtggagaga tggatgcctt tcgaatacag atggaagagc	6000
	gattcatggc atcaaaccct tccaaagtct cttatgagcc cattacgacc acgttgaaac	6060
	gcaaacaaga ggaggtgtct gctattatta tccagagggc ttacagacgc tacctcttga	6120
[0012]	agcaaaaagt taaaaaggta tcaagtatat acaagaaaga caaaggcaaa gaatgtgatg	6180
	gaacacccat caaagaagat actctcattg ataaactgaa tgagaattca actccagaga	6240
	aaaccgatat gacgccttcc accacgtctc caccctcgta tgatagtgtg accaaaccag	6300
	aaaaagaaaa atttgaaaaa gacaaatcag aaaaggaaga caaagggaaa gatatcaggg	6360
	aaagtaaaaa gtaaaaagaa accaagaatt ttccattttg tgatcaattg tttacagccc	6420
	gtgatggtga tgtgttttg tcaacaggac tcccacagga ggtctatgcc aaactgactg	6480
	ttttacaaa tgtatactta aggtcagtc ctataacaag acagagacct ctggtcagca	6540
	aactggaact cagtaaaact gagaaatagt atcgatggga ggtttctatt ttcacaacca	6600
	gctgacactg ctgaagagca gaggcgtaat ggctactcag acgataggaa ccaatttaaa	6660
	gggggggaggg aagttaaatt ttatgtaaa ttcaacatgt gacacttgat aatagtaatt	6720
	gtcaccagtg ttatgtttt aactgccaca cctgccatat tttacaaaa cgtgtgctgt	6780
	gaatttatca ctttctttt taattcacag gttgtttact attatatgtg actatttttg	6840

	taa atgggtt tgtgtttggg gagagggatt aaagggaggg aattctacat ttctctattg	6900
	tattgtataa ctggatatat tttaaatgga ggcatgctgc aattctcatt cacacataaa	6960
	aaaatcacat cacaaaaggg aagagtttac ttctgtttc aggatgtttt tagatttttg	7020
	agggtgcttaa atagctattc gtatttttaa ggtgtctcat ccagaaaaaa ttaaatgtgc	7080
	ctgtaa atgt tccatagaat cacaagcatt aaagagttgt tttatttta cataacccat	7140
	taaatgtaca tgtatatatg tatatatgta tatgtgcgtg tatatacata tatatgtata	7200
	cacacatgca cacacagaga tatacacata ccattacatt gtcattcaca gtcccagcag	7260
	catgactatc acatttttga taagtgtcct ttggcataaa ataaaaatat cctatcagtc	7320
	ctttctaaga agcctgaatt gacaaaaaa catccccacc accactttat aaagttgatt	7380
	ctgctttatc ctgcagtatt gtttagccat cttctgctct tggttaagggt gacatagtat	7440
	atgtcaattt aaaaaataaa agtctgcttt gtaaatagta atttaccca gtggtgcatg	7500
[0013]	tttgagcaaa caaaaatgat gatttaagca cactacttat tgcacaaat atgtaccaca	7560
	gtaagtatag ttgcaagct ttcaacaggt aatatgatgt aattggttcc attatagttt	7620
	gaagctgtca ctgctgcatg ttatcttgc ctatgctgct gtatcttatt ccttcactg	7680
	ttcagaagtc taatatggga agccatatat cagtggtaaa gtgaagcaaa ttgttctacc	7740
	aagacctcat tctcatgctc attaagcaat aggttgcagc aaacaaggaa gagcttcttg	7800
	ctttttatc ttcaacctt aattgaacac tcaatgatga aaagcccgac tgtacaaaca	7860
	tggtgcaagc tgcttaaatc tgtttaaaat atatggttag agttttctaa gaaaataaa	7920
	atactgtaaa aagttcattt tattttattt ttcagccttt tgtacgtaaa atgagaaatt	7980
	aaaagtatct tcaggtggat gtcacagtca ctattgttag tttctgttcc tagcactttt	8040
	aaattgaagc acttcacaaa ataagaagca aggactagga tgcagtgtag gtttctgctt	8100
	ttttattagt actgtaaact tgcacacatt tcaatgtgaa acaaattctca aactgagttc	8160

	aatgtttatt tgctttcaat agtaatgcct tatcattgaa agaggcttaa agaaaaaaaa	8220
	aatcagctga tactctggc attgcttgaa tccaatgttt ccacctagtc tttttattca	8280
	gtaatcatca gtctttcca atgtttgttt acacagatag atcttattga cccatatggc	8340
	actagaactg tatcagatat aatatgggat cccagctttt tttctctcc cacaaaacca	8400
	ggtagtgaag ttatattacc agttacagca aaatactttg tgtttcaca gcaacaataa	8460
	atgtagattc ttatactga agctattgac ttgtagtggt ttggtgaaat gcatgcagga	8520
	aaatgctgtt accataaaga acggtaaacc acattacaat caagccaaaa gaataaaggt	8580
	ttcgcttttg ttttgtatt taattgttgt cttgtttct atctttgaaa tgccatttaa	8640
	aggtagattt ctatcatgta aaaataatct atctgaaaa caaatgtaa gaacacacat	8700
	taattactat aattcatctt tcaattttt catggaatgg aagttaatta agaagagtg	8760
	attggataac tactttaata ttggccaaaa agctagatat ggcacaggt agactagtgg	8820
[0014]	aaagtacaa aaattaataa aaaattgact aacattttaa aaaaaaaaaa aaaaaa	8876
	<210> 3	
	<211> 9141	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 3	
	accatagagt gaatctcaga acaggaagcg gaggcataag cagagaggat tctggaaagg	60
	tctctttgtt ttcttatcca cagagaaaga aagaaaaaaaa attgtaacta atttgtaaac	120
	ctctgtggtc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagctgaaca gctgcagagg aagacacgtt	180
	ataccctaac catcttgat gctgggcttt gttatgctgt aattcataag gctctgtttt	240
	atcagagatt atggagcaag aaaactgaag ccaagccaca tcaaggtttg acagggatga	300
	gatactgtc aaggattcat agtagagtgg ctactggga aaggagcaaa gaatctcttc	360
	tagggatatt gtaagaataa atgagataat tcacagaagg gacctggagc tttccggaa	420

	aaagggtgctg tgactatcta aggtaattcg tatgcaagaa gctacacgta attaatgtg	480
	caggatgaaa agatggcaca ggcactgttg gtaccccccag gacctgaaag ctccgcctt	540
	tttactagag aatctcttgc tgctatcgaa aaacgtgctg cagaagagaa agccaagaag	600
	cccaaaaagg aacaagataa tgatgatgag aacaaaccaa agccaaatag tgacttgaa	660
	gctggaaaga acctccatt tatttatgga gacattctc cagagatggt gtcagagccc	720
	ctggaggacc tggatcccta ctatatcaat aagaaaactt ttatagtaat gaataaagga	780
	aaggcaattt tccgattcag tgccacctct gccttgata tttaactcc actaaacctt	840
	gttaggaaaa ttgctatcaa gattttgga cattctttat tcagcatgct tatcatgtgc	900
	actatttga ccaactgtgt atttatgacc ttgagcaacc ctctgactg gacaaagaat	960
	gtagagtaca cattcactgg aatctatacc ttgagtcac ttataaaaat ctggcaaga	1020
	gggttttgc tagaagattt tacgtttctt cgtgatccat ggaactggct ggatttcagt	1080
[0015]	gtcattgtga tggcatatgt gacagagttt gtggacctgg gcaatgtctc agcgttgaga	1140
	acattcagag ttctccgagc actgaaaaca atttcagtca ttccaggttt aaagaccatt	1200
	gtggggggccc tgatccagtc ggtaaagaag ctttctgatg tgatgatcct gactgtgttc	1260
	tgctgagcg tgtttgctct cattgggctg cagctgttca tgggcaatct gaggaataaa	1320
	tgtttgcagt ggccccaag cgattctgct ttgaaacca acaccactc ctactttaat	1380
	ggcacaatgg attcaaatgg gacatttgtt aatgtaacaa tgagcacatt taactggaag	1440
	gattacattg gagatgacag tcacttttat gtttggatg ggcaaaaaga cccttactc	1500
	tgtggaaatg gctcagatgc aggccagtgt ccagaaggat acatctgtgt gaaggctggt	1560
	cgaaaccca actatggcta cacaagcttt gacacctta gctgggcttt cctgtctcta	1620
	tttcgactca tgactcaaga ctactgggaa aatctttacc agttgacatt acgtgctgct	1680
	gggaaaacat acatgatatt tttgtcctg gtcattttct tgggctcatt ttatttggtg	1740

	aatttgatcc tggctgtggt ggccatggcc tatgaggagc agaatcaggc caccttgaa	1800
	gaagcagaac aaaaagaggc cgaatttcag cagatgctcg aacagcttaa aaagcaacag	1860
	gaagaagctc aggcagtgc ggcagcatca gctgctcaa gagatttcag tggaataggt	1920
	gggttaggag agctgttga aagtcttca gaagcatcaa agttgagttc caaaagtgc	1980
	aaagaatgga ggaaccgaag gaagaaaaga agacagagag agcacctga aggaacaac	2040
	aaaggagaga gagacagctt tcccaatcc gaatctgaag acagcgtcaa aagaagcagc	2100
	ttcttttct ccatggatgg aaacagactg accagtgaca aaaaattctg ctcccctcat	2160
	cagtctctct tgagtatccg tggctccctg tttcccaa gacgcaatag caaaacaagc	2220
	attttcagtt tcagaggctg ggcaaaggat gttggatctg aaaatgactt tgctgatgat	2280
	gaacacagca catttgaaga cagcgaaagc aggagagact cactgtttgt gccgcacaga	2340
	catggagagc gacgcaacag taacgttagt caggccagta tgtcatccag gatggtgcca	2400
[0016]	gggcttcag caaatgggaa gatgcacagc actgtggatt gcaatgggtg ggtttcctg	2460
	gtgggtggac cttcagctct aacgtcacct actggacaac tccccaga gggcaccacc	2520
	acagaaacgg aagtcagaaa gagaaggta agctcttacc agatttcaat ggagatgctg	2580
	gaggattcct ctggaaggca aagagccgtg agcatagcca gcattctgac caacacaatg	2640
	gaagaacttg aagaatctag acagaaatgt ccgccatgct ggtatagatt tgccaatgtg	2700
	ttcttgatct gggactgctg tgatgcatgg taaaagtaa aacatcttgt gaatttaatt	2760
	gttatggatc catttgtga tctgccatc actatttgca ttgtctaaa taccctctt	2820
	atggccatgg agcactaccc catgactgag caattcagta gtgtgttgac ttaggaaac	2880
	ctggtcttta ctgggatttt cacagcagaa atggttctca agatcattgc catggatcct	2940
	tattactatt tccaagaagg ctggaatctc ttgatggaa ttattgtcag cctcagttta	3000
	atggagcttg gtctgtcaaa tgtggagggg ttgtctgtac tgcatcatt cagactgctt	3060

	agagttttca agttggcaaa atcctggccc acactaaata tgctaattaa gatcattggc	3120
	aattctgtgg gggctctagg aaacctcacc ttggtgttgg ccatcatcgt cttcattttt	3180
	gctgtggtcg gcatgcagct ctttggaag agctacaaag aatgtgtctg caagatcaat	3240
	gatgactgta cgctcccacg gtggcacatg aacgacttct tccactcctt cctgattgtg	3300
	ttccgcgtgc tgttgggaga gtggatagag accatgtggg actgtatgga ggtcgtggc	3360
	caaaccatgt gccttattgt tttcatgttg gtcattgtca ttggaaacct tgtggttctg	3420
	aacctcttc tggccttatt gttgagttca ttagctcag acaaccttgc tgctactgat	3480
	gatgacaatg aatgaataa tctgcagatt gcagtaggaa gaatgcaaaa gggaattgat	3540
	tatgtgaaaa ataagatgcg ggagtgttc caaaaagcct ttttagaaa gccaaaagtt	3600
	atagaaatcc atgaaggcaa taagatagac agctgcatgt ccaataatac tggaattgaa	3660
	ataagcaaag agcttaatta tcttagagat gggaatggaa ccaccagtgg ttaggtact	3720
[0017]	ggaagcagtg ttgaaaaata cgtaatcgat gaaaatgatt atatgtcatt cataaacaac	3780
	cccagcctca ccgtcacagt gccaatgct gttggagagt ctgacttga aaactaaat	3840
	actgaagagt tcagcagtga gtcagaacta gaagaaagca aagagaaatt aaatgaacc	3900
	agctcatctg aaggaagcac agttgatgtt gttctacccc gagaagggtga acaagctgaa	3960
	actgaacccg aagaagacct taaaccggaa gcttgtttta ctgaaggatg tattaanaag	4020
	ttccattct gtcaagtaag tacagaagaa ggcaaaggga agatctggtg gaatcttga	4080
	aaaacctgct acagtattgt tgagcacaac tggttgaga ctttcattgt gttcatgatc	4140
	cttctcagta gtggtgcatt ggcctttgaa gatataaca ttgaacagcg aaagactatc	4200
	aaaaccatgc tagaatatgc tgacaaagtc ttacctata tattcattct ggaaatgctt	4260
	ctcaaatggg ttgcttatgg atttcaaaca tatttacta atgctggtg ctggctagat	4320
	ttctgatcg ttgatgttc ttggttagc ctggtagcca atgctcttg ctactcagaa	4380

	ctcggtgcca tcaaatcatt acggacatta agagctttaa gaccttaag agccttatcc	4440
	cggtttgaag gcatgagggt ggttgatgaat gctcttggtg gagcaattcc ctctatcatg	4500
	aatgtgctgt tggctctgtct catcttctgg ttgatcttta gcatcatggg tgtgaatttg	4560
	tttgctggca agttctacca ctgtgttaac atgacaacgg gtaacatgtt tgacattagt	4620
	gatgttaaca attgagtga ctgtcaggct ctgggcaagc aagctcgggtg gaaaaacgtg	4680
	aaagtaaact ttgataatgt tggcgctggc tatcttgac tgcttcaagt ggccacattt	4740
	aaaggctgga tggatattat gtatgcagct gttgattcac gagatgttaa acttcagcct	4800
	gtatatgaag aaaatctgta catgtattta tactttgtca tctttatcat ctttgggtca	4860
	ttctcactc tgaatctatt cattggtgtc atcatagata acttcaacca gcagaaaaag	4920
	aagtttgag gtcaagacat ctttatgaca gaggaacaga aaaaatatta caatgcaatg	4980
	aagaaacttg gatccaagaa acctcagaaa cccatacctc gccagcaaa caaattccaa	5040
[0018]	ggaatggtct ttgattttgt aaccagacaa gtctttgata tcagcatcat gatcctcatc	5100
	tgctcaaca tggtcacat gatggtggaa acggatgacc agggcaaata catgacccta	5160
	gtttgtccc ggatcaacct agtgttcatt gttctgttca ctggagaatt tgtgctgaag	5220
	ctcgtctccc tcagacacta ctacttact ataggctgga acatctttga ctttggtgtg	5280
	gtgattctct ccattgtagg tatgtttctg gctgagatga tagaaaagta tttgtgtcc	5340
	cctacctgt tccgagtgt cctgttggc aggattggcc gaatcctacg tctgatcaaa	5400
	ggagcaaagg ggatccgcac gctgctctt gctttgatga tgtccctcc tgcgtgttt	5460
	aacatcggcc tctgctctt cctggtcatg ttatctatg ccatctttgg gatgtccaac	5520
	ttgcctatg ttaaaaagga agctggaatt gatgacatgt tcaacttga gacctttggc	5580
	aacagcatga tctgctgtt ccaaattaca acctctgtg gctgggatgg attgctagca	5640
	cctattctta atagtgcacc acccgactgt gacctgaca caattcacc tggcagctca	5700

	gttaagggag actgtgggaa cccatctgtt gggattttct ttttgtcag ttacatcatc	5760
	atatccttc tggttgtggt gaacatgtac atcgcggtca tcttgagaa cttcagtgtt	5820
	gctactgaag aaagtgcaga gccctgagt gaggatgact ttgagatgtt ctatgaggtt	5880
	tgggaaaagt ttgatccga tgcgaccag ttatagagt tctctaaact ctctgatttt	5940
	gcagctgcc tggatcctc tcttcata gcaaaacca acaaagtcca gcttattgcc	6000
	atggatctgc ccatggcag tggtgaccgg atccactgtc ttgatatttt attgccttt	6060
	acaaagcgtg ttttgggtga gaggggagag atggatgccc ttcgaataca gatggaagac	6120
	aggtttatgg catcaaacc ctcaaagtc tctatgagc ctattacaac cacttgaaa	6180
	cgtaaacaag aggaggtgtc tgccgtatc attcagcgtt attcagatg ttatcttta	6240
	aagcaaaggt taaaaatat atcaagtaac tataacaaag aggcaattaa agggaggatt	6300
	gacttaccta taaaacaaga catgattatt gacaaactaa atgggaactc cactccagaa	6360
[0019]	aaaacagatg ggagttcctc taccacctc cctcctcct atgatagtgt aaaaaacca	6420
	gacaaggaaa agtttgagaa agacaaacca gaaaagaaa gcaaaggaaa agaggtcaga	6480
	gaaaatcaaa agtaaaaaga aacaaagaat tatctttgtg atcaattgtt tacagcctat	6540
	gaaggtaaag tatatgtgtc aactggactt caagaggagg tccatgcaa actgactgtt	6600
	ttacaaata ctcatagta gtgcctatac aagacagtga agtgacctt ctgtcactgc	6660
	aactctgtga agcagggtat caacattgac aagaggtgtc tgttttatt accagctgac	6720
	actgctgagg agaaaccaa tggctaccta gactatagg atagttgtgc aaagtgaaca	6780
	ttgtaactac accaaacacc ttagtacag tcttgcac cttctattt ttaactcca	6840
	tatctgcat attttaca aattgttct agtgatttc catggtccc aattcatagt	6900
	ttattcataa tgctatgtca ctattttgt aaatgaggtt tacgttgaag aaacagtata	6960
	caagaaccct gtctctcaa tgatcagaca aaggtgttt gccagagaga taaaatttt	7020

	gctcaaaacc agaaaaagaa ttgtaatggc tacagtttca gttacttcca ttttctagat	7080
	ggctttaatt ttgaaagtat ttagtctgt tatgtttgt tctatctgaa cagttatgtg	7140
	cctgtaaagt ctctctaat atttaaagga ttattttat gcaaagtatt ctgtttcagc	7200
	aagtgcaaat ttattctaa gtttcagagc tctatattha atttaggtca aatgctttcc	7260
	aaaaagtaat ctaataaatc cattctagaa aaatatatct aaagtattgc tttagaatag	7320
	ttgtccact ttctgctgca gtattgcttt gccatcttct gctctcagca aagctgatag	7380
	tctatgtaa ttaaataccc tatgttatgt aaatagttat ttatcctgt ggtgcatgtt	7440
	tgggcaaata tatatatagc ctgataaaca acttctatta aatcaaata gtaccacagt	7500
	gtagtgtct tttgcaagct tccaacaggg atgtatctg tatcattcat taaacatagt	7560
	ttaaaggcta tcactaatgc atgttaatat tgcctatgct gctctattht actcaatcca	7620
[0020]	ttctcaca gctttggta aagaatgtca catattggtg atagaatgaa ttcaacctgc	7680
	tctgtccatt atgtcaagca gaataattg aagctattta caaacacctt tacttttgca	7740
	ctttaattc aacatgagta tcatatggta tctctctaga ttcaaggaa acacactgga	7800
	tactgcctac tgacaaaacc tattcttcat attttgctaa aaatatgtct aaaactgtt	7860
	taaatataaa taatgtaaaa atataatcaa ctttattgt cagcatttg tacataagaa	7920
	aattatttc aggttgatga catcacaatt tattttactt tatgctttg ctttgattt	7980
	ttaatcaca ttccaaact ttgaatccat aagattttc aatggataat ttctaaaat	8040
	aaaagtaga taatgggtt tatggatttc ttgttataa tatatttct accattcaa	8100
	taggagatac attggtcaaa cactcaaacc tagatcatt tctaccaact atggtgcct	8160
	caatataacc ttttattcat agatgtttt tttattcaa ctttgtagt atttacgtat	8220
	gcagactagt cttattttt taattcctgc tgactaaag ctattacaaa tataacatgg	8280
	actttgtct ttttagccat gaacaaagt gcaaagttgt gcaattacct aacatgatat	8340

	aaattttgt ttttgcaca aacaaaaagt ttaatgttaa ttctttttac aaaactattt	8400
	actgtagtgt attgaagaac tgcattgcagg gaattgctat tgctaaaaag aatgggtgagc	8460
	tacgtcatta ttgagccaaa agaataaatt tcatttttta ttgcatttca cttattggcc	8520
	tctgggggtt tttgttttg tttttgctg ttggcagttt aaaatatata taattaataa	8580
	aacctgtgct tgatctgaca ttgtatata taaaagtta catgaatttt acaacaaact	8640
	agtgcattgt tcaccaagca gtactacaga acaaaggcaa attaaaagca gctttgtgaa	8700
	cttttatgtg tgcaaaggat caagttcaca tgttccaact ttcagggttg ataataatag	8760
	tagtaaccac ctacaatagc ttcaatttc aattaactcc cttggctata agcatctaaa	8820
	ctcatcttct tcaatataa ttgatgctat ctctaatta cttgggtggct aataaatgtt	8880
	acattctttg ttacttaaat gcattatata aactcctatg tatacataag gtattaatga	8940
[0021]	tatagttatt gagaatttat attaactttt tttcaagaa cccttggatt tatgtgaggt	9000
	caaaacaaaa ctcttattct cagtggaaaa ctccagttgt aatgcatatt tttaaagaca	9060
	atttgatct aaatatgtat ttcataattc tccataata aattatataa ggtggcta	9120
	tggaaaaaaa aaaaaaaaaa a	9141
	<210> 4	
	<211> 7805	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 4	
	ccagaccccc ggggctgcgc actgcagctc ccaggccac ccaccacct tctggtctct	60
	gagcccagga tgcgaggatg gccagacat ctctgtgcac cctggtgcct ctgggccctg	120
	agtgttgcg ccccttcacc cgggagtcac tggcagccat agaacagcgg gcggtggagg	180
	aggaggcccg gctgcagcgg aataagcaga tggagattga ggagcccgaa cggaagccac	240

	gaagtgactt ggaggctggc aagaacctac ccatgatcta cggagacccc ccgccggagg	300
	tcacggcat cccctggag gacctggatc cctactacag caataagaag accttcatcg	360
	tactcaacaa gggcaaggcc atcttcgct tctccgccac acctgcttc tacctgctga	420
	gcccttcag cgtagtcagg cgcggggcca tcaagggtct catccatgcg ctgttcagca	480
	tgttcatcat gatcaccatc ttgaccaact gcgtattcat gaccatgagt gacccgcctc	540
	cctggtccaa gaatgtggag tacacctca cagggatcta cacctttgag tcctcatca	600
	agatactggc ccgaggcttc tgtgtcgacg acttcacatt cctccgggac ccctggaact	660
	ggctggactt cagtgtcatc atgatggcgt acctgacaga gtttgtggac ttgggcaaca	720
	tctagccct gaggacctc cgggtgctgc gggccctcaa aaccatcacg gtcatcccag	780
	ggctgaagac gatcgtgggg gccctgatcc agtcggtgaa aaagctgtcg gatgtgatga	840
	tcctcactgt cttctgcctg agcgtctttg cgctggtagg actgcagctc ttcattggaa	900
[0022]	acctgaggca gaagtgtgtg cgctggcccc cgccgttcaa cgacaccaac accacgtggt	960
	acagcaatga cacgtgttac ggcaatgaca catggtatgg caatgagatg tggtagcgca	1020
	atgactcatg gtatgccaac gacacgtgga acagccatgc aagctgggac accaagata	1080
	ccttgattg ggacgcctac atcagtgatg aagggaactt ctactcctg gagggctcca	1140
	acgatgccct gctctgtggg aacagcagtg atgctgggca ctgccctgag ggttatgagt	1200
	gcataagac cgggcggaac cccaactatg gctacaccag ctatgacacc ttcagctggg	1260
	ccttctggc tcttccgc ctcatgacac aggactattg ggagaacctc ttccagctga	1320
	ccctcgagc agctggcaag acctacatga tcttctcgt ggtcatcatc ttctgggct	1380
	ctttctacct catcaatctg atcctggccg tgggtggccat ggcataatg gagcagaatg	1440
	aggccacct ggccgaggat aaggagaaag aggaggagt tcagcagatg cttgagaagt	1500
	tcaaaaagca ccaggaggag ctggagaagg ccaaggccgc ccaagctctg gaagggtggg	1560

	aggcagatgg ggaccagcc catggcaaag actgcaatgg cagcctggac acatcgcaag	1620
	gggagaaggg agccccgagg cagagcagca gcggagacag cggcatctcc gacgccatgg	1680
	aagaactgga agaggccac caaaagtgc caccatggtg gtacaagtgc gccacaaaag	1740
	tgctcatatg gaactgctgc gccccgtggc tgaagttaa gaacatcatc cacctgatcg	1800
	tcatggaccc gtctgtggac ctgggcatca ccatctgcat cgtgctcaac accctcttca	1860
	tggccatgga acattacccc atgacggagc actttgacaa cgtgctcact gtgggcaacc	1920
	tggctttcac aggcattctc acagcagaga tggttctgaa gctgattgcc atggaccct	1980
	acgagtattt ccagcagggg tggaatatct tcgacagcat catcgtcacc ctcagcctgg	2040
	tagagctagg cctggccaac gtacagggac tgtctgtgct acgctcctc cgtctgctgc	2100
	gggtcttcaa gctggccaag tcgtggccaa cgctgaacat gctcatcaag atcattggca	2160
	attcagtggg ggcgctgggt aacctgacgc tgggtctggc tatcatcgtg ttcattctcg	2220
[0023]	ccgtggtggg catgcagctg ttggcaaga gctacaagga gtgcgtgtgc aagattgcct	2280
	tggactgcaa cctgccgcgc tggcacatgc atgatttctt ccactcctc ctcacgtct	2340
	tccgcatcct gtgcggggag tggatcgaga ccatgtggga ctgcatggag gtggccggcc	2400
	aagccatgtg cctcacgctc ttctcatgg tcattgtcat cggcaatctt gtgtctctga	2460
	acctgttctt ggctctgctg ctgagctctt tcagcgccga cagtctggca gcctcggatg	2520
	aggatggcga gatgaacaac ctgcagattg ccatcgggcg catcaagttg ggcacggct	2580
	ttgccaaggc cttctcctg gggctgtgc atggcaagat cctgagcccc aaggacatca	2640
	tgctcagcct cggggagggt gacggggccg gggaggctgg agaggcgggg gagactgccc	2700
	ccgaggatga gaagaaggag ccgcccagg aggacctgaa gaaggacaat cacatcctga	2760
	accacatggg cctggctgac ggcccccat ccagcctcga gctggaccac ctaacttca	2820
	tcaacaacct ctacctgacc atacaggtgc ccatcgctc cgaggagtcc gacctggaga	2880

	tgcccaccga ggaggaaacc gacactttct cagagcctga ggatagcaag aagccgccgc	2940
	agcctctcta tgatgggaac tcgtccgtct gcagcacagc tgactacaag ccccccgagg	3000
	aggaccctga ggagcaggca gaggagaacc ccgaggggga gcagcctgag gagtgttca	3060
	ctgaggcctg cgtgcagcgc tggccctgcc tctacgtgga catctcccag ggccgtggga	3120
	agaagtgggtg gactctgcgc agggcctgct tcaagattgt cgagcacaac tggttcgaga	3180
	ccttcattgt cttcatgatc ctgctcagca gtggggctct ggccttcgag gacatctaca	3240
	ttgagcagcg gcgagtcatt cgcaccatcc tagaatatgc cgacaaggtc ttcacctaca	3300
	tcttcatcat ggagatgctg ctcaaatggg tggcctacgg cttaagggtg tacttcacca	3360
	acgcctgggtg ctggctcgac ttctcatcg tggatgtctc catcatcagc ttggtggcca	3420
	actggctggg ctactcggag ctgggacca tcaaatccct gcggacactg cgggccctgc	3480
	gtcccctgag ggactgtcc cgattcgagg gcatgagggt ggtggtgaac gccctcctag	3540
[0024]	gcgccatccc ctccatcatg aatgtgctgc ttgtctgcct catcttctgg ctgatctca	3600
	gcatcatggg tgtaacctg ttgcccga agttctacta ctgcatcaac accaccacct	3660
	ctgagagggt cgacatctcc gaggtcaaca acaagtctga gtgcgagagc ctcatgcaca	3720
	cagggcagggt ccgctggctc aatgtcaagg tcaactacga caacgtgggt ctgggctacc	3780
	tctccctct gcagggtggc acctcaagg gttgatgga catcatgtat gcagccgtgg	3840
	actccggga gaaggaggag cagccgcagt acgagggtgaa cctctacatg tacctctact	3900
	ttgtcatctt catcatcttt ggctccttct tcacctcaa cctctcatt ggcgtcatca	3960
	ttgacaactt caaccagcag aagaagaagt taggggggaa agacatcttt atgacggagg	4020
	aacagaagaa atactataac gccatgaaga agcttggctc caagaagcct cagaagccaa	4080
	ttccccggcc ccagaacaag atccagggca tgggtgatga cctcgtgacg aagcaggcct	4140
	tcgacatcac catcatgatc ctcatctgcc tcaacatggt caccatgatg gtggagacag	4200

	acaaccagag ccagctcaag gtggacatcc tgtacaacat caacatgatc ttcacatca	4260
	tcttcacagg ggagtgcgtg ctcaagatgc tcgccctgcg ccagtactac ttcaccgttg	4320
	gctggaacat ctttgacttc gtggctgtca tctgtccat tgtgggcctt gccctctctg	4380
	acctgatcca gaagtacttc gtgtcaccca cgctgttccg tgtgatccgc ctggcgcgga	4440
	ttgggcgtgt cctgcggctg atccgcgggg ccaagggcat ccggacgctg ctgttcgccc	4500
	tcatgatgtc gctgcctgcc ctctcaaca tcggcctcct cctcttctg gtcatttca	4560
	tctactccat cttcggcatg tccaacttg cctacgtcaa gaaggagtgc ggcacgatg	4620
	atatgttcaa cttcgagacc ttcggcaaca gcatcatctg cctgttcgag atcaccacgt	4680
	cggccggctg ggacgggctc ctcaaccca tctcaacag cggggcccca gactgtgacc	4740
	ccaacctgga gaaccgggc accagtgtca agggtgactg cggcaacccc tccatcggca	4800
[0025]	tctgcttctt ctgcagctat atcatcatct ccttctcat cgtgggtcaac atgtacatcg	4860
	ccatcatcct ggagaacttc aatgtggcca cagaggagag cagcgagccc cttggtgaag	4920
	atgactttga gatgttctac gagacatggg agaagttcga ccccgacgcc acccagttca	4980
	tcgcctacag ccgcctctca gacttcgtgg acacctgca ggaaccgctg aggattgcca	5040
	agccaacaa gatcaagctc atcacactgg acttgccat ggtgccaggg gacaagatcc	5100
	actgcctgga catcctctt gccctgacca aagaggctct ggggtgactt ggggaaatgg	5160
	acgccctcaa gcagaccatg gaggagaagt tcatggcagc caaccctcc aagggtcct	5220
	acgagcccat caccaccacc ctcaagagga agcagagga ggtgtgcgcc atcaagatcc	5280
	agagggccta ccgccggcac ctgtacagc gctccatgaa gcaggcatcc tacatgtacc	5340
	gccacagcca cgacggcagc ggggatgacg ccctgagaa ggaggggctg cttgccaaca	5400
	ccatgagcaa gatgtatggc cagagaatg ggaacagcag ctgcceaagc ccggaggaga	5460
	agggcgaggc aggggacgcc ggaccacta tggggctgat gcccatcagc cctcagaca	5520

	ctgcctggcc tcccgcccct ccccagggc agactgtgcg cccaggtgtc aaggagtctc	5580
	ttgtctagca ggcagcatcg ggggtggcca ctgagtctcg gcatagtccc cagagctccc	5640
	ccgtggtgcc tgcacacaga gtgagggagg agggcttga atctgggact gtgcctggct	5700
	ccctgatggg ggacaggatt tggccacact ggggctgaca cccaggcccg agcgctgcg	5760
	ttccagacc atgggaaatg ggaattgcgc tcaggggctc catgctgggt ctgaggcccc	5820
	tgctccaag atttaacctg caagttgctc tgacctctc tgggccctgt cggccctct	5880
	tttggcctgg gggaggtcag aacattcgaa tctctgccc tcaactgagg aggagctggc	5940
	ctgcggtgga gggatcagtt gcccccatc accagagtct taagggtcac tggcctctcc	6000
	ccaggaagtg gctcagacct ctcagcccca gccagacaa agatgtctta acctcagga	6060
	gtgcagacac ctaaccccag ggcaactgcca gccaccccc ttgactctg ggggtgcagct	6120
	tcaccacca ggccagctca ggaattccct ggaaaaggga aatgtgactg gttcagaaat	6180
[0026]	agctctcaa agcctcaaaa cctgattggc cactggatcc tgctgcttg ggctgggatg	6240
	gtgactctg aaacctctc ctaggccacg tccagggtcc tagctcccct ggctggctcc	6300
	taggggaaga gcagaaggaa ggatgccact tgggaatgaa ttgtctttt ctaggaagca	6360
	cgggggagtg agacaggctg ggtctgcca gctggatcgc tgcacatggc ctgagcatcc	6420
	agacctgagc gggagtcagg gacctgctgc tcagtaagaa gattctcgcc ccttcctct	6480
	ctcctgcct cactctccg tgagcaccac cagggtcca ggagcctcat ccagcctcag	6540
	agatctccct tctcatctcc ccacgccgt ctctttctca ctttccac ctctctccc	6600
	aaagtatcc taagaatgta cagttgagct caggtagat attcgacct tggggcgtgc	6660
	agcaggaag gcccaactgg ttcaggctca acctccaac ttctgtggc ctgaagaagc	6720
	acttctgctg catcgctgtt ctggcatgg cagggccagg cctctgctgg ctaggagga	6780
	ggggtgagag acctgctcag gcgtcgctgg atttattcac ttgtgtgtg acctgtggct	6840

	gtgtgtctgc ttgtatgctt ttataggcct gtgtgtatag ctgtgtgtgt gttcaagtgc	6900
	gtgactgtat gtgtgtgtgt gaaccactgt gtactggagc ctgcattatg cacgtgtctg	6960
	ggatctttg tatatatgtg tatatatgtg tgccctggac tgtttcaagg tccatggagt	7020
	acggctgggtg tgtcactactg tgcaggcctg tcctggggag tgttcccggtg cctgggagag	7080
	tggacctgtg ctgtgagtgt gtggatgcgt gtgaacgcat gtggtaagggt gtgtactcag	7140
	ggcattctgt tggcctaagt gcctcttctt tttcttctg tttctcatga aaagtttgat	7200
	taaaattcag gaagcagcaa aacctcaaa acaagacatg tatgtgtgct tgagtgtgtg	7260
	aacacgtgtg tgtgtgtgca catctacatg ccatgcctat gggccagagt tgtctttatt	7320
	gtccaccatg ctctctcacc tgctcccagt cctgcctgaa cagccctctc tctcactccc	7380
	ctctcctccc ctctctgttt ctggtgtgca caccatggc ctacgcctg ctccctgcct	7440
	cctgcctatg tctctctat ggaaggaggc ctccactcct tccatctctt ccttcagaag	7500
[0027]	tttctgctaa tgggggcagt ctcccctcc tggcacattg ccctctgcc ttgccctcct	7560
	gggccctggg ctggcacagc ccctggagcc tcagaaatct gtttgattgg atattctcct	7620
	cggactgtgt gcaggttgca gaggaagagt agatgagccg ggtccggcct ctccctgcct	7680
	gtggccctc cctgcagac ggatgccat tctgcctgg tccagtgggg aacagggtccc	7740
	acgccaggcc agcaggcggg ctctttgta cagttcttac aataaacct ccttggtgcc	7800
	tctgg	7805
<210> 5		
<211> 8504		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 5		
	agacggcggc ggcgcccgtg ggatgcaggg atcgctcccc cggggccgct gagcctgcgc	60
	ccagtgcccc gagccccgcg ccgagccgag tccgcgcaa gcagcagcgg cccacccccg	120

	ggcccggccg ggggaccagc agcttcccca caggcaacgt gaggagagcc tgtgccaga	180
	agcaggatga gaagatggca aacttcctat tacctcgggg caccagcagc ttccgcaggt	240
	tcacacggga gtccttgga gccatcgaga agcgcatggc agagaagcaa gcccgcggct	300
	caaccacctt gcaggagagc cgagaggggc tgcccagga ggaggctccc cgccccagc	360
	tggacctga ggctccaaa aagtgccag atctctatgg caatccacc caagagtca	420
	tcggagagcc cctggaggac ctggaccct tctatagcac caaaagact tcatcgta	480
	tgaataaagg caagaccatc ttccggtca gtgccacaa cgccttgat gtcctcagtc	540
	ccttccacc catccggaga gcggtgtga agattctggt tactcgctc tcaacatgc	600
	tcatcatgtg caccatcctc accaactgcg tggtcatggc ccagcagac cctccacct	660
	ggaccaagta tgtcgagtac accttcaccg ccatttacac ctttgagtct ctggtcaaga	720
	ttctggctcg aggtcttgc ctgcacgct tcacttctc tcgggacca tggaaactggc	780
[0028]	tggacttag tgtgattatc atggcataca caactgaatt tgtggacctg ggcaatgtct	840
	cagccttacg cacctccga gtctccggg ccctgaaaac tatatcagtc attcagggc	900
	tgaagacat cgtgggggccc ctgatccagt ctgtgaagaa gctggctgat gtgatggtcc	960
	tcacagtctt ctgctcagc gtcttgccc tcatcgccct gcagctctc atgggcaacc	1020
	taaggacaaa gtgcgtgcgc aacttcacag cgctcaacgg caccaacggc tccgtggagg	1080
	ccgacggctt ggtctgggaa tccctggacc ttacctcag tgatccagaa aattacctgc	1140
	tcaagaacgg cacctctgat gtgttactgt gtgggaacag ctctgacgct gggacatgc	1200
	cggagggcta ccggtgccta aaggcaggcg agaaccgccga ccacggctac accagcttcg	1260
	attcctttgc ctgggcctt ctgcaactc tccgctgat gacgcaggac tgctgggagc	1320
	gcctctatca gcagaccctc aggtccgcag ggaagatcta catgatctc tcatgcttg	1380
	tcatcttct ggggtcctc tacctggtga acctgatcct ggccgtggc gcaatggct	1440

	atgaggagca aaaccaagcc accatcgctg agaccgagga gaaggaaaag cgcttcagg	1500
	aggccatgga aatgctcaag aaagaacacg aggcctcac catcaggggt gtggataccg	1560
	tgtcccgtag ctcttgag atgtccctt tggccccagt aaacagccat gagagaagaa	1620
	gcaagaggag aaaacggatg tcttcaggaa ctgaggagtg tggggaggac aggtcccca	1680
	agtctgactc agaagatggt ccagagcaa tgaatcatct cagcctacc cgtggcctca	1740
	gcaggacttc tatgaagcca cgttcagcc gcgggagcat ttacacctt cgaggcgag	1800
	acctgggttc tgaagcagat ttgcagatg atgaaaacag cacagcggg gagagcgaga	1860
	gccaccacac atcactgctg gtgccctggc cctgcgccg gaccagtgcc caggacagc	1920
	ccagtcccg aacctcggt cctggccacg cctccatgg caaaaagaac agcactgtg	1980
	actgcaatgg ggtggtctca ttactggggg caggcgaccc agaggccaca tcccaggaa	2040
	gccacctct ccgccctgtg atgctagagc accgccaga cagaccacg ccacggagg	2100
[0029]	agccaggcgg gcccagatg ctgacctcc aggtccgtg ttagatggc ttcaggagc	2160
	caggagcacg gcagcgggcc ctacgcag tcagcgtct caccagcga ctggaagagt	2220
	tagaggagtc tcgccacaag tgtccacat gctggaaccg tctgccag cgctacctga	2280
	tctgggagtg ctgccgctg tggatgtcca tcaagcagg agtgaagtg gtggtcatg	2340
	accgtttac tgacctacc atcactatg gcatcgact caacacactc ttcatggcg	2400
	tggagcacta caacatgaca agtgaattc aggagatgct gcaggtcgga aacctggtc	2460
	tcacagggat ttacagca gatgacct tcaagatcat tgccctgcac ccctactact	2520
	actccaaca gggctggaac atctcgaca gcatcatgt catccttagc ccatggagc	2580
	tgggcctgtc ccgatgagc aactgtcgg tgctgcgtc ctccgctg ctgcgggtc	2640
	tcaagctggc caaatcatg cccacctga acacactcat caagatcatc gggaactcag	2700
	tgggggcact ggggaacctg aactggtgc tagccatcat cgtgtcatc ttgctgtg	2760

	tgggcatgca gctctttggc aagaactact cggagctgag ggacagcgac tcaggcctgc	2820
	tgctcgctg gcacatgatg gacttctttc atgccttct catcatcttc cgcacacct	2880
	gtggagagtg gatcgagacc atgtgggact gcatggaggt gtcggggcag tcattatgcc	2940
	tgctggtctt ctgcttgtt atggtcattg gcaacctgt ggtctgaat ctctcttg	3000
	ccttgctgct cagctcttc agtgcagaca acctcacagc ccctgatgag gacagagaga	3060
	tgaacaacct ccagctggcc ctggcccgca tccagagggg cctgcgctt gtcaagcgga	3120
	ccacctggga tttctgctg ggtctctgc ggcagcgcc tcagaagccc gcagccctg	3180
	ccgcccaggg ccagctgccc agctgcattg ccaccccta ctcccgcga ccccagaga	3240
	cggagaaggt gcctcccacc cgcaaggaaa cacggttga ggaaggcgag caaccaggcc	3300
	agggcacccc cggggatcca gagccctgt gtgtgccat cgctgtggc gagtcagaca	3360
	cagatgacca agaagaagat gaggagaaca gcctgggcac ggaggaggag tccagcaagc	3420
[0030]	agcaggaatc ccagctgtg tccggtggc cagaggcccc tccgattcc aggacctga	3480
	gccaggtgtc agcgactgcc tctctgagg ccgaggccag tgcatctcag gccgactggc	3540
	ggcagcagtg gaaagcggaa cccaggccc cagggtgcg tgagaccca gaggacagtt	3600
	gctccgaggg cagcacagca gacatgacca acaccgtga gctctggag cagatccctg	3660
	acctcgcca gcatgtcaag gaccagagg actgcttac tgaaggctgt gtccggcgct	3720
	gtcctgctg tgcggtggac accacacagg cccaggga ggtctggtg cggttgcga	3780
	agacctgcta ccacatctg gagcacagct ggttcgagac attcatcatc tcatgatcc	3840
	tactcagcag tggagcgctg gcctcgagg acatctacct agaggagcgg aagaccatca	3900
	aggttctgct tgagtatgcc gacaagatgt tcacatatgt ctctgtctg gagatgctgc	3960
	tcaagtgggt ggcctacggc ttcaagaagt acttcacaa tgctggtgc tggctcgact	4020
	tcctcatctg agacgtctct ctggtcagcc tgggtggcaa caccctggc tttgccgaga	4080

	tgggccccat caagtactg cgagcgtgc gtgactccg tcctctgaga gctctgtcac	4140
	gatttgaggg catgaggggtg gtggtaatg ccctgggtgg cgccatccc tccatcatga	4200
	acgtctctct cgtctgcctc atcttctggc tcattctcag catcatgggc gtgaacctct	4260
	ttgcggggaa gtttgggagg tgcatcaacc agacagaggg agacttgcct ttgaactaca	4320
	ccatcgtgaa caacaagagc cagtgtgagt ccttgaactt gaccggagaa ttgtactgga	4380
	ccaaggtgaa agtcaacttt gacaacgtgg gggccgggta cctggccctt ctgcaggtgg	4440
	caacatttaa aggctggatg gacattatgt atgcagctgt ggactccagg gggtatgaag	4500
	agcagcctca gtgggaatac aacctctaca tgtacatcta tttgtcatt ttcacatct	4560
	ttgggtcttt cttaccctg aacctctta ttgggtgcat cattgacaac ttcaaccaac	4620
	agaagaaaaa gttagggggc caggacatct tcattgacaga ggagcagaag aagtactaca	4680
	atgccatgaa gaagctgggc tccaagaagc ccagaagcc catcccacgg ccctgaaca	4740
[0031]	agtaccaggg cttcatattc gacattgtga ccaagcaggc cttgacgtc accatcatgt	4800
	ttctgatctg cttgaatatg gtgacctga tgggtggagac agatgaccaa agtcctgaga	4860
	aatcaacat cttggccaag atcaacctgc tctttgtggc catcttcaca ggcgagtga	4920
	ttgtcaagct ggctgccctg cgccactact acttcaccaa cagctggaat atcttcgact	4980
	tcgtggttgt catcctctcc atcgtgggca ctgtgctctc ggacatcatc cagaagtact	5040
	tcttctccc gacgtcttc cgagtcattc gcttggccc aataggccgc atctcagac	5100
	tgatccgagg ggccaagggg atccgcacgc tgctctttgc cctcatgatg tcctgcctg	5160
	ccctctcaa catcgggctg ctgctctcc tcgtcatgtt catctactcc atctttggca	5220
	tggccaactt cgcttatgtc aagtgggagg ctggcatcga cgacatgttc aacttcaga	5280
	ccttcgcaa cagcatgctg tgctcttcc agatcaccac gtcggccggc tgggatggcc	5340
	tcctcagccc catcctcaac actgggccc cctactgcga cccactctg cccaacagca	5400

	atggctctcg gggggactgc gggagcccag ccgtgggcat cctcttctc accacctaca	5460
	tcacatctc ctctctatc gtgttcaaca tgtacattgc catcatctg gagaactca	5520
	gcgtggccac ggaggagagc accgagcccc tgagtgagga cgacttcgat atgttctatg	5580
	agatctggga gaaatttgac ccagaggcca ctacgtttat tgagtattcg gtcctgtctg	5640
	actttgccga tgcctgtct gagccactcc gtatcgccaa gccaaccag ataagcctca	5700
	tcaacatgga cctgcccattg gtgagtgggg accgcatcca ttgcatggac attctctttg	5760
	ccttcaccaa aagggctctg ggggagtctg gggagatgga cgcctgaag atccagatgg	5820
	aggagaagtt catggcagcc aacctatcca agatctcta cgagcccatc accaccacac	5880
	tccggcgcaa gcacgaagag gtgtcggcca tggttatcca gagagcctc cgagggcacc	5940
	tgctgcaacg ctctttgaag catgcctctt tctcttccg tcagcaggcg ggcagcggcc	6000
	tctccgaaga ggatgccctt gagcgagagg gcctcatcgc ctacgtgatg agtgagaact	6060
[0032]	tctccgacc ccttggccca cctccagct cctccatctc ctccacttc tcccaccct	6120
	cctatgacag tgtcactaga gccaccagcg ataacctcca ggtgcggggg tctgactaca	6180
	gccacagtga agatctcgcc gacttcccc ctctccgga cagggaccgt gactccatcg	6240
	tgtgagcctc ggcttggtg gccaggacac actgaaaagc agccttttc accatggcaa	6300
	acctaaatgc agtcagtcac aaaccagcct ggggccttc tggctttggg agtaagaaat	6360
	gggcctcagc cccgcggatc aaccaggcag agttctgtgg cgccgcgtgg acagccggag	6420
	cagttggcct gtgcttgag gcctcagata gacctgtgac ctggtctggt caggcaatgc	6480
	cctgcggctc tggaaagcaa ctcatccca gctgctgagg cgaaatataa aactgagact	6540
	gtatatgttg tgaatgggct tcataaatt tattatattt gatattttt tacttgagca	6600
	aagaactaag gatttttcca tggacatggg cagcaattca cgctgtctct tcttaaccct	6660
	gaacaagagt gtctatggag cagccggaag tctgttctca aagcagaagt ggaatccagt	6720

	gtggctcca caggtcttca ctgccagggt gtcgaatggg gtccccctcc cacttgacct	6780
	gagatgctgg gagggctgaa cccccactca cacaagcaca cacacacagt cctcacacac	6840
	ggaggccaga cacaggccgt gggacccagg ctccagcct aaggagagaca ggcctttccc	6900
	tgccggcccc ccaaggatgg ggttctgtc cacggggctc actctggccc cctattgtct	6960
	ccaagggtccc attttcccc tgtgtttca cgcaggatcat attgtcagtc ctacaaaaat	7020
	aaaaggcttc cagaggagag tggcctgggt cccagggtg gccctaggca ctgatagttg	7080
	ccttttctc cctcctgta agagtattaa caaaacaaa ggacacaagg gtgcaagccc	7140
	cattcacggc ctggcatgca gcttgcctt gctcctggaa cctggcaggc cctgccagc	7200
	cagccatcgg aagagagggc tgagccatgg gggtttggg ctaagaagtt caccagccct	7260
	gagccatggc ggcccctcag cctgcctgaa gagaggaaac tggcgatctc ccagggtctt	7320
	ctggaccata cgcgaggag tttctgtgt ggtctccagc tcctctccag acacagagac	7380
[0033]	atgggagtg ggagcggagc ttggccctgc gccctgtgca gggaaaggga tggtcaggcc	7440
	cagttctctg gcccttagag gggaatgaac catggcacct ttgagagagg gggcactgtg	7500
	gtcaggccca gcctctctgg ctacgccgg gatcctgatg gcacccacac agaggacctc	7560
	tttggggcaa gatccagggt gtcccatagg tctgtgaaa aggcttttc agggaaaaat	7620
	atttactag tccaatcacc ccaggacct cttcagctgc tgacaatcct atttagcata	7680
	tgcaaatctt ttaacataga gaactgtcac cctgaggtaa cagggtcaac tggcgaagcc	7740
	tgagcaggca ggggcttggc tgccccattc cagctctccc atggagcccc tccaccgggc	7800
	gcctgcctcc caggccacct cagtctcacc tgccggctct gggctggctg ctctaacct	7860
	acctcgccga gctgtcggag ggctggacat ttgtggcagt gctgaagggg gcattgccgg	7920
	cgagtaaagt attatgttct ttctgtcac ccagttccc ttggtggcaa cccagacctc	7980
	aacctatgcc cctgacagat ctagtctct tctcctgtgt tcccttgag tccagtgtgg	8040

	gacacggttt aactgtccca gcgacatttc tccaagtgga aatcctattt ttgtagatct	8100
	ccatgctttg ctctcaaggc ttggagaggt atgtgccctt cctgggtgct caccgcctgc	8160
	tacacaggca ggaatgcggt tgggaggcag gtcgggctgc cagcccagct ggccggaagg	8220
	agactgtggt ttttgtgtgt gtggacagcc cgggagcttt gagacagggtg cctggggctg	8280
	gctgcagacg gtgtggttgg ggggtgggagg tgagctagac ccaaccctta gcttttagcc	8340
	tggctgtcac cttttaatt tccagaactg cacaatgacc agcaggaggg aaggacagac	8400
	atcaagtgcc agatgttgtc tgaactaatc gagcacttct caccaaactt catgtataaa	8460
	taaaatacat atttttaaaa caaaccaata aatggcttac atga	8504
[0034]	<210> 6	
	<211> 7186	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 6	
	caggctctcc accatgtgaa tgccaacatg gccaggctcat tagagctgag ggaaaactag	60
	tgcccaaaga tatgaaaaga gtgtggatct tctggagaag tgctgttgtt caacaggtag	120
	aaaattggaa atgttggctt caccagaacc taagggcctt gttccctca ctaaagagtc	180
	ttttgaactt ataaaacagc atattgctaa aacacataat gaagaccatg aagaagaaga	240
	cttaaagcca actcctgatt tggagattgg caaaaagctt ccatttattt atggaaacct	300
	ttctcaagga atgggtgtcag agcccttggg agatgtggac ccatattact acaagaaaaa	360
	aaatacttct atagtattaa ataaaaatag aacaatcttc agattcaatg cggttccat	420
	cttgtgtaca ttgtctcctt tcaattgtat tagaagaaca actatcaagg ttttggtaga	480
	tcctttttc caactgttta ttctaattag tgtcctgatt gattgcgtat tcattgcctt	540
	gactaatttg ccaaaatgga gaccagtatt agagaatact ttgcttgga tttacacatt	600

	tgaataactt gtaaaactct ttgcaagagg tgtctgggca ggatcatttt ccttcctcgg	660
	tgatccatgg aactggctcg attcagcgt aactgtgttt gaggttatta taagatactc	720
	acctctggac ttattccaa cgcttcaaac tgcaagaact ttgagaattt taaaaattat	780
	tcctttaa at caaggctga aatccctgt aggggtcctg atccactgct tgaagcagct	840
	tattggtgtc attatcctaa ctctgtttt tctgagcata ttttctctaa ttgggatggg	900
	gctcttcattg ggcaactga aacataaatg ttttcgatgg cccaagaga atgaaaatga	960
	aacctgcac aacagaactg gaaaccata ttatattcga gaaacagaaa acttttatta	1020
	tttgaagga gaaagatatg ctctccttg tggcaacagg acagatgctg gtcagtgtcc	1080
	tgaaggatat gtgtgtgtaa aagctggcat aaatcctgat caaggcttca caaatttga	1140
	cagttttggc tgggccttat ttgccctatt tcgggtaatg gctcaggatt accctgaagt	1200
	actttatcac cagatacttt atgcttctgg gaaggtctac atgatatttt ttgtggtggt	1260
[0035]	aagtttttg ttttctttt atatggcaag ttgttctta ggcatacttg ccatggccta	1320
	tgaagaagaa aagcagagag ttggtgaaat atctaagaag attgaacaa aattcaaca	1380
	gactggaaaa gaactcaag aaggaaatga aacagatgag gccaagacca taaaataga	1440
	aatgaagaaa aggtcaccaa ttccacaga cacatcattg gatgtgttgg aagatgctac	1500
	tctcagacat aaggaagaac ttgaaaaatc caagaagata tgcccattat actggtataa	1560
	gtttgctaaa actttctga tctggaattg ttctccctgt tgggtaaaat tgaaagagtt	1620
	tgccatagg attataatgg caccatttac tgatctttc cttatcatat gcataatttt	1680
	aaacgtatgt tttctgacct tggagcatta tccaatgagt aaacaaacta acactcttct	1740
	caacattgga aacctggttt tcattggaat ttccacagca gaaatgattt taaaataat	1800
	tgcaatgcat ccatatgggt attccaagt aggttggaa attttgata gcatgatagt	1860
	gttccatggt ttaatagaac ttgtctagc aaatgttgca ggaatggctc ttctcgatt	1920

	attcaggatg ttaagaattt tcaagttggg aaagtattgg ccaacattcc agattttgat	1980
	gtggctctct agtaactcat ggggtggcct gaaagacttg gtctgttgt tgttcacatt	2040
	catctctttt tctgctgcat tcggcatgaa gctgttttgt aagaattatg aagaatttgt	2100
	ctgccacata gacaaagact gtcaactccc acgctggcac atgcatgact tttccactc	2160
	cttctgaat gtgttccgaa ttctctgtgg agagtgggta gagacctgt gggactgtat	2220
	ggaggttgca ggccaatcct ggtgtattcc ttttacctg atggtcattt taattggaaa	2280
	tttactggta ctttacctgt ttctggcatt ggtgagctca tttagttcat gcaaggatgt	2340
	aacagctgaa gagaataatg aagcaaaaaa tctccagctt gcagtggcaa gaattaaaaa	2400
	aggaataaac tatgtgcttc ttaaaatact atgcaaaaca caaaatgtcc caaaggacac	2460
	aatggaccat gtaaataagg tatatgttaa agaagatatt tctgaccata ccctttctga	2520
[0036]	attgagcaac acccaagatt ttctcaaaga taaggaaaaa agcagtggca cagagaaaaa	2580
	cgctactgaa aatgagagcc aatcacttat cccagtcct agtgtctcag aaactgtacc	2640
	aattgcttca ggagaatctg atatagaaaa tctggataat aaggagattc agagtaagtc	2700
	tggatgga ggcagcaaag agaaaataaa gcaatctagc tcattctgaat gcagtactgt	2760
	tgatattgct atctctgaag aagaagaaat gttctatgga ggtgaaagat caaagcatct	2820
	gaaaaatggt tgacagcgcg gatcttact tggtaaactc agtggagcat ccaagaaagg	2880
	aaaaatctgg cagaacatca ggaaaacctg ctgcaagatt gtagagaaca attggtttaa	2940
	gtgttttatt gggcttgta ctctgctcag cactggcact ctggcttttg aagatatata	3000
	tatggatcag agaaagacaa ttaaaatttt attagaatat gctgacatga tcttactta	3060
	tatcttcatt ctggaaatgc ttctaaaatg gatggcatat ggttttaagg cctatttctc	3120
	taatggctgg tacaggctgg acttcgtggg tgttattgtg tttgtctta gcttaatagg	3180
	caaaactcgg gaagaactaa aacctctat ttccatgaaa ttccttcggc ccctcagagt	3240

	tctatctcaa ttgaaagaa tgaaggtggt tgtgagagct ttgatcaaaa caacctacc	3300
	cactttgaat gtgtttcttg tctgcctgat gatctggctg atttttagta tcatgggagt	3360
	agacttattt gctggcagat tctatgaatg cattgacca acaagtggag aaaggtttcc	3420
	ttcatctgaa gtcataaata agagtcggtg tgaaagcctt ctgtttaacg aatccatgct	3480
	atgggaaaat gcaaaaatga actttgataa tgttggaaat ggtttccttt ctctgcttca	3540
	agtagcaaca ttaatggat ggatcactat tatgaattca gcaattgatt ctgttgctgt	3600
	taatatacag cctcattttg aagtcaacat ctacatgtat tgttacttta tcaactttat	3660
	tatatttggg gtattttccc ctctgagtat gctgattact gttattattg ataatttcaa	3720
	caagcataaa ataaagctgg gaggctcaaa tatctttata acggttaaac agagaaaaca	3780
	gtaccgcagg ctgaagaagc taatgtatga ggattctcaa agaccagtac ctcgccatt	3840
[0037]	aaacaagctc caaggattca tctttgatgt ggtaacaagc caagctttta atgtcattgt	3900
	tatggttctt atatgtttcc aagcaatagc catgatgata gacactgatg ttcagagtct	3960
	acaaatgtcc attgctctct actggattaa ctcaattttt gttatgctat atactatgga	4020
	atgtatactg aagctcatcg cttccgttg ttttatttc accattgctg ggaacatttt	4080
	tgattttatg gtggttattt tctccatcac aggactatgt ctgcctatga cagtaggac	4140
	ctaccttggt cctccttcac ttgtgcaact gatacttctc tcacggatca ttcacatgct	4200
	gcgtcttgga aaaggaccaa aggtgtttca taatctgatg cttcctttga tgctgtccct	4260
	cccagcatta ttgaacatca ttcttctcat cttcctggtc atgttcatct atgccgtatt	4320
	tggaatgtat aattttgcct atgttaaaaa agaagctgga attaataatg tgtctaattt	4380
	tgaaaccttt ggcaacagta tgctctgtct tttcaagtt gcaatatttg ctggttggga	4440
	tgggatgctt gatgcaattt tcaacagtaa atggctctgac tgtgatcctg ataaaattaa	4500
	ccctgggact caagtttagag gagattgtgg gaaccctct gttgggattt tttattttgt	4560

	cagttatc ctcatacat ggctgatcat tgtaaatac tacattgttg ttgtcatgga	4620
	gtttttaa attgcttcta agaagaaaa caagaccttg agtgaagatg atttaggaa	4680
	attcttcag gtatggaaaa ggttgatcc tgataggacc cagtacatag actctagcaa	4740
	gcttcagat ttgcagctg ctctgatcc tcctcttc atggcaaac caacaagg	4800
	ccagctcatt gcttggacc tcccatggc tgtggggac agaattcatt gcctcgatat	4860
	cttactgct ttacaaaga gagttatggg tcaagatgtg aggatggaga aagttgttc	4920
	agaaatagaa tcagggttt tgtagccaa ccctttaag atcacatgtg agccaattac	4980
	gactacttg aaacgaaac aagaggcagt tcagcaacc atcattcaac gtgctataa	5040
	aaattaccgc ttgaggcgaa atgacaaaa tacatcagat attcatatga tagatggta	5100
	cagagatgt catgctacta aagaagggtc ctatttgac aaagctaagg aaaagtcacc	5160
[0038]	tattcaaagc cagatcta accactacc acctcttc atattcttc acatatctga	5220
	aaaatgttga aagcctaagc caggaataaa agaaaagtag agataataat cagttctta	5280
	caaccgatgg taattaagct tgtattcaca agactcatg ccaattcac ttttagcat	5340
	tatatctaac aaatcaagag aatcctaata attgctgcag tgagttaaa gtgggttaa	5400
	gtggccatt gacaatctca tattgttt ctctacatgg cttatatgat gtgtgcctc	5460
	tagggaatga aggaagtgg tgatagagat cagcagcagc aggggcttc tttatatt	5520
	tatgtataat ttaatgggt ttaagtcacc actattaaga cttacaaata agcaaatac	5580
	tcctgatgt gggatggtga aatgctaag gccattaaat cataaactg cctagacaa	5640
	agccaattgg aagaaggag agagcagtc ttagaaagt gccttgaga tcaacctcag	5700
	agattcttg gctgattaaa actgcattg aaaaagattg gttgaagctc tgtgttatt	5760
	ttgtatgtt ctgttttca ttggaactg ggaatgaata ggattcatt gtgctcaagc	5820
	tcctgttc tcactctgg atagttcac ctaagctctg gctctaagc aggacagatt	5880

	cgtaaaacaa gaagcataaa ggagaggat agcctttttt tttttttt tttcatttt	5940
	cttctcattt acacctattt ttttaaaaag tatacattta ctaaaatgat gtaataaata	6000
	acatgttaat agactcaagc ttacacctat gaaattgatg ttttttacc agttatttct	6060
	aatgtaacat tgaatatata agatctgaca aatgtatgtt taaacatgaa ttagaagagt	6120
	tgagaactac cattatgtat agggattctc atagtgtctt ggccctaata tggaaagtgt	6180
	tggcaacttt aaagtacttt ttactgtatg ttataattct ttataactta gagagagaca	6240
	atggtcactc aaactatgag aactatgaat taggagataa aagtttaaat ttgttgtgt	6300
	ttataacag tatgtacaag ttagttttcc cttatatatt tacgttttca agttttttaa	6360
	tctcatcata tacatccata cttataaaa tgttttatat tcaaagaact gtaaaatcct	6420
	aaacattagt ttactactatt gaaattgttt tttaaagata ggcataaata gttgtcctta	6480
	gacttattca taaaatata gtcatttact tctatgtagt ttgagattct gagagttatt	6540
[0039]	ccaactttat gaagattgat ttcaatgtgc ctgctaagtc ctaaaagatt cagaaagaaa	6600
	atttatatat tattgattta aatatcatcc tttaaatatg ttgtataaca ttcaatatag	6660
	tttatgtatc agtgatttga ttttattctg aatgcatgat ctcaagcctt aactactata	6720
	atctttttct gccctcaga aattgaataa cctaaccaag atgcctttag gggatgccct	6780
	aagtaaagt aatttcagat ttcagggttt ttttttttct ctctctaagt gttccttccc	6840
	tttcttctcc tgctctccat catgttatgg agaccagtga ggaaccagtg ttaacttgg	6900
	gacaatgtga cagctggtgc ttatctaag ctccgttttc tatttcttgg gaatgcttta	6960
	ttgtggaac tgcttcagat acttaaattg aatcataact tgcttctgta aattgcgtaa	7020
	agacaacaaa ctgattttag ttgaaaagt ttatctttta ctgttaaacc ttgttgcca	7080
	gttaccttcc gaaagctgtg taaagagtta ttttaacaa agtcttaaca atatagtta	7140
	cttttagat actatagaaa ataataaata taacctgtaa accaca	7186

	<210> 7	
	<211> 7215	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 7	
	gagcgtcca agatggcgcc caccgcagtc ccgcccgcg catcctcggc gcctttgcag	60
	tccggccgcg cctcccggc cccgcgttag ggccgccgct gcctccctcg ccgcccgcg	120
	tgccagctga cctgtcctgg acgcagcata actaacgaag ctgctgcagg atgagaagat	180
	ggcagcgcg ctgctgcac caccaggccc tgatagtctc aagccttca cccctgagtc	240
	actggcaaac attgagaggc gcattgctga gagcaagctc aagaaaccac caaaggccga	300
	tggcagtcac cgggaggacg atgaggacag caagccaag ccaaacagcg acctggaagc	360
	aggggaagagt ttgccttca tctacgggga catccccaag ggcttggtg cagttccct	420
	ggaggacttt gaccatact atttgacgca gaaaacctt gtagtattaa acagagggaa	480
[0040]	aactctctc agatttagtg ccacgcctgc ctgtacatt ttaagtcctt ttaacctgat	540
	aagaagaata gctattaaaa tttgataca ttcagtattt agcatgatca ttatgtgcac	600
	tattttgacc aactgtgtat tcatgacttt tagtaaccct cctgactggt cgaagaatgt	660
	ggagtacacg ttacaggga ttatacatt tgaatcacta gtgaaaatca ttgcaagagg	720
	ttctgcata gatggcttta ccttttacg ggacccatgg aactggtag atttcagtgt	780
	catcatgatg gcgtatataa cagagtttgt aaacctaggc aatgtttcag ctctacgcac	840
	tttcagggta ctgagggtt tgaaaactat ttcggtaatc ccaggcctga agacaattgt	900
	gggtgccctg attcagtctg tgaagaaact gtcagatgtg atgacctga cagtgttctg	960
	cctgagtgtt ttgccttga tcggactgca gctgttcag gggaacctc gaaacaagtg	1020
	tggtgtgtgg ccataaaact tcaacgagag ctatcttgaa aatggcacca aaggctttga	1080
	ttgggaagag tatatcaaca ataaaacaaa ttctacaca gttcctggca tgctggaacc	1140

	tttactctgt gggaacagtt ctgatgctgg gcaatgccca gagggatacc agtgtatgaa	1200
	agcaggaagg aacccaact atggttacac aagtttgac acttttagct gggccttctt	1260
	ggcattattt cgccttatga cccaggacta ttgggaaaac ttgtatcaat tgactttacg	1320
	agcagccggg aaaacataca tgatcttctt cgtcttggtc atctttgtgg gttctttcta	1380
	tctggtgaac ttgatcttgg ctgtggtggc catggcttat gaagaacaga atcaggcaac	1440
	actggaggag gcagaacaaa aagaggctga atttaaagca atgttgagc aacttaagaa	1500
	gcaacaggaa gaggcacagg ctgctcgat ggccactca gcaggaactg tctcagaaga	1560
	tgccatagag gaagaagggtg aagaaggagg gggctcccct cggagctctt ctgaaatctc	1620
	taaactcagc tcaaagagtg caaaggaaaag acgtaacagg agaaagaaga ggaagcaaaa	1680
	ggaactctct gaaggagagg agaaagggga tcccgagaag gtgtttaagt cagagtcaga	1740
	agatggcatg agaaggaagg cctttcggct gccagacaac agaataggga ggaaattttc	1800
[0041]	catcatgaat cagtactgc tcagcatccc aggctcgccc ttctctccc gccacaacag	1860
	caagagcagc atcttcagtt tcaggggacc tgggcgggtc cgagaccggt gctccgagaa	1920
	tgagttcgcg gatgacgagc acagcacggt ggaggagagc gagggccgcc gggactccct	1980
	cttcacccc atccgggccc gcgagcgccg gagcagctac agcggctaca gcggctacag	2040
	ccagggcagc cgctctcgc gcatcttccc cagcctgcgg cgcagcgtga agcgcaacag	2100
	cacggtggac tgcaacggcg tgggtgccct catcggcggc cccggctccc acatcggcgg	2160
	gcgtctctg ccagaggcta caactgaggt ggaaattaag aagaaaggcc ctggatctct	2220
	tttagttcc atggaccaat tagcctccta cgggcggaag gacagaatca acagtataat	2280
	gagtgttgtt acaaatacac tagtagaaga actggaagag tctcagagaa agtgcccgcc	2340
	atgctggtat aaatttgcca acactttcct catctgggag tgccaccctt actggataaa	2400
	actgaaagag attgtgaact tgatagttat ggaccctttt gtggatttag ccatcaccat	2460

	ctgcatcgtc ctgaatacac tgtttatggc aatggagcac catcctatga caccacaatt	2520
	tgaacatgtc ttggctgtag gaaatctggt tttactgga attttcacag cggaaatgtt	2580
	cctgaagctc atagccatgg atccctacta ttatttccaa gaaggttgga acatttttga	2640
	cggatttatt gtctccctca gtttaatgga actgagtcta gcagacgtgg aggggctttc	2700
	agtgtgcga tctttccgat tgctccgagt ctcaaattg gccaaatcct ggcccaccct	2760
	gaacatgcta atcaagatta ttggaaattc agtgggtgcc ctgggcaacc tgacactggt	2820
	gctggccatt attgtcttca tctttgccgt ggtggggatg caactcttg gaaaaagcta	2880
	caaagagtgt gtctgcaaga tcaaccagga ctgtgaactc cctcgctggc atatgcatga	2940
	ctttttccat tccttctca ttgtctttcg agtgtgtgc ggggagtgga ttgagaccat	3000
	gtgggactgc atggaagtgg caggccaggc catgtgcctc attgtcttta tgatggtcac	3060
	ggtgattggc aacttggtgg tgctgaacct gtttctggcc ttgctcctga gctcctcag	3120
[0042]	tgagacaac ctggctgcca cagatgacga tggggaaatg aacaacctcc agatctcagt	3180
	gatccgtatc aagaagggtg tggcctggac caaactaaag gtgcacgcct tcatgcaggc	3240
	ccacttaag cagcgtgagg ctgatgaggt gaagcctctg gatgagttgt atgaaaagaa	3300
	ggccaactgt atcgccaatc acaccggtgc agacatccac cggaatggtg acttcagaa	3360
	gaatggcaat ggcaacaac gcggcattgg cagcagcgtg gagaagtaca tcattgatga	3420
	ggaccacatg tccttcatca acaaccccaa cttgactgta cgggtacca ttgctgtggg	3480
	cgagtctgac ttgagaacc tcaacacaga ggatgttagc agcgagtcgg atcctgaagg	3540
	cagcaaagat aaactagatg acaccagctc ctctgaagga agcaccattg atatcaaacc	3600
	agaagtagaa gaggtccctg tggaacagcc tgaggaatac ttggatccag atgcctgctt	3660
	cacagaaggt tgtgtccagc ggttcaagtg ctgccaggtc aacatcgagg aagggctagg	3720
	caagtcttgg tggatcctgc ggaaaacctg cttctcatc gtggagcaca actggtttga	3780

	gaccttcac atcttcatga ttctgctgag cagtggcgcc ctggccttcg aggacatcta	3840
	cattgagcag agaaagacca tccgcacat cctggaatat gctgacaaag tcttcaccta	3900
	tatcttcac ctggagatgt tgctcaagtg gacagcctat ggcttcgtca agttcttcac	3960
	caatgcctgg tgttggtgg acttcctcat tgtggctgtc tcttagtca gccttatagc	4020
	taatgcctg ggctactcg aactaggtgc cataaagtc ctaggaccc taagagcttt	4080
	gagaccctta agagccttat cacgattga agggatgagg gtggtggtga atgccttgg	4140
	ggcgccatc cctccatca tgaatgtgct gctggtgtgt ctcatcttct ggctgatttt	4200
	cagcatcatg ggagttaact tgttgctggg aaagtaccac tactgcttta atgagacttc	4260
	tgaaatccga ttgaaattg aagatgtcaa caataaaact gaatgtgaaa agcttatgga	4320
	ggggaacaat acagagatca gatggaagaa cgtgaagatc aactttgaca atgttggggc	4380
[0043]	aggatactg gcccttctc aagtagcaac ctcaaaggc tggatggaca tcatgtatgc	4440
	agctgtagat tcccggaagc ctgatgagca gcctaagtat gaggacaata tctacatgta	4500
	catctatctt gtcatcttca tcatcttcgg ctcttcttc acctgaacc tgttcattgg	4560
	tgcatcatt gataactca atcaacaaaa gaaaaagttc ggaggtcagg acatcttcat	4620
	gaccgaagaa cagaagaagt actacaatgc catgaaaaag ctgggctcaa agaagccaca	4680
	gaaacctatt ccccgccct tgaacaaaat ccaaggaatc gtcttgatt ttgtcactca	4740
	gcaagcctt gacattgta tcatgatgct catctgcctt aacatggtga caatgatgg	4800
	ggagacagac actcaaagca agcagatgga gaacatctc tactggatta acctggtgtt	4860
	tggtatcttc ttcacctgtg agtgtgtgct caaatgttt gcgttgaggc actactactt	4920
	caccattggc tggaacatct tcgacttcgt ggtagtcac ctctcattg tgggaatgtt	4980
	cctggcagat ataattgaga aatactttgt tcccccaacc ctattccgag tcatccgatt	5040
	ggcccgatt gggcgcatct tgcgtctgat caaaggcgcc aaagggattc gtacctgt	5100

	ctttgcctta atgatgtcct tgcctgccct gttcaacatc ggccctctgc tcttctggt	5160
	catgttcac tctccattt ttgggatgtc caattttgca tatgtgaagc acgaggctgg	5220
	tatcgatgac atgttcaact ttgagacatt tggcaacagc atgatctgcc tgtttcaaat	5280
	cacaacctca gctggttggg atggcctgct gctgcccac ctaaaccgcc cccctgactg	5340
	cagcctagat aaggaacacc cagggagtgg cttaaggga gattgtggga acccctcagt	5400
	gggcaccttc ttcttgtaa gctacatcat catctcttc ctaattgtcg tgaacatga	5460
	cattgccac atcctggaga acttcagtgt agccacagag gaaagtgcag accctctgag	5520
	tgaggatgac ttgagacct tctatgagat ctgggagaag ttcgaccccg atgccacca	5580
	gttcattgag tactgtaagc tggcagactt tgcagatgcc ttggagcatc ctctccgagt	5640
	gccaagccc aataccattg agctcatcgc tatggatctg ccaatggtga gcggggatcg	5700
[0044]	catccactgc ttggacatcc ttttgcctt caccaagcgg gtctctgggag atagcgggga	5760
	gttgacatc ctgcggcagc agatggaaga gcggttcgtg gcatccaatc ctccaaagt	5820
	gtcttacgag ccaatcacia ccacactgcg tcgcaagcag gaggaggtat ctgcagtgg	5880
	cctgcagcgt gcctaccggg gacatttggc aaggcggggc ttcatctgca aaaagacaac	5940
	ttctaataag ctggagaatg gaggcacaca ccgggagaaa aaagagagca ccccatctac	6000
	agcctccctc ccgtctatg acagtgtaac taaacctgaa aaggagaaac agcagcgggc	6060
	agaggaagga agaagggaaa gagccaaaag acaaaaagag gtcagagaat ccaagtgtta	6120
	gaggagaaca aaaattcagt attatacaga tctaaaactc gcaagtgaag gattgtttac	6180
	aaacttctg aatattatca atgcagaaca gctgtggaga cttaacctg aagatctata	6240
	caaacgctg tctgcttacc acgtaacaca gctgcatctt gagcagtgc ctgccaagg	6300
	caaaggaccc cgctccctag acttacagat ttctaatgc ttgggcaggt ggttactgca	6360
	tgtccacat cagtcaatgc aacttaggac aaaactaacc agatacagaa acagaagaga	6420

	ggctgccggg accagcatat ttccgttgca gccaaatgga tttattttt tcattttatt	6480
	gatttcaga agcagaaagc atcactttaa aagttcggtt gttcatgcaa actatatttg	6540
	cattcttaca ttagttaagc taagcagcaa aaagaaaaca cacacacaca ctcacattta	6600
	gcccatgtca ttaattgtc agtttcttg acataaagcg catcttctcc acatgggctt	6660
	cacgtgggtt ggagatgggt gggggaaaac aatcagggtt cttcaggctg aggaggactt	6720
	gctcaggccg attccaaaca ttgtgctcgt tcaatgcgta gaaatgattt gcatgatggc	6780
	atgccgtgat cagaagtcac gcatgagatc catacaccac aggacactac taatctagtc	6840
	ccttgactg ggtcagcctt tggacaggac ccagccctgc accgttcact gtatttgag	6900
	aaaatggtaa gagttccata ccggctacaa ttctttgagt tcttaaaagt cttcataca	6960
	ccttctgggt agggaaacaa ccaactaatt gactaacacc accaacaaca aaaaacaaac	7020
[0045]	ccaatccaac aagcagatgg atccgttgcg tgtatatgtt taacagacat ctctaacata	7080
	cagccattgt tgcacatttt gcaagatgaa ctatttaatg ctgctctgtg tccagtacat	7140
	gggggagact ttgatcccaa atggcttgta ctatttatgt cactgtaaaa ccaaatccta	7200
	gggctaataa aaaaa	7215
	<210> 8	
	<211> 9771	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 8	
	cggggctgct acctccacgg gcgcgccctg gcaggagggg cgagctctgc ttgcaggcgg	60
	tcgccagcgc tccagcggcg gctgtcggct ttccaattcc gccagctcgg ctgaggctgg	120
	gctagcctgg gtgccagtgg ctgctagcgg caggcgtccc ctgagcaaca ggagcccaga	180
	gaaaaagaag cagccctgag agagcgccgg ggaaggagag gcccgcgcc tctctggag	240

	ccagattctg cagggtgcact ggggtggggat gatcggcggg ctagggtgca agcctcttat	300
	gtgaggagct gaagaggaat taaaatatac aggatgaaaa gatggcaatg ttgcctcccc	360
	caggacctca gagctttgtc catttcacaa aacagtctct tgccctcatt gaacaacgca	420
	ttgtgaaag aaaatcaaag gaacccaaag aagaaaagaa agatgatgat gaagaagccc	480
	caaagccaag cagtgacttg gaagctggca aacagctgcc cttcatctat ggggacattc	540
	ctcccgcat ggtgtcagag cccctggagg acttggaacc ctactatgca gacaaaaaga	600
	cttcatagt attgaacaaa gggaaaacaa tcttccgtt caatgccaca cctgctttat	660
	atatgcttc tccttcagt cctctaagaa gaatatctat taagatttta gtacactcct	720
	tattcagcat gctcatcatg tgactattc tgacaaactg catatttatg accatgaata	780
	accacccgga ctggaccaa aatgtcgagt acactttac tggaatatat acttttgaat	840
	cacttgtaa aatccttgca agaggcttct gtgtaggaga attcactttt cttcgtgacc	900
[0046]	cgtggaactg gctggatttt gtcgtcattg ttttgcgta tttaacagaa ttgtaaacc	960
	taggcaatgt ttcagctctt cgaacttca gagtattgag agctttgaaa actatttctg	1020
	taatcccagg cctgaagaca attgtagggg ctttgatcca gtcagtgaag aagctttctg	1080
	atgtcatgat cctgactgtg ttctgtctga gtgtgtttgc actaattgga ctacagctgt	1140
	tcatgggaaa cctgaagcat aaatgtttc gaaattcact tgaaaataat gaaacattag	1200
	aaagcataat gaatacccta gagagtgaag aagactttag aaaatatttt tattacttgg	1260
	aaggatccaa agatgctctc ctttgtggtt tcagcacaga ttcaggtcag tgtccagagg	1320
	ggtacacctg tgtgaaaatt ggcagaaacc ctgattatgg ctacacgagc ttgacactt	1380
	tcagctgggc cttcttagcc ttgttaggc taatgacca agattactgg gaaaacctt	1440
	accaacagac gctgcgtgct gctggcaaaa cctacatgat cttcttgtc gtagtgattt	1500
	tcctgggctc cttttatcta ataaactga tcctggctgt ggttgccatg gcatatgaag	1560

	aacagaacca ggcaaacatt gaagaagcta aacagaaaga attagaattt caacagatgt	1620
	tagaccgtct taaaaagag caagaagaag ctgaggcaat tgcagcggca gcggctgaat	1680
	atacaagtat taggagaagc agaattatgg gcctctcaga gagttcttct gaaacatcca	1740
	aactgagctc taaaagtgt aaagaaagaa gaaacagaag aaagaaaaag aatcaaaaga	1800
	agctctccag tggagaggaa aaggagatg ctgagaaatt gtcgaaatca gaatcagagg	1860
	acagcatcag aagaaaaagt ttccacctg gtgtcgaagg gcataggcga gcacatgaaa	1920
	agaggtgtc taccccaat cagtcaccac tcagattcg tggctccttg ttttctgaa	1980
	ggcgaagcag cagaacaagt cttttagtt tcaaaggcag aggaagagat ataggatctg	2040
	agactgaatt tgccgatgat gagcacagca ttttggaga caatgagagc agaaggggct	2100
	cactgtttgt gcccacaga cccaggagc gacgcagcag taacatcagc caagccagta	2160
	gggtcccacc aatgctgccg gtgaacggga aaatgcacag tgctgtggac tgcaacgggtg	2220
[0047]	tggtctccct ggttgatgga cgctcagccc tcattgctcc caatggacag ctctgccag	2280
	agggcagcag caatcaaata cacaagaaaa ggcgtttag ttctatctc ctttcagagg	2340
	atatgctgaa tgatccaac ctgacacaga gagcaatgag tagagcaagc atattaacaa	2400
	acactgtgga agaactgaa gagtccagac aaaaatgtcc acctgggtgg tacagatttg	2460
	cacacaaatt ctgatctgg aattgctctc catattggat aaaattcaaa aagtgtatct	2520
	atattattgt aatggatcct ttgtagatc ttgcaattac cattgcata gttttaaca	2580
	cattatttat ggctatggaa caccaccaa tgactgagga attcaaaaat gtacttgcta	2640
	taggaaattt ggtctttact ggaatctttg cagctgaaat ggtattaaaa ctgattgcca	2700
	tgatccata tgagtatttc caagtaggct ggaatatttt tgacagcctt attgtgactt	2760
	taagtttagt ggagctcttt ctgacagatg tggaaggatt gtcagttctg cgatcattca	2820
	gactgctccg agtcttcaag ttggcaaaat cctggccaac attgaacatg ctgattaaga	2880

	tcattggttaa ctcagtaggg gctctaggta acctcacctt agtgttggcc atcatcgtct	2940
	tcatttttgc tgggtcggc atgcagctct ttggaagag ctacaaagaa tgtgtctgca	3000
	agatcaatga tgactgtacg ctcccacggt ggcacatgaa cgacttctc cactcctcc	3060
	tgatttgttt ccgctgctg tgggagagt ggatagagac catgtgggac tgtatggagg	3120
	tcgctggtca agctatgtgc cttattgtt acatgatggg catggtcatt ggaaacctgg	3180
	tggtcctaaa cctatttctg gccttattat tgagctcatt tagttcagac aatcttacag	3240
	caattgaaga agacctgat gcaaacaacc tccagattgc agtgactaga attaaaaagg	3300
	gaataaatta tgtgaacaa acctacgtg aatttattct aaaagcattt tccaaaaagc	3360
	caaagatttc caggagata agacaagcag aagatctgaa tactaagaag gaaaactata	3420
	tttctaacca tacacttgct gaaatgagca aaggtcacaa tttctcaag gaaaaagata	3480
	aatcagtggt ttttgaagc agcgtggaca aacacttgat ggaagacagt gatggccaat	3540
[0048]	catttattca caatcccagc ctacagtga cagtgccaat tgcacctggg gaatccgatt	3600
	tggaaaatat gaatgctgag gaacttagca gtgattcgga tagtgaatac agcaaagtga	3660
	gattaaaccg gtcaagctcc tcagagtga gcacagttga taacctttg cctggagaag	3720
	gagaagaagc agaggctgaa cctatgaatt ccgatgagcc agaggcctgt ttacagatg	3780
	gttgtgtacg gaggttctca tgcgtccaag ttaacataga gtcagggaaa ggaaaaatct	3840
	ggtggaacat caggaaaacc tgctacaaga ttgtgaaca cagttggtt gaaagcttca	3900
	ttgtctcat gatcctgctc agcagtggg ccctggctt tgaagatatt tatattgaaa	3960
	ggaaaaagac cattaagatt atcctggagt atgcagacaa gatcttact tacatcttca	4020
	ttctggaaat gcttctaaaa tggatagcat atggttataa aacatattc accaatgcct	4080
	ggtgtggct ggatttcta attgttgatg tttcttggg tactttagt gcaaactc	4140
	ttggctactc agatcttggc ccattaaat ccctcggac actgagagct ttaagacctc	4200

	taagagcctt atctagattt gaaggaatga gggctgtgt gaatgcactc ataggagcaa	4260
	ttccttccat catgaatgtg ctacttgtgt gtcttatatt ctggctgata ttcagcatca	4320
	tgggagtaaa tttgtttgct ggcaagtct atgagtgtat taacaccaca gatgggtcac	4380
	ggtttctgc aagtcaagtt ccaaatcggt ccgaatgttt tgcccttatg aatgttagtc	4440
	aaaatgtgcg atggaaaaac ctgaaagtga actttgataa tgtcggactt ggttacctat	4500
	ctctgcttca agttgcaact ttaagggat ggacgattat tatgtatgca gcagtggatt	4560
	ctgttaatgt agacaagcag cccaatatg aatatagcct ctacatgtat atttattttg	4620
	tcgtctttat catctttggg tcattcttca cttgaactt gttcattggt gtcacatag	4680
	ataatttcaa ccaacagaaa aagaagcttg gaggtcaaga catctttatg acagaagaac	4740
	agaagaaata ctataatgca atgaaaaagc tgggggtccaa gaagccacaa aagccaattc	4800
[0049]	ctcgaccagg gaacaaaatc caaggatgta tatttgacct agtgacaaat caagcctttg	4860
	atattagtat catggttctt atctgtctca acatggtaac catgatgga gaaaaggagg	4920
	gtcaaagtca acatatgact gaagttttat attggataaa tgtgggtttt ataaccttt	4980
	tcactggaga atgtgtgcta aaactgatct ccctcagaca ctactactc actgtaggat	5040
	ggaatatttt tgattttgtg gttgtgatta tctccattgt aggtatgttt ctactgatt	5100
	tgattgaaac gtattttgtg tcccctacc tgtccgagt gatccgtctt gccaggattg	5160
	gccgaatcct acgtctagtc aaaggagcaa aggggatccg cacgtgctc ttgctttga	5220
	tgatgtccct tcctgcgttg ttaacatcg gcctctgct ctctctggc atgttcatct	5280
	acgccatctt tggaatgtcc aactttgcct atgttaaaaa ggaagatgga attaagaca	5340
	tgttcaattt tgagaccttt ggcaacagta tgatttgctt gttccaaatt acaacctctg	5400
	ctggctggga tggattgcta gcacctatc ttaacagtaa gccacccgac tgtgaccaa	5460
	aaaaagtca tcctggaagt tcagttgaag gagactgtgg taacctatct gttggaatat	5520

	tctactttgt tagttatatc atcatatcct tcctggttgt ggtgaacatg tacattgcag	5580
	tcatactgga gaattttagt gttgccactg aagaaagtac tgaacctctg agtgaggatg	5640
	actttgagat gttctatgag gtttgggaga agtttgatcc cgatgcgacc cagtttatag	5700
	agttctctaa actctctgat ttgcagctg ccctggatcc tcctcttctc atagcaaaac	5760
	ccaacaaagt ccagctcatt gccatggatc tgcccatggt tagtggtgac cggatccatt	5820
	gtcttgacat cttatttgc tttacaaagc gtgttttggg tgagagtggg gagatggatt	5880
	ctcttcgttc acagatggaa gaaaggttca tgtctgcaa tccttccaaa gtgtcctatg	5940
	aacctcatc aaccacacta aaacggaaac aagaggatgt gtctgtact gtcattcagc	6000
	gtgcttatag acgttaccgc ttaaggcaaa atgtcaaaaa tatatcaagt atatacataa	6060
	aagatggaga cagagatgat gatttactca ataaaaaga tatggctttt gataatgtta	6120
	atgagaactc aagtcagaa aaaacagatg ccacttcac caccacctct ccacctcat	6180
[0050]	atgatagtgt aacaaagcca gacaaagaga aatatgaaca agacagaaca gaaaaggaag	6240
	acaaagggaa agacagcaag gaaagcaaaa aatagagctt cattttgat atattgttta	6300
	cagcctgtga aagtgattta tttgtgttaa taaaactctt ttgaggaagt ctatgcaaaa	6360
	atccttttta tcaaatatt ctgaaggca gtgcagtcac taactctgat ttctaagaa	6420
	agggtggcag cattagcaga tggttatttt tgactgatg attctttaag aatcgtaaga	6480
	gaactctgta ggaattattg attatagcat acaaaagtga ttcagttttt tggtttttaa	6540
	taaatcagaa gaccatgtag aaaactttta catctgcctt gtcactcttt cacaggattg	6600
	taattagtct tgtttcccat gtaaataaac aacacacgca tacagaaaaa tctattattt	6660
	atctattatt tggaaatcaa caaaagtatt tgcctggct ttgcaatgaa atgcttgata	6720
	gaagtaatgg acattagtta tgaatgttta gttaaatgc attattaggg agcttgactt	6780
	ttatcaatg tacagaggtt attctatatt ttgaggtgct taaatttatt ctacattgca	6840

	tcagaaccaa ttatatgtg cctataaaat gccatgggat taaaatata tgtaggctat	6900
	tcatttctac aaatgtttt cattcatctt gactcacatg ccaacaagga taagacttac	6960
	ctttagagta ttgtgtttca tagcctttct tctttcatat cccttttgt tcatagaata	7020
	accacagaac ttgaaaaatt attctaagta catattacac tcctcaaaaa aaacaagat	7080
	aactgagaaa aaagtattg acagaagttc tatttgctat tatttacata gcctaacatt	7140
	tgactgtgct gcccaaaata ctgataatag tctcttaaac tctttgtca aattttcctg	7200
	ctttctatg cagtattgtt tagtcatcct ttcgctgtaa gcaaagttga tgaaatcctt	7260
	cctgatatgc agttagtgtt ttgaccacgg tacatacttg agcagataat aactggggca	7320
	cagtatttat tgcatactt gtatacaatc ccgtgtttgg caagctttca aatcatgtaa	7380
	tatgacagac ttacacaga tatgtgttta gtatgaataa aaaagcattg aaatagggat	7440
[0051]	tcttgccaac ttgctctctt gccaccaact tactttccta aattatggaa gtaatctttt	7500
	ttggatatac ttcaatgtat acaatgagga agatgtcacc ttctcctaa aattctatga	7560
	tgtgaaatat attttgctc aatcaacaca gtacatggg cttctaatt atcaagcaca	7620
	tattcatttt gcattagctg tagacatcta gtttttgaa aacacctatt aatagtaatt	7680
	tgaaaagaaa taaccataat gcttttttc gtgagttat ttcaggaata tgagatcttt	7740
	ctctataaa gtattcatg cacaggcaaa aattgagcta cacaggtaga atgtagtttt	7800
	actagaaga tttttgtggg aggttttgaa gcaaatatat aaaacaact tcactaattt	7860
	gctttccata tttaaaaaat aataaattac atttatataa taaatgttta aagcacatat	7920
	ttttgtgtg tctggcaatt taaaagaaa gaggatttaa acgtacctat agaaacaaag	7980
	atttatgggt aaagaatgag atcagaagtc tagaatgttt ttaaattgtg atatatttta	8040
	caacatccgt tattactttg agacatttgt cctaacttac gtataaaact caatctaggg	8100
	ctaaagattc ttataccat ctaggttca ttcatcttag gctatttgaa ccacttttta	8160

	atttaatatg aaagacacca tgcagtgttt tccgagacta catagatcat ttatcacat	8220
	acctaccaag cctgttgga ataggttttg ataatttaag tagggaccta tacaaaatat	8280
	attacattta tcagattttt aaatacattc aattaagaat ttaacatcac cttaaatttg	8340
	aattcaatct accgttattt caaactcaca aatataactg cattatgaat acttacataa	8400
	tgtagtaaga caagatgttt gacagggtcg tgtgtaattt tctattaatg tttttacatt	8460
	gccttgtttt tatgtaaaat aaaaaatatg ggcaactggg ttgtaacaa cacaatttct	8520
	tcttagcatt tcaaaaaat atataaagtt gttctttttc ctatttcag aactatgttt	8580
	tttttaaaa taacatgggt aagttttata tatatttacg tttgtttcag gaatgtctac	8640
	ttgtgacttt ttatcaatta aaaataatat ttggaagaaa gagcttatta agtataagct	8700
	tgaagtaaaa ttagacctct ctttccatgt agattactgt ttgtactgat ggtttcaccc	8760
	ttcagaaggc actgtcatat taatatttaa attttataat cgctgaactt attacacca	8820
[0052]	acaatacaga aaggcagtta cactgaagaa cttaacttag aataaaatgg aagcaaacag	8880
	gttttctaaa aactttttta agtgaccagg tctcgctctg tcaccaggc tagagtgcaa	8940
	tggcatgatc atagctctct gcagcctcaa ctctgggctc aagcaaccct cctgcctcag	9000
	cctcccaagt agctaagact acaggtagat gccaccatgc ctggctaata tttaaatttt	9060
	tgtagataag gggctttgct atgttgccca ggctagtctc aaactcctgg cttaagtgt	9120
	tcctactgtc atgacctgcc aacatgctgg ggttacaggc atgagccacc atgccccaaa	9180
	caggtttgaa cacaaatctt tcggatgaaa attagagaac ctaattttag cttttgata	9240
	gttacctagt ttgcaaaaga ttgggtgac ttgtgagctg tttttaaag ctgattgttg	9300
	aacatcacia cccaaaatac ttagcatgat ttatagagt ttgatagct ttattaaaaa	9360
	gagtgaaaat aaaatgcata tgtaaataaa gcagttctaa atagctattt cagagaaatg	9420
	ttaatagaag tgctgaaaga agggccaact aaattaggat ggccagggaa ttggcctggg	9480

	tttaggacct atgtatgaag gccaccaatt ttttaaaat atctgtgggt tattatgtta	9540
	ttatcttctt gaggaaaaca atcaagaatt gcttcatgaa aataaataaa tagccatgaa	9600
	tatcataaag ctgtttacat aggattcttt acaaatttca tagatctatg aatgctcaaa	9660
	atgtttgagt ttgccataaa ttatattgta gttatattgt agttatactt gagactgaca	9720
	cattgtaata taatctaaga ataaaagtta tacaaaataa aaaaaaaaaa a	9771
	<210> 9	
	<211> 5874	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 9	
	atggaattcc ccattggatc cctcgaaact aacaacttc gtcgcttac tccggagtca	60
	ctggtggaga tagagaagca aattgctgcc aagcagggaa caaagaaagc cagagagaag	120
[0053]	catagggagc agaaggacca agaagagaag cctcgcccc agctggactt gaaagcctgc	180
	aaccagctgc ccaagtcta tggtagctc ccagcagaac tgatcgggga gccctggag	240
	gatctagatc cgttctacag cacacaccgg acatttatgg tgctgaacaa agggaggacc	300
	attcccgggt ttagtgccac tcgggccctg tggctattca gtccttcaa cctgatcaga	360
	agaacggcca tcaaagtgtc tgtccactcg tggtcagtt tatttattac ggtcactatt	420
	ttggttaatt gtgtgtgcat gacccgaact gaccttcag agaaaattga atatgtcttc	480
	actgtcattt acaccttga agccttgata aagatactgg caagaggatt ttgtctaaat	540
	gagttcacgt acctgagaga tccttgaac tggctggatt ttagcgcat taccctggca	600
	tatgttggca cagcaataga tctccgtggg atctcaggcc tgcggacatt cagagttctt	660
	agagcattaa aaacagtttc tgtgatcca ggcctgaagg tcattgtggg gccctgatt	720
	cactcagtga agaaactggc tgatgtgacc atctcacca tcttctgcct aagtgtttt	780
	gccttgggtg ggctgcaact ctcaagggc aacctcaaaa ataaatgtgt caagaatgac	840

	atggctgtca atgagacaac caactactca tctcacagaa aaccagatat ctacataaat	900
	aagcgaggca cttctgaccc cttactgtgt ggcaatggat ctgactcagg ccactgccct	960
	gatggttata tctgccttaa aacttctgac aacccggatt ttaactacac cagctttgat	1020
	tcctttgctt gggctttcct ctactgttc cgcctcatga cacaggattc ctgggaacgc	1080
	ctctaccagc agaccctgag gacttctggg aaaatctata tgatctttt tgtgctcgta	1140
	atcttctgg gatctttcta cctggtaac ttgatcttg ctgtagtcac catggcgat	1200
	gaggagcaga accaggcaac cactgatgaa attgaagcaa aggagaagaa gttccaggag	1260
	gccctcgaga tgctccgaa ggagcaggag gtgctagcag cactagggat tgacacaacc	1320
	tctctccact ccacaaatgg atcaccttta acctcaaaa atgccagtga gagaaggcat	1380
	agaataaagc caagagtgtc agagggtcc acagaagaca acaaatcacc ccgctctgat	1440
[0054]	ccttacaacc agcgcaggat gtcttttcta ggctcgcct ctggaaaacg ccgggctagt	1500
	catggcagtg tgttcattt ccggtcccct ggccgagata tctactccc tgagggagtc	1560
	acagatgatg gagtctttcc tggagaccac gaaagccatc ggggctctct gctgctgggt	1620
	gggggtgctg gccagcaagg cccctccct agaagccctc ttctcaacc cagcaaccct	1680
	gactccaggc atggagaaga tgaacaccaa ccgccgccca ctagttagct tgcccctgga	1740
	gctgtcatg tctcggcatt cgatgcagga caaagaaga ctttctgtc agcagaatac	1800
	ttagatgaac cttccgggc ccaaaggga atgagtgtg tcagtatcat aacctcgtc	1860
	cttgaggaa tcgaggagtc tgaacagaag tgcccacct gcttgaccag cttgtctcag	1920
	aagtatctga tctgggattg ctgccccatg tgggtgaagc tcaagacaat tctcttggg	1980
	ctgtgacgg atccctttgc agagctcacc atcacctgt gcatcgtgtt gaacaccatc	2040
	ttcatggcca tggagacca tggcatgagc cctaccttcg aagccatgct ccagataggc	2100
	aacatcgtct ttacatatt tttactgtc gaaatggtc taaaaatcat tgccttcgac	2160

	ccatactatt atttcagaa gaagtggaat atctttgact gcatcatcgt cactgtgagt	2220
	ctgctagagc tgggcgtggc caagaaggga agcctgtctg tgctgcggag ctccgcttg	2280
	ctgcgcgtat tcaagctggc caaatcctgg cccaccttaa acacactcat caagatcatc	2340
	ggaaactcag tgggggcact ggggaacctc accatcatcc tggccatcat tgtctttgtc	2400
	tttgctctgg ttggcaagca gctcctaggg gaaaactacc gtaacaaccg aaaaaatc	2460
	tccgcgcccc atgaagactg gccccgctgg cacatgcacg acttctcca ctcttctc	2520
	attgtctcc gtatcctctg tggagagtgg attgagaaca tgtgggctg catggaagt	2580
	ggccaaaaat ccatatgcct catcctttc ttgacggtga tggtgctagg gaacctggtg	2640
	gtgcttaacc tgtcatcgc cctgctattg aactcttca gtgctgaca cctcacagcc	2700
	ccggaggacg atggggagggt gaacaacctg cagggtggccc tggcacggat ccaggctctt	2760
[0055]	ggccatcgta ccaaacaggc tcttgcagc ttctcagca ggtcctgccc attccccag	2820
	ccaaggcag agcctgagct ggtggtgaaa ctcccactct ccagctcaa ggctgagaac	2880
	cacattgctg ccaacactgc cagggggagc tctggagggc tccaagctcc cagaggcccc	2940
	agggatgagc acagtgactt catcgcta at ccgactgtgt gggctctgt gccattgct	3000
	gaggggtgaat ctgatctga tgacttgag gatgatggtg gggaagatgc tcagagctc	3060
	cagcaggaag tgatcccaa aggacagcag gagcagctgc agcaagtcga gaggtgtggg	3120
	gaccacctga caccaggag cccaggcact ggaacatctt ctgaggacct ggctccatcc	3180
	ctgggtgaga cgtggaaaga tgagtctgtt cctcaggctc ctgctgagg agtggaagc	3240
	acaagctcct ctgagggcag cacggtggac tgcttagatc ctgaggaaat cctgaggaag	3300
	atcctgagc tggcagatga cctggaagaa ccagatgact gcttcacaga aggatgcatt	3360
	cgccactgtc cctgctgcaa actggatacc accaagagtc catgggatgt gggctggcag	3420
	gtgcgcaaga ctgctaccg tatcgtggag cacagctggt ttgagagctt catcatctc	3480

	atgatcctgc tcagcagtggt atctctggcc ttgaagact attacctgga ccagaagccc	3540
	acggtgaaag ctttgctgga gtacactgac agggcttca ctttatctt tgtgttcgag	3600
	atgtgctta agtgggtggc ctatggcttc aaaaagtact tcaccaatgc ctgggtgctgg	3660
	ctggacttcc tcattgtgaa tatctactg ataagtctca cagcgaagat tctggaatat	3720
	tctgaagtgg ctcccatcaa agcccttga acccttcgag ctctgcggcc actgcgggct	3780
	ctttctgat ttgaaggcat gcgggtggtg gtggatgccc tggggggcg catcccatcc	3840
	atcatgaatg tctcctcgt ctgcctcatc ttctggctca tcttcagcat catgggtgtg	3900
	aacctctcg caggggaagt ttggagggtg atcaactata ccgatggaga gttttccctt	3960
	gtacctttgt cgatttgtaa taacaagtct gactgcaaga tcaaaaactc cactggcagc	4020
	ttctctggg tcaatgtgaa agtcaacttt gataatgttg caatgggtta cttgcactt	4080
[0056]	ctgcagggtg caaccttaa aggctggatg gacattatgt atgcagctgt tgattcccgg	4140
	gaggtaaca tgcaaccaa gtggaggagc aacgtgtaca tgtatttga cttgtcatc	4200
	ttcatcattt ttggaggctt cttcacactg aatctcttg ttgggggtcat aattgacaac	4260
	ttcaatcaac agaaaaaaaa gttagggggc caggacatct tcatgacaga ggagcagaag	4320
	aaatactaca atgcatgaa gaagtgggc tccaagaagc ccagaagcc catcccacgg	4380
	cccctgaaca agtccagggt tttgtcttt gacatcgtga ccagacaagc ttttgacatc	4440
	accatcatgg tctcatctg cctcaacatg atcaccatga tgggtggagac tgatgaccaa	4500
	agtgaagaaa agacgaaaat tctgggcaaa atcaaccagt tctttgtggc cgtcttcaca	4560
	ggcgaatgtg tcatgaagat gttcgcttg aggcagtact acttcacaaa tggctggaat	4620
	gtgtttgact tcattgtggt ggttctctcc attgcgagcc tgatttttc tgcaattctt	4680
	aagtcacttc aaagtactt ctcccaacg ctcttcagag tcatccgctt ggcccgaatt	4740
	ggccgcatcc tcagactgat ccgagcggcc aaggggatcc gcacactgct cttgccttc	4800

	atgatgtccc tgcctgccct ctcaacatc gggctgttc tattcctgt catgttcac	4860
	tactctatct tcggtatgtc cagctttccc catgtgaggt gggaggctgg catcgacgac	4920
	atgttcaact tccagacctt cgccaacagc atgctgtgcc tctccagat taccacgtcg	4980
	gccggctggg atggcctct cagccccatc ctcaacacag ggcccccta ctgtgacccc	5040
	aatctgccc acagcaatgg caccagagg gactgtggga gccagccgt aggcacatc	5100
	ttctcacca cctacatcat catctcttc ctcatcatgg tcaacatga cattgcagt	5160
	attctggaga acttcaatgt ggccacggag gagagcactg agcccctgag tgaggacgac	5220
	ttgacatgt tctatgagac ctgggagaag ttgaccag aggcactca gtttattacc	5280
	tttctgctc tctcggaact tgacagact ctctctggtc cctgagaat cccaaaacc	5340
	aatcgaaata tactgatcca gatggacctg ccttggctc ctggagataa gatccactgc	5400
	ttggacatcc ttttgctt caccaagaat gtctaggag aatccggga gttggattct	5460
[0057]	ctgaaggcaa atatggagga gaagttatg gcaactaat ttcaaaatc atcctatgaa	5520
	ccaatagcaa cactctccg atggaagcaa gaagacattt cagccactgt cattcaaaag	5580
	gcctatcga gctatgtgt gcaccgtcc atggcactct ctaacacccc atgtgtgccc	5640
	agagctgagg aggaggctgc atcactcca gatgaagggt ttgtgcatt cacagcaaat	5700
	gaaaattgtg tactcccaga caaatctgaa actgctctg ccacatcatt cccaccgtcc	5760
	tatgagagtg tactagagg ccttagtgat agagtcaaca tgaggacatc tagctcaata	5820
	caaatgaag atgaagccac cagtatggag ctgattgcc ctgggccta gtga	5874

<210> 10
 <211> 6500
 <212> DNA
 <213> 智人

 <400> 10

	tcctgctata cccacagtgg tggatcatctc ttctgatctt cacagccaat cagctccaa	60
	ggcccctgac ctacagctcag cttttgtaga tccttatgac accatccttt aagactggaa	120
	tcctagggca ggctgtttta ttcccgcctc ctgaggcctt tctgaggatc tgtggcttgt	180
	ctctgtcctg aggggtgaaga tggatgacag atgctaccca gtaatcttc cagatgagcg	240
	gaatttccgc cccttactt ccgactctct ggctgcaatt gagaagcgga ttgccatcca	300
	aaaggagaaa aagaagtcta aagaccagac aggagaagta cccagcctc ggcctcagct	360
	tgacctaaag gcctccagga agttgccaa gctctatggc gacattcctc gtgagctcat	420
	aggaaagcct ctggaagact tggaccatt ctaccgaaat cataagacat ttatggtgtt	480
	aaacagaaag aggacaatct accgcttcag tgccaagcat gccttgtca ttttgggcc	540
	tttaattca atcagaagtt tagccattag agtctcagtc cattcattgt tcagcatgtt	600
	cattatcggc accgttatca tcaactgcgt gttcatggct acagggcctg ctaaaaacag	660
[0058]	caacagtaac aatactgaca ttgcagagtg tgtcttact gggattata ttttgaagc	720
	tttgattaaa atattggcaa gaggttcat tctggatgag tttcttcc ttcgagatcc	780
	atggaactgg ctggactcca ttgtcattgg aatagcgatt gtgtcatata ttccaggaat	840
	caccatcaa ctattgccc tgcgtacct ccgtgtgttc agagcttga aagcaatttc	900
	agtagttca cgtctgaagg tcatcgtggg ggccttgcta cgctctgtga agaagctggt	960
	caacgtgatt atctcacct tctttgcct cagcatctt gccctggtag gtcagcagct	1020
	cttcatggga agtctgaacc tgaatgcat ctgagggac tgtaaaaata tcagtaacct	1080
	ggaagcttat gaccattgct tgaaaagaa agaaaattca cctgaattca aaatgtgtgg	1140
	catctggatg ggtaacagt cctgttccat acaatatgaa tgtaagcaca ccaaaattaa	1200
	tcctgactat aattatacga atttgacaa ctttgctgg tctttcttg ccatgttccg	1260
	gctgatgacc caagattcct gggagaagct ttatcaacag accctgcgta ctactgggct	1320

	ctactcagtc ttcttctca ttgtggcat tttctgggc tcttctacc tgattaactt	1380
	aacctggct gttgtacca tggcatatga ggagcagaac aagaatgtag ctgcagagat	1440
	agaggccaag gaaaagatgt ttcaggaagc ccagcagctg ttaaaggagg aaaaggaggc	1500
	tctggttgcc atgggaattg acagaagttc acttactcc cttgaaacat catattttac	1560
	ccaaaaaag agaaagctct ttgtaataa gaaaaggaag tccttcttt tgagagagtc	1620
	tgggaaagac cagcctctg ggtcagattc tgatgaagat tgccaaaaa agccacagct	1680
	cctagagcaa accaaacgac tgtccagaa tctatcactg gaccacttg atgagcatgg	1740
	agatcctctc caaaggcaga gagcactgag tgctgtcagc atcctacca tcaccatgaa	1800
	ggaacaagaa aaatcacaag agcctgtct ccttgtgga gaaaacctgg catccaagta	1860
	cctcgtgtgg aactgttgc ccagtggtc gtgcgttaag aaggctctga gaactgtgat	1920
	gactgaccgc ttactgagc tggccatcac catctgcac atcatcaaca ctgtctctt	1980
[0059]	ggccatggag catcacaaga tggaggccag ttttgagaag atgttgaata tagggaattt	2040
	ggtttctact agcattttta tagcagaaat gtgcctaaaa atcattgctc tcgatcccta	2100
	ccactactt cgccagggt ggaacattt tgacagcatt gttgctctc tgagttttgc	2160
	agatgtaatg aactgtgtac tcaaaagag aagctggcca ttctgctgt cctcagagt	2220
	gctcagggtc tcaagttag ccaaatcctg gccaacttg aacacactaa ttaagataat	2280
	cggcaactct gtcggagccc ttggaagcct gactgtggtc ctggtcattg tgatcttat	2340
	tttctagta gttggcatgc agcttttgg ccgtagcttc aattccaaa agagtccaaa	2400
	actctgaac ccgacaggcc cgacagtctc atgtttacgg cactggcaca tgggggattt	2460
	ctggcactcc ttctagtgg tattccgcat cctctcgagg gaatggatcg aaaatatgtg	2520
	ggaatgtatg caagaagcga atgcatcac atcattgtgt gttattgtct tcatattgat	2580
	cacggtgata ggaaaactg tgggtctcaa cctcttcatt gccttactgc tcaattcctt	2640

	tagcaatgag gaaagaaatg gaaacttaga aggagaggcc aggaaaacta aagtccagtt	2700
	agcactggat cgattccgcc gggctttttg tttgtgaga cacactcttg agcatttctg	2760
	tcacaagtgg tgcaggaagc aaaacttacc acagcaaaaa gaggtggcag gaggtgtgc	2820
	tgcacaaagc aaagacatca ttccctggt catggagatg aaaaggggct cagagacca	2880
	ggaggagctt ggtatactaa cctctgtacc aaagaccctg ggcgtcaggc atgattggac	2940
	ttggttgga ccactgctg aggaggaaga tgacgttgaa tttctggtg aagataatgc	3000
	acagcgcac acacaacctg agcctgaaca acaggcctat gagctccac aggagaacaa	3060
	gaagcccacg agccagagag ttaaagtgt ggaaattgac atgttctctg aagatgagcc	3120
	tcactgacc atacaggatc ccgaaagaa gtctgatgtt accagtatac tatcagaatg	3180
	tagcaccatt gatcttcagg atggcttttg atggttacct gagatgggtc caaaaagca	3240
	accagagaga tgttgccca aaggctttg ttgctgctt ccatgctga gcgtggacaa	3300
[0060]	gagaaagcct cctgggtca ttggtggaa cctgcgaaa acctgctacc aaatagtga	3360
	acacagctgg ttgagagct ttattatctt tgtgattctg ctgagcagt gggcactgat	3420
	attgaagat gttcacctg agaaccaacc caaatccaa gaattactaa attgtactga	3480
	cattatattt acacatattt ttactctgga gatggtacta aaatgggtag ccttcggatt	3540
	tggaaagtat ttaccagtg cctggtgctg cctgatttc atcattgtga ttgtctctgt	3600
	gaccaccctc attaaactaa tggaattgaa gtcctccgg actctacgag cactgaggcc	3660
	tctcgtgcg ctgtcccagt ttgaaggaat gaaggtggtg gtcaatgctc tcataggtgc	3720
	catactgcc attctgaatg tttgcttgt ctgcctcatt ttctggctg tattttgtat	3780
	tctgggagta tacttcttt ctggaaaatt tgggaaatgc attaattgaa cagactcagt	3840
	tataaattat accatcatta caaataaaag tcaatgtgaa agtggcaatt tctctggat	3900
	caaccagaaa gtcaactttg acaatgtggg aaatgcttac ctgcctctgc tgcaagtggc	3960

	aacatttaag ggctggatgg atattatata tgcagctgtt gattccacag agaaagaaca	4020
	acagccagag ttgagagca attcactcgg ttacatttac ttcgtagtct ttatcatctt	4080
	tggctcattc ttcactctga atctcttcat tggcgttatac attgacaact tcaaccaaca	4140
	gcagaaaaag ttaggtggcc aagacatttt tatgacagaa gaacagaaga aatactataa	4200
	tgcaatgaaa aaattaggat ccaaaaaacc tcaaaaaccc attccacggc ctctgaacaa	4260
	atgtcaaggt ctctgttcg acatagtcac aagccagatc ttgacatca tcatacataag	4320
	tctcattatc ctaaactga ttagcatgat ggctgaatca tacaaccaac ccaaagccat	4380
	gaaatccatc cttgaccatc tcaactgggt cttgtgggc atctttacgt tagaatgtct	4440
	catcaaaatc ttgctttga ggcaatacta cttaccaat ggctggaatt tatttgactg	4500
	tgtggctcgtg cttctttcca ttgtagtac aatgatttct accttggaatc atcaggagca	4560
	cattcctttc cctccgacgc tcttcagaat tgtccgcttg gctcggattg gccgaatcct	4620
[0061]	gaggcttgc cgggctgcac gaggaatcag gactctctc ttgctctga tgatgtcgt	4680
	tccttctctg ttcaacattg gtcttctact ctttctgatt atgtttatct atgccattct	4740
	gggtatgaac tggttttcca aagtgaatcc agagtctgga atcgatgaca tattcaactt	4800
	caagactttt gccagcagca tgctctgtct cttccagata agcacatcag caggttgga	4860
	ttccctgctc agcccatgc tgcgatcaaa agaatcatgt aactcttct cagaaaactg	4920
	ccacctccct ggcatagcca catcctactt tgcagttac attatcatct cttttctcat	4980
	tgtgtcaac atgtacattg ctgtgatttt agagaacttc aatacagcca ctgaagaaag	5040
	tgaggaccct ttgggtgaag atgactttga catattttat gaagtgtggg aaaagtttga	5100
	cccagaagca acacaattta tcaaatattc tgccctttct gactttgctg atgccttgcc	5160
	tgagcctttg cgtgtcgcaa agccaaataa atatcaattt ctagtaatgg acttgcccat	5220
	ggtgagtgaat gatcgctcc actgcatgga tattcttttc gccttcaccg ctaggttact	5280

	cggtggctct gatggcctag atagtatgaa agcaatgatg gaagagaagt tcatggaagc	5340
	caatcctctc aagaagttgt atgaacccat agtcaccacc accaagagaa aggaagagga	5400
	aagaggtgct gctattattc aaaaggcctt tcgaaagtac atgatgaagg tgaccaaggg	5460
	tgaccaaggt gacaaaaatg acttgaaaa cgggcctcat tcaccactcc agactcttg	5520
	caatggagac ttgtctagct ttgggtggc caagggcaag gtccactgtg actgagccct	5580
	cacctcacg cctacctcat agcttcacag cttgccttc agcctctgag ctccaggggt	5640
	cagcagctta gtgtatcaac agggagtggg ttcaccaa tagccattcc attttcttt	5700
	ctggctaaaa taaatgatat ttcaatttca tttaaataa tacttacaga gatataagat	5760
	aaggctactt gacaaccagt ggtactatta taataaggaa gaagacacca ggaaggactg	5820
	taaaaggaca taccaatttt aggattgaaa tagttcaggc cgggcgcagt ggctcatgcc	5880
	tgtaatccca gcactttgag aggccaaggc aggtggatca cgaggtaag agatcgagac	5940
[0062]	catcctggcc aacatgatga aactccgtct ctactaaaaa taaaaaatt agctgggcat	6000
	ggcggcgtgc gctgtagtc ccagctactt gggaggctga ggcaggagaa tcgcttaaac	6060
	ctgggagacg gaggttgacg tgagccaaga tcgtgccact gcactccagc ctggtgacag	6120
	agtgagactc tgtttcaaaa aagaaaagaa aagaacatg gttcaaatta tatctaaaca	6180
	aaaaagaata agaacaaaa aacacattaa aattttaagt tgtattttct atgtttctag	6240
	atacatcatt ttgtttgat attttctga tgcaagtatg tggtttatca catgtagctc	6300
	tttgcacgc taaatgaaaa ttcaaaactt gccataaat gaatagctta tgcagacat	6360
	ttttacca cattaattat ttgggtttg tttaaacct agaggcacia tcttgacttg	6420
	tcaattacta cctttcaca agctaccatc tcagatatat atatatat aaattcaata	6480
	aagctttctg tttgtgtcc	6500
<210>	11	

	<211> 6528	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 11	
	tcctgtcata cccacagtgg tggatcatctc ttctgatctt cacagccaat cagctcccaa	60
	ggccccctgac ctacagctcag cttttgtaga tccttatgac accatccttt aagactggaa	120
	tcctagggca ggctgtttta ttccgcctc ctgaggcctt tctgaggatc tgtggcttgt	180
	ctctgtcctg aggggtgaaga tggatgacag atgctacca gtaatcttc cagatgagcg	240
	gaatttccgc cccttcactt ccgactctct ggctgcaatt gagaagcggg ttgcatcca	300
	aaaggagaaa aagaagtcta aagaccagac aggagaagta cccagcctc ggcctcagct	360
	tgacctaaag gcctccagga agttgcccaa gctctatggc gacattctc gtgagctcat	420
	aggaaagcct ctggaagact tggaccatt ctaccgaaat cataagacat ttatggtgtt	480
[0063]	aaacagaaag aggacaatct accgcttcag tgccaagcat gccttgtca ttttgggcc	540
	tttaattca atcagaagtt tagccattag agtctcagtc cattcattgt tcagcatgtt	600
	cattatcggc accgttatca tcaactgcgt gtctatggct acagggcctg ctaaaaacag	660
	caacagtaac aatactgaca ttgcagagtg tgtcttcact gggatttata ttttgaagc	720
	tttgattaaa atattggcaa gaggtttcat tctggatgag ttttcttcc ttcgagatcc	780
	atggaactgg ctggactcca ttgtcattgg aatagcgatt gtgtcatata ttccaggaat	840
	caccatcaaa ctattgccc tgctgtacct ccgtgtgttc agagcttga aagcaattc	900
	agtagtttca cgtctgaagg tcatcgtggg ggccttgcta cgctctgtga agaagctggg	960
	caacgtgatt atcctcacct tcttttgct cagcatcttt gccctggtag gtcagcagct	1020
	cttcatggga agtctgaacc tgaaatgcat ctgagggac tgtaaaaata tcagtaacct	1080
	ggaagcttat gaccattgct ttgaaaagaa agaaaattca cctgaattca aaatgtgtgg	1140
	catctggatg ggtaacagtg cctgttccat acaatatgaa tgtaagcaca ccaaaattaa	1200

	tctgactat aattatacga attttgacaa ctttgctgg tctttcttg ccatgtccg	1260
	gctgatgacc caagattcct gggagaagct ttatcaacag accctgcgta ctactgggct	1320
	ctactcagtc ttcttctca ttgtggcat tttctgggc tccttctacc tgattaactt	1380
	aacctggct gttgttacca tggcatatga ggagcagaac aagaatgtag ctgcagagat	1440
	agaggccaag gaaaagatgt ttcaggaagc ccagcagctg ttaaaggagg aaaaggaggc	1500
	tctggttgcc atgggaattg acagaagttc acttactcc ctgaaacat catattttac	1560
	cccaaaaaag agaaagctct ttgtaataa gaaaaggaag tccttcttt tgagagagtc	1620
	tgggaaagac cagcctctg ggtcagattc tgatgaagat tgccaaaaa agccacagct	1680
	cctagagcaa accaaacgac tgtccagaa tctatcactg gaccacttg atgagcatgg	1740
	agatcctctc caaaggcaga gagcactgag tgccgtcagc atcctacca tcaccatgaa	1800
	ggaacaagaa aatcacaaag agcctgtct ccctgcgga gaaaacctgg catccaagta	1860
[0064]	cctcgtgtgg aactgttgc ccagtggtc gtgcgttaag aaggctctga gaactgtgat	1920
	gactgacccg ttactgagc tggccatcac catctgcatc atcatcaaca ctgtctctt	1980
	ggccatggag catcacaaga tggaggccag tttgagaag atgttgaata tagggaattt	2040
	ggttttcact agcattttta tagcagaaat gtgcctaaa atcattgcgc tcgatcccta	2100
	ccactactt cgccgaggct ggaacattt tgacagcatt gttgctctc tgagttttgc	2160
	agatgtaatg aactgtgtac ttcaaaagag aagctggcca ttctgcgtt ccttcagggt	2220
	gctcagggtc ttcaagttag ccaaactctg gccaacttg aacacactaa ttaagataat	2280
	cggcaactct gtcggagccc ttgaaacct gactgtggtc ctggcattg tgatctttat	2340
	tttctcagta gttggcatgc agctttttg ccgtagcttc aattccaaa agagtccaaa	2400
	actctgtaac ccgacaggcc cgacagtctc atgtttacgg cactggcaca tgggggattt	2460
	ctggcactcc ttctagtgg tattccgcat cctctcggg gaatggatcg aaaatatgtg	2520

	ggaatgtatg caagaagcga atgcatcatc atcattgtgt gttattgtct tcatattgat	2580
	cacggtgata ggaaaacttg tgggtgctcaa cctcttcatt gccttactgc tcaattcctt	2640
	tagcaatgag gaaagaaatg gaaacttaga aggagaggcc aggaaaacta aagtccagtt	2700
	agcactggat cgattccgcc gggctttttg tttgtgaga cacactcttg agcatttctg	2760
	tcacaagtgg tgcaggaagc aaaacttacc acagcaaaaa gaggtggcag gaggtgtgac	2820
	tgcacaaagc aaagacatca ttcccctggt catggagatg aaaaggggct cagagacca	2880
	ggaggagctt ggtatactaa cctctgtacc aaagaccctg ggcgtcaggc atgattggac	2940
	ttggttgga ccactgctg aggaggaaga tgacgttgaa tttctggtg aagataatgc	3000
	acagcgcac acacaacctg agcctgaaca acaggcctat gagctccatc aggagaacaa	3060
	gaagcccacg agccagagag ttaaaagtgt ggaaattgac atgttctctg aagatgagcc	3120
[0065]	tcactgacc atacaggatc cccgaaagaa gtctgatgtt accagtatac taccagaatg	3180
	tagcaccatt gatcttcagg atggctttgg atggttacct gagatgggtc ccaaaaagca	3240
	accagagaga tgttgccca aaggctttgg ttgctgctt ccatgctga gcgtggacaa	3300
	gagaaagcct ccttgggtca tttggtggaa cctgcggaaa acctgctacc aaatagtga	3360
	acacagctgg ttgagagct ttattatctt tgtgattctg ctgagcagtg gggcactgat	3420
	atttgaagat gttcaccttg agaaccaacc caaatccaa gaattactaa attgtactga	3480
	cattatttt acacatattt ttatcctgga gatggtacta aaatgggtag ccttcggatt	3540
	tggaaagtat ttcaccagtg cctggtgctg ccttgatttc atcattgtga ttgtctctgt	3600
	gaccaccctc attaaactaa tggaattgaa gtcctccgg actctacgag cactgaggcc	3660
	tctcgtgctg ctgtcccagt ttgaaggaat gaaggtggtg gtcaatgctc tcataggtgc	3720
	catactgcc attctgaatg ttttcttgt ctgcctcatt ttctggctcg tttttgtat	3780
	tctgggagta tacttctttt ctggaaaatt tgggaaatgc attaatggaa cagactcagt	3840

	tataaattat accatcatta caaataaaag tcaatgtgaa agtggcaatt tctcttgat	3900
	caaccagaaa gtcaactttg acaatgtggg aaatgcttac ctgctctgc tgcaagtggc	3960
	aacatttaag ggctggatgg atattatata tgcagctgtt gattccacag agaaagaaca	4020
	acagccagag ttgagagca attcactcgg ttacatttac ttcgtagtct ttatcatctt	4080
	tggctcattc ttcactctga atctcttcat tggcgttatc attgacaact tcaaccaaca	4140
	gcagaaaaag ttaggtggcc aagacatttt tatgacagaa gaacagaaga aatactataa	4200
	tgcaatgaaa aaattaggat ccaaaaaacc tcaaaaaccc attccacggc ctctgaacaa	4260
	atgtcaaggt ctggtgttcg acatagtcac aagccagatc ttgacatca tcatacataag	4320
	tctcattatc ctaaactga ttagcatgat ggctgaatca tacaaccaac ccaaagccat	4380
	gaaatccatc cttgaccatc tcaactgggt ctttgtggc atctttacgt tagaatgtct	4440
	catcaaaatc ttgctttga ggcaatacta cttaccaat ggctggaatt tatttgactg	4500
[0066]	tgtggtcgtg cttctttcca ttgtagtac aatgatttct acctggaaa atcaggagca	4560
	cattccttc cctccgacgc tcttcagaat tgtccgcttg gctcggattg gccgaatcct	4620
	gaggcttgc cgggctgcac gaggaatcag gactctctc tttgctctga tgatgtcgt	4680
	tccttctctg ttcaacattg gtcttctact ctttctgatt atgtttatct atgccattct	4740
	gggtatgaac tggttttcca aagtgaatcc agagtctgga atcgatgaca tattcaactt	4800
	caagactttt gccagcagca tgctctgtct ctccagata agcacatcag caggttgga	4860
	ttccctgctc agcccatgc tgcgatcaaa agaatcatgt aactcttct cagaaaactg	4920
	ccacctccct ggcatagcca catcctactt tgcagttac attatcatct cttttctcat	4980
	tgtgtcaac atgtacattg ctgtgatttt agagaacttc aatacagcca ctgaagaaag	5040
	tgaggaccct ttgggtgaag atgactttga catattttat gaagtgtggg aaaagtttga	5100
	cccagaagca acacaattta tcaaatattc tgccctttct gactttgctg atgccttgcc	5160

	tgagccttg cggtgcgcaa agccaaataa atatcaattt ctagtaatgg acttgcccat	5220
	ggtagtgaa gatgcctcc actgcatgga tattcttttc gccttcaccg ctaggttact	5280
	cggtaggctct gatggcctag atagtatgaa agcaatgatg gaagagaagt tcatggaagc	5340
	caatcctctc aagaagttgt atgaacccat agtcaccacc accaagagaa aggaagagga	5400
	aagagggtgct gctattattc aaaaggcctt tcgaaagtac atgatgaagg tgaccaaggg	5460
	tgaccaaggt gacaaaaatg acttgaaaaa cgggcctcat tcaccactcc agactcttg	5520
	caatggagac ttgtctagct ttgggggtggc caagggcaag gtccactgtg actgagcct	5580
	cacctcacg cctacctcat agcttcacag ccttgccctc agcctctgag ctccaggggt	5640
	cagcagctta gtgtatcaac agggagtgga ttcaccaaata tagccattcc attttcttt	5700
	ctggctaaat aaatgatatt tcaatttcat tttaaagtat acttacagag atataagata	5760
[0067]	aggctacttg acaaccagcg gtactatttt aataaggaag aagacaccag gaaggactgt	5820
	aaaaggacat tccaatttta ggattggaat agttcaagcc gggcgagtg gctcatgcct	5880
	ggaatcccag cactttgaga ggccaaggca ggtggatcac gaggtcaaga gatcgagacc	5940
	atctggcca accatgatga aactccgtct ctactaaat acaaaaatta gctgggcatg	6000
	gttgcgtagc cctgtagtcc cagctacttg ggaggctgag gcaggagaat cgcttaaac	6060
	tgggagacgg aggttgagc gagccaagat cgtgtcactg cactccagcc tggtagaca	6120
	gtgagactct gtttcaaaaa agaaaagaaa agaaacatgg ttcaaattat atctaaaca	6180
	aaaagaataa gaaacaaaaa acacattaaa attttaagtt gtattttcta tgtttctaga	6240
	tacatcattt ttgttgata tttcctgat gcaagtatgt ggttatcac atgtagctct	6300
	tttgcagctc aatgaaaaat tcaagacttg ccaataaatg aatagcttat tgcagacatt	6360
	ttttaccaac attaatattt ttgggtttgt ttaaaccta gaggcacaat cttgactgt	6420
	caattactac ctttcacaa gctaccatct cagatatata tatatatata aattcaataa	6480

	agctttctgt ttgtgttcca taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	6528
<210>	12	
<211>	1123	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	12	
	agcggggggt tccgcccgc gcctctccct ccacacctcc ccgcaagcag agggagccgg	60
	ctccggcctt ggccagccca gagacaggct cccacagtgc agcggcgggc tgaagggctc	120
	ctcaagcact gccagagtgg acaccgaggc cgaggagacg ccaagagcga tgaacaagc	180
	ttctggttca agagtttctt caggttcac tacgggctgt tcttctacag gtgcgccgat	240
	gtccacagtg ctacctctg atgagctact gctttcattc agtttctgct gacttaatat	300
	gtgagctgac agaatgcaga gaccacgttg tatatgaagc atccacttg cctgtacac	360
[0068]	cagggcattc aataaccact taataactac aaccctgatg atccgattca ctactaaagt	420
	cttccgtgtt taaattttca aagtcagatt ctctacagc aattgttaca gtcacagtaa	480
	gactgggggt gttatgaat gacatgtaat cactttcatc aataatgtat tttcaacac	540
	tgctgccagt tcctatacca cttgtagttc catttacatc ttaagatag tcaagatctt	600
	tccaatttc tgctgtatga ttggacatac aactgtcttt cttgtgttt agatcatcaa	660
	gtggtttaat ttcactaaa atcttttgtt tcctaataa ggactgttga ataaattcat	720
	atatttttct tttcacataa gctactcctt tgtgcatcct atccacagca atttggagat	780
	tattcatttc attatcatca tcagtggctg caaggtgtgc tgcactaaat gagctcagaa	840
	gcaaggccag aaagagattc aggaccttaa aaacaacaaa aacatgatta taattttaca	900
	ccaatgtagg gaagagcaga ttacaatcac ttattcttc tttaagtgt ggaaaaaact	960
	ctaagttcta aaacttgatg agaaggaaac accacagcat agtgattaga agatgggtga	1020

	tctgaatttg tgactggctc aatagcacat ccttgacaa agacatgatt tctgttgctc	1080
	tcaagttctc ccattcgtaa agtgaaattg aatgagctaa tct	1123
	<210> 13	
	<211> 2352	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 13	
	gtcttagtcc tctgaatatt tttctttgt tcagaacctg agaaagatga atgaaattta	60
	gtgtttcca tccccgagag acaccagca tccacaactt cacactctga tgccattgtg	120
	tatttatgca agaaatacca taactaagat gaggtctcgc tatgttgctt aggctagtct	180
	tgaactcctg gcctcaagtg atccttctgc ctgagcatcg ggagtcactg ggattaaagg	240
	catgagccac catgctcagg aacttgacat catcagacag taaatcaaga ggtactgaca	300
[0069]	actgagactg agtgatggtc cctgcctagg atttggaatc ttgcatgaa atagggactc	360
	tagccaccag cgacaaagaa gtcagggaga ctgcgggtctc taggaagcac ttccaggaaa	420
	caggaattca ggcaaagttg gacattcaa agatggcgta gatgaacatg accaggaaga	480
	gcaggaggcc gatgttaaac aacgcaggaa gggacatcat caaagcaaag agcagcgtgc	540
	ggatcccctt tgctccttg actagacgta ggattcggcc aatcctggca agacggatca	600
	ctcggacag ggtaacagag atctctggag gtgaacatt gctctgaact ggcattgatt	660
	ctagcccagc tctttagac caattacaa cttgtccatc tccctccagt gcctggaact	720
	ggacctggca cacaggcctc tggctcatcg gaattcatag gttcagcctc tgcttctct	780
	ccttctccag gcaaaggggt atcaactgtg ctgcactctg aggagcttga ccggtttaat	840
	ctctagaag gaattcacca cccaccagc acgcggaaca caatcaggaa ggagtggaag	900
	aagtcgttca tgtgccaccg tgggagcgta cagtcatcat tgatcttgca gacacattct	960
	ttgtagctct taccaaagag ctgcatgccg accacagcaa aatgaagac gatgatggcc	1020

	aacactaagc ctttagacta aaaagaaaac aaatattaca taccctgaat ctgtgctgaa	1080
	accacaaagg agagcatctt tggatccttc caagtaataa aaatattctg ttgaagaaga	1140
	atttgaacag ttataacatc acagacttta atctgtgatt gtgataaagg aggtcaaatt	1200
	aaaaaatctg attattggga gacttttgga gtaatcatgg aagaaagact atgaaatcag	1260
	atattcttgg atttgaatgt tgcttctatc ccttcttaac ttaatccat gggcattcat	1320
	tatcatcagt gcctaacctg gcagaaccac agtctacaca taatctggca tctgtctttt	1380
	ccatgctggc taccaaatgg ctgaatgttg gtggagaaac ttcacaacc aagtgaatgg	1440
	ttatatTTTA atttcgctct tgttgcccag tctggagtgc aatggcacga tctcggctca	1500
	ccgcaacctc tgctcccgga gttcaagcga ttctctgcc tcagcctcct gagtagctgg	1560
	aattacaggc acccaccacc atgcccggct aatttttTgt atttttagta gagacggggT	1620
[0070]	ttctttttt ttcttcttt ttgtattat ttttagcaa aaaaaaaaa aaaatacatg	1680
	aagcaattcc agaaagcgat gaattaaatt aaatttgatt aaaggctgtc tgtgtacata	1740
	gagaattgca atctaactc atatgtaaac aaattgcatt ctaatctatt agtatattct	1800
	tgtacaagt agctgtctca gccaatcaca gcagctgagc tcagccaac cacagcctgc	1860
	tgatttatca gacaatgtcc acataaggca aatgtcaagc tataagcaat caagctgttt	1920
	ttgtgcgtca ctccctttt ctgtctataa atactctgc tcatgttgct gagttgagct	1980
	ctccgaactt ctcttggttc tgagtgtgc ctaaatcatt attattatta tcttatttca	2040
	gcaataaata ctatttcatt gctgaaataa gctgctaaat ttaatttggt gaaaattttt	2100
	ctttaacaa aggttaagaa aaccattcac agtataaact cagaaatagg agcaagactc	2160
	agaataaaag gacagatccc agtgagaaaa cttaagtTta aataagtTg gtaaaataat	2220
	ctacaatatt aaatgtaagt tactcatcag atatattaat ttacagcat ataaattaag	2280
	aaataaaatt ctccatcaat tggaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	2340

	aaaaaaaaaa aa	2352
	<210> 14	
	<211> 267	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7)..(7)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (166)..(166)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
[0071]	<222> (194)..(194)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (230)..(230)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<400> 14	
	gtgcggntcc cctttgctcc ttgactaga cgtaggattc ggccaatcct ggcaagacgg	60
	atcactcgga acagggtaac agagatctct ggaggtgaaa cattgctctg aactggcatt	120
	gattctagcc cagctcttgt agaccaatta ccaactgtc catctncctc cagtcctgg	180
	gaactggacc tggnacacag gcaaaggggt atcaactgtg ctgcactctn aggagcttga	240
	ccggtttaat ctctagaaag gaattca	267
	<210> 15	
	<211> 1080	

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

gagtttaaga agaggttggt gttacatgga gcagcagcac agtcaagcag ggaacagatc 60

acgtaaagcc ctttagagag tgaagtcggc ttttatgct aggtgcaact gggagttctg 120

aacacggcaa agttggacat tccaaagatg gcgtagatga acatgaccag gaagagcagg 180

aggccgatgt taaacaacgc aggaaggac atcatcaaag caaagagcag cgtgcggatc 240

cccttgctc cttgactag acgtaggatt cgccaatcc tggcaagacg gatcactcgg 300

aacagggtaa cagagatctc tggaggtgaa acattgctct gaactggcat tgattctagc 360

ccagctcttg tagaccaatt accaacttgt ccatctccct ccagtgcctg gaactggacc 420

tggcacacag gcctctggct catcggaatt catagggtca gcctctgctt cttctcctc 480

tccaggcaaa gggttatcaa ctgtgctgca ctctgaggag cttgaccggt ttaatctcta 540

[0072]

gaaaggaatt caccaccca ccaggttaaca gagatctctg gaggtgaaac attgctctga 600

actggcattg attctagccc agctcttgta gaccaattac caactgttc atctccctcc 660

agtgcctgga actggacctg gcacacaggc aaaggggtat caactgtgct gcactctgag 720

gagcttgacc ggtttaatct ctgaaagga attcaccacc ccaccagaca caatgaagat 780

gaggtcattg tgtgggtcca aatccaatat aactggggtc cttataagaa gaaaagaccg 840

agacacacag ggagaaaact acgtgagtac cgggccagag attgggatga tgcagctgca 900

agctgcaagg attgccaaca acctccaaag ttagaaagca gcaaggcagg atacttacta 960

gagccttag agaaatcatg gccttgctca gaccttgatt tcagacttct agcctccaga 1020

attggcaaaa gaataaattt ctgttgtgt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080

<210> 16

<211> 173

<212> DNA

<213> 智人

<400> 16

tttttttt tttttttt tccaattgat ggagaatttt atttcttaatt ttatatgctg 60

taaaattaat atatctgatg agtaacttac atttaattatt gtagattatt ttaccacact 120

tatttaaact taagttttct cactgggatac tgtcctttta ttctgagtct tgc 173

<210> 17

<211> 618

<212> DNA

<213> 智人

<400> 17

tgtacatgga gcagcagcac agtcaagcag ggaacagatc acgtaaagcc cttagaaga 60

gtgaagtcgg cttttatgc taggtgcaac tgggagtct gaacacggca aagttggaca 120

ttccaaagat ggcgtagatg aacatgacca ggaagagcag gaggccgatg ttaacaacg 180

[0073]

caggaaggga catcatcaaa gcaaagagca gcgtgcggat ccccttgct ccttgacta 240

gacgtaggat tcggccaatc ctggcaagac ggatcactcg gaacagggta acagagatct 300

ctggaggtga aacattgctc tgaactggca ttgattctag ccagctctt gtaagaccaa 360

ttaccaactt gtccatctcc ctccagtgcc tggaactgga cctggcacac aggctctgg 420

tcaatcgga ttcataggtt cagcctctgt tcttctctt ctccaggcaa gggttatcaa 480

ctgtgctgca ctctgaggag cttgaccggt taaatctcta gaaaggaatt caccaccca 540

caggtaacca gagatctctg aggtgaacat tgtctgaacg gattgttcta gccagtctgt 600

aaccattaca tgcattc 618

<210> 18

<211> 871

<212> DNA

<213> 智人

[0074]	<400> 18	
	gaaactggcc tttataagt aaatcattat gtagtttctt ccttggagg gcagctctgt	60
	gtgactgctt gggcctctgt ggtagatct gttgggtaa cgggcttgg gcttcacac	120
	aaagctatac tctccacaaa cttctgtgag ataaaaaggt gatatctgtc ttagtcctct	180
	gaatattttt tctttgttca gaacctgaga aagatgaatg aaatttagtg tttcccatcc	240
	ccgagagaca cccagcatcc acaacttcac actctgatgc cattgtgtat ttatgcaaga	300
	aataccataa ctaaggtaat gtcttgagat ttttgggtca ataatgtcct taaattctat	360
	gtgtttttaa agcctaaaag aaattcccc tctcactcc cccgtctctc cctacaacct	420
	ggtgagacaa ttctctcatt ttctctccc agttccaat gctattgta tgatctatta	480
	gaataattgc tattattttt ttggccttat ctgaccctag aagtgattac agggaaaaaa	540
	attactaacc aattgattag gggaactgga atataaagtg cagctcttat ggtttattca	600
	cagaccaaga atatacatag tacttaatgt gataggtatt tgctcgttga ctgtggaacc	660
	aggtagtct ataatacagg ttcaggcag aacagactta ttacctgaa ctctggactt	720
	cggaaaaggt gagtaaggta ttaagagaa ctgaccacgt ttgtattcca cccatatagg	780
	ggatttaaca gaaattcttc ctcttataa acaacgttcc caaagggtt tgtaaattgtg	840
	cccttaaaaa ttgcgcccg tgggggacac t	871
<210> 19		
<211> 304		
<212> DNA		
<213> 智人		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (1)..(1)		
<223> n 为 a、c、g 或 t		
<220>		

	<221> misc_feature	
	<222> (32)..(32)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (42)..(42)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (45)..(45)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (51)..(51)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (58)..(58)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
[0075]	<400> 19	
	nctttcggag caagattgcg ccatttcaa antaggcgta gnagnaacag naccaggnaa	60
	gacaggaggc cgatgttaaa caacgcagga aggacatca tcaaagcaaa gagcagcgtg	120
	cggatcccct ttgctcctt gactagacgt aggattcggc caatcctggc aagacggatc	180
	actcggaaca gggtagggga aacaaaatac gtttcaatca aatcagctag aaacatacct	240
	gtatgtggag gaaaataata gaaataaaat atttaaagat gtatgctacc taaaaaaaaa	300
	aaaa	304
	<210> 20	
	<211> 293	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 20	

ctggcaaagc tggcattcca agatggcgta gatgaacatg accaggaaga gcaggaggcc 60
gatgttaaac aacgcaggaa gggacgtcat caaagcaaag agcagcgtgc ggatcccctt 120
tgctcctttg actagacgta ggattcggcc aatcctggca agacggatca ctcggaacag 180
ggtaggggaa acaaaatacg tttaaatcaa atcagctaga aacatacctg tatgtggagg 240
aatataattg aaataaaata tttaaagatg tatgctacct aaaaaaaaaa aaa 293

<210> 21
<211> 892
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (663)..(663)
<223> n 为 a、c、g 或 t

[0076]

<220>
<221> misc_feature
<222> (685)..(685)
<223> n 为 a、c、g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (784)..(784)
<223> n 为 a、c、g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (845)..(845)
<223> n 为 a、c、g 或 t

<400> 21
tttctaggcg aagattggca cattccaaag atggcgtagc aggaacatga ccagggaaga 60
gcaggaggcc gatgttaaac aacgcaggaa gggacatcat caaagcaaag agcagcgtgc 120
ggatcccctt tgctcctttg actagacgta ggattcggcc aatcctggca agacggatca 180

	ctcggaacag ggtaaccgag atctctggag gtgaaacatt gctctgaact ggcattgatt	240
	ctagcccagc tctttagac caattacaa cttgtccatc tccctccagt gcctggaact	300
	ggacctggca cacaggcaaa gggttatcaa ctgtgctgca ctctgaggag cttgaccggt	360
	ttaatctcta gaaaggagtt caccaccca ccagcacgcg gaacacaatc aggaaggagt	420
	ggaagaagtc gttcatgtgc caccgtggga gcgtacagtc atcattgatc ttgcagacac	480
	attctttgta gctcttacca aagagctgca tgccgaccac agcaaaaatg aagacgatga	540
	tggccaacac taagaagctg tcattgggg agcatgaggg ctgagcgtcc atcaaccagg	600
	gagaccacac cgttgcagtc cacagcactg tgcattttcc cgttcaccgg cagcattggt	660
	ggngacctac tggcttggt gatgntactg ctgcgtcgct cctggggtct gtggagcaca	720
	aacagtgagc ccttctgct ctattgtct acaagatgct gtgctcatca tcggcaaatt	780
	cagnctcaga tcctatatct ctctcttg ccttgaact aaaaagactt gttctgctgc	840
[0077]	ttcgnctgc agaaacaagg agcacgatgc tcgagtggga ctgcaaaaaa at	892
<210> 22		
<211> 260		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 22		
	taacattgcc tggaagagca ggaggccgat gtttaacaac gcaggaaggg acatcatcaa	60
	agcaaagagc agcgtgcgga tccccttgc tccttgact agacgtagga ttcggccaat	120
	cctggcaaga cggatcactc ggaacagggt aggggaaaca aaatacgttt caatcaaatc	180
	agctagaaac atacctgtat gtggaggaaa ataatagaaa taaaatatatt aaagatgtat	240
	gctacccaaa aaaaaaaaaa	260
<210> 23		
<211> 982		

<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 23	
cacgcgtccg gtcttagtcc tctgaatatt ttttcttgt tcagaacctg agaaagatga	60
atgaaattta gtgtttccca tccccgagag acaccagca tccacaactt cacactctga	120
tgccattgtg tatttatgca agaaatacca taactaagat gaggtctcgc tatgttcct	180
aggctagtct tgaactcctg gcctcaagtg atccttctgc ctcagcatcg ggagtcactg	240
ggattaaagg catgagccac catgctcagg aacttgacat catcagacag taaatcaaga	300
ggtagtgaca actgagactg agtgatggtc cctgcctagg atttgaatc tttcatgaa	360
atagggactc tagccaccag cgacaaagaa gtcagggaga ctgcggtctc taggaagcac	420
ttccaggaaa caggaattca ggcaaagttg gacattcaa agatggcgta gatgaacatg	480
accaggaaga gcaggaggcc gatgttaaac aacgcaggaa gggacatcat caaagcaaag	540
[0078] agcagcgtgc ggatcccctt tgctccttg actagacgta ggattcggcc aatcctggca	600
agacggatca ctcggaacag ggtaacagag atctctggag gtgaaacatt gctctgaact	660
ggcattgatt ctgcccagc tctttagac caattacaa cttgtccatc tccctcagt	720
gcctggaact ggacctggca cacaggcctc tggctcatcg gaattcatag gttcagcctc	780
tgcttctct ccttctccag gcaaaggggt tatcaactgt gctgcactct gaggagcttg	840
accggtttaa tctctagaaa ggaattcacc accccccag cacgcggaac acaatcaggg	900
aaggagtggg aggaagtcct tctggggccc acggggggag acggacaggc attcattgat	960
cttcagaaaa ccttctttg ta	982
<210> 24	
<211> 906	
<212> DNA	
<213> 智人	

<400> 24		
taaggcttgt tcctaagact gggggcagat ctatccttgt atagtaaag tttaaatgac	60	
taaaaaacct tttgtcatct ctctaaata tctattctac tataagaacc tgacttcta	120	
tttactcag gtcaaattaa aaaatctgat tattgggaga ctttggagt aatcatggaa	180	
gaaagactat gaaatcagat attcttggat ttgaatgtg cttctatccc ttctaagta	240	
agtgaattat cttaagcca ttaagccta gctgctgcat ctgaaaata cgtataagaa	300	
tacctacttt ataaagttgt taaatagtat aaataggata ttgcatgtaa accacttgat	360	
actgtgatcc acacattctg tactagctgc tcaaaaacag gagttattat aattagtaa	420	
actattatac aatttgagat aaaactattg attgaattac acatcatcat ttatcttac	480	
ttagaagaca cagataaac aataaagcct tgagtttga ggtgcaaag taggtgaaaa	540	
tgtgcatgaa aagctttcct gaaaacactc ctgaacctcg ggaaggatgg gcctggtaga	600	
[0079] gtgagtatgg gagaggataa gatgcaattt tgcatacata aacatccaaa atattttaat	660	
aaggatggat tactttagaa ttatccttta aactaatgct gggtcacatt tatcaaccac	720	
tgaggagctg aattatatga atgggctctg gagctgtcta ttagcacact gctatactac	780	
tgtatttaac acagtataag aatgatgaaa ggtaaagcaa tgcaggtagc tcaacttagg	840	
gtttagataa actttacaat aatttctaaa caactagaca taaaatatta agatgggttg	900	
gcttca	906	
<210> 25		
<211> 476		
<212> DNA		
<213> 小家鼠		
<400> 25		
gatctgattc actgctaaag tcttctgtgt ttaagttctc aaagtcagac tctccacag	60	
caatgggcac agtcacagtg aggctggggg tgtttatgaa tgacatataa tcaactctcat	120	

	caatgatgta ctctccaca ctgctgccg tcctatgcc acttgtggtt ccattcacat	180
	cttcagaca gtccagatct ttccaattt ctgtgtgtg gttagagata caattgtctt	240
	ttctgtgtt tagatcatca agtggcttaa ttcatctag aatcttctgt ttctaaca	300
	aggattgtg aatgaattca tatattttc ttttacata agctattcct ttgtgcatcc	360
	tgccacagc aatctgcagg ttgtcatct cattgtcatc atcagtggct gcaagggtgt	420
	ctgcactaaa tgagctcaga agcaaggcca gaaagagggt caagacctg aaaaca	476
	<210> 26	
	<211> 185	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 26	
	aggcaaagt ggacatccca aagatggcgt agatgaacat gacgagaaaa agcaggaggc	60
[0080]	cgatgttaa cagcgcagga agggacatca tcagagcaaa gagcagcgtg cggatcccct	120
	tggcacctt gatcaggcgt aggattcgtc caatcctggc caggcggatg actcggaaca	180
	gggta	185
	<210> 27	
	<211> 162	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 27	
	ccccacacag cacacggaac acgatcagga aggagtggaa gaagtcgttc atgtgccagc	60
	gtgggagctt gcagttctcg ttgatcttgc aaacacactc cttgtagctc ttccaaca	120
	gctgcatgcc gaccacggca aaaatgaaga cgatgatggc ca	162
	<210> 28	
	<211> 94	
	<212> DNA	

	<213>	小家鼠	
	<400>	28	
	ttacataccc tgaatctgtg ctgaaaccgc aaagaagagc atctttggat ccctccaagt	60	
	aataaaaata tctgttttag gaagaatttg aaca	94	
	<210>	29	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	29	
	mcmcmumamu mctttccccc ccctmamcmc mumumu	24	
[0081]	<210>	30	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	30	
	tcggtgtcca ctctggcagt	20	
	<210>	31	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	31	
	tgactgtgg gagcctgtct	20	

	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 32	
	gtagcactgt ggacatcggc	20
	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 33	
[0082]	gtagaagaac agcccgtagt g	21
	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 34	
	gtggctctcg cattctgtca	20
	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 35 gtggtatagg aactggcagc a	21
	<210> 36 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 36 gtccaatcat acagcagaa	19
	<210> 37 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
[0083]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 37 gtgactgtac caattgctgt	20
	<210> 38 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 38 acttcttcca ctccttct	19
	<210> 39 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	39	
		gatgtccctt cctgcgttgt	20
	<210>	40	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	40	
		tgtggatgct ggggtgtctct c	21
[0084]	<210>	41	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	41	
		tcccagtgac tcccgatgct	20
	<210>	42	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	42	
		agtctcagtt gtcagtacct c	21

	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 43	
	gttattgaat gccctggtgt	20
	<210> 44	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 44	
[0085]	tcggatcatc agggttgtag t	21
	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 45	
	gtggtatagg aactggcagc a	21
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	

	<400> 46 tctgctcttc cctacattgg	20
	<210> 47 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 47 gtaatctgct cttccctac	19
	<210> 48 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
[0086]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 48 gggagaactt gagagcaaca g	21
	<210> 49 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 49 gccagtcaca aattcagatc a	21
	<210> 50 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220>			
	<223>	反义寡核苷酸		
	<400>	50		
	gtataggaac	tggca		15
	<210>	51		
	<211>	15		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	反义寡核苷酸		
	<400>	51		
	gtggtatagg	aactg		15
[0087]	<210>	52		
	<211>	21		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	反义寡核苷酸		
	<400>	52		
	mgmumggmua	muaggaamct	ggmcamgmcm	a
	21			
	<210>	53		
	<211>	15		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	反义寡核苷酸		
	<400>	53		
	agaacttgag	agcaa		15

	<210> 54		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 54		
	mgmgmgagaa	mctmugagag	mcaamcmamg
	21		
	<210> 55		
	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
[0088]	<400> 55		
	gccagtcaca aattc		15
	<210> 56		
	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 56		
	cacaaattca gatca		15
	<210> 57		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 57 mgmcmcagtm cacaaamutm cagamumcma	21
	<210> 58 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 58 rarururura rararcrcrc rgrgrararg rarcrcruru rargrurarg rurg	27
	<210> 59 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
[0089]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 59 rurrcrcra rararururc rargrarurc rarcrcrcra rurrcrururc rura	27
	<210> 60 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 60 gtggtatagg aactg	15
	<210> 61 <211> 21	

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 61

mgmumggmua

muaggaamct

ggmcamgmcm

a

21

<210> 62

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 62

gccagtcaca aattc

15

[0090]

<210> 63

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 63

cacaaattca gatca

15

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 64

	mgmgmua 25	ggmaacmugg	mcagmcagmu	gmumumg
	<210> 65			
	<211> 22			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 反义寡核苷酸			
	<400> 65			
	mumgmgtamu 22	agmgaamctg	gmcagcmamg	mu
	<210> 66			
	<211> 25			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
[0091]	<220>			
	<223> 反义寡核苷酸			
	<400> 66			
	mrggtamuagg aamctggmca gmcagtgttm g			25
	<210> 67			
	<211> 24			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 反义寡核苷酸			
	<400> 67			
	mamagmcggm uataggaamc tggmcagmca mg			24
	<210> 68			
	<211> 21			
	<212> DNA			

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 68

gtggcatagg gacgggcagc a

21

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 69

mgmumggmca

muagmggamc

gggmcamgmc

ma

21

[0092]

<210> 70

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 70

mgmamgccag mucamcaaam utcagmatca mcmcmc

26

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 71

maamugggag

aamcmumuga

gagmcmama

21

<210> 72

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 72

mamcmamamg

muggcatagg

gacggmgmcm

amgmcma

25

<210> 73

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0093]

<223> 反义寡核苷酸

<400> 73

mamcaagmug

gmcatamggg

amcgggmcag

mcma

25

<210> 74

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 74

maagmuggmc

amuagmggam

cgggmcagmc

agmu

25

<210> 75

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 75

mamamgmumg

gcatagggac

gggcamgmcm

amgmu

25

<210> 76

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 76

gtgactgtgc ccattgctg

19

[0094]

<210> 77

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 77

gccacttgat gatctaaac

19

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡核苷酸

<400> 78

	gtggacagga tgcacaaagg a	21
	<210> 79	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 79	
	mgtgacmugt gccmcattgc tmg	19
	<210> 80	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0095]	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 80	
	mgtgactgtg cccattgctm g	19
	<210> 81	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 81	
	mcctcmuttc muggcmcttg mcttmc	20
	<210> 82	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	82	
		mgacaamcct tgmccagccam ctgamugatg ma	26
	<210>	83	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	83	
		tggtatagga actggcagca	20
[0096]	<210>	84	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	84	
		mumggmuamu	20
		aggaamctgg	
		mcamgmcma	
	<210>	85	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	85	
		mcmcagtmca caaamutmca gamumcma	20

	<210> 86		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 86		
	mumggmuamu	aggaamctgg	mcamgmcma
	20		
	<210> 87		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
[0097]	<400> 87		
	mamgccagmu camcaaamut cagmatcamc mcmc		25
	<210> 88		
	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 88		
	mgmccagmuc amcaaamutc mamg		17
	<210> 89		
	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		

	<400> 89 mgmccagmuc amcaaamumu mc	15
	<210> 90 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 90 gccagmucam caamamutc	15
	<210> 91 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
[0098]	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 91 gccagtcaca aattc	15
	<210> 92 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 反义寡核苷酸	
	<400> 92 gcmcagmuca mcamaat	13
	<210> 93 <211> 13 <212> DNA	

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	93	
		gccagtcaca aat	13
	<210>	94	
	<211>	11	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	94	
		gccagtcaca a	11
[0099]	<210>	95	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸 SEQ ID NO: 48 的反向互补序列	
	<400>	95	
		rcrurarcru rararargru rcrururcru rgrurgruru ruraraat	25
	<210>	96	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸 SEQ ID NO: 49 的反向互补序列	
	<400>	96	
		rgrarargra rurgrgrgru rgrarurcru rgrararuru rurgruga	25

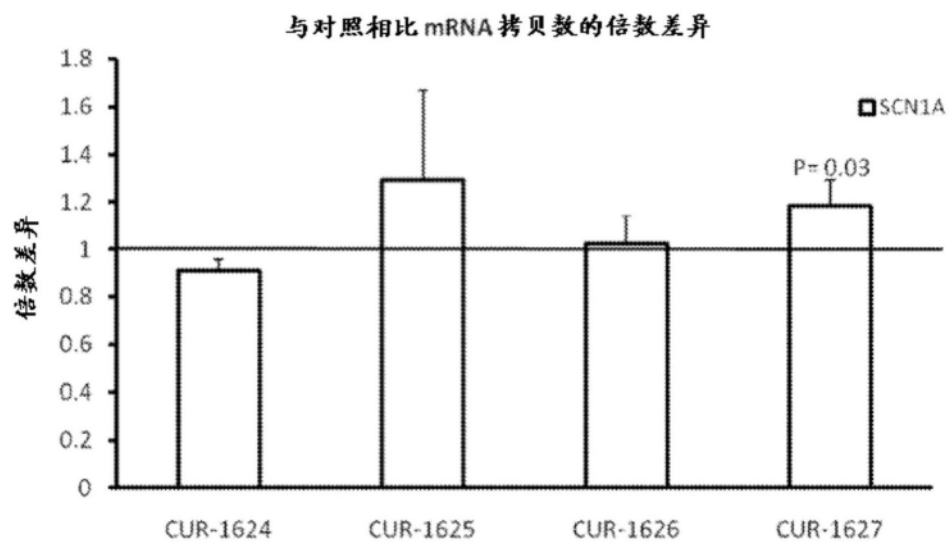


图1

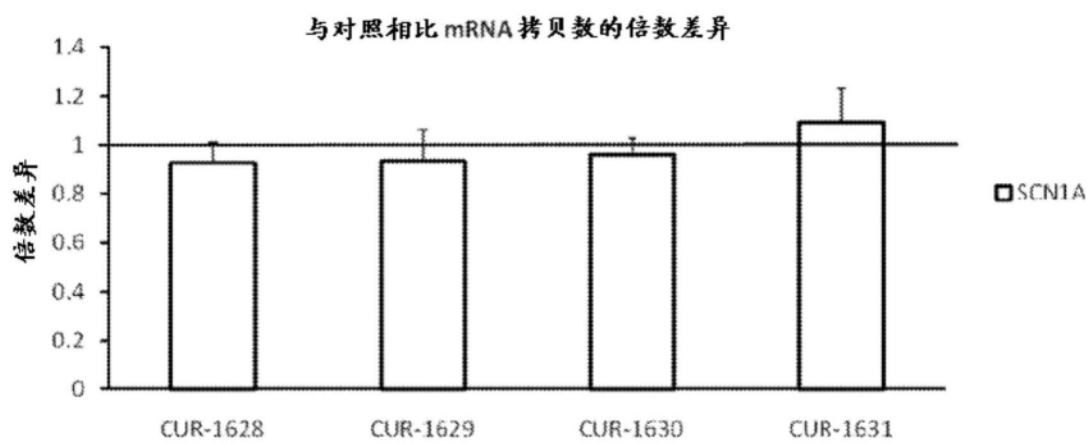


图2

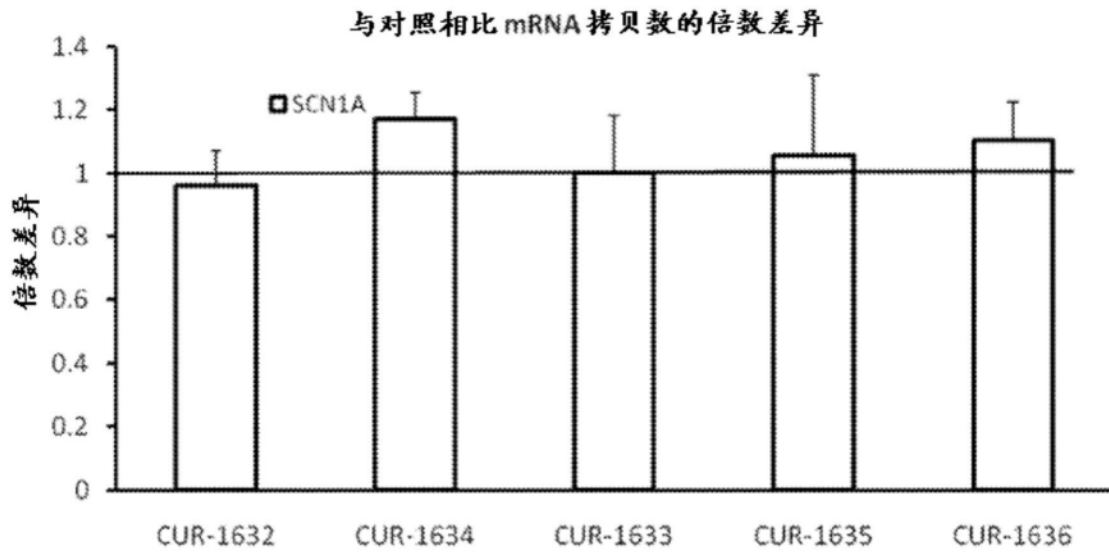


图3

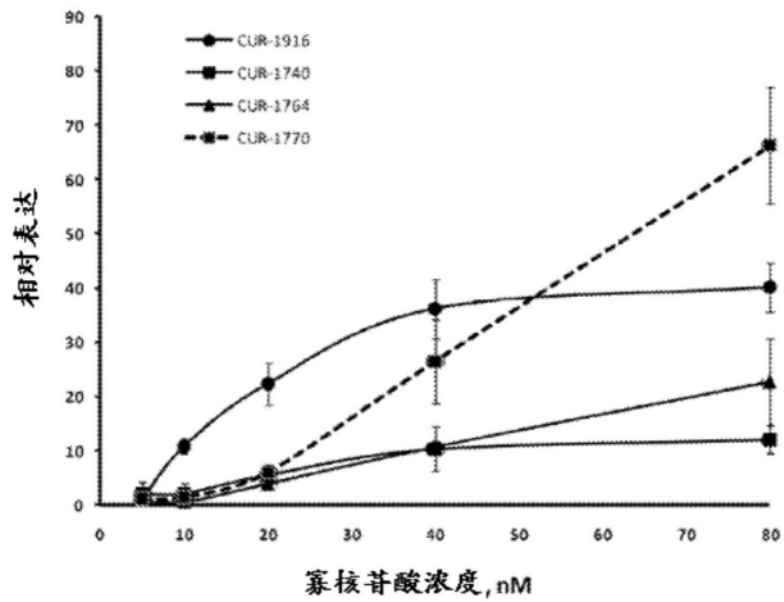


图4

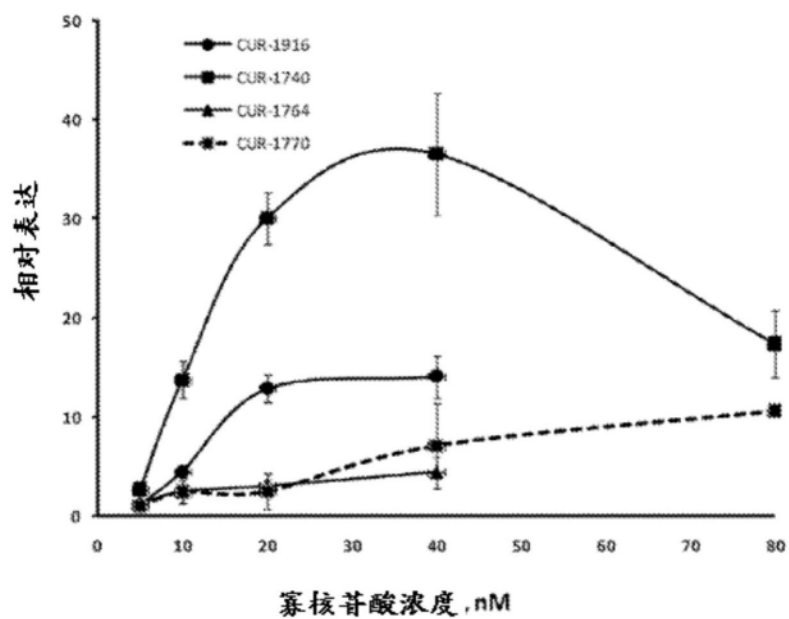


图5

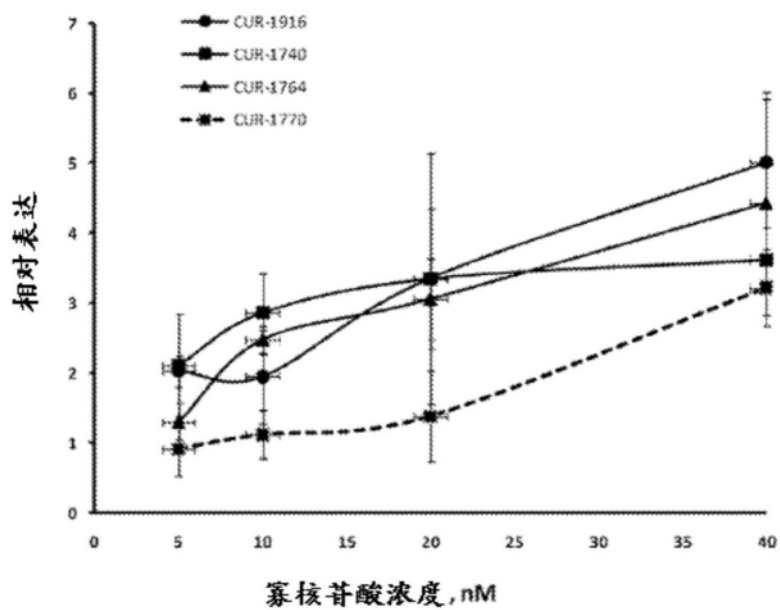


图6

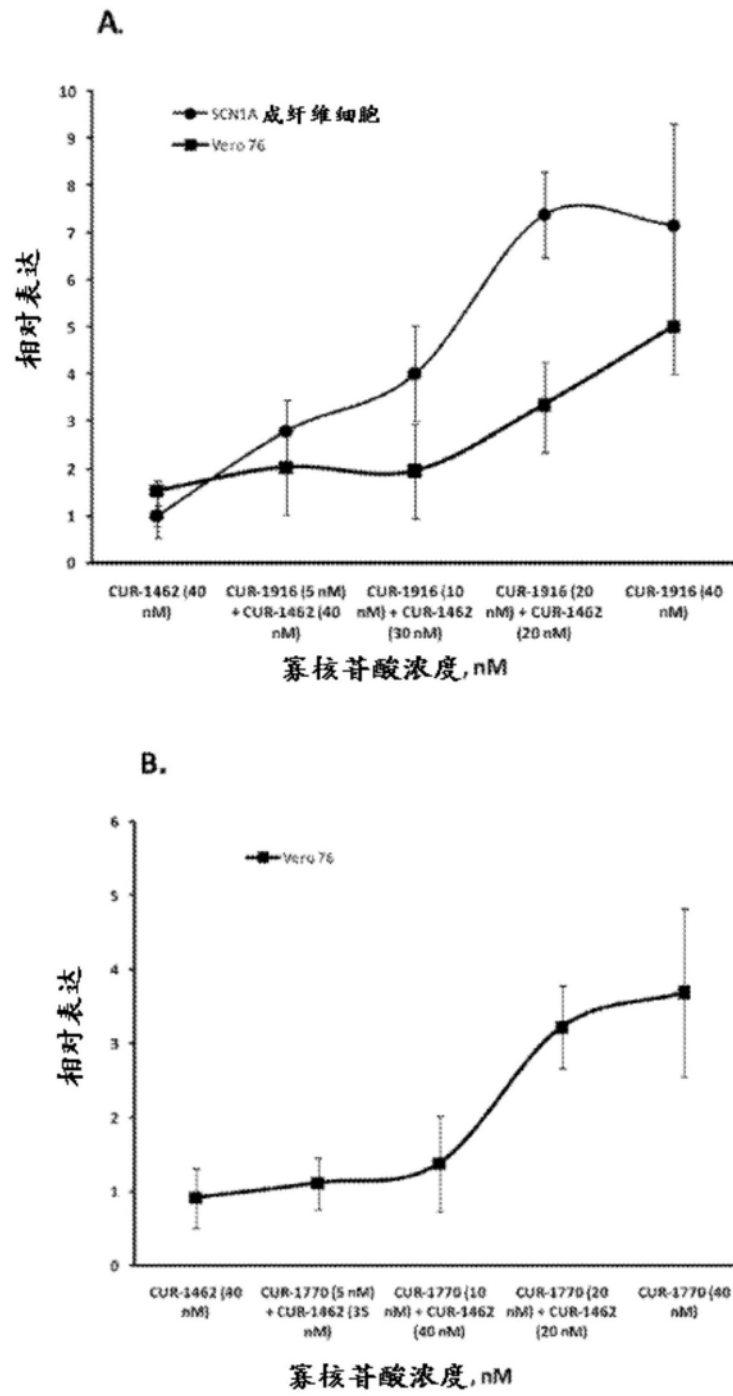


图7

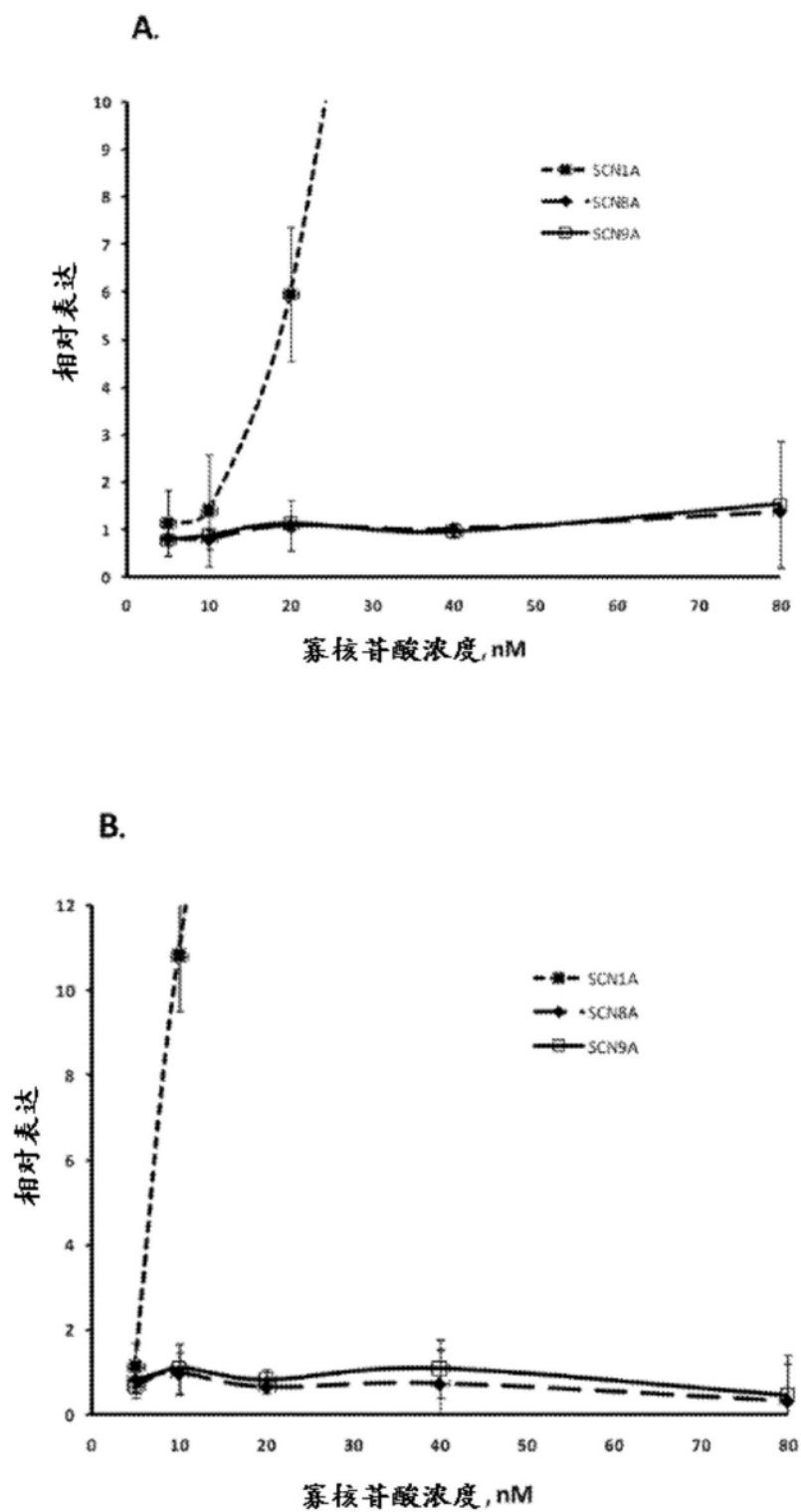


图8

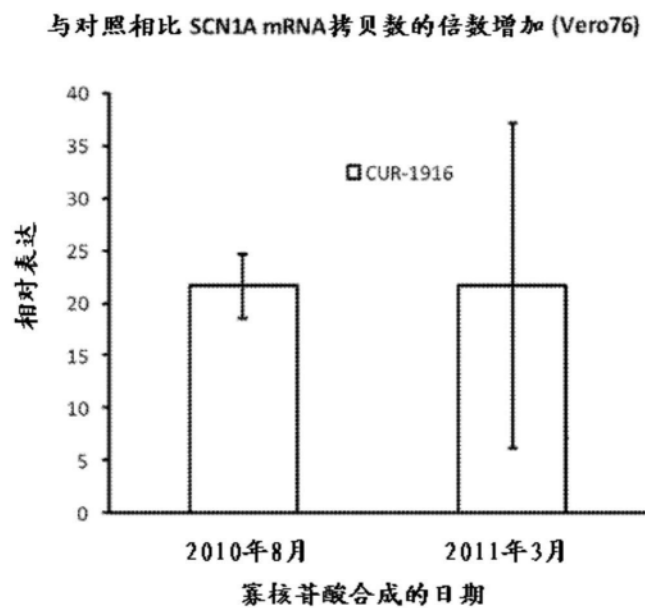


图9

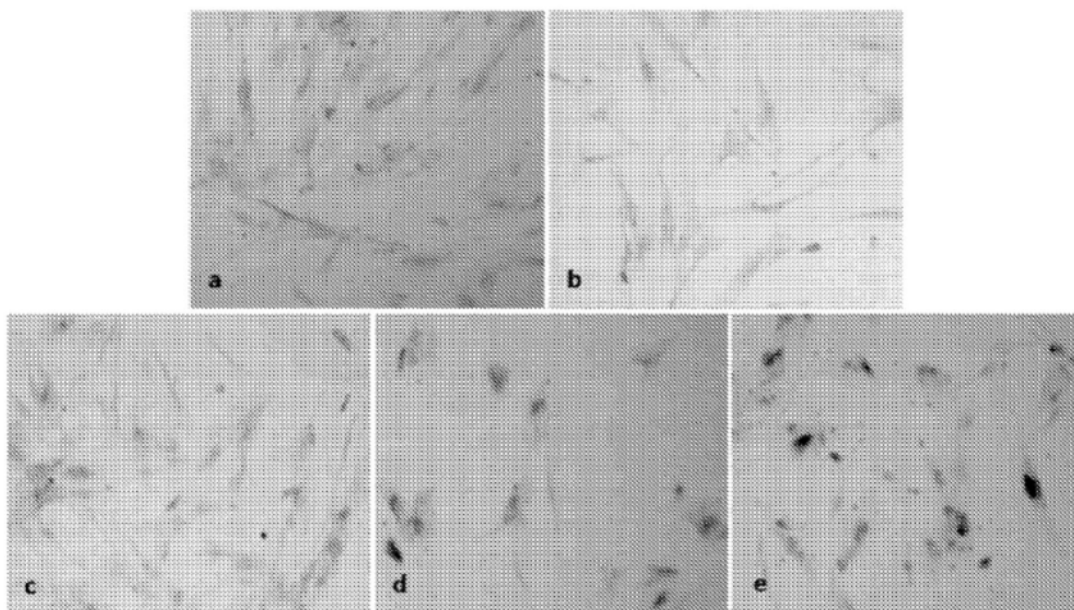


图10

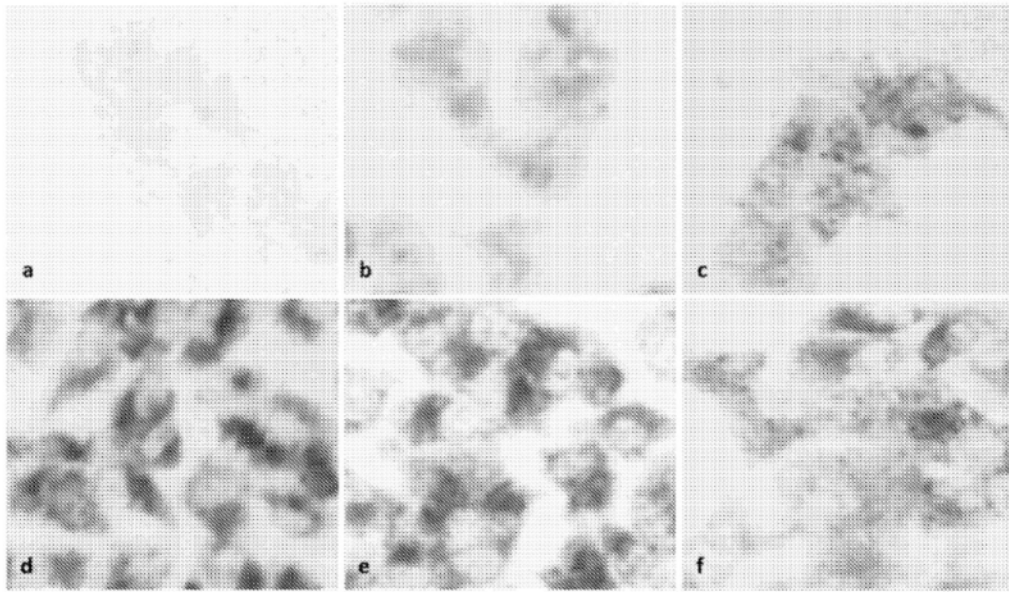


图11

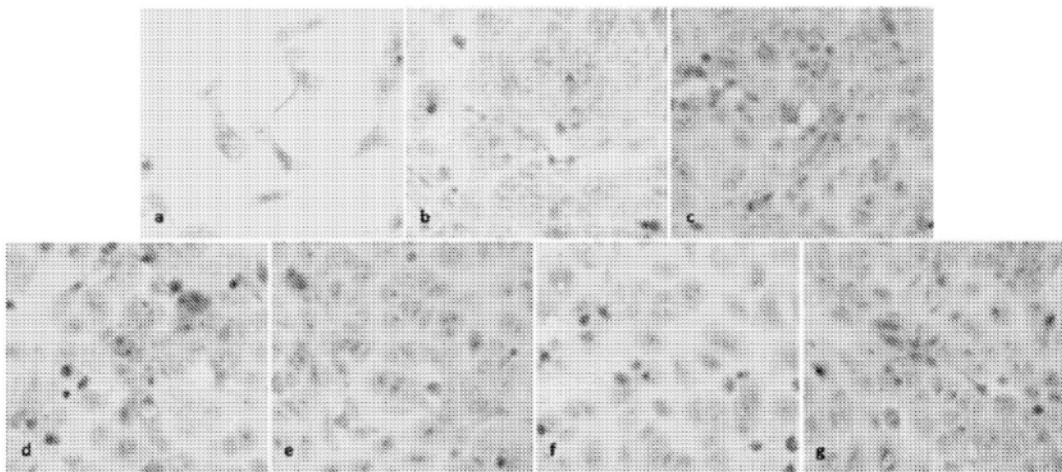


图12

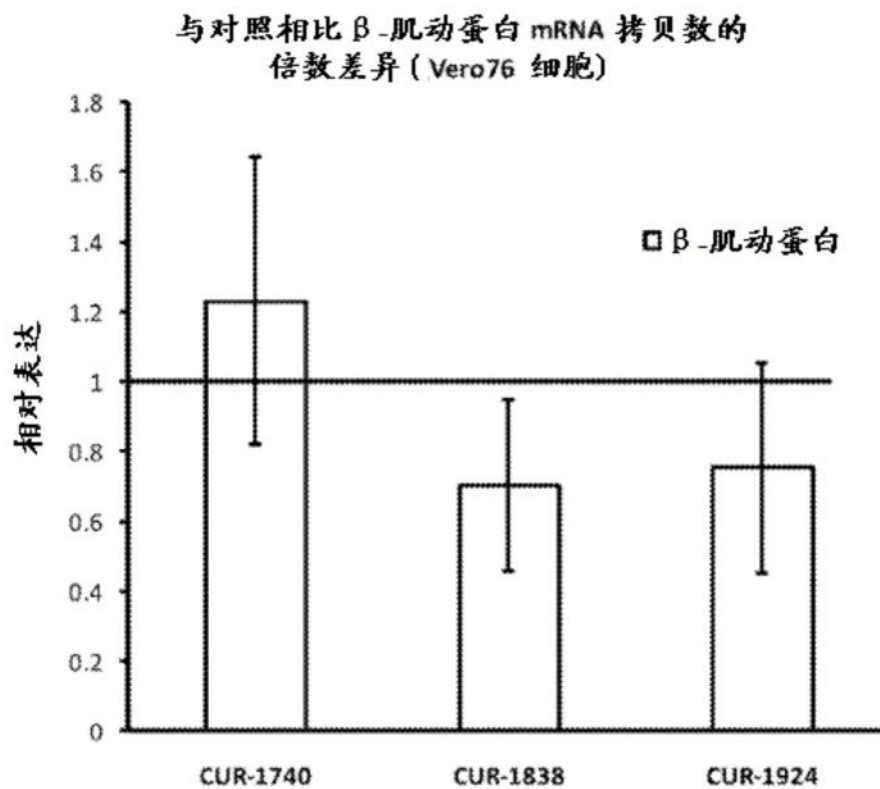


图13

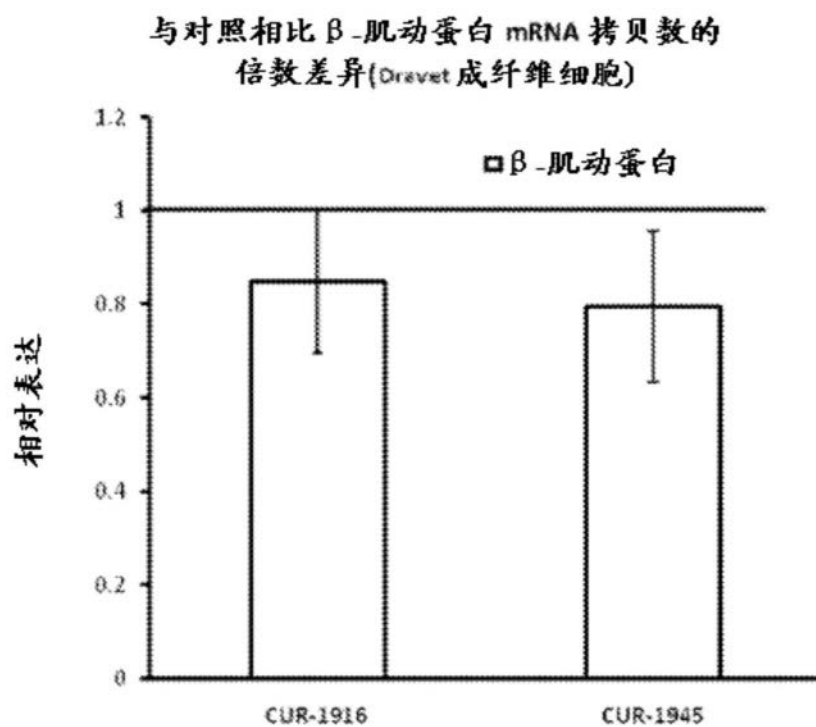


图14

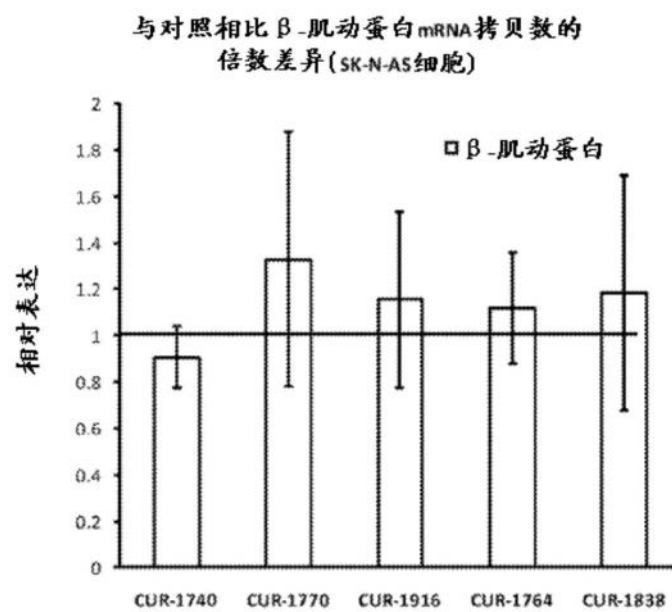


图15

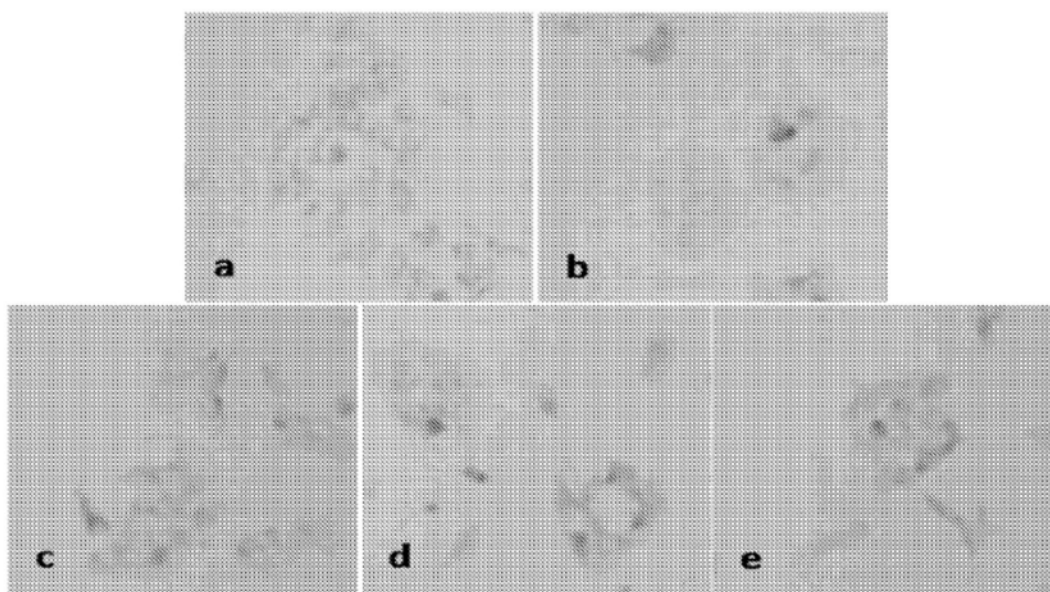


图16

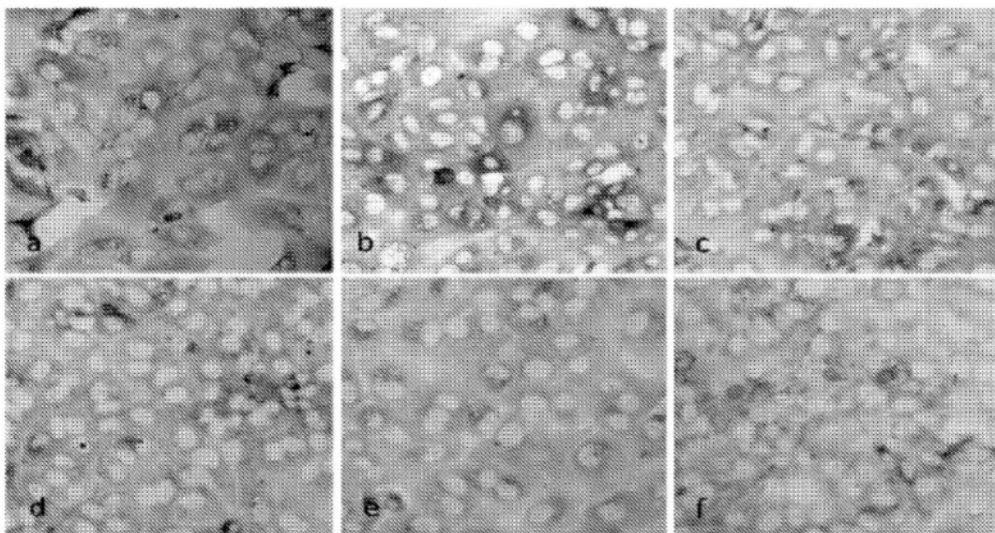


图17

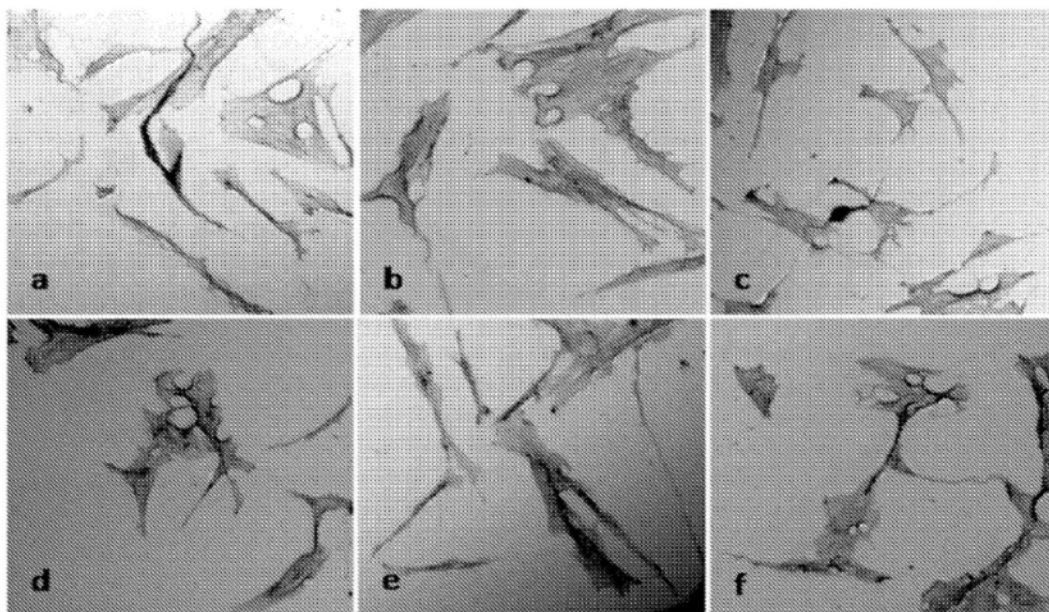


图18

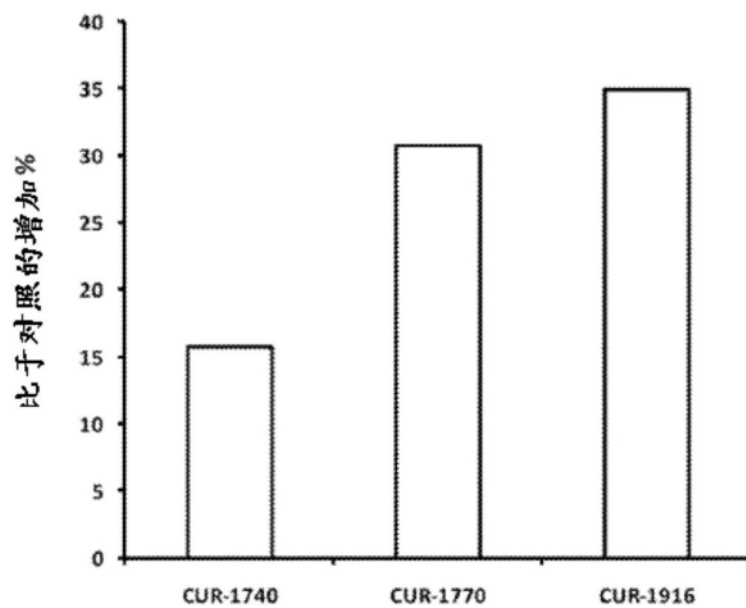


图19

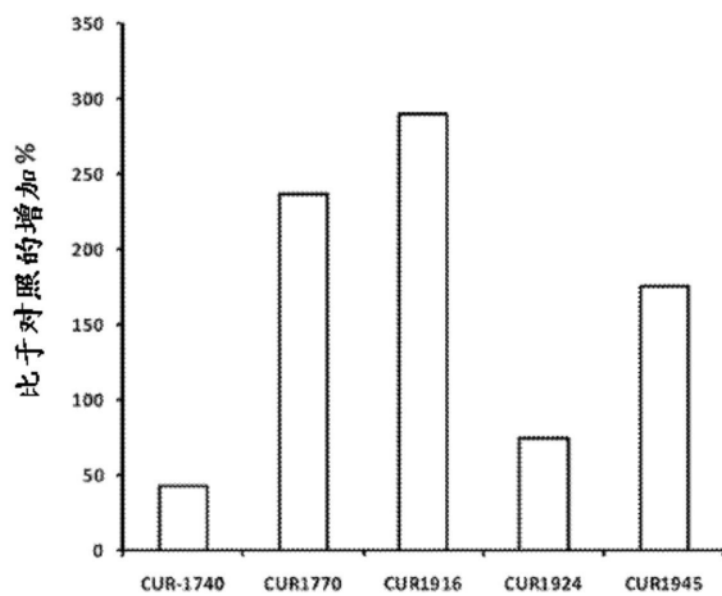


图20

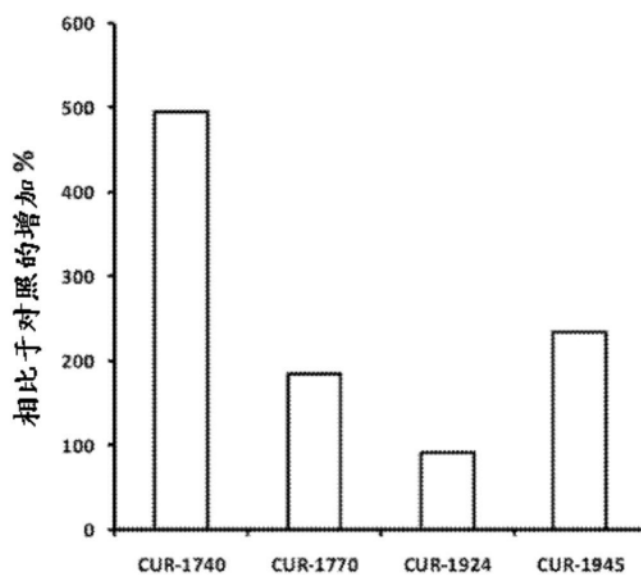


图21

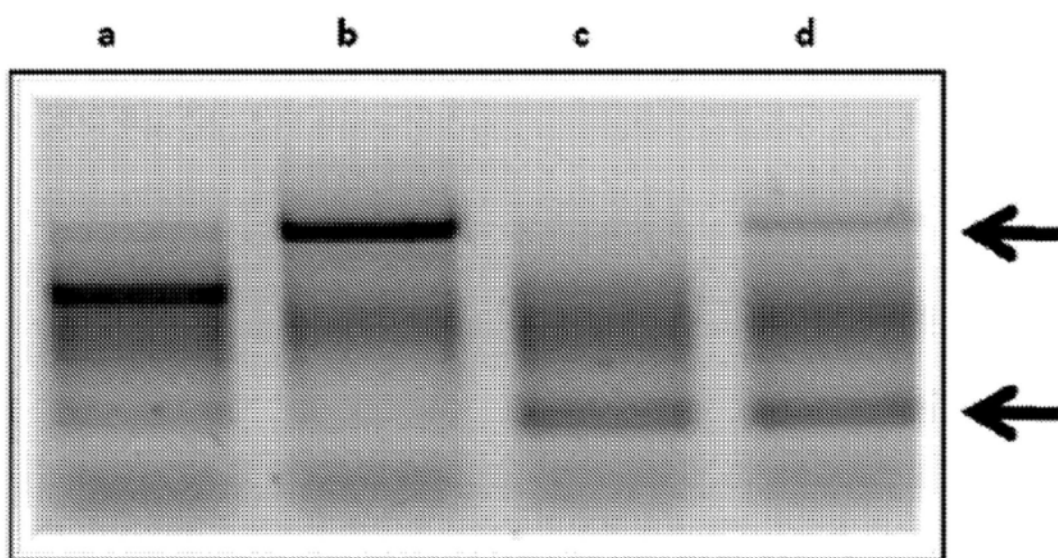


图22