



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113265404 A

(43) 申请公布日 2021.08.17

(21) 申请号 202110535254.3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2016.04.15

G12N 15/113 (2010.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7088 (2006.01)

62/148,691 2015.04.16 US

A61P 25/00 (2006.01)

62/232,941 2015.09.25 US

A61P 25/02 (2006.01)

62/239,400 2015.10.09 US

A61P 25/16 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 25/22 (2006.01)

201680016814.1 2016.04.15

A61P 25/28 (2006.01)

(71) 申请人 IONIS制药公司

A61P 21/00 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚州

A61P 21/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(72) 发明人 F·里戈

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 杜丹 赵昊

权利要求书3页 说明书85页

序列表44页

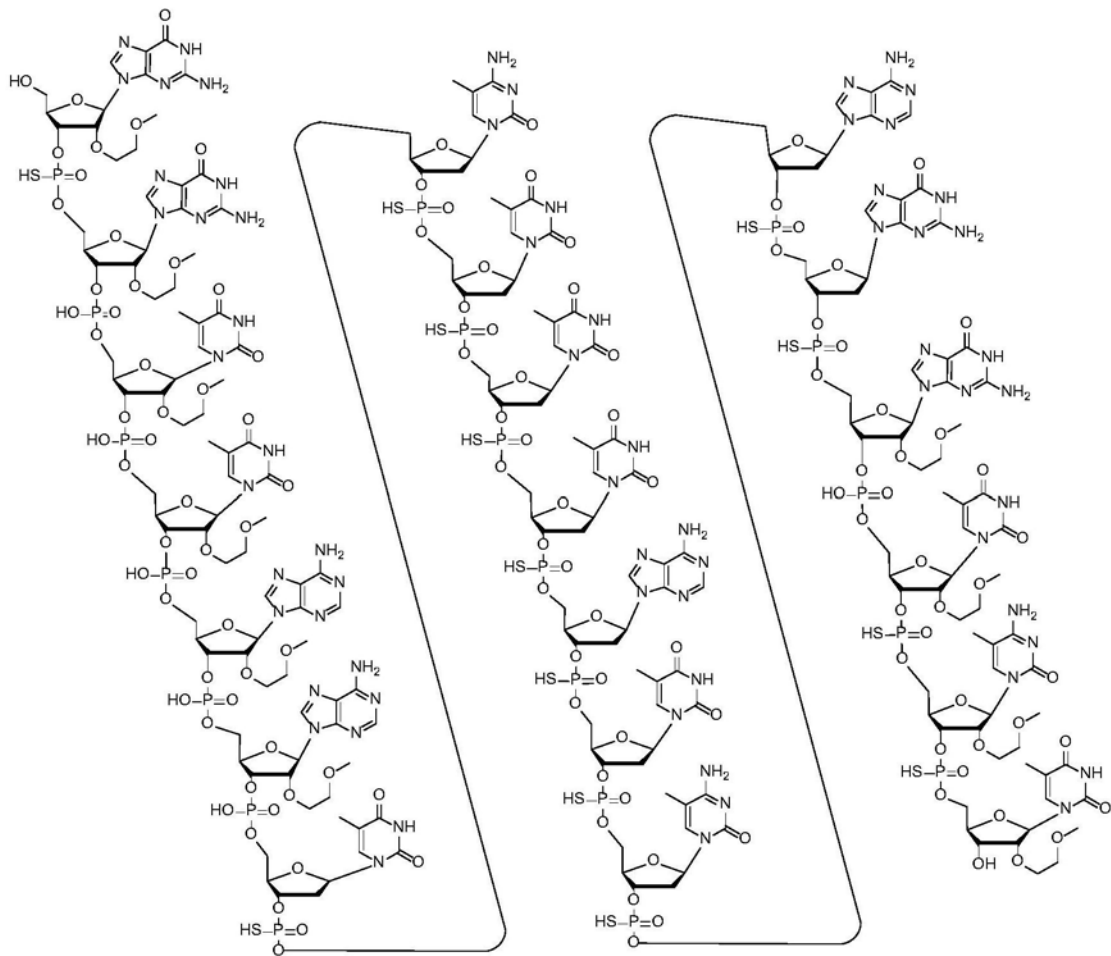
(54) 发明名称

用于调节C9ORF72表达的组合物

(57) 摘要

本文公开用于降低动物中的C9ORF72mRNA和蛋白质表达的组合物和方法。所述方法适用于治疗、预防、改善有需要的个体的神经退行性疾病或减缓所述疾病的进展。

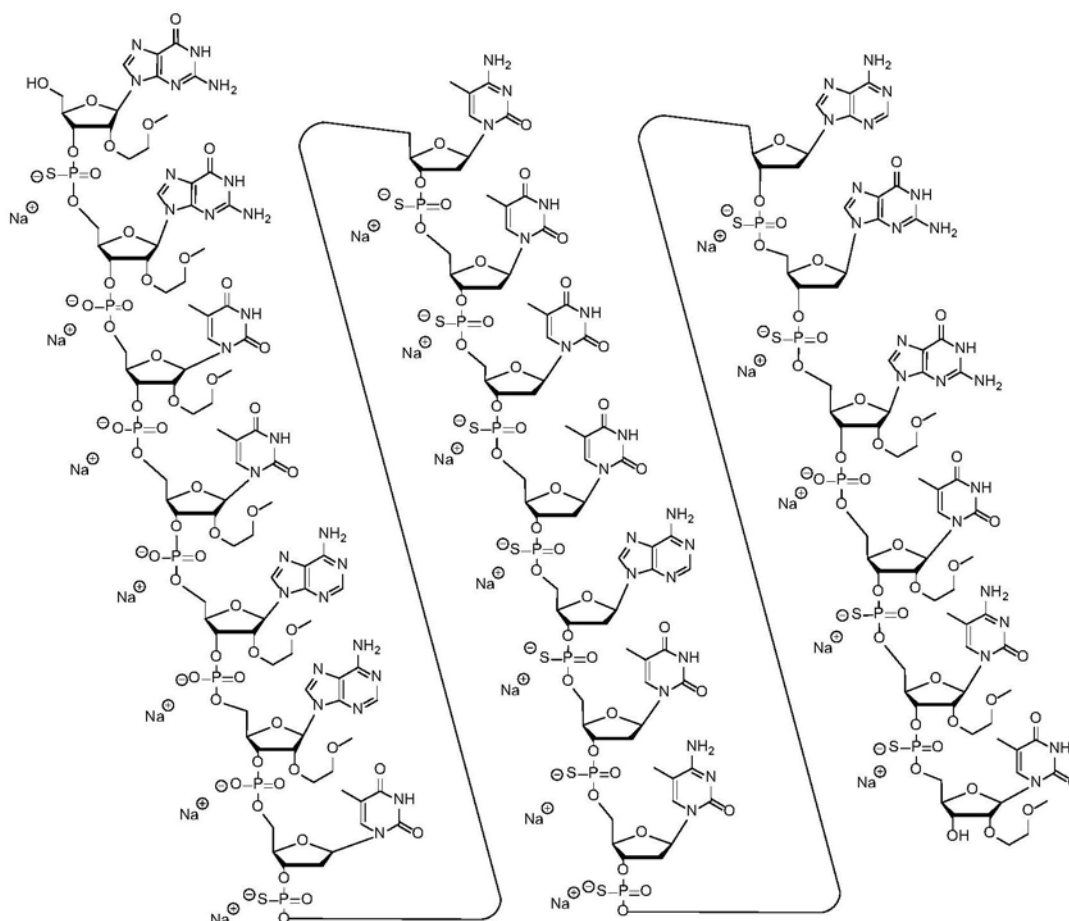
1. 一种修饰的寡核苷酸, 具有如下的化学结构:



, 或

其盐。

2. 一种修饰的寡核苷酸, 具有如下的化学结构:



3. 根据权利要求1所述的修饰的寡核苷酸, 其是钠盐或钾盐。

4. 一种药物组合物, 其包含如权利要求1-3中任一项所述的修饰的寡核苷酸, 以及药学上可接受的稀释剂。

5. 根据权利要求4所述的药物组合物, 其中所述药学上可接受的稀释剂是磷酸盐缓冲的生理盐水。

6. 根据权利要求4所述的药物组合物, 其中所述药物组合物仅由所述修饰的寡核苷酸和磷酸盐缓冲的生理盐水组成。

7. 一种包括修饰的寡核苷酸的化合物, 其中所述修饰的寡核苷酸是由5'翼区段、中心缺口区段和3'翼区段组成的缺口聚物, 其中:

由6个2'-O-甲氧基乙基核苷组成的5'翼区段,

由10个 β -D-脱氧核糖核苷组成的中心缺口区段, 以及

由4个2'-O-甲氧基乙基核苷组成的3'翼区段;

其中, 所述修饰的寡核苷酸具有核酸序列5'-GGTGAATCTTTATCAGGTCT-3', 其中每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶; 并且其中所述修饰的寡核苷酸的核苷间键联从5'到3'是soooooossssssssssooss, 其中每个s是硫代磷酸酯键联, 每个o是磷酸二酯键联。

8. 根据权利要求7所述的化合物, 其包括与缀合物基团共价连接的所述修饰的寡核苷酸。

9. 一种药物组合物, 其包含如权利要求7或8所述的化合物, 以及药学上可接受的稀释剂。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的稀释剂是磷酸盐缓冲的生理盐水。

11. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述药物组合物仅由所述化合物和磷酸盐缓冲的生理盐水组成。

用于调节C9ORF72表达的组合物

[0001] 本申请是申请号为201680016814.1、申请日为2016年4月15日、发明名称为“用于调节C9ORF72表达的组合物”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2016/027747的国家阶段申请,该国际申请要求申请日为2015年4月16日,申请号为62/148,691的美国申请;申请日为2015年9月25日,申请号为62/232,941的美国申请;申请日为2015年10月9日,申请号为62/239,400的美国申请的优先权。

[0002] 序列表

[0003] 本申请连同序列表一起以电子格式提交。序列表作为在2016年4月15日创建的名称为BIOL0269W0SEQ_ST25.txt的文件提供,所述文件的大小为104Kb。电子格式的序列表中的信息以引用的方式整体并入本文。

[0004] 领域

[0005] 提供用于调节细胞和动物中的C9ORF72 mRNA和蛋白质表达的组合物和方法。此类组合物和方法可用于治疗、预防、改善神经退行性疾病或减缓其进展,所述神经退行性疾病包括肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征和橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)。

[0006] 背景

[0007] 肌萎缩性侧索硬化(ALS)是一种致命的神经退行性疾病,其临床特征在于进行性麻痹,从而导致通常在症状发作的二至三年内因呼吸衰竭而死亡(Rowland和Shneider, N.Engl. J. Med., 2001, 344, 1688-1700)。ALS是西方世界第三大常见的神经退行性疾病(Hirtz等人, Neurology, 2007, 68, 326-337),并且目前没有有效的疗法。大约10%的病例在本质上是家族性的,而被诊断患有所述疾病的大多数患者被分类为散发性的,因为他们似乎在整个群体中随机发生(Chio等人, Neurology, 2008, 70, 533-537)。基于临床、遗传和流行病学数据,越来越认识到ALS和额颞叶痴呆(FTD)代表疾病的重叠连续体,其病理学特征在于中枢神经系统中TDP-43阳性包涵体的存在(Lillo和Hodges, J. Clin. Neurosci., 2009, 16, 1131-1135; Neumann等人, Science, 2006, 314, 130-133)。

[0008] 迄今为止,许多基因已被发现为是典型家族性ALS的原因,例如SOD1、TARDBP、FUS、OPTN和VCP(Johnson等人, Neuron, 2010, 68, 857-864; Kwiatkowski等人, Science, 2009, 323, 1205-1208; Maruyama等人, Nature, 2010, 465, 223-226; Rosen等人, Nature, 1993, 362, 59-62; Sreedharan等人, Science, 2008, 319, 1668-1672; Vance等人, Brain, 2009, 129, 868-876)。最近,涉及ALS、FTD和ALS-FTD的多种病例的亲缘连锁分析表明,9号染色体短臂上存在疾病的重要基因座(Boxer等人, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2011, 82, 196-203; Morita等人, Neurology, 2006, 66, 839-844; Pearson等人, J. Neurol., 2011, 258, 647-655; Vance等人, Brain, 2006, 129, 868-876)。C9ORF72基因中的突变是ALS和FTD的最常见遗传病因。导致突变的ALS-FTD是C9ORF72基因的第一个内含子中的较大六核苷酸(GGGGCC)重复序列扩增(Renton等人, Neuron, 2011, 72, 257-268; DeJesus-Hernandez等人, Neuron, 2011, 72, 245-256)。涵盖C9ORF72基因的建立者单倍型存在于大多数与此区域相关的病例中(Renton等人, Neuron, 2011, 72, 257-268)。染色体9p21上的此基因座在405名芬兰患者的组

中占家族性ALS的近一半,且占有所有ALS病例的近四分之一(Laaksovirta等人,Lancet Neurol.,2010,9,978-985)。

[0009] 涵盖C9ORF72基因的建立者单倍型存在于大多数与此区域相关的病例中。

[0010] 目前没有用于治疗此类神经退行性疾病的有效疗法。因此,目的是提供用于治疗此类神经退行性疾病的组合物和方法。

[0011] 概述

[0012] 某些实施方案提供用于抑制细胞、组织和动物中的C9ORF72 mRNA和蛋白质表达的方法、化合物和组合物。某些实施方案提供用于降低细胞、组织和动物中的C9ORF72 mRNA和蛋白质水平的方法、化合物和组合物。某些实施方案提供靶向C9ORF72核酸的反义化合物。在某些实施方案中,反义化合物是修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸是单链的。

[0013] 在某些实施方案中,减少C9ORF72相关的重复序列相关非ATG翻译(RAN翻译)产物。在某些实施方案中,C9ORF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)。在某些实施方案中,优先减少某些C9ORF72 mRNA变体。在某些实施方案中,优先减少的C9ORF72 mRNA变体是从含有内含子1的前体mRNA加工的变体。在某些实施方案中,内含子1含有六核苷酸重复序列扩增。在某些实施方案中,优先减少的C9ORF72 mRNA变体是C9ORF72致病相关mRNA变体。在某些实施方案中,C9ORF72致病相关mRNA变体是NM_001256054.1 (SEQ ID NO:1)。在某些实施方案中,六核苷酸重复序列扩增与C9ORF72相关疾病相关。在某些实施方案中,六核苷酸重复序列扩增与C9ORF72六核苷酸重复序列扩增相关疾病相关。在某些实施方案中,六核苷酸重复序列扩增包含至少30个GGGGCC重复序列、超过30个GGGGCC重复序列、超过100个GGGGCC重复序列、超过500个GGGGCC重复序列或超过1000个GGGGCC重复序列。在某些实施方案中,六核苷酸重复序列扩增与核灶相关。在某些实施方案中,C9ORF72相关RAN翻译产物与核灶相关。在某些实施方案中,C9ORF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)。在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法适用于降低C9ORF72 mRNA水平、C9ORF72蛋白质水平、C9ORF72 RAN翻译产物和核灶。在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法适用于选择性地减少C9ORF72致病相关mRNA变体。所述减少可以时间依赖性方式或以剂量依赖性方式出现。

[0014] 还提供适用于预防、治疗、改善与C9ORF72相关的疾病且减缓所述疾病的进展的方法。在某些实施方案中,所述C9ORF72相关疾病是神经退行性疾病。在某些实施方案中,神经退行性疾病是肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征和橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)。

[0015] 所述疾病可具有一个或多个共同的风险因素、成因或结果。发展神经退行性疾病且具体地说ALS和FTD的某些风险因素和成因包括遗传素质和年龄。

[0016] 在某些实施方案中,治疗方法包括向有需要的个体施用C9ORF72反义化合物。在某些实施方案中,反义化合物是单链修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,单链修饰的寡核苷酸与C9ORF72核酸互补。

[0017] 详述

[0018] 应理解,以上概述和以下详述二者都仅为示例性和解释性的,并且不限制要求保

护的本发明。在本文中,除非另外确切说明,否则单数的使用包括复数。如本文所使用,除非另外说明,否则“或”的使用是指“和/或”。此外,除非另外说明,否则如本文所用,“和”的使用是指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及其他形式诸如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用不是限制性的。此外,除非另外明确陈述,否则如“要素”或“组分”的术语涵盖包含一个单元的要素和组分与包含一个以上亚单元的要素和组分两者。

[0019] 本发明的化合物包括所公开的化合物的变体,其中一个或多个氢、碳、氮、氧或硫原子被同一元素的稳定同位素置换。

[0020] 本文所用的章节标题仅出于组织目的,并且不应解释为限制所述主题。本公开中引用的所有文件或文件部分,包括但不限于专利、专利申请、公开的专利申请、文章、书籍、论文和GENBANK登录号和可通过数据库如国家生物技术信息中心(NCBI)获得的相关序列信息以及在本文的公开内容通篇所涉及的其他数据关于本文所论述的文件部分以及其全部内容以引用的方式特此明确并入。

[0021] 定义

[0022] 除非提供具体定义,否则关于本文所述的分析化学、合成有机化学和医学和药物化学所用的命名以及本文所述的分析化学、合成有机化学和医学和药物化学的工序和技术为本领域中熟知且常用的。标准技术可用于化学合成和化学分析。

[0023] 除非另外指出,否则以下术语具有以下含义:

[0024] “2'-O-甲氧基乙基”(又为2'-MOE和2'-OCH₂CH₂-OCH₃以及MOE)是指呋喃糖环的2'位的O-甲氧基-乙基修饰。2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是修饰的糖。

[0025] “2'-MOE核苷”(又为2'-O-甲氧基乙基核苷)是指包含MOE修饰的糖部分的核苷。

[0026] “2'-取代的核苷”是指在呋喃糖环的2'位处包含除H或OH以外的取代基的核苷。在某些实施方案中,2'-取代的核苷包括具有双环糖修饰的核苷。

[0027] “5-甲基胞嘧啶”是指使用连接至5'位置的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是修饰的核碱基。

[0028] “伴随施用”是指在相同时间以任何方式对两种药剂同时施用,其中两种药剂的药理作用均在患者中显现。同时施用不要求以单一的药物组合物、以相同剂型或通过相同的施用途径来施用两种药剂。两种药剂的作用本身不需要同时显现出来。这些作用仅需要一段时间重叠并且不需要共延。

[0029] “施用”是指向动物提供药剂,且包括但不限于由医学专业人员施用及自行施用。

[0030] “改善”是指减轻、减缓、停止或逆转病状或疾病严重性的至少一个指标。指标的严重性可通过本领域的技术人员已知的主观或客观度量来确定。

[0031] “动物”是指人类或非人类动物,包括但不限于小鼠、大鼠、家兔、狗、猫、猪,以及非人灵长类,包括但不限于猴子和黑猩猩。

[0032] “抗体”是指特征在于与抗原以某种方式特异性反应的分子,其中抗体与抗原各自利用另一者来定义。抗体可指完全抗体分子或其任何片段或区域,如重链、轻链、Fab区和Fc区。

[0033] “反义活性”是指可归因于反义化合物与其靶核酸的杂交的任何可检测或可测量的活性。在某些实施方案中,反义活性为靶核酸或由此靶核酸所编码的蛋白质的量或表达的减少。

[0034] “反义化合物”是指能够经历通过氢键合与靶核酸进行杂交的低聚化合物。反义化合物的实例包括单链和双链化合物,诸如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、ssRNA和占位型化合物。

[0035] “反义抑制”是指与在不存在与靶核酸互补的反义化合物的情况下的靶核酸水平相比,在存在反义化合物的情况下靶核酸水平的降低。

[0036] “反义机制”是所有涉及化合物与靶核酸的杂交的那些机制,其中杂交的结果或效果是靶标降解或靶标占位,伴随阻碍涉及例如转录或剪接的细胞机器。

[0037] “反义寡核苷酸”是指具有允许与靶核酸的对应片段杂交的核碱基序列的单链寡核苷酸。

[0038] “碱基互补性”是指反义寡核苷酸的核酸碱基与靶核酸中的相应核酸碱基进行准确碱基配对(即杂交)的能力,且由相应核酸碱基之间的沃森-克里克(Watson-Crick)、霍氏(Hoogsteen)或反霍氏氢键结合介导。

[0039] “双环糖”是指通过两个原子桥接而修饰的呋喃糖基环。双环糖是修饰的糖。

[0040] “双环核苷”(也称为BNA)指具有如下核苷,所述核苷所具有的糖部分包含连接糖环的两个碳原子的桥,从而形成双环系统。在某些实施方案中,所述桥连接糖环的4'碳与2'碳。

[0041] “C90RF72反义转录物”是指从C90RF72基因的非编码链(又为反义链和模板链)产生的转录物。C90RF72反义转录物不同于从C90RF72基因的编码链(又为有义链)产生的规范转录的“C90RF72有义转录物”。在某些实施方案中,C90RF72反义转录物是SEQ ID NO:18。

[0042] “C90RF72反义转录物特异性抑制剂”是指能够在分子水平特异性地抑制C90RF72反义转录物和/或其表达产物的表达的任何试剂。如本文所用,“特异性”是指降低或抑制C90RF72反义转录物的表达而不将非靶标转录物降低至明显的程度(例如,C90RF72反义转录物特异性抑制剂降低C90RF72反义转录物的表达,但不将C90RF72有义转录物的表达降低至明显程度)。C90RF72特异性反义转录物抑制剂包括反义化合物、siRNA、适体、抗体、肽、小分子和其他能够抑制C90RF72反义转录物和/或其表达产物(如C90RF72反义转录物相关的RAN翻译产物)的表达的试剂。

[0043] “C90RF72相关疾病”是指与任何C90RF72核酸或其表达产物相关的任何疾病。此类疾病可包括神经退行性疾病。此类神经退行性疾病可包括ALS和FTD。在某些实施方案中,C90RF72相关疾病是由六核苷酸重复序列扩增引起的(或与其相关)。在某些实施方案中,六核苷酸重复序列扩增可包括重复至少30次、超过30次、超过100次、超过500次或超过1000次的GGGGCC、GGGGGG、GGGGGC或GGGGCG。

[0044] “C90RF72相关的RAN翻译产物”是指通过RAN翻译(即,重复序列相关的,和非-ATG-依赖性翻译)而翻译的异常肽或二肽聚合物。在某些实施方案中,C90RF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)中的任一种。

[0045] “C90RF72核酸”是指编码C90RF72的任何核酸。例如,在某些实施方案中,C90RF72核酸包括编码C90RF72的DNA序列,从编码C90RF72的DNA(包括含有内含子和外显子的基因组DNA(即,前体mRNA))转录的RNA序列,和编码C90RF72的mRNA序列。“C90RF72 mRNA”是指编码C90RF72蛋白的mRNA。

[0046] “C90RF72致病相关mRNA变体”是指从含有六核苷酸重复序列的C90RF72前体mRNA

变体加工的C90RF72 mRNA变体。当前体mRNA的转录在从外显子1A的起始位点至外显子1B的起始位点的区域,例如,基因组序列(SEQ ID NO:2,从核苷酸27535000至27565000截短的GENBANK登录号NT_008413.18的补体)的核苷酸1107至1520中开始时,C90RF72前体mRNA包含六核苷酸重复序列。在某些实施方案中,测量C90RF72致病相关mRNA变体的水平以测定样品中含有六核苷酸重复序列的C90RF72前体mRNA的水平。

[0047] “C90RF72特异性抑制剂”是指能够在分子水平上特异性地抑制C90RF72 mRNA和/或C90RF72蛋白的表达的任何试剂。例如,C90RF72特异性抑制剂包括核酸(包括反义化合物)、siRNA、适体、抗体、肽、小分子和其他能够抑制C90RF72 mRNA和/或C90RF72蛋白的表达的试剂。类似地,在某些实施方案中,C90RF72特异性抑制剂可影响动物中的其他分子过程。

[0048] “帽结构”或“端帽部分”是指已在反义化合物的任一末端并入的化学修饰。

[0049] “cEt”或“限制性乙基”是指具有包含连接4'-碳与2'-碳的桥的糖部分的双环核苷,其中所述桥具有下式:4'-CH(CH₃)-O-2'。

[0050] “限制性乙基核苷”(又为cEt核苷)是指包含含有4'-CH(CH₃)-O-2'桥的双环糖部分的核苷。

[0051] “化学上不同的区域”是指以某种方式化学上不同于同一反义化合物的另一区域的反义化合物的区域。例如,具有2'-O-甲氧基乙基核苷的区化学上不同于具有无2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷的区。

[0052] “嵌合反义化合物”是指具有至少两个化学上不同的区的反义化合物,每一位置具有多个亚单位。

[0053] “共同施用”是指对个体施用两种或更多种药剂。两种或更多种药剂可在单一药物组合物中,或可在分开的药物组合物中。两种或更多种药剂中的每一种可通过相同或不同的施用途径进行施用。共同施用包括平行或相继施用。

[0054] “互补性”是指第一核酸与第二核酸的核碱基之间配对的能力。

[0055] “包含(comprise)”、“包含(comprises)”和“包含(comprising)”应理解为意指包括所述步骤或要素或步骤或要素的群组,但不排除任何其他步骤或要素或步骤或要素的群组。

[0056] “连续核碱基”是指彼此紧邻的核碱基。

[0057] “设计”或“被设计来”是指设计与所选核酸分子特异性杂交的低聚化合物的方法。

[0058] “稀释剂”是指组合物中缺乏药理活性但在药学上是必需的或期望的成分。例如,在注射的药物中,稀释剂可以是液体,例如盐水溶液。

[0059] “剂量”是指在单个施用中或在指定时间内提供的指定量的药剂。在某些实施方案中,剂量可在一个、两个或多个大丸剂、片剂或注射剂中施用。例如,在某些实施方案中,当期望皮下施用时,所需剂量需要不易由单次注射调节的体积,因此,两个或多个注射可用于实现所需剂量。在某些实施方案中,药剂通过在延长的时段内或连续地输注来施用。剂量可被规定为每小时、每天、每周或每月药剂的量。

[0060] “有效量”在调节活性或治疗或预防病状的情况下是指向需要这种调节、治疗或防治的受试者以单次剂量或一系列剂量的一部分形式施用有效调节所述效应,或治疗或防治或改善所述病状的药剂的量。有效量可在个体间变化,取决于待治疗个体的健康和身体条件、待治疗个体的分类群、组合物的制剂、个体的医疗条件的评价以及其他相关因素。

[0061] “功效”是指产生所需效应的能力。

[0062] “表达”包括基因密码信息借以转化成细胞中存在且起作用的结构的的所有功能。此类结构包括但不限于转录和翻译的产物。

[0063] “灶 (Focus)”或“灶 (foci)”是指包含C90RF72转录物的核或细胞质体。在某些实施方案中,灶包含至少一种C90RF72转录物。在某些实施方案中,C90RF72灶包含转录物,所述转录物包含以下六核苷酸重复序列中的任一种:GGGGCC、GGGGGG、GGGGGC和/或GGGGCG。

[0064] “完全互补”或“100%互补”是指第一核酸的每个核碱基在第二核酸中均具有互补核碱基。在某些实施方案中,第一核酸是反义化合物且靶核酸是第二核酸。

[0065] “缺口聚物 (Gapmer)”是指其中具有多个支持RNA酶H裂解的核苷的内部区域位于具有一个或多个核苷的外部区域之间的嵌合反义化合物,其中包含内部区域的核苷化学上不同于包含外部区域的核苷。内部区域可被称为“缺口”,且外部区域可被称为“翼”。

[0066] “六核苷酸重复序列扩增”是指重复至少两次的一系列六个碱基(例如,GGGGCC、GGGGGG、GGGGCG或GGGGGC)。在某些实施方案中,六核苷酸重复序列扩增可位于C90RF72核酸的内含子1中。在某些实施方案中,致病性六核苷酸重复序列扩增包括C90RF72核酸中GGGGCC、GGGGGG、GGGGCG或GGGGGC的至少30个、超过30个、超过100个、超过500个或超过1000个重复序列并且与疾病相关。在某些实施方案中,重复序列是连续的。在某些实施方案中,重复序列被1个或多个核碱基间断。在某些实施方案中,野生型六核苷酸重复序列扩增包括C90RF72核酸中GGGGCC、GGGGGG、GGGGCG或GGGGGC的23个或更少重复序列。在某些实施方案中,重复序列是连续的。在某些实施方案中,重复序列被1个或多个核碱基间断。

[0067] “杂交”是指互补核酸分子的退火。在某些实施方案中,互补核酸分子包括但不限于反义化合物和靶核酸。在某些实施方案中,互补核酸分子包括但不限于反义寡核苷酸与核酸靶标。

[0068] “鉴别患有C90RF72相关疾病的动物”是指鉴别已被诊断为患有C90RF72相关疾病或易发展C90RF72相关疾病的动物。易发展C90RF72相关疾病的个体包括那些具有发展C90RF72相关疾病的一种或多种风险因素的个体,所述风险因素包括具有一种或多种C90RF72相关疾病的个人或家族病史或遗传易感性。这种鉴别可通过包括评估个体的医疗史和标准临床测试或评估(诸如遗传测试)的任何方法来实现。

[0069] “紧邻”是指在紧邻的要素之间没有插入要素。

[0070] “个体”是指选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0071] “抑制C90RF72”是指降低C90RF72 mRNA和/或蛋白质的水平或表达。在某些实施方案中,相较于在不存在C90RF72反义化合物(诸如反义寡核苷酸)下C90RF72 mRNA和/或蛋白质的表达水平,C90RF72 mRNA和/或蛋白质水平在靶向C90RF72的反义化合物(包括靶向C90RF72的反义寡核苷酸)存在下得到抑制。

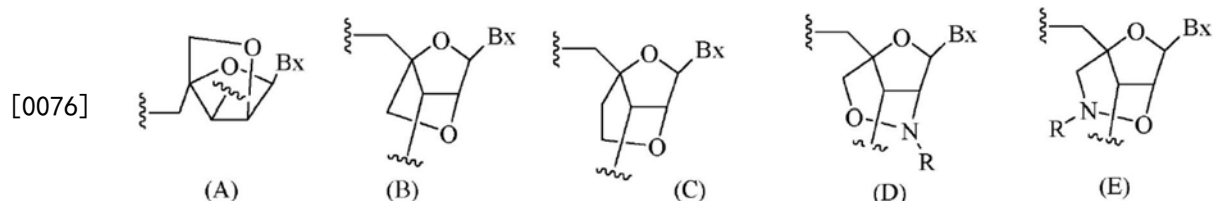
[0072] “抑制表达或活性”是指表达或活性的降低或阻断并且不一定表示表达或活性的完全消除。

[0073] “核苷间键联”是指核苷之间的化学键。

[0074] “连接的核苷”是指由核苷间键联连接在一起的相邻核苷。

[0075] “锁核酸”或“LNA”或“LNA核苷”是指在核苷糖单位的4'位置与2'位置之间具有连接两个碳原子、从而形成双环糖的桥的核酸单体。这种双环糖的实例包括但不限于A) α -L-

亚甲基氧基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$) LNA; (B) β -D-亚甲基氧基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$) LNA; (C) 亚乙基氧基 ($4' - (\text{CH}_2)_2 - \text{O} - 2'$) LNA; (D) 氨基氧基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{N}(\text{R}) - 2'$) LNA; 以及 (E) 氧基氨基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}) - \text{O} - 2'$) LNA, 如下文所述。



[0077] 如本文所述, LNA化合物包括但不限于, 在所述糖的4'与2'位置之间具有至少一个桥的化合物, 其中所述桥各自独立地包含1或2至4个独立地选自以下的连接基团: $-\text{[C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)]_n-$ 、 $-\text{C}(\text{R}_1)=\text{C}(\text{R}_2)-$ 、 $-\text{C}(\text{R}_1)=\text{N}-$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}_1)-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{Si}(\text{R}_1)_2-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_x-$ 和 $-\text{N}(\text{R}_1)-$; 其中: x 是0、1或2; n 是1、2、3或4; 每个 R_1 和 R_2 独立地是H、保护基团、羟基、 C_1-C_{12} 烷基、取代的 C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_{12} 烯基、取代的 C_2-C_{12} 烯基、 C_2-C_{12} 炔基、取代的 C_2-C_{12} 炔基、 C_5-C_{20} 芳基、取代的 C_5-C_{20} 芳基、杂环基团、取代的杂环基团、杂芳基、取代的杂芳基、 C_5-C_7 脂环族基团、取代的 C_5-C_7 脂环族基团、卤素、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 COOJ_1 、酰基($\text{C}(=\text{O})-\text{H}$)、取代的酰基、 CN 、磺酰基($\text{S}(=\text{O})_2-\text{J}_1$)或亚磺酰基($\text{S}(=\text{O})-\text{J}_1$); 并且每个 J_1 和 J_2 独立地是H、 C_1-C_{12} 烷基、取代的 C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_{12} 烯基、取代的 C_2-C_{12} 烯基、 C_2-C_{12} 炔基、取代的 C_2-C_{12} 炔基、 C_5-C_{20} 芳基、取代的 C_5-C_{20} 芳基、酰基($\text{C}(=\text{O})-\text{H}$)、取代的酰基、杂环基团、取代的杂环基团、 C_1-C_{12} 氨基烷基、取代的 C_1-C_{12} 氨基烷基或保护基团。

[0078] 涵盖于LNA的定义内的4'-2'桥连基团的实例包括但不限于下式中的一个: $-\text{[C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)]_n-$ 、 $-\text{[C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)]_n-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{R}_1\text{R}_2)-\text{N}(\text{R}_1)-\text{O}-$ 或 $-\text{C}(\text{R}_1\text{R}_2)-\text{O}-\text{N}(\text{R}_1)-$ 。此外, 涵盖于LNA的定义内的其他桥连基团是4'- CH_2-2' 、4'- $(\text{CH}_2)_2-2'$ 、4'- $(\text{CH}_2)_3-2'$ 、4'- $\text{CH}_2-\text{O}-2'$ 、4'- $(\text{CH}_2)_2-\text{O}-2'$ 、4'- $\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{R}_1)-2'$ 和4'- $\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}_1)-\text{O}-2'$ 桥, 其中每个 R_1 和 R_2 独立地是H、保护基团或 C_1-C_{12} 烷基。

[0079] 根据本发明的LNA的定义内还包括如下LNA, 其中核糖基糖环的2'-羟基连接至糖环的4'碳原子, 从而形成亚甲基氧基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$) 桥以形成双环糖部分。桥还可以是连接2'氧原子与4'碳原子的亚甲基 ($-\text{CH}_2-$), 对于其使用术语亚甲基氧基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$) LNA。此外, 在于这个位置中具有亚乙基桥连基团的双环糖部分的情况下, 使用术语亚乙基氧基 ($4' - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - 2'$) LNA。在如本文所用的LNA的定义内还涵盖 α -L-亚甲基氧基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$), 其是亚甲基氧基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$) LNA的异构体。

[0080] “错配”或“非互补核碱基”是指当第一核酸的核碱基不能与第二或靶核酸的对应核碱基配对的情况。

[0081] “修饰的核苷间键联”是指来自天然存在的核苷间键(即, 磷酸二酯核苷间键)的取代或任何变化。

[0082] “修饰的核碱基”是指除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸苷或尿嘧啶的以外任何核碱基。“未修饰的核碱基”是指嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G), 以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。

[0083] “修饰的核苷”是指独立地具有修饰的糖部分和/或修饰的核碱基的核苷。

[0084] “修饰的核苷酸”是指独立地具有修饰的糖部分、修饰的核苷间键联和/或修饰的

核碱基的核苷酸。

[0085] “修饰寡核苷酸”意指包含至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖和/或修饰的核碱基的寡核苷酸。

[0086] “修饰的糖”是指来自天然糖部分的取代和/或任何变化。

[0087] “单体”是指低聚物的单个单元。单体包括但不限于天然存在或修饰的核苷和核苷酸。

[0088] “基序”是指反义化合物中未修饰的和修饰的核苷的型态。

[0089] “天然糖部分”是指DNA (2' -H) 或RNA (2' -OH) 中发现的糖部分。

[0090] “天然存在的核苷间键联”是指3'至5'磷酸二酯键联。

[0091] “非互补核碱基”是指彼此不形成氢键或以其他方式支持杂交的一对核碱基。

[0092] “核酸”是指由单体核苷酸组成的分子。核酸包括但不限于核糖核酸 (RNA)、脱氧核糖核酸 (DNA)、单链核酸、双链核酸、小干扰核糖核酸 (siRNA) 和微RNA (miRNA)。

[0093] “核碱基”是指能够与另一核酸的碱基配对的杂环部分。

[0094] “核碱基互补性”是指能够与另一核碱基进行碱基配对的核碱基。例如,在DNA中,腺嘌呤 (A) 与胸腺嘧啶 (T) 互补。例如,在RNA中,腺嘌呤 (A) 与尿嘧啶 (U) 互补。在某些实施方案中,互补核碱基是指反义化合物中能够与其靶核酸的核碱基进行碱基配对的核碱基。例如,如果反义化合物的某一位置上的核碱基能够与靶核酸的某一位置上的核碱基进行氢键合,那么寡核苷酸与靶核酸之间的氢键合的位置被认为在所述核碱基对上互补的。

[0095] “核碱基序列”是指不依赖于任何糖、键联或核碱基修饰的连续核碱基的顺序。

[0096] “核苷”是指连接至糖的核碱基。

[0097] “核苷模拟物”包括用于在低聚化合物的一个或多个位置处置换糖或糖和碱基且不一定置换键联的那些结构,例如像具有吗啉代、环己烯基、环己基、四氢吡喃基、双环或三环糖模拟物 (例如非呋喃糖糖单位) 的核苷模拟物。核苷酸模拟物包括用于在低聚化合物的一个或多个位置处置换核苷和键联的那些结构,例如像肽核酸或吗啉代类 (由 -N (H) -C (=O) -O- 或其他非磷酸二酯键联连接的N-吗啉基)。糖替代物与稍微更广泛的术语核苷模拟物重叠,但仅旨在指示置换糖单位 (呋喃糖环)。本文提供的四氢吡喃基环说明糖替代物的一个实例,其中呋喃糖糖基已被四氢吡喃基环系统置换。“模拟物”是指替代糖、核碱基和/或核苷间键联的基团。一般而言,使用模拟物替代糖或糖-核苷间键联组合,且维持核碱基以便与所选靶标杂交。

[0098] “核苷酸”是指具有共价连接至核苷的糖部分的磷酸酯基团的核苷。

[0099] “脱靶效应”是指与调节除预期靶核酸以外的基因的RNA或蛋白质表达相关的不想要或有害的生物效应。

[0100] “低聚化合物”或“低聚物”是指具有连接的单体亚单位且能够与核酸分子的至少一个区杂交的聚合物。

[0101] “寡核苷酸”是指连接的核苷的聚合物,其中每个可以彼此独立地经修饰或未经修饰。

[0102] “胃肠外施用”是指通过注射 (例如,快速浓注) 或输注来施用。胃肠外施用包括皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、动脉内施用、腹膜内施用或颅内施用,例如鞘内或脑室内施用。

[0103] “肽”是指通过由酰胺键连接至少两个氨基酸而形成的分子。如本文所用,“肽”是指多肽和蛋白质,而不限于此。

[0104] “药剂”是指当施用给个体时提供治疗益处的物质。例如,在某些实施方案中,靶向 C90RF72 的反义寡核苷酸是药剂。

[0105] “药学上可接受的衍生物”涵盖本文所述的化合物的药学上可接受的盐、缀合物、前药或异构体。

[0106] “药学上可接受的盐”是指反义化合物的生理上和药学上可接受的盐,即保留了母体寡核苷酸的所需生物活性并且不赋予其不希望的毒理学效应的盐。

[0107] “硫代磷酸酯键联”是指核苷之间的键联,其中磷酸二酯键通过用硫原子置换非桥联氧原子之一而被修饰。硫代磷酸酯键联为修饰的核苷间键联。

[0108] “部分”是指核酸的限定数目的连续(即连接的)核碱基。在某些实施方案中,部分是靶核酸的限定数目的连续核碱基。在某些实施方案中,部分是反义化合物的限定数目的连续核碱基。

[0109] “预防(Prevent)”或“预防(preventing)”是指延迟或阻止疾病、病症或病状的发生或发展持续数分钟到数天、数周到数月或无限期的时间段。

[0110] “前药”是指以非活性形式制备且在体内或其细胞内通过内源酶或其他化学物质或条件的作用转化成活性形式的治疗剂。

[0111] “防治有效量”是指向动物提供防治或预防益处的药剂的量。

[0112] “区”被定义为靶核酸中具有至少一个可鉴别的结构、功能或特征的部分。

[0113] “核糖核苷酸”是指在核苷酸的糖部分的2'位上具有羟基的核苷酸。核糖核苷酸可用多种取代基中的任一种进行修饰。

[0114] “盐”是指反义化合物的生理上和药学上可接受的盐,即保留了母体寡核苷酸的所需生物活性并且不赋予其不希望的毒理学效应的盐。

[0115] “区段”被定义为靶核酸内的区的较小部分或子部分。

[0116] 本文所教导的反义寡核苷酸的“缩短”或“截短”型式具有一个、两个或多个核苷缺失。

[0117] “副作用”是指可归因于治疗的除所需作用以外的生理反应。在某些实施方案中,副作用包括但不限于注射部位反应、肝功能测试异常、肾功能异常、肝毒性、肾毒性、中枢神经系统异常和肌病。

[0118] “单链寡核苷酸”是指未与互补链杂交的寡核苷酸。“单链修饰的寡核苷酸”是指未与互补链杂交的修饰的寡核苷酸。

[0119] 如本文所用的“位点”被定义为靶核酸内的独特核碱基位置。

[0120] “减缓进展”是指疾病发展的减少。

[0121] “可特异性地杂交”是指反义化合物在反义寡核苷酸与靶核酸之间具有足够的互补度以在需要特异性结合的条件下,即在体内测定及治疗性治疗的情况下于生理条件下诱导所需作用,而对非靶核酸展现极小的影响或无影响。

[0122] “严格杂交条件”或“严格条件”是指低聚化合物与其靶序列杂交,但与极少数目的其他序列杂交的条件。

[0123] “受试者”是指选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0124] “靶标”是指需要调节的蛋白质。

[0125] “靶基因”是指编码靶标的基因。

[0126] “靶向”或“靶向的”是指将与靶核酸特异性杂交并诱导所需效应的反义化合物的设计和选择的过程。

[0127] “靶核酸”、“靶RNA”和“靶RNA转录物”以及“核酸靶标”都是指能够由反义化合物靶向的核酸。

[0128] “靶区”是指靶核酸中由一种或多种反义化合物所靶向的部分。

[0129] “靶区段”是指反义化合物所靶向的靶核酸的核苷酸的序列。“5' 靶位点”是指靶区段的最5' 核苷酸。“3' 靶位点”是指靶区段的最3' 核苷酸。

[0130] “治疗有效量”是指向个体提供治疗益处的药剂的量。

[0131] “治疗(Treat)”或“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指施用组合物以实现疾病或病状的改变或改善。

[0132] “未修饰的核碱基”是指嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。

[0133] “未修饰的核苷酸”是指由天然存在的核碱基、糖部分和核苷间键联组成的核苷酸。在某些实施方案中,未修饰的核苷酸是RNA核苷酸(即 β -D-核糖核苷)或DNA核苷酸(即 β -D-脱氧核糖核苷)。

[0134] “翼区段”是指被修饰来赋予寡核苷酸诸如抑制活性增强、对靶核酸的结合亲和力增强或对由体内核酸酶引起的降解具抗性的性质的多个核苷。

[0135] 某些实施方案

[0136] 某些实施方案提供用于降低总C90RF72 mRNA和蛋白质表达的组合物和方法。

[0137] 某些实施方案提供用于减少C90RF72致病相关mRNA变体的组合物和方法。

[0138] 某些实施方案提供用于治疗、预防、改善有需要的个体中与C90RF72相关的疾病或减缓所述疾病的进展的方法。还涵盖用于制备用以治疗、预防或改善与C90RF72相关的疾病的药物的方法。C90RF72相关疾病包括神经退行性疾病。在某些实施方案中,神经退行性疾病可以是ALS或FTD。在某些实施方案中,神经退行性疾病可以是家族性的或散发性的。

[0139] 本公开提供以下非限制性编号的实施方案:

[0140] 实施方案1.一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接核苷组成并且具有核碱基序列,所述核碱基序列包含SEQ ID NO:22-55的任何核碱基序列的至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或至少20个连续核碱基。

[0141] 实施方案2.如实施方案1所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。

[0142] 实施方案3.如实施方案1和2所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸是单链修饰的寡核苷酸。

[0143] 实施方案4.如实施方案1-3中任一项所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键联。

[0144] 实施方案5.如实施方案4所述的化合物,其中所述至少一个修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0145] 实施方案6.如实施方案4和5所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯键联。

[0146] 实施方案7.如实施方案5所述的化合物,其中每个修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0147] 实施方案8.如实施方案1-7中任一项所述的化合物,其中至少一个核苷包含修饰的核碱基。

[0148] 实施方案9.如实施方案8所述的化合物,其中所述修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

[0149] 实施方案10.如实施方案1-9中任一项所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包含修饰的糖。

[0150] 实施方案11.如实施方案10所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸的每个核苷包含修饰的糖。

[0151] 实施方案12.如实施方案10或11所述的化合物,其中所述至少一个修饰的糖是双环糖。

[0152] 实施方案13.如实施方案12所述的化合物,其中所述双环糖包含在所述糖的4'位置与2'位置之间的化学桥,其中所述化学桥选自:4'-CH(R)-O-2'和4'-(CH₂)₂-O-2',其中R独立地是H、C₁-C₆烷基和C₁-C₆烷氧基。

[0153] 实施方案14.如实施方案13所述的化合物,其中所述化学桥是4'-CH(R)-O-2',并且其中R是甲基。

[0154] 实施方案15.如实施方案13所述的化合物,其中所述化学桥是4'-CH(R)-O-2',并且其中R是H。

[0155] 实施方案16.如实施方案13所述的化合物,其中所述化学桥是4'-CH(R)-O-2',并且其中R是-CH₂-O-CH₃。

[0156] 实施方案17.如实施方案10或11所述的化合物,其中所述至少一个修饰的糖包含2'-O-甲氧基乙基。

[0157] 实施方案18.如实施方案1-10或12-16中任一项所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸是缺口聚物。

[0158] 实施方案19.如实施方案18所述的化合物,其中所述缺口聚物是以下中的任一种:3-8-7MOE缺口聚物、3-10-7MOE缺口聚物、4-8-6MOE缺口聚物、4-10-6MOE缺口聚物、6-10-4MOE缺口聚物、6-8-4MOE缺口聚物、7-8-3MOE缺口聚物或7-10-3MOE缺口聚物。

[0159] 实施方案20.如权利要求5所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸包含呈以下状态中的任一种的核苷间键联:s o o s s s s s s s s s s s s o o o o s s、s o o o s s s s s s s s s s s s o o o s s、s o o o o o s s s s s s s s s s s s o s s、s o o o o o o s s s s s s s s s s s s s s、s o o o o s s s s s s s s s s s s o o s s、s o o o s s s s s s s s s s s s o o o s s、s o o o o o s s s s s s s s s s s s o s s、s o o s s s s s s s s s s s s o o o s s、s o o o o s s s s s s s s s s s s o s s、s o s s s s s s s s s s s s o o o o s s或s o o o o o s s s s s s s s s s s s,其中,

[0160] s=硫代磷酸酯键联,以及

[0161] o=磷酸二酯键联。

[0162] 实施方案19.一种组合物,其包含如前述实施方案中任一项所述的化合物或其盐,

和药学上可接受的载体或稀释剂中的至少一种。

[0163] 实施方案20.如实施方案19所述的组合物,其还包含C90RF72反义转录物特异性抑制剂。

[0164] 实施方案21.如实施方案20所述的组合物,其中所述C90RF72反义转录物特异性抑制剂是反义化合物。

[0165] 实施方案22.如实施方案21所述的组合物,其中所述反义化合物是修饰的寡核苷酸。

[0166] 实施方案23.如实施方案22所述的组合物,其中所述修饰的寡核苷酸是单链的。

[0167] 实施方案24.如实施方案22或23所述的组合物,其中所述修饰的寡核苷酸具有与C90RF72反义转录物至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补的核碱基序列。

[0168] 实施方案25.如实施方案24所述的组合物,其中所述C90RF72反义转录物具有SEQ ID NO:18的核碱基序列。

[0169] 实施方案26.一种方法,其包括向动物施用如前述实施方案中任一项所述的化合物或组合物。

[0170] 实施方案27.如实施方案26所述的方法,其中所述动物是人。

[0171] 实施方案28.如实施方案26和27所述的方法,其中施用所述化合物预防、治疗、改善C90RF72相关疾病或减缓所述疾病的进展。

[0172] 实施方案29.如实施方案28所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病由六核苷酸重复序列扩增引起。

[0173] 实施方案30.如实施方案28所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病是肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征和橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)。

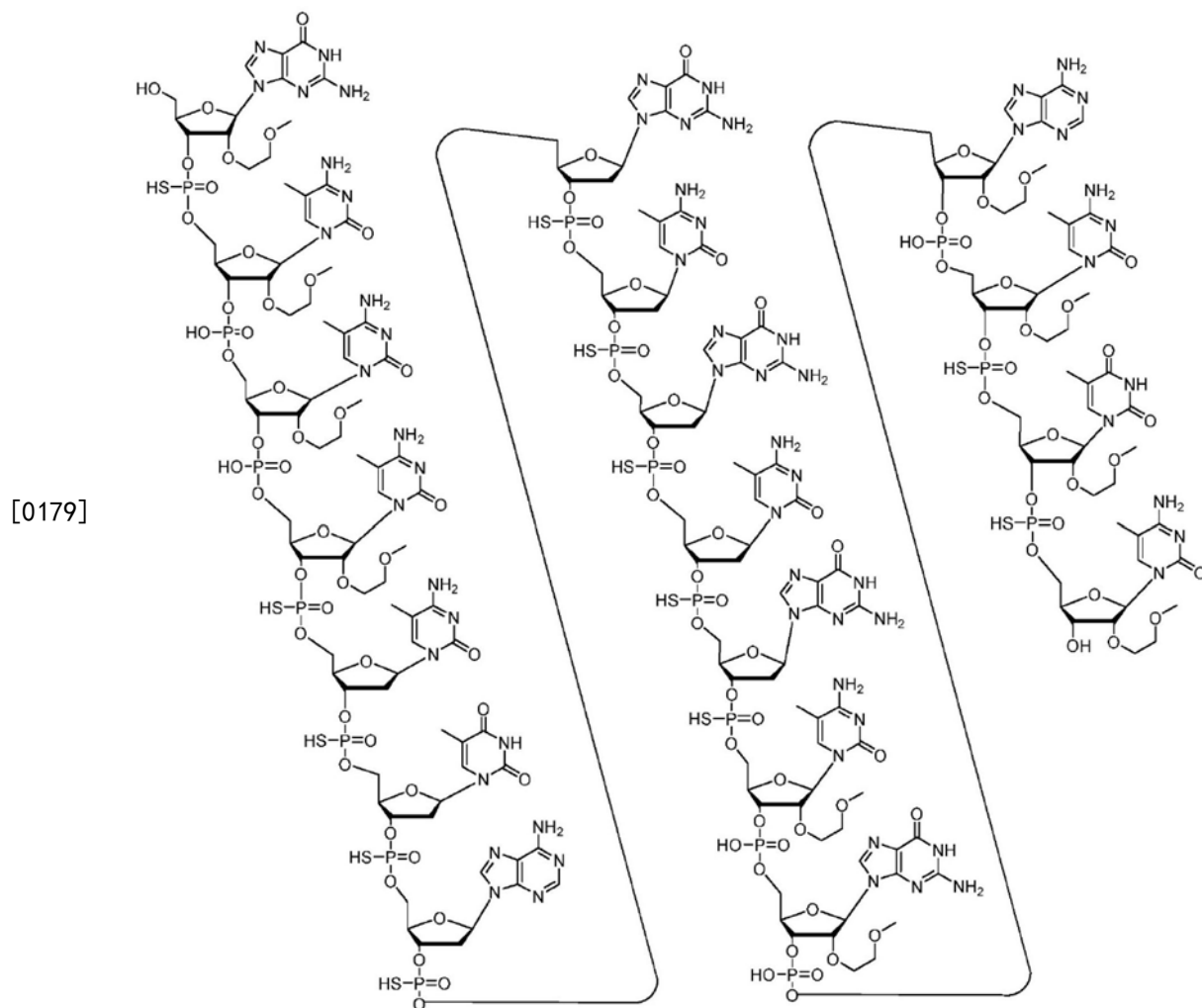
[0174] 实施方案31.如实施方案26-30所述的方法,其中所述施用减少核灶。

[0175] 实施方案32.如实施方案26-31所述的方法,其中所述施用降低C90RF72相关的RAN翻译产物的表达。

[0176] 实施方案33.如实施方案32所述的方法,其中所述C90RF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)中的任一种。

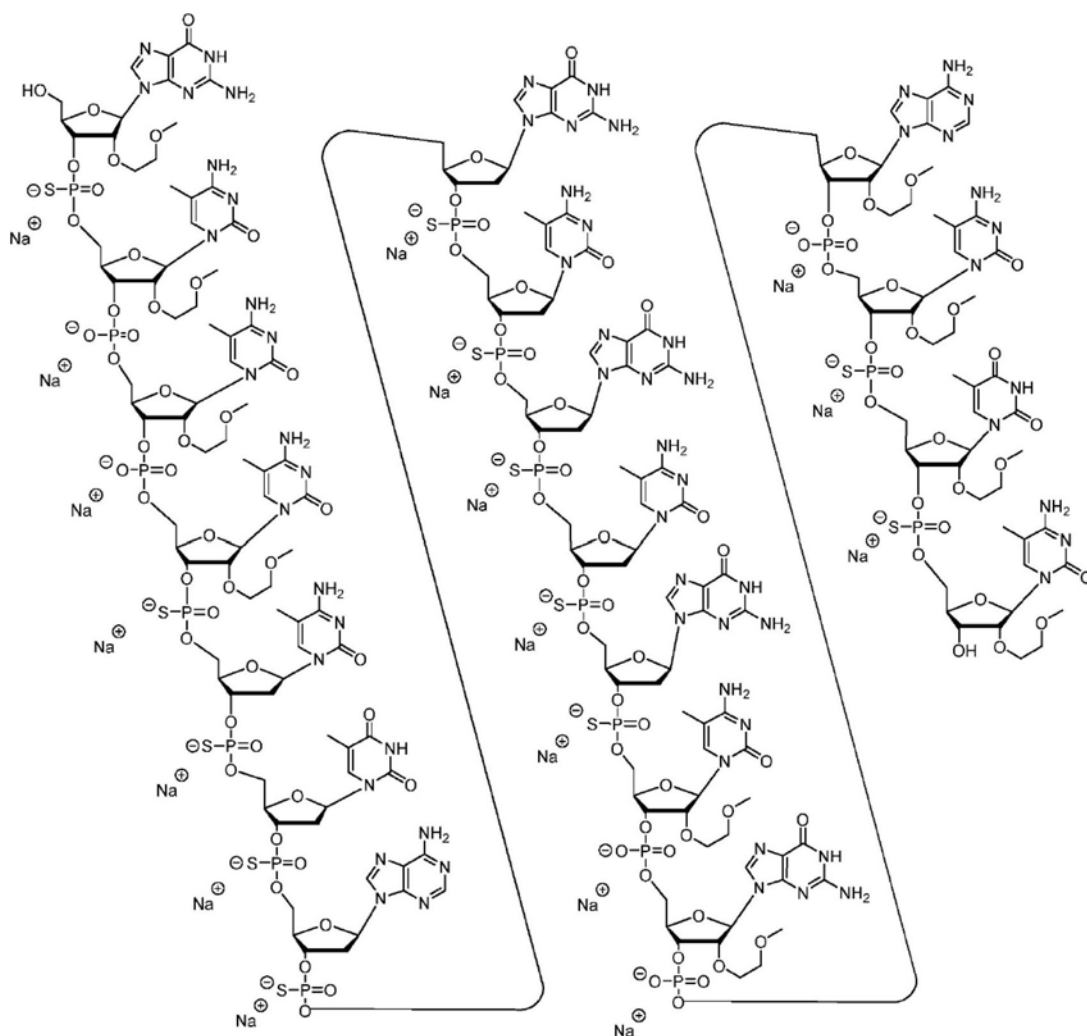
[0177] 实施方案34.如实施方案1-33中任一项所述的化合物或组合物的用途,其用于制造用于治疗神经退行性病症的药物。

[0178] 实施方案35.一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:



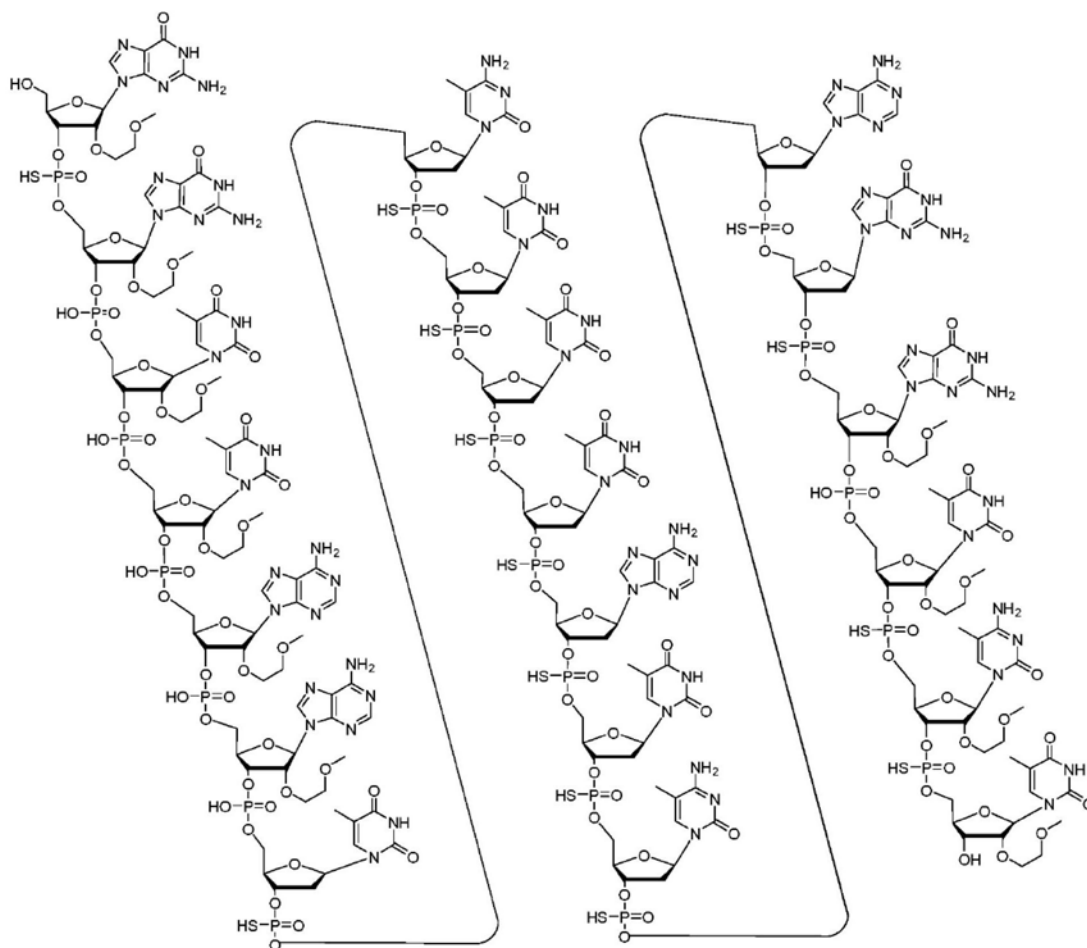
[0180] 实施方案36. 一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:

[0181]



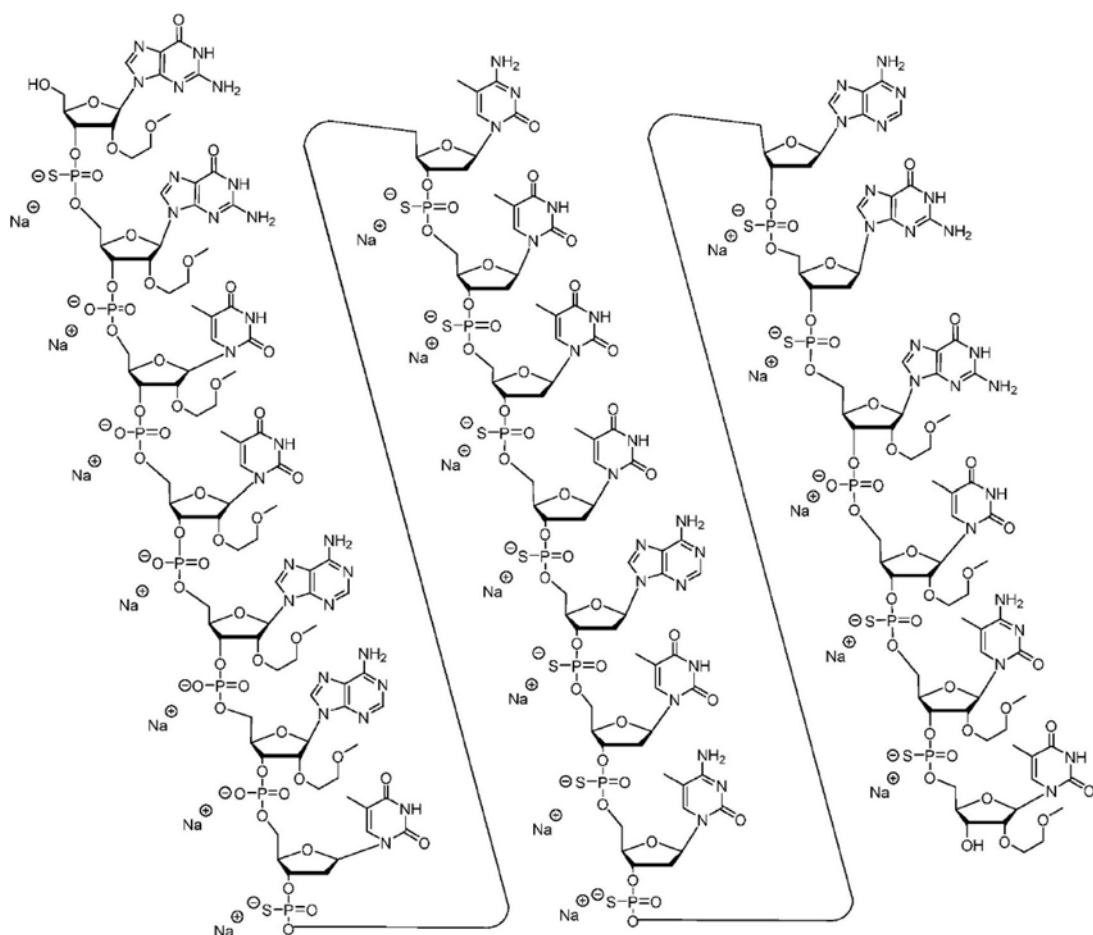
[0182] 实施方案37. 一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:

[0183]



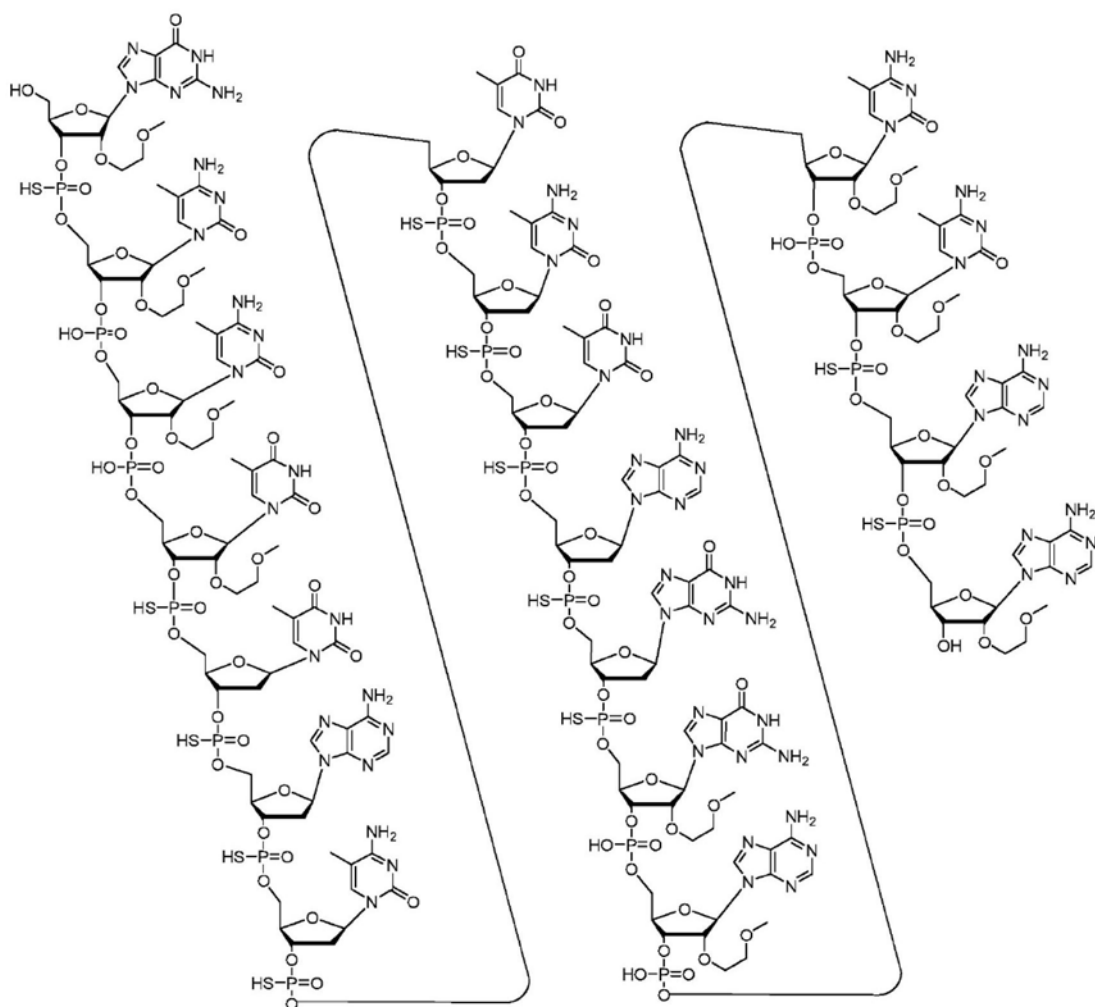
[0184] 实施方案38.一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:

[0185]



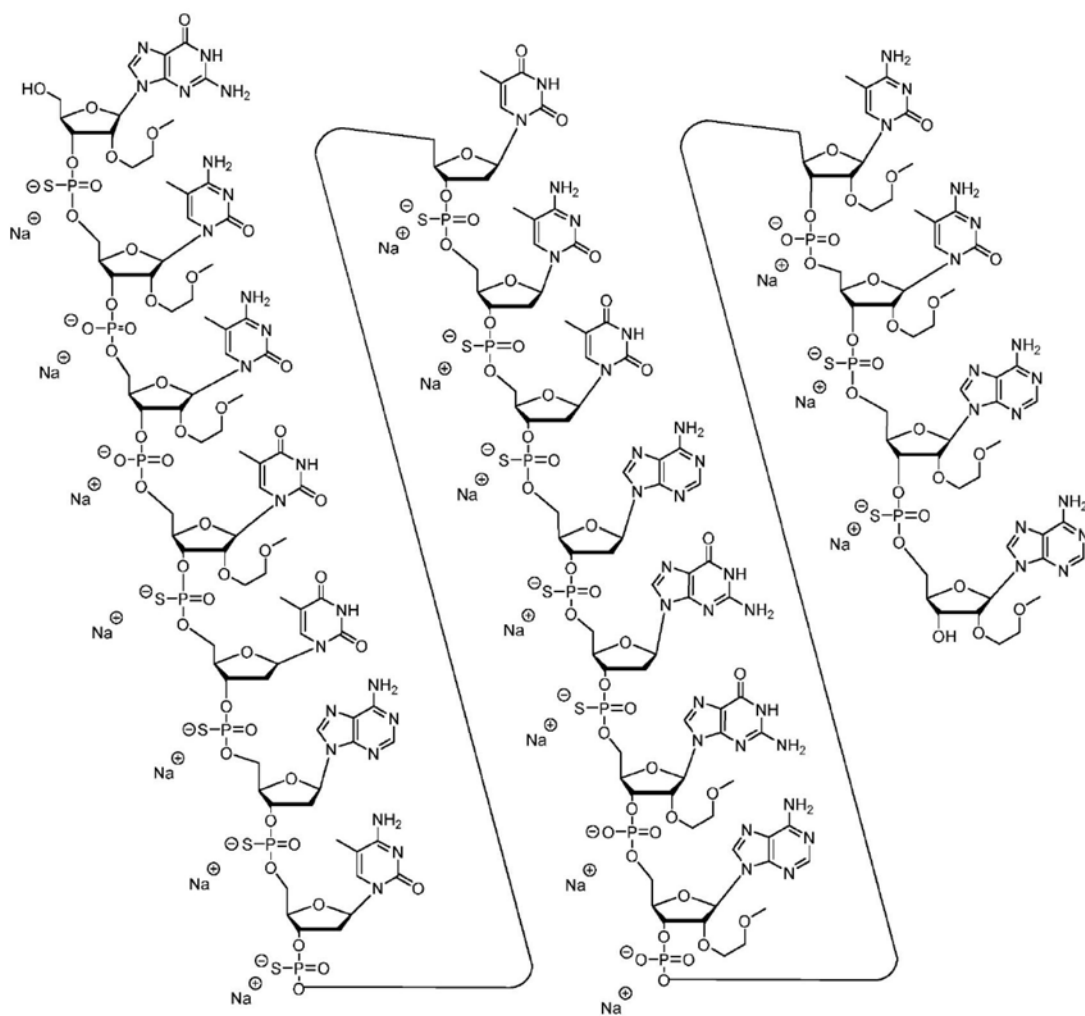
[0186] 实施方案39.一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:

[0187]



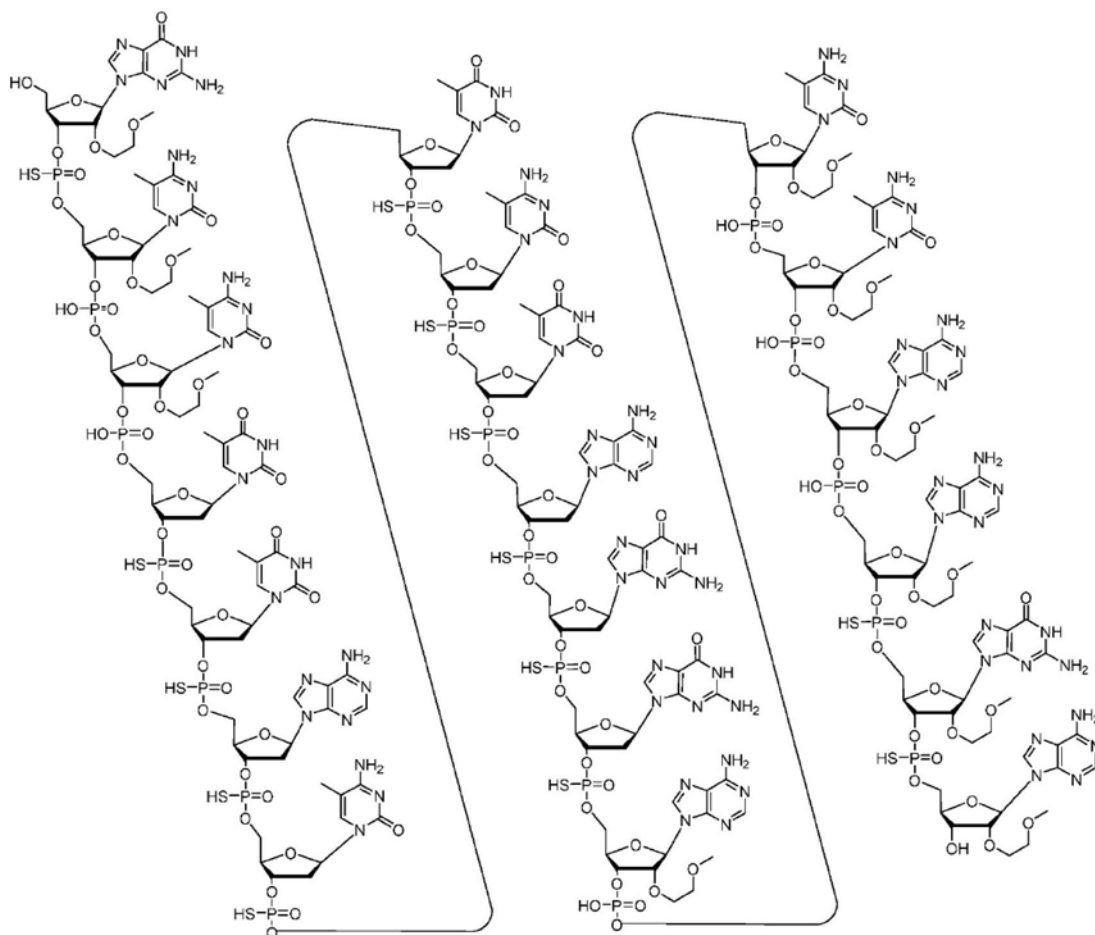
[0188] 实施方案40.一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:

[0189]

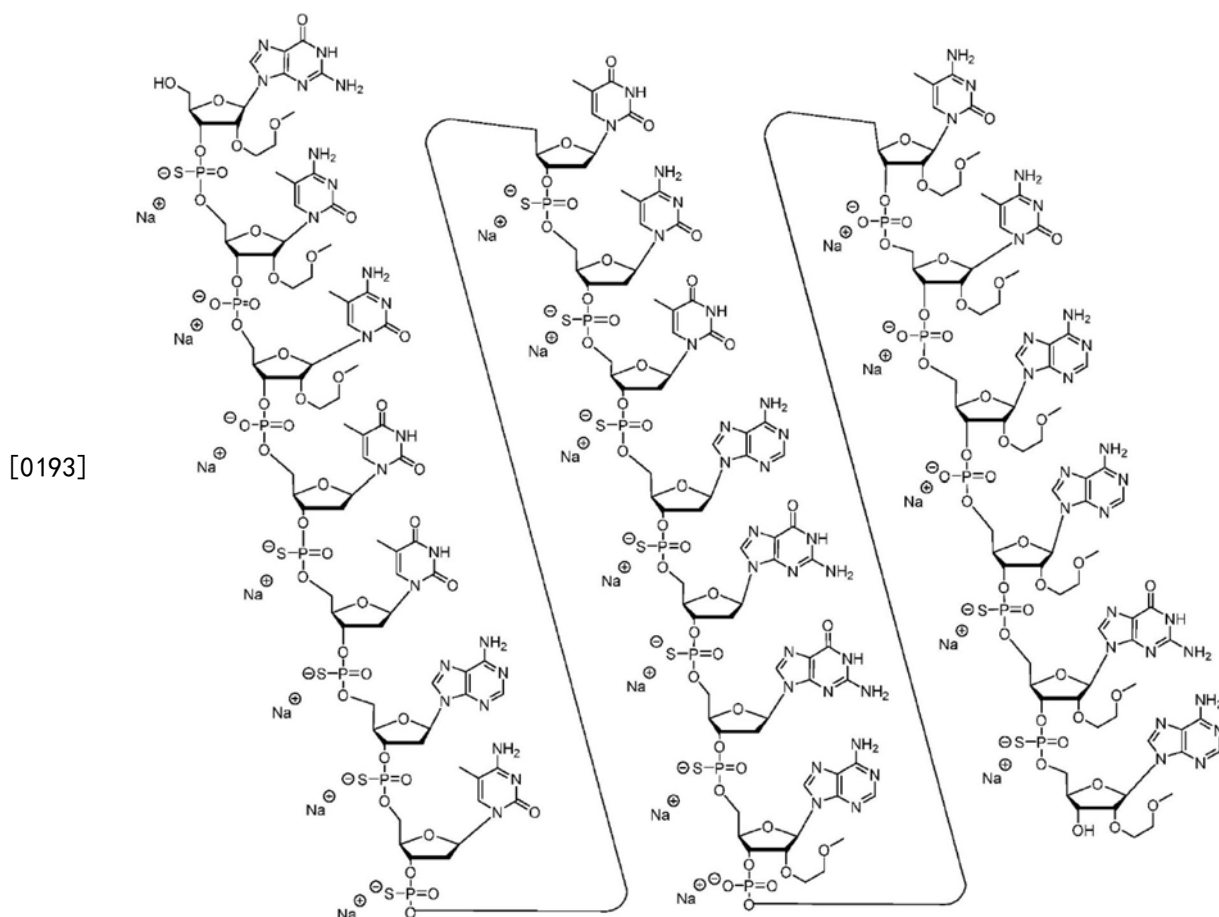


[0190] 实施方案41. 一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物, 或其盐:

[0191]



[0192] 实施方案42. 一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:



[0194] 实施方案43.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够降低哺乳动物中的人C90RF72 mRNA或蛋白质表达。

[0195] 实施方案44.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够改善肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征或橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)的至少一种症状。

[0196] 实施方案45.如实施方案44所述的化合物或组合物,其中所述ALS症状是运动缺陷、焦虑和去神经支配中的任一种。

[0197] 实施方案46.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够延迟疾病进展。

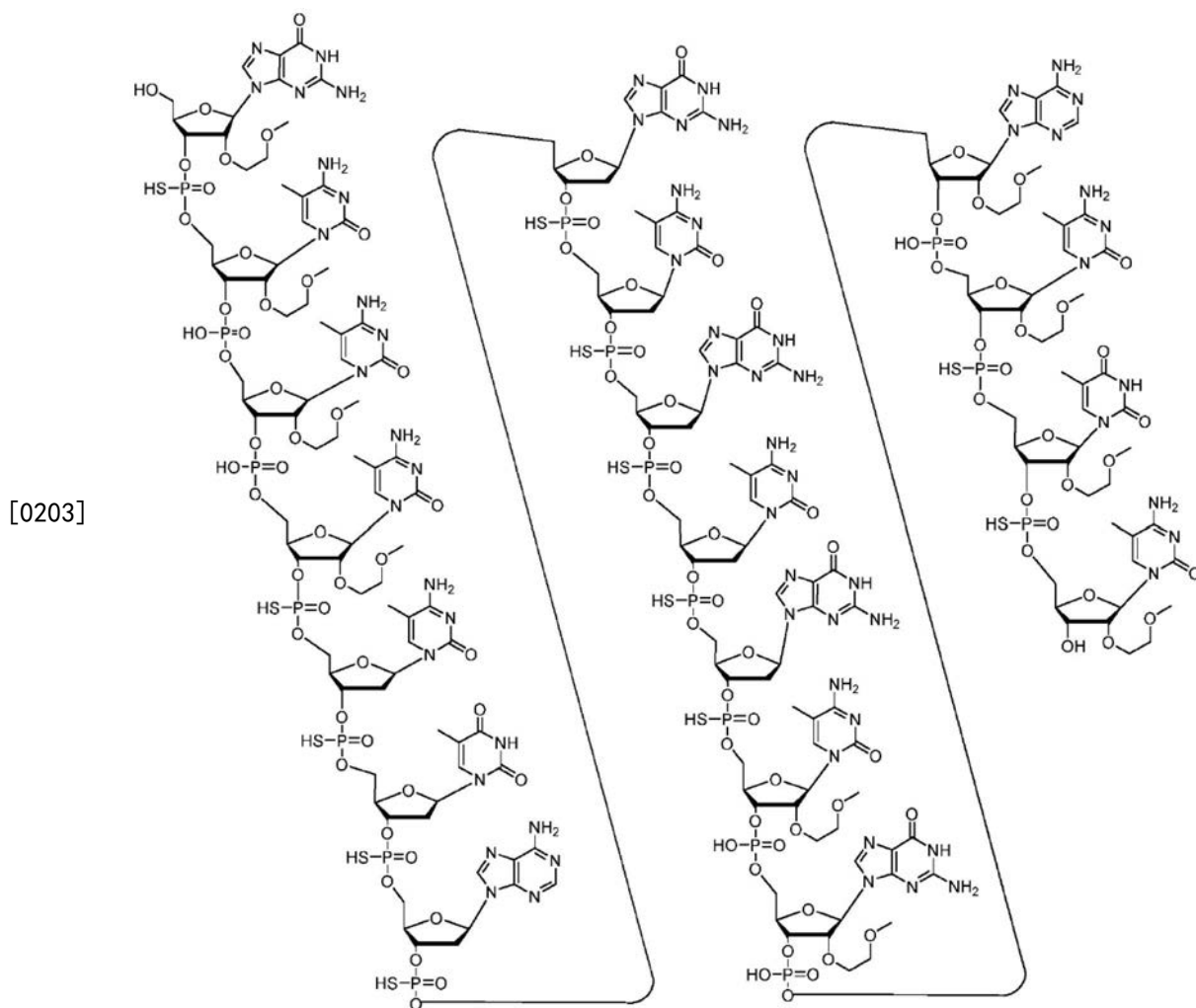
[0198] 实施方案47.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够延长存活。

[0199] 实施方案48.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够减少C90RF72相关的RAN翻译产物。

[0200] 实施方案49.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够选择性地减少C90RF72致病相关mRNA变体。

[0201] 实施方案50.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够减少核灶。

[0202] 实施方案51.一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:



[0204] 实施方案52. 一种方法, 其包括向动物施用如实施方案51所述的化合物。

[0205] 实施方案53. 如实施方案52所述的方法, 其中所述动物是人。

[0206] 实施方案54. 如实施方案53所述的方法, 其中所述施用抑制C9ORF72。

[0207] 实施方案55. 如实施方案53所述的方法, 其中所述施用预防、治疗、改善C9ORF72相关疾病或减缓所述疾病的进展。

[0208] 实施方案56. 如实施方案55所述的方法, 其中所述C9ORF72相关疾病由六核苷酸重复序列扩增引起。

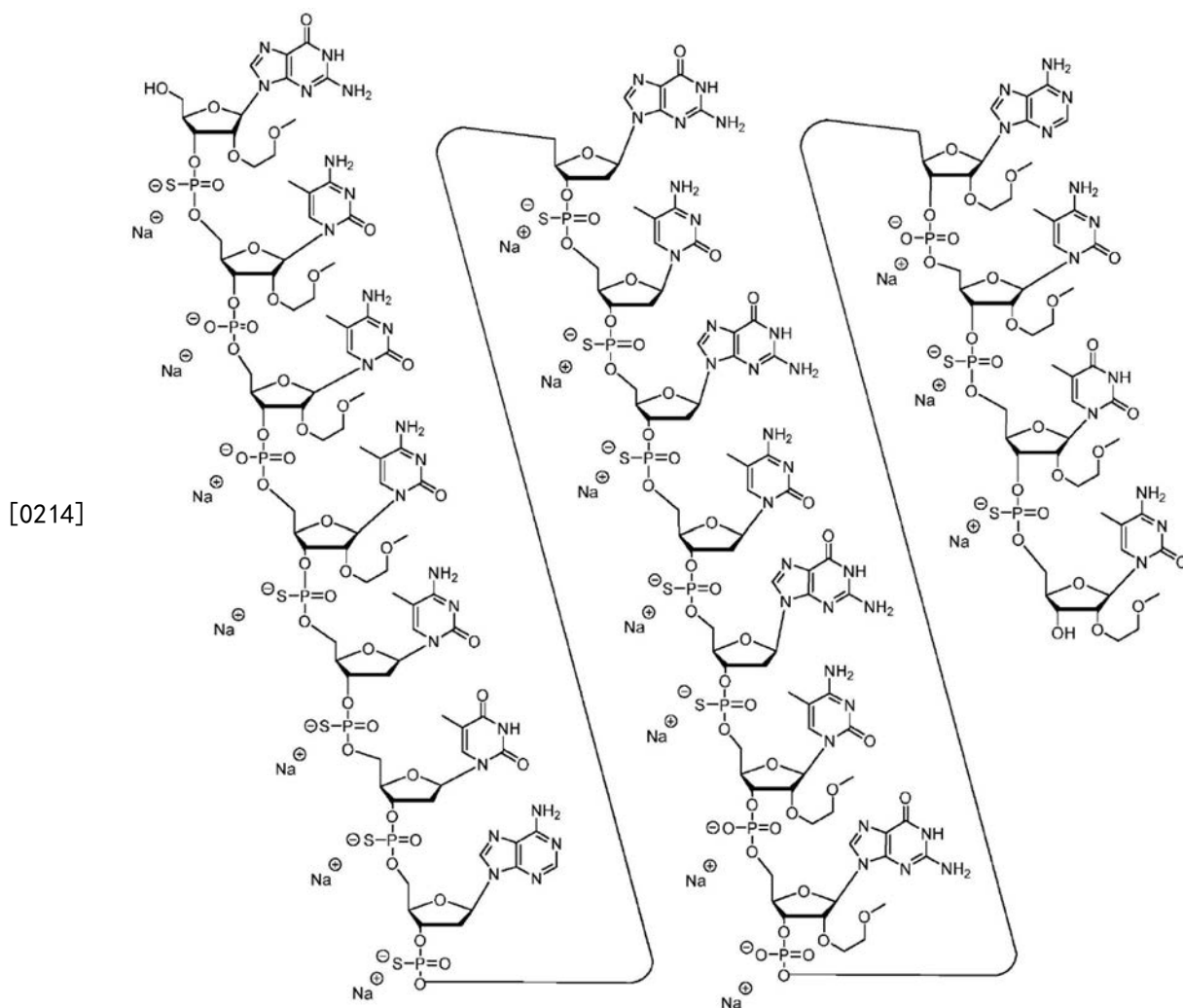
[0209] 实施方案57. 如实施方案55所述的方法, 其中所述C9ORF72相关疾病是肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、额颞叶痴呆 (FTD)、皮质基底变性综合征 (CBD)、非典型帕金森综合征或橄榄体脑桥小脑退化症 (OPCD) 中的任一种。

[0210] 实施方案58. 如实施方案53所述的方法, 其中所述施用减少核灶。

[0211] 实施方案59. 如实施方案53所述的方法, 其中所述施用降低C9ORF72相关的RAN翻译产物的表达。

[0212] 实施方案60. 如实施方案59所述的方法, 其中所述C9ORF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)中的任一种。

[0213] 实施方案61. 一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:



[0215] 实施方案62.一种方法,其包括向动物施用如实施方案60所述的组合物。

[0216] 实施方案63.如实施方案62所述的方法,其中所述动物是人。

[0217] 实施方案64.如实施方案63所述的方法,其中所述施用抑制C90RF72。

[0218] 实施方案65.如实施方案62所述的方法,其中所述施用预防、治疗、改善C90RF72相关疾病或减缓所述疾病的进展。

[0219] 实施方案66.如实施方案65所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病由六核苷酸重复序列扩增引起。

[0220] 实施方案67.如实施方案65所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病是肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征或橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)中的任一种。

[0221] 实施方案68.如实施方案63所述的方法,其中所述施用减少核灶。

[0222] 实施方案69.如实施方案63所述的方法,其中所述施用降低C90RF72相关的RAN翻译产物的表达。

[0223] 实施方案70.如实施方案69所述的方法,其中所述C90RF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)中的任一种。

[0224] 反义化合物

[0225] 低聚化合物包括但不限于寡核苷酸、寡核苷、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物、

反义化合物、反义寡核苷酸和siRNA。低聚化合物可以是靶核酸的“反义序列”，意味着其能够与靶核酸经由氢键合进行杂交。

[0226] 在某些实施方案中，反义化合物具有在按5'至3'方向书写时包含其所靶向的靶核酸的靶区段的反向互补序列的核碱基序列。在某些这类实施方案中，反义寡核苷酸具有在按5'至3'方向书写时包含其所靶向的靶核酸的靶区段的反向互补序列的核碱基序列。

[0227] 在某些实施方案中，靶向C90RF72核酸的反义化合物的长度是12至30个亚单位。换言之，此类反义化合物是12至30个连接的亚单位。在其他实施方案中，反义化合物是8至80个、12至50个、15至30个、18至24个、19至22个或20个连接的亚单位。在某些实施方案中，反义化合物的长度是8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个或80个连接的亚单位，或处于由上述值中的任何两个界定的范围内。在一些实施方案中，反义化合物是反义寡核苷酸，且连接的亚单位是核苷。

[0228] 在某些实施方案中，靶向C90RF72核酸的反义寡核苷酸可以是缩短或截短的。举例来说，单个亚单位可自5'端缺失(5'截短)，或者可替代地自3'端缺失(3'截短)。靶向C90RF72核酸的缩短或截短的反义化合物可具有自反义化合物的5'端缺失的两个亚单位，或者可替代地可具有自反义化合物的3'端缺失的两个亚单位。或者，缺失的核苷可散布于整个反义化合物中，例如在5'端有一个核苷缺失和3'端有一个核苷缺失的反义化合物中。

[0229] 当单个额外亚单位存在于延长的反义化合物中时，所述额外亚单位可位于反义化合物的5'或3'端处。当存在两个或多个额外亚单位时，所添加的亚单位可彼此邻近，例如在反义化合物的5'端上添加有两个亚单位(5'添加)或可替代地3'端上添加有两个亚单位(3'添加)的反义化合物中。或者，所添加的亚单位可散布于整个反义化合物中，例如在5'端上添加有一个亚单位和3'端上添加有一个亚单位的反义化合物中。

[0230] 有可能增加或减少反义化合物(如反义寡核苷酸)的长度和/或引入错配碱基而不消除活性。例如，在Woolf等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7305-7309,1992)中，测试长度为13-25个核碱基的一系列反义寡核苷酸在卵母细胞注射模型中诱导靶RNA裂解的能力。长度为25个核碱基且在接近反义寡核苷酸的末端处具有8或11个错配碱基的反义寡核苷酸能够导引靶mRNA进行特异性裂解，但程度低于不含错配的反义寡核苷酸。同样，靶标特异性裂解可使用具有13个核碱基的反义寡核苷酸(包括具有1或3个错配者)达成。

[0231] Gautschi等人(J.Natl.Cancer Inst.93:463-471,2001年3月)证明与bcl-2mRNA具有100%互补性且与bcl-xL mRNA具有3个错配的寡核苷酸在体外及体内减少bcl-2及bcl-xL两者的表达的能力。此外，这个寡核苷酸展现有效的体内抗肿瘤活性。

[0232] Maher和Dolnick(Nuc.Acid.Res.16:3341-3358,1988)分别测试一系列具有14个核碱基的串联反义寡核苷酸以及包含所述串联反义寡核苷酸中的两个或三个的序列的具有28个及42个核碱基的反义寡核苷酸在家兔网状红血球测定中阻止人DHFR转译的能力。3个具有14个核碱基的反义寡核苷酸各自能够单独抑制转译，但程度相较于具有28个或42个核碱基的反义寡核苷酸而言更适中。

[0233] 反义化合物基序

[0234] 在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的反义化合物具有排列成一定型态或基序的化学上修饰的亚单位,以赋予反义化合物诸如抑制活性增强、对靶核酸的结合亲和力增强或对由体内核酸酶引起的降解具抗性的性质。

[0235] 嵌合反义化合物通常含有至少一个修饰的以赋予增强的核酸酶降解抗性、增加的细胞吸收、增强的对靶核酸的结合亲和力和/或增强的抑制活性的区。嵌合反义化合物的第二区可任选地用作细胞核酸内切酶RNA酶H的底物,所述酶裂解RNA:DNA双螺旋体的RNA链。

[0236] 具有缺口聚物基序的反义化合物被认为是嵌合反义化合物。在缺口聚物中,具有多个支持RNA酶H裂解的核苷酸的内部区位于具有多个在化学上与内部区的核苷不同的核苷酸的外部区之间。在具有缺口聚物基序的反义寡核苷酸的状况下,缺口区段一般用作核酸内切酶裂解的底物,而翼区段包含修饰的核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的区由构成每个相异区的糖部分的类型来区分。用于区分缺口聚物的各区的糖部分的类型在一些实施方案中可包括 β -D-核糖核苷、 β -D-脱氧核糖核苷、2'-修饰的核苷(所述2'-修饰的核苷可尤其包括2'-MOE和2'-O-CH₃),以及双环糖修饰的核苷(所述双环糖修饰的核苷可包括具有4'-(CH₂)_n-O-2'桥(其中n=1或n=2)和4'-CH₂-O-CH₂-2'的那些核苷)。优选地,每一个不同的区域包括均一的糖部分。翼-缺口-翼基序常被描述为“X-Y-Z”,其中“X”表示5'翼区的长度,“Y”表示缺口区的长度,且“Z”表示3'翼区的长度。本文所用的描述为“X-Y-Z”的缺口聚物具有一定构型以使缺口段位于紧邻5'翼段及3'翼段中的每一个。因此,在5'翼段与缺口段之间,或缺口段与3'翼段之间不存在介入的核苷酸。本文所述的任何反义化合物均可具有缺口聚物基序。在某些实施方案中,X与Z相同,在其他实施方案中,它们不同。在某些实施方案中,Y为8至15个核苷。X、Y或Z可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个或超过30个核苷酸中的任一个。因此,本文所述的缺口聚物包括但不限于例如5-10-5、5-10-4、4-10-4、4-10-3、3-10-3、2-10-2、5-9-5、5-9-4、4-9-5、5-8-5、5-8-4、4-8-5、5-7-5、4-7-5、5-7-4或4-7-4。

[0237] 在某些实施方案中,反义化合物具有“翼聚体(wingmer)”基序,其具有翼-缺口或缺口-翼构型,即如上文对于缺口聚物构型所述的X-Y或Y-Z构型。因此,本文所述的翼聚体构型包括但不限于例如5-10、8-4、4-12、12-4、3-14、16-2、18-1、10-3、2-10、1-10、8-2、2-13、5-13、5-8或6-8。

[0238] 在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的反义化合物具有5-10-5缺口聚物基序。

[0239] 在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的反义化合物具有5-8-5缺口聚物基序。

[0240] 在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的反义化合物具有呈以下型态中的任一种的糖修饰:eeekkkdddddckkeee、eekkkdddddckkeee、ekkkddddddekekeee、kekkddddddekeke和ekkkddddddekeee;其中,

[0241] e=2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷

[0242] d=2'-脱氧核苷,以及

[0243] k=cEt核苷。

[0244] 在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的反义化合物具有缺口缩窄的基序。在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的缺口缩窄的反义寡核苷酸具有位于紧邻且介于5、4、3、2或1个化学修饰的核苷的翼区段之间的9、8、7或6个2'-脱氧核苷酸的缺口区段。在某些实施方

案中,化学修饰包含双环糖。在某些实施方案中,双环糖包含选自以下的4'至2'桥:4'-(CH₂)_n-O-2'桥,其中n是1或2;和4'-CH₂-O-CH₂-2'。在某些实施方案中,双环糖包含4'-CH(CH₃)-O-2'桥。在某些实施方案中,化学修饰包含非双环2'-修饰的糖部分。在某些实施方案中,非双环2'-修饰的糖部分包含2'-O-甲基乙基或2'-O-甲基。

[0245] 靶核酸、靶区域和核苷酸序列

[0246] 编码C9ORF72的核苷酸序列包括但不限于以下:GENBANK登录号NM_001256054.1 (作为SEQ ID NO:1并入本文)的补体、从核碱基27535000至27565000截短的GENBANK登录号NT_008413.18 (作为SEQ ID NO:2并入本文)的补体、GENBANK登录号BQ068108.1 (作为SEQ ID NO:3并入本文)、GENBANK登录号NM_018325.3 (作为SEQ ID NO:4并入本文)、GENBANK登录号DN993522.1 (作为SEQ ID NO:5并入本文)、GENBANK登录号NM_145005.5 (作为SEQ ID NO:6并入本文)、GENBANK登录号DB079375.1 (作为SEQ ID NO:7并入本文)、GENBANK登录号BU194591.1 (作为SEQ ID NO:8并入本文)、序列标识符4141_014_A (作为SEQ ID NO:9并入本文)和序列标识符4008_73_A (作为SEQ ID NO:10并入本文)、以及从核苷8522000至8552000截短的GENBANK登录号NW_001101662.1 (作为SEQ ID NO:11并入本文)。

[0247] 应了解,本文中所含的实例中的各SEQ ID NO中所列的序列与糖部分、核苷间键联或核碱基的任何修饰无关。因而,由SEQ ID NO定义的反义化合物可独立地包含糖部分、核苷间键联或核碱基的一个或多个修饰。由Isis编号(Isis No)描述的反义化合物指示核酸碱基序列与基序的组合。

[0248] 在某些实施方案中,靶区域为靶核酸的结构明确的区。例如,靶区域可包含3' UTR、5' UTR、外显子、内含子、外显子/内含子接合部、编码区、翻译起始区、翻译终止区,或其他所定义的核酸区域。关于C9ORF72的结构上定义的区域可通过登录号从序列数据库如NCBI获得并且所述信息以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,靶区域可涵盖从靶区域内一个靶区段的5'靶位点到同一靶区域内另一靶区段的3'靶位点的序列。

[0249] 靶向包括确定至少一个与反义化合物杂交,从而出现所需作用的靶区段。在某些实施方案中,所需作用为mRNA靶核酸水平降低。在某些实施方案中,所需作用为由靶核酸编码的蛋白质水平的降低或与靶核酸有关的表型改变。

[0250] 靶区域可含有一个或多个靶区段。靶区域内的多个靶区段可重叠。或者,它们可不相重叠。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段相隔至多约300个核苷酸。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段相隔靶核酸上一定数目的核苷酸,所述数目为、为约、为至多、为至多约250个、200个、150个、100个、90个、80个、70个、60个、50个、40个、30个、20个或10个核苷酸,或为由前述任何两个值所界定的范围。在某些实施方案中,靶区域内的靶区段相隔靶核酸上的至多或至多约5个核苷酸。在某些实施方案中,靶区段为连续的。涵盖由具有为本文所列的5'靶位点或3'靶位点中的任一个的起始核酸的范围所界定的靶区。

[0251] 适合的靶区段可见于5'UTR、编码区、3'UTR、内含子、外显子或外显子/内含子接合点内。含有起始密码子或终止密码子的靶区段也为适合的靶区段。适合的靶区段可尤其排除某一结构明确的区,诸如起始密码子或终止密码子。

[0252] 确定适合的靶区段可包括将靶核酸的序列与整个基因组中的其他序列相比较。举例来说,可使用BLAST算法来鉴别不同核酸当中具相似性的区域。这个比较可预防选择可能以非特异性方式与除所选靶核酸以外的序列(即非靶或脱靶序列)杂交的反义化合物序列。

[0253] 反义化合物在靶区内的活性(例如如由靶核酸水平的降低百分比所定义)可能不同。在某些实施方案中,C90RF72 mRNA水平的降低指示对C90RF72表达的抑制。C90RF72蛋白质水平的降低还指示靶mRNA表达的抑制。扩增的C90RF72 RNA灶的存在减少指示对C90RF72表达的抑制。此外,表型改变指示对C90RF72表达的抑制。例如,改善的运动功能和呼吸可指示对C90RF72表达的抑制。

[0254] 杂交

[0255] 在一些实施方案中,在本文公开的反义化合物与C90RF72核酸之间进行杂交。杂交的最常见机制涉及核酸分子的互补核碱基之间的氢键键结(例如沃森-克里克、霍氏或反霍氏氢键键结)。

[0256] 杂交可在不同条件下进行。严格条件具序列依赖性且由待杂交的核酸分子的性质和组成决定。

[0257] 确定序列是否可与靶核酸特异性杂交的方法在本领域中是熟知的。在某些实施方案中,本文提供的反义化合物可与C90RF72核酸特异性杂交。

[0258] 互补性

[0259] 当反义化合物中足够数目的核碱基可与靶核酸中的相应核碱基进行氢键合,从而出现所需作用(例如对靶核酸(诸如C90RF72核酸)的反义抑制)时,反义化合物与靶核酸彼此互补。

[0260] 可容忍反义化合物与C90RF72核酸之间的非互补性核碱基,前提是所述反义化合物仍能够与靶核酸特异性杂交。此外,反义化合物可在C90RF72核酸的一个或多个区段上杂交,以使得介入或相邻区段不参与杂交事件(例如环结构、错配或发夹结构)。

[0261] 在某些实施方案中,本文提供的反义化合物或其指定部分与C90RF72核酸、靶区、靶区段或其指定部分为或为至少70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%互补。反义化合物与靶核酸的互补性百分比可使用常规方法测定。

[0262] 举例来说,反义化合物中反义化合物的20个核碱基中有18个核碱基与靶区互补且因此特异性杂交将表示90%互补性。在这个实例中,其余非互补核碱基可与互补核碱基丛集或交替并且不需要彼此相邻或与互补核碱基相邻。因此,长18个核碱基并且具有4(四)个非互补核碱基且所述非互补核碱基侧接有两个与靶核酸完全互补的区的反义化合物将与靶核酸具有77.8%总体互补性且因此将处于本发明的范围内。反义化合物与靶核酸的区域的互补性百分比可常规地使用本领域中已知的BLAST程序(基本局部比对搜寻工具)和PowerBLAST程序来测定(Altschul等人,J.Mol.Biol.,1990,215,403410;Zhang和Madden,Genome Res.,1997,7,649-656)。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(Adv.Appl.Math.,1981,2,482-489)的算法的Gap程序(Wisconsin Sequence Analysis Package,Version 8for Unix,Genetics Computer Group,University Research Park,Madison Wis.)使用默认设置来测定。

[0263] 在某些实施方案中,本文提供的反义化合物或其指定部分与靶核酸或其指定部分完全互补(即,100%互补)。例如,反义化合物可与C90RF72核酸或其靶区域或靶区段或靶序列完全互补。本文所用的“完全互补”是指反义化合物的每个核碱基皆能够与靶核酸的相应核碱基进行准确碱基配对。举例来说,具有20个核碱基的反义化合物与长度为400个核碱基

的靶序列完全互补,只要靶核酸中有具有20个核碱基的相应部分与反义化合物完全互补即可。完全互补还可参考第一和/或第二核酸的指定部分来使用。举例来说,具有30个核碱基的反义化合物中的20个核碱基的部分可与长度为400个核碱基的靶序列“完全互补”。具有30个核碱基的寡核苷酸中的20个核碱基的部分在靶序列具有含20个核碱基且每个核碱基与反义化合物中的所述20个核碱基的部分互补的相应部分的情况下与靶序列完全互补。同时,整个具有30个核碱基的反义化合物与靶序列可能完全互补或可能不是完全互补,这取决于反义化合物的其余10个核碱基是否也与靶序列互补。

[0264] 非互补核碱基的位置可处于反义化合物的5'端或3'端处。或者,一个或多个非互补核碱基可处于反义化合物的内部位置处。当存在两个或多个非互补核碱基时,它们可为连续(即连接的)或不连续的。在一个实施方案中,非互补核碱基位于缺口聚物反义寡核苷酸的翼段中。

[0265] 在某些实施方案中,长度为或为达12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个核碱基的反义化合物相对于靶核酸(诸如C90RF72核酸)或其指定部分包含至多4个、至多3个、至多2个或至多1个非互补核碱基。

[0266] 在某些实施方案中,长度为或为达12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个核碱基的反义化合物相对于靶核酸(诸如C90RF72核酸)或其指定部分包含至多6个、至多5个、至多4个、至多3个、至多2个或至多1个非互补核碱基。

[0267] 本文提供的反义化合物还包括与靶核酸的一部分互补的反义化合物。本文所用的“部分”是指靶核酸的区或段内确定数目的连续(即连接的)核碱基。“部分”还可指反义化合物中确定数目的连续核碱基。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少8个核碱基的部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少9个核碱基的部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少10个核碱基的部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少11个核碱基的部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少12个核碱基的部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少13个核碱基的部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少14个核碱基的部分互补。在某些实施方案中,反义化合物与靶区段中具有至少15个核碱基的部分互补。还涵盖与靶区段中具有至少9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个(或由这些值中的任何两个所界定的范围)核碱基的部分互补的反义化合物。

[0268] 同一性

[0269] 本文提供的反义化合物还可与特定核苷酸序列SEQ ID NO或由特定Isis编号表示的化合物或其部分具有确定的同一性百分比。如本文所用,如果反义化合物具有相同的核碱基配对能力,那么其与本文公开的序列同一。举例来说,在所公开的DNA序列中含有尿嘧啶代替胸苷的RNA将被视作与DNA序列同一,因为尿嘧啶和胸苷皆与腺嘌呤配对。还涵盖本文所述的反义化合物的缩短及延长型式以及相对于本文提供的反义化合物具有不一致碱基的化合物。不一致碱基可彼此相邻或散布于整个反义化合物中。反义化合物的同一性百分比是根据相对于与其比较的序列具有同一碱基配对的碱基的数目来计算的。

[0270] 在某些实施方案中,反义化合物或其部分与本文公开的一种或多种反义化合物或

SEQ ID NO或其部分具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0271] 在某些实施方案中,将反义化合物的一部分与靶核酸的等长部分相比较。在某些实施方案中,将具有8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个核碱基的部分与靶核酸的等长部分相比较。

[0272] 在某些实施方案中,将反义寡核苷酸的一部分与靶核酸的等长部分相比较。在某些实施方案中,将具有8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个核碱基的部分与靶核酸的等长部分相比较。

[0273] 修饰

[0274] 核苷为碱基-糖组合。核苷的核碱基(又称为碱基)部分通常为杂环碱基部分。核苷酸为还包括共价连接至核苷的糖部分的磷酸酯基团的核苷。对于包括呋喃戊糖基糖的那些核苷,磷酸酯基可连接至糖的2'、3'或5'羟基部分。寡核苷酸是经由相邻核苷彼此共价键联形成线性聚合寡核苷酸而形成的。在寡核苷酸结构内,磷酸酯基通常被视作形成寡核苷酸的核苷间键联。

[0275] 反义化合物的修饰涵盖核苷间键联、糖部分或核碱基的取代或改变。修饰的反义化合物常因具有如以下的所需性质而优于原生形式:细胞吸收增强、对核酸靶标的亲和力增强、在核酸酶存在下的稳定性增强或抑制活性增强。

[0276] 化学上修饰的核苷还可用于增强缩短或截短型反义寡核苷酸对其靶核酸的结合亲和力。因此,常可以具有所述化学上修饰的核苷的较短反义化合物获得类似结果。

[0277] 修饰的核苷间键联

[0278] RNA和DNA的天然存在的核苷间键联为3'至5'磷酸二酯键联。相较于具有天然存在的核苷间键联的反义化合物,具有一个或多个修饰的(即非天然存在)的核苷间键联的反义化合物常会因具有所需性质(如细胞吸收增强、对靶核酸的亲和力增强及在核酸酶存在下的稳定性增强)而被优先选择。

[0279] 具有修饰的核苷间键联的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间键联以及不具磷原子的核苷间键联。代表性含磷的核苷间键联包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯及硫代磷酸酯。制备含磷键及不含磷键的方法为熟知的。

[0280] 在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的反义化合物包含一个或多个修饰的核苷间键联。在某些实施方案中,修饰的核苷间键联散布于整个反义化合物中。在某些实施方案中,修饰的核苷间键联为硫代磷酸酯键联。在某些实施方案中,反义化合物的每个核苷间键联为硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的反义化合物包含至少一个磷酸二酯键联和至少一个硫代磷酸酯键联。

[0281] 在某些实施方案中,靶向C90RF72核酸的反义化合物具有呈以下型态中的任一种的核苷间键联:s o o o o s s s s s s s s s s s o o s s、s o o o s s s s s s s s s s s o o s s、s o o s s s s s s s s s s s o o s s和s o s s s s s s s s s s o o o s s;其中,

[0282] s=硫代磷酸酯键联,以及

[0283] o=磷酸二酯键联。

[0284] 修饰的糖部分

[0285] 本发明的反义化合物可任选含有其中糖基已被修饰的一个或多个核苷。所述糖修

饰的核苷可赋予反义化合物以增强的核酸酶稳定性、增强的结合亲和力或某种其他有利生物性质。在某些实施方案中,核苷包含化学上修饰的呋喃核糖环部分。化学上修饰的呋喃核糖环的实例包括但不限于添加取代基(包括5'及2'取代基);非偕位环原子桥连形成双环核酸(BNA);核糖基环氧原子用S、N(R)或C(R₁)(R₂)(R、R₁和R₂各自独立地为H、C₁-C₁₂烷基或保护基)置换;及其组合。化学上修饰的糖的实例包括2'-F-5'-甲基取代的核苷(关于其他所公开的5',2'-双取代的核苷,参见08年8月21日公开的PCT国际申请W02008/101157)或核糖基环氧原子被S置换且2'位上被进一步取代(参见2005年6月16日公开的公开美国专利申请US2005-0130923);或者BNA的5'-取代(参见07年11月22日公开的PCT国际申请W02007/134181,其中LNA被例如5'-甲基或5'-乙烯基取代)。

[0286] 具有修饰的糖部分的核苷的实例包括但不限于包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、2'-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F和2'-O(CH₂)₂OCH₃取代基的核苷。2'位置处的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、巯基、O-烯丙基、O-C₁-C₁₀烷基、OCF₃、OCH₂F、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)和O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n),其中R₁、R_m和R_n各自独立地为H或取代的或未取代的C₁-C₁₀烷基。

[0287] 本文所用的“双环核苷”是指包含双环糖部分的修饰的核苷。双环核酸(BNA)的实例包括但不限于在4'与2'核糖基环原子之间包含桥的核苷。在某些实施方案中,本文提供的反义化合物包含一个或多个BNA核苷,其中桥包含下式中的一个:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(以及其类似物,参见2008年7月15日颁发的美国专利7,399,845);4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'(以及其类似物,参见2009年1月8日公布的以W0 2009/006478公布的PCT/US2008/068922);4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(以及其类似物,参见2008年12月11日公布的以W0/2008/150729公布的PCT/US2008/064591);4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(参见2004年9月2日公布的已公布的美国专利申请US2004-0171570);4'-CH₂-N(R)-O-2',其中R为H、C₁-C₁₂烷基或保护基(参见2008年9月23日颁发的美国专利7,427,672);4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(参见Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem.,2009,74,118-134);以及4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(以及其类似物,参见2008年12月8日公布的以W0 2008/154401公布的PCT/US2008/066154)。

[0288] 其他双环核苷已经在公开的文献中进行了报道(参见例如:Srivastava等人,J.Am.Chem.Soc.,2007,129(26)8362-8379;Frieden等人,Nucleic Acids Research,2003,21,6365-6372;Elayadi等人,Curr.Opinion Invens.Drugs,2001,2,558-561;Braasch等人,Chem.Biol.,2001,8,1-7;Orum等人,Curr.Opinion Mol.Ther.,2001,3,239-243;Wahlestedt等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,2000,97,5633-5638;Singh等人,Chem.Comm.,1998,4,455-456;Koshkin等人,Tetrahedron,1998,54,3607-3630;Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222;Singh等人,J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039;美国专利号:7,399,845;7,053,207;7,034,133;6,794,499;6,770,748;6,670,461;6,525,191;6,268,490;美国专利公布号:US2008-0039618;US2007-0287831;US2004-0171570;美国专利申请序列号:12/129,154;61/099,844;61/097,787;61/086,231;61/056,564;61/026,998;61/026,995;60/989,574;国际申请W0 2007/134181;W0 2005/021570;W0 2004/106356;以及PCT国际申请号:PCT/US2008/068922;PCT/US2008/066154;和PCT/US2008/064591)。上述各双环核苷可被制备而具有一种或多种立体化学糖

构型,包括例如 α -L-呋喃核糖及 β -D-呋喃核糖(参见1999年3月25日公开为W099/14226的PCT国际申请PCT/DK98/00393)。

[0289] 如本文所用,“单环核苷”是指包含不为双环糖部分的修饰的糖部分的核苷。在某些实施方案中,核苷的糖部分或糖部分类似物可在任何位置上被修饰或取代。

[0290] 本文所用的“4'-2'双环核苷”或“4'至2'双环核苷”是指包含连接2'碳原子与4'碳原子的桥基的呋喃糖环的双环核苷。

[0291] 在某些实施方案中,BNA核苷的双环糖部分包括但不限于在呋喃戊糖基糖部分的4'与2'碳原子之间具有至少一个桥的化合物,所述桥包括但不限于包含1个或1至4个独立地选自以下的连接基团的桥: $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-C(R_a)=C(R_b)-$ 、 $-C(R_a)=N-$ 、 $-C(=NR_a)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R_a)_2-$ 、 $-S(=O)_x-$ 以及 $-N(R_a)-$;其中: x 是0、1或2; n 是1、2、3或4;每个 R_a 和 R_b 独立地为H、保护基团、羟基、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_5 - C_{20} 芳基、取代的 C_5 - C_{20} 芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、 C_5 - C_7 脂环基、取代的 C_5 - C_7 脂环基、卤素、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、酰基($C(=O)-H$)、取代的酰基、CN、磺酰基($S(=O)_2-J_1$)或亚磺酰基($S(=O)-J_1$);以及

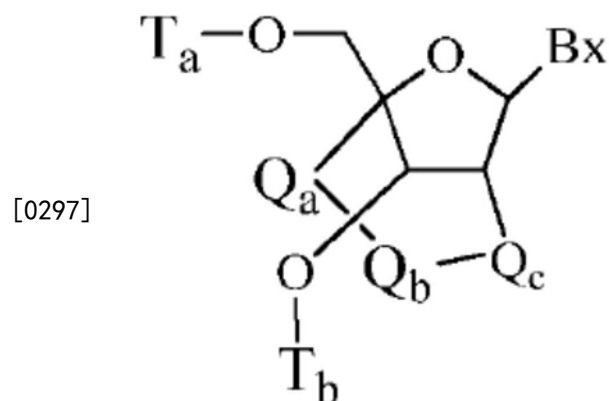
[0292] 各 J_1 和 J_2 独立地为H、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_5 - C_{20} 芳基、取代的 C_5 - C_{20} 芳基、酰基($C(=O)-H$)、取代的酰基、杂环基、取代的杂环基、 C_1 - C_{12} 氨基烷基、取代的 C_1 - C_{12} 氨基烷基或保护基团。

[0293] 在某些实施方案中,双环糖部分的桥是 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ 或 $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ 。在某些实施方案中,桥为4'- CH_2 -2'、4'-(CH_2)₂-2'、4'-(CH_2)₃-2'、4'- CH_2 -O-2'、4'-(CH_2)₂-O-2'、4'- CH_2 -O-N(R)-2'和4'- CH_2 -N(R)-O-2'-,其中每个R独立地为H、保护基团或 C_1 - C_{12} 烷基。

[0294] 在某些实施方案中,双环核苷进一步由异构构型定义。例如,包含4'-(CH_2)-O-2'桥的核苷可呈 α -L构型或呈 β -D构型。 α -L-亚甲基氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA先前已并入展示反义活性的反义寡核苷酸中(Frieden等人,Nucleic Acids Research,2003,21,6365-6372)。

[0295] 在某些实施方案中,双环核苷包括具有4'至2'桥的那些,其中此类桥包括但不限于 α -L-4'-(CH_2)-O-2'、 β -D-4'- CH_2 -O-2'、4'-(CH_2)₂-O-2'、4'- CH_2 -O-N(R)-2'、4'- CH_2 -N(R)-O-2'、4'-CH(CH_3)-O-2'、4'- CH_2 -S-2'、4'- CH_2 -N(R)-2'、4'- CH_2 -CH(CH_3)-2'以及4'-(CH_2)₃-2',其中R为H、保护基团或 C_1 - C_{12} 烷基。

[0296] 在某些实施方案中,双环核苷具有式:



[0298] 其中：

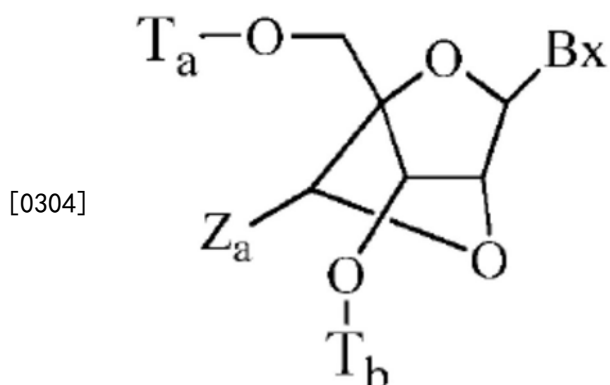
[0299] B_x为杂环碱基部分；

[0300] -Q_a-Q_b-Q_c-为-CH₂-N(R_c)-CH₂-、-C(=O)-N(R_c)-CH₂-、-CH₂-O-N(R_c)-、-CH₂-N(R_c)-O-或-N(R_c)-O-CH₂；

[0301] R_c为C₁-C₁₂烷基或氨基保护基团；以及

[0302] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接。

[0303] 在某些实施方案中，双环核苷具有式：



[0305] 其中：

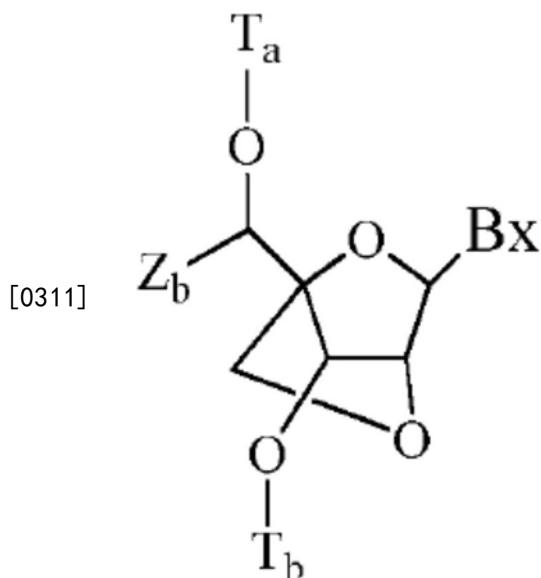
[0306] B_x为杂环碱基部分；

[0307] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0308] Z_a为C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、取代的C₁-C₆烷基、取代的C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆炔基、酰基、取代的酰基、取代的酰胺、巯基或取代的巯基。

[0309] 在一个实施方案中，每个取代的基团独立地被独立地选自以下的取代基单取代或多取代：卤素、氧代、羟基、OJ_c、NJ_cJ_d、SJ_c、N₃、OC(=X)J_c、以及NJ_eC(=X)NJ_cJ_d，其中每个J_c、J_d和J_e独立地为H、C₁-C₆烷基或取代的C₁-C₆烷基且X为O或NJ_c。

[0310] 在某些实施方案中，双环核苷具有式：



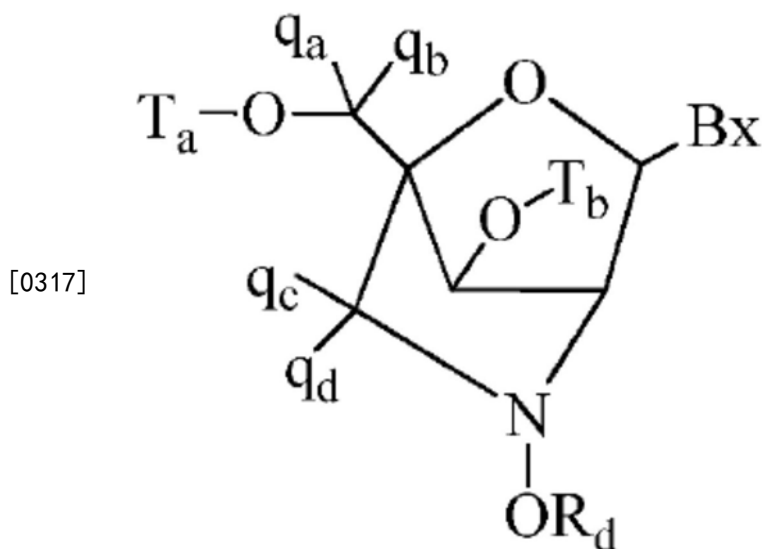
[0312] 其中：

[0313] B_x为杂环碱基部分；

[0314] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0315] Z_b为C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、取代的C₁-C₆烷基、取代的C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆炔基或取代的酰基(C(=O)-)。

[0316] 在某些实施方案中，双环核苷具有式：



[0318] 其中：

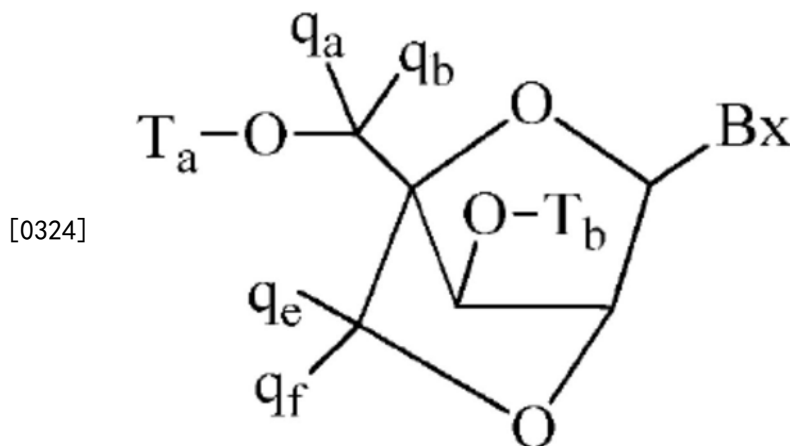
[0319] B_x为杂环碱基部分；

[0320] T_a和T_b各自独立地为H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0321] R_d为C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

[0322] 各q_a、q_b、q_c和q_d独立地为H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、酰基、取代的酰基、C₁-C₆氨基烷基或取代的C₁-C₆氨基烷基；

[0323] 在某些实施方案中，双环核苷具有式：



[0325] 其中：

[0326] Bx为杂环碱基部分；

[0327] T_a 和 T_b 各自独立地为H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

[0328] q_a 、 q_b 、 q_e 和 q_f 各自独立地为氢、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、取代的 C_1 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ ；

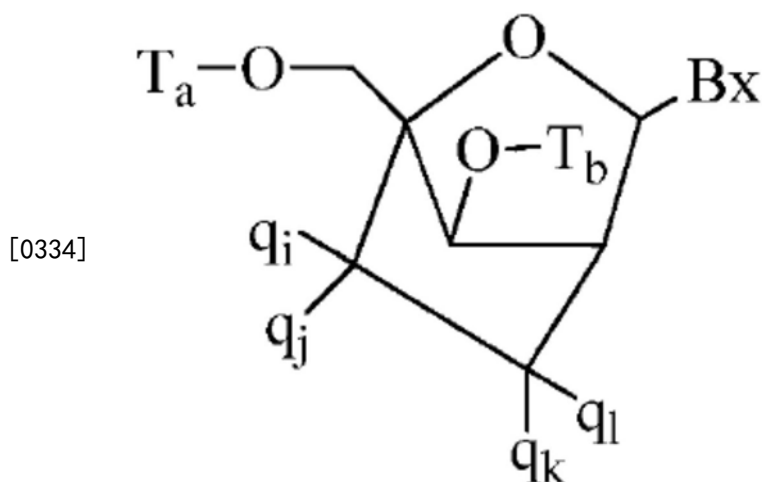
[0329] 或 q_e 和 q_f 一起为 $=C(q_g)(q_h)$ ；

[0330] q_g 和 q_h 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基或取代的 C_1 - C_{12} 烷基；

[0331] 已描述了具有4'- CH_2 -0-2'桥的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶双环核苷的合成和制备连同其低聚化以及核酸识别性质(Koshkin等人, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630)。双环核苷的合成还已描述于W0 98/39352和W0 99/14226中。

[0332] 还已制备具有4'至2'桥连基团诸如4'- CH_2 -0-2'和4'- CH_2 -S-2'的各种双环核苷的类似物(Kumar等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222)。包含双环核苷作为核酸聚合酶的底物的寡脱氧核糖核苷酸双螺旋体的制备也已有所描述(Wengel等人, W0 99/14226)。此外, 2'-氨基-BNA(一种新颖的构形受限的高亲和力寡核苷酸类似物)的合成在本领域中已有所描述(Singh等人, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。另外, 2'-氨基-BNA和2'-甲基氨基-BNA已被制备且它们与互补的RNA及DNA链的双螺旋体的热稳定性先前已有所报道。

[0333] 在某些实施方案中, 双环核苷具有式：



[0335] 其中：

[0336] Bx为杂环碱基部分；

[0337] T_a 和 T_b 各自独立地为H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基、磷部分或与支撑介质的共价连接；

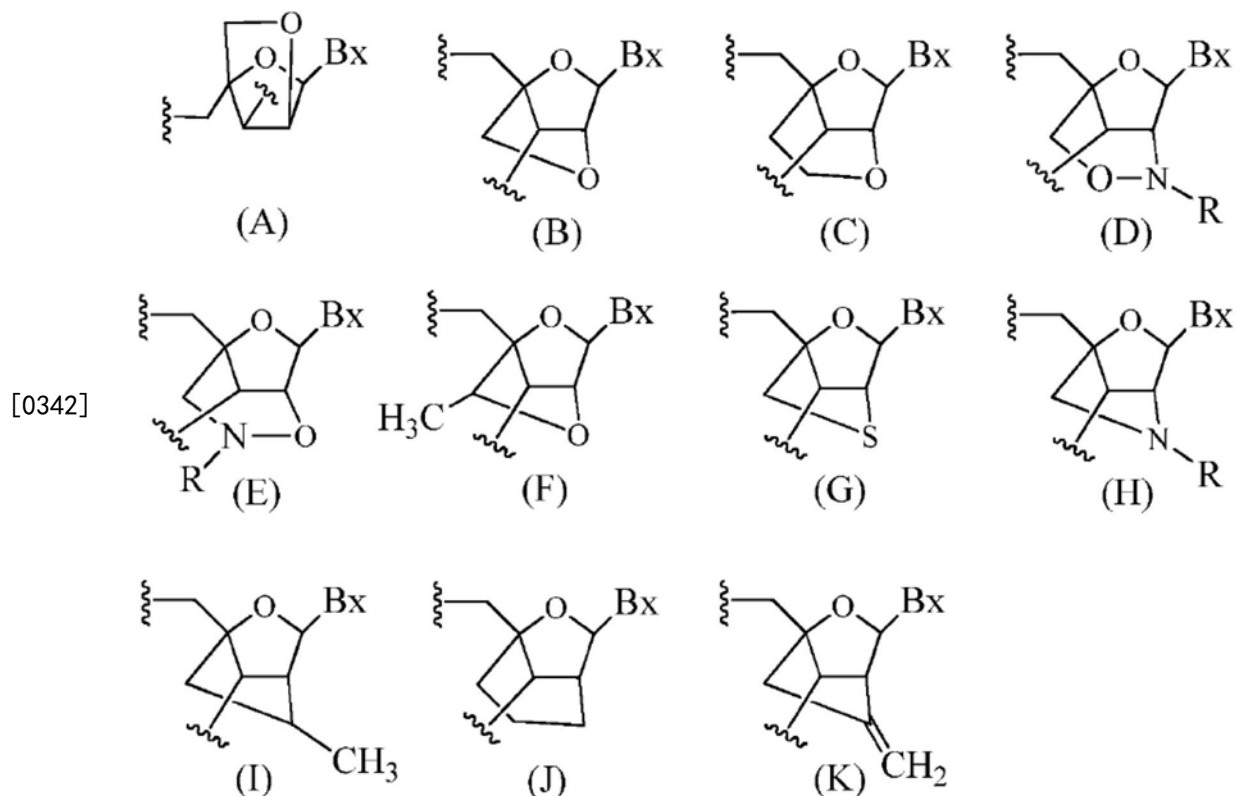
[0338] 各 q_i 、 q_j 、 q_k 和 q_l 独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、取代的 C_1 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ ；

$\text{NJ}_j\text{J}_k\text{-N(H)C(=O)NJ}_j\text{J}_k$ 或 $\text{N(H)C(=S)NJ}_j\text{J}_k$; 以及

[0339] q_i 和 q_j 或 q_i 和 q_k 一起为 $\text{=C}(q_g)(q_h)$, 其中 q_g 和 q_h 各自独立地为 H、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基或取代的 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基。

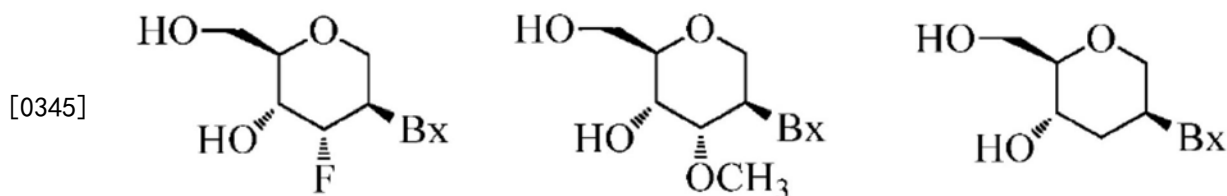
[0340] 一种具有 $4'-(\text{CH}_2)_3-2'$ 桥和烯基类似物桥 $4'-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-2'$ 的碳环双环核苷已有所描述 (Frier 等人, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (22), 4429-4443 和 Albaek 等人, *J.Org.Chem.*, 2006, 71, 7731-7740)。碳环双环核苷的合成和制备连同其低聚化和生物化学研究也已有所描述 (Srivastava 等人, *J.Am.Chem.Soc.* 2007, 129 (26), 8362-8379)。

[0341] 在某些实施例中, 双环核苷包括但不限于如下所描绘的 (A) $\alpha\text{-L-亚甲基氧基}(4'-\text{CH}_2\text{-O-}2')$ BNA; (B) $\beta\text{-D-亚甲基氧基}(4'-\text{CH}_2\text{-O-}2')$ BNA; (C) 亚乙基氧基 ($4'-(\text{CH}_2)_2\text{-O-}2'$) BNA; (D) 氨基氧基 ($4'-\text{CH}_2\text{-O-N(R)-}2'$) BNA; (E) 氧基氨基 ($4'-\text{CH}_2\text{-N(R)-O-}2'$) BNA; (F) 甲基 (亚甲基氧基) ($4'-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O-}2'$) BNA (又称为约束的乙基或 cEt); (G) 亚甲基硫代 ($4'-\text{CH}_2\text{-S-}2'$) BNA; (H) 亚甲基-氨基 ($4'-\text{CH}_2\text{-N(R)-}2'$) BNA; (I) 甲基碳环 ($4'-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}2'$) BNA; (J) 亚丙基碳环 ($4'-(\text{CH}_2)_3\text{-}2'$) BNA 以及 (K) 乙烯基 BNA。

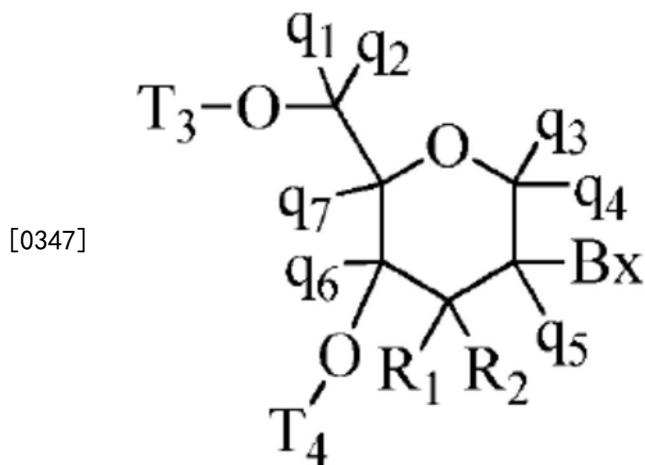


[0343] 其中 Bx 为碱基部分且 R 独立地为 H、保护基团、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基。

[0344] 如本文所用, “修饰的四氢吡喃核苷”或“修饰的 THP 核苷”是指具有取代普通核苷中的呋喃戊糖基残基的 6 元四氢吡喃“糖”的核苷并且也可以称为糖替代物。修饰的 THP 核苷包括但不限于在本领域中称为己糖醇核酸 (HNA)、anitol 核酸 (ANA)、甘露醇核酸 (MNA) (参见 Leumann, *Bioorg.Med.Chem.*, 2002, 10, 841-854) 或具有如下所示的四氢吡喃环系统的氟 HNA (F-HNA)。



[0346] 在某些实施方案中,选择具有下式的糖替代物:



[0348] 其中:

[0349] Bx为杂环碱基部分;

[0350] T_3 和 T_4 各自独立地为将四氢吡喃核苷类似物连接至低聚化合物的核苷间连接基团,或者 T_3 和 T_4 中的一个为将四氢吡喃核苷类似物连接至低聚化合物或寡核苷酸的核苷间连接基团,且 T_3 和 T_4 中的另一个为H、羟基保护基团、连接的缀合物基团或5'或3'-端基;

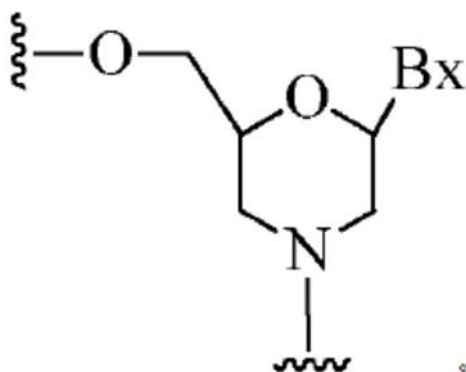
[0351] q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 各自独立地为H、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或取代的 C_2 - C_6 炔基;以及

[0352] R_1 和 R_2 中的一个为氢且另一个选自卤素、取代或未取代的烷氧基、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $OC(=X)J_1$ 、 $OC(=X)NJ_1J_2$ 、 $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ 和CN,其中X为O、S或 NJ_1 ,且 J_1 、 J_2 和 J_3 各自独立地为H或 C_1 - C_6 烷基。

[0353] 在某些实施方案中, q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 各自独立地为H。在某些实施方案中, q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 中至少一个不为H。在某些实施方案中, q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 和 q_7 中至少一个为甲基。在某些实施方案中,提供THP核苷,其中 R_1 和 R_2 中的一个为F。在某些实施方案中, R_1 为氟且 R_2 为H; R_1 为甲氧基并且 R_2 为H,以及 R_1 为甲氧基乙氧基并且 R_2 为H。

[0354] 在某些实施方案中,糖替代物包含具有多于5个原子和多于一个杂原子的环。例如包含吗啉代糖部分的核苷以及它们在低聚化合物中的用途已有所报道(参见例如: Braasch等人, Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510; 和美国专利5,698,685; 5,166,315; 5,185,444以及5,034,506)。如在此所使用,术语“吗啉代”是指具有以下式的糖替代物:

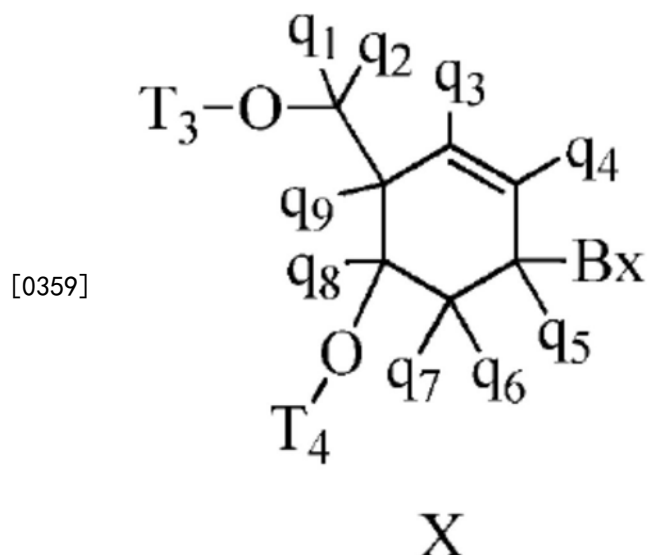
[0355]



[0356] 在某些实施方案中,可例如通过添加或改变来自以上吗啉代结构的各种取代基来修饰吗啉代。所述糖替代物在本文中称为“修饰的吗啉代”。

[0357] 还提供了修饰的组合,不限于如2'-F-5'-甲基取代的核苷(对于其他公开的5', 2'-双取代核苷,参见8/21/08公布的PCT国际申请W02008/101157)和用S替代核糖基环氧原子以及在2'-位上的进一步取代(参见2005年6月16日公布的已公布的美国专利申请US2005-0130923)或替代地双环核酸的5'-取代(参见11/22/07公布的PCT国际申请W0 2007/134181,其中4'-CH₂-O-2'双环核苷在5'位上被5'-甲基或5'-乙烯基进一步取代)。碳环双环核苷的合成和制备连同其低聚和生物化学研究也已有所描述(参见,例如, Srivastava等人, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (26), 8362-8379)。

[0358] 在某些实施方案中,反义化合物包含一个或多个修饰的环己烯基核苷,其为用六元环己烯基替代天然存在的核苷中的呋喃戊糖基残基的核苷。修饰的环己烯基核苷包括但不限于本领域中描述的那些(参见例如共同拥有的已公布的2010年4月10日公布的PCT申请W02010/036696; Robeyns等人, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (6), 1979-1984; Horváth等人, Tetrahedron Letters, 2007, 48, 3621-3623; Nauwelaerts等人, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (30), 9340-9348; Gu等人, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2005, 24 (5-7), 993-998; Nauwelaerts等人, Nucleic Acids Research, 2005, 33 (8), 2452-2463; Robeyns等人, Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2005, F61 (6), 585-586; Gu等人, Tetrahedron, 2004, 60 (9), 2111-2123; Gu等人, Oligonucleotides, 2003, 13 (6), 479-489; Wang等人, J. Org. Chem., 2003, 68, 4499-4505; Verbeure等人, Nucleic Acids Research, 2001, 29 (24), 4941-4947; Wang等人, J. Org. Chem., 2001, 66, 8478-82; Wang等人, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001, 20 (4-7), 785-788; Wang等人, J. Am. Chem., 2000, 122, 8595-8602; 已公布的PCT申请W0 06/047842; 以及已公布的PCT申请W0 01/049687; 其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。某些修饰的环己烯基核苷具有式X。



[0360] 其中独立地对于所述至少一种式X的环己烯基核苷类似物中的每一个：

[0361] Bx为杂环碱基部分；

[0362] T₃和T₄各自独立地为将环己烯基核苷类似物连接至反义化合物的核苷间连接基团，或者T₃和T₄中的一个为将四氢吡喃核苷类似物连接至反义化合物的核苷间连接基团且T₃和T₄中的另一个为H、羟基保护基、连接的缀合物基团或5'或3'-端基；以及

[0363] q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、q₇、q₈以及q₉各自独立地为H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、取代的C₂-C₆炔基或其他糖取代基团。

[0364] 许多其他单环、双环和三环的环系统为本领域中已知的并且适合作为可用来修饰用于并入本文所提供的低聚化合物中的核苷的糖替代物(参见，例如，综述文章：Leumann, Christian J. Bioorg. & Med. Chem., 2002, 10, 841-854)。可对所述环系统进行各种其他的取代以进一步增强活性。

[0365] 如本文所用，“2'-修饰的糖”是指在2'位上修饰的呋喃糖基糖。在某些实施方案中，所述修饰包括选自以下的取代基：包括但不限于卤基、取代和未取代的烷氧基、取代和未取代的硫烷基、取代和未取代的氨基烷基、取代和未取代的烷基、取代和未取代的烯丙基以及取代和未取代的炔基。在某些实施方案中，2'修饰选自包括但不限于以下的取代基：O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nF、O(CH₂)_nNH₂、OCH₂C(=O)N(H)CH₃、以及O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂，其中n和m为1至约10。其他2'取代基还可选自：C₁-C₁₂烷基、取代的烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、F、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷氨基、聚烷氨基、取代的硅烷基、RNA裂解基团、报告基团、嵌入剂、改进药物动力学性质的基团、或改进反义化合物的药效学性质的基团，以及其他具有类似性质的取代基。在某些实施方案中，修饰的核苷包含2'-MOE侧链(Baker等人, J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000)。所述2'-MOE取代已被描述为相较于未修饰的核苷及其他修饰的核苷(如2'-O-甲基、O-丙基及O-氨基丙基)具有改善的结合亲和力。具有2'-MOE取代基的寡核苷酸还已展示为基因表达的反义抑制剂且具有有希望用于体内使用的特征(Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann等人, Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann等人, Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; 以及 Altmann等人, Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926)。

[0366] 本文所用的“2’-修饰的核苷”或“2’-取代的核苷”是指包含在2’位上包含除H或OH以外的取代基的糖的核苷。2’-修饰的核苷包括但不限于其中连接糖环的两个碳原子的桥连接糖环的2’碳与另一个碳的双环核苷以及具有如以下的非桥连2’取代基的核苷：烯丙基、氨基、叠氮基、硫基、0-烯丙基、0-C₁-C₁₀烷基、-OCF₃、0-(CH₂)₂-O-CH₃、2’-O(CH₂)₂SCH₃、0-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)或0-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n),其中R_m和R_n各自独立地为H或取代或未取代的C₁-C₁₀烷基。2’-修饰的核苷可进一步例如在糖的其他位置上和/或在核碱基上包含其他修饰。

[0367] 本文所用的“2’-F”是指包括在糖环的2’位上包含氟基的糖的核苷。

[0368] 本文所用的“2’-OMe”或“2’-OCH₃”、“2’-O-甲基”或“2’-甲氧基”各自是指包含在糖环的2’位上包含-OCH₃基团的糖的核苷。

[0369] 本文所用的“MOE”或“2’-MOE”或“2’-OCH₂CH₂OCH₃”或“2’-O-甲氧基乙基”各自是指包含在糖环的2’位上包含-OCH₂CH₂OCH₃基团的糖的核苷。

[0370] 用于制备修饰的糖的方法为本领域技术人员所熟知。教导此类修饰的糖的制备的一些代表性美国专利包括但不限于U.S.: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;5,670,633;5,700,920;5,792,847和6,600,032,以及2005年6月2日提交且2005年12月22日公布为W0 2005/121371的国际申请PCT/US2005/019219,并且其各自以引用的方式整体并入本文。

[0371] 本文所用的“寡核苷酸”是指包含多个连接的核苷的化合物。在某些实施方案中,多个核苷中的一或多个是修饰的。在某些实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个核糖核苷(RNA)和/或脱氧核糖核苷(DNA)。

[0372] 在具有修饰的糖部分的核苷酸中,核碱基部分(天然、修饰的或其组合)被维持以便与适当核酸靶标杂交。

[0373] 在某些实施方案中,反义化合物包含一个或多个具有修饰的糖部分的核苷酸。在某些实施方案中,修饰的糖部分为2’-MOE。在某些实施方案中,2’-MOE修饰的核苷酸排列于缺口聚物基序中。在某些实施方案中,修饰的糖部分是具有(4’-CH(CH₃)-O-2’)桥接基团的双环核苷。在某些实施方案中,(4’-CH(CH₃)-O-2’)修饰的核苷布置在整个缺口聚物基序的翼中。

[0374] 用于配制药物流组合物的组合物和方法

[0375] 反义化合物可与药学上可接受的活性或惰性物质混合以制备药物组合物或制剂。组合物和用于配制药物流组合物的方法取决于许多标准,包括但不限于施用途径、疾病程度或所施用的剂量。

[0376] 靶向C90RF72核酸的反义化合物可通过将反义化合物与适合的药学上可接受的稀释剂或载体组合而用于药物组合物中。药学上可接受的稀释剂包括磷酸盐缓冲的生理盐水(PBS)。PBS是适用于以胃肠外方式递送的组合物中的稀释剂。因此,在一个实施方案中,在本文所述的方法中使用包含靶向C90RF72核酸的反义化合物及药学上可接受的稀释剂的药物组合物。在某些实施方案中,药学上可接受的稀释剂为PBS。在某些实施方案中,反义化合物为反义寡核苷酸。

[0377] 包含反义化合物的药物组合物涵盖在动物(包括人)施用时能够提供(直接或间

接) 其生物活性代谢物或残余物的任何药学上可接受的盐、酯或所述酯的盐, 或任何其他寡核苷酸。因此, 例如, 本公开还涉及反义化合物的药学上可接受的盐、前药、所述前药的药学上可接受的盐以及其他生物等效物。合适的药学上可接受的盐包括但不限于钠盐和钾盐。

[0378] 前药可包括在反义化合物的一端或两端上并入可由体内内源性核酸酶裂解而形成活性反义化合物的额外核苷。

[0379] 缀合的反义化合物

[0380] 反义化合物可共价连接至一个或多个增强所得反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞吸收的部分或缀合物。典型缀合物基团包括胆固醇部分和脂质部分。额外的缀合物基团包括碳水化合物、磷脂、生物素、啡啉、叶酸盐、啡啉、葱醌、吡啶、荧光素、若丹明、香豆素和染料。

[0381] 反义化合物还可被修饰以具有一个或多个稳定化基团, 所述一个或多个稳定化基团一般连接至反义化合物的一端或两端以增强如核酸酶稳定性的性质。在稳定化基团中包括帽结构。这些末端修饰保护具有末端核酸的反义化合物免遭核酸外切酶降解, 且可有助于递送和/或定位于细胞内。帽可存在于5'端(5'帽)或3'端(3'帽)上, 或可存在于这两端上。帽结构在本领域中为熟知的且包括例如反向脱氧无碱基帽。其他可用于对反义化合物的一端或两端进行封端以赋予核酸酶稳定性的3'及5'-稳定化基团包括2003年1月16日公开的WO 03/004602中所公开的那些基团。

[0382] 细胞培养和反义化合物处理

[0383] 可在多种细胞类型中体外测试反义化合物对C90RF72核酸的水平、活性或表达的作用。用于所述分析的细胞类型可获自商业供货商(例如American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) 且根据供货商的说明书使用商购的试剂(例如Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 培养细胞。说明性细胞类型包括但不限于HepG2细胞、Hep3B细胞及初级肝细胞。

[0384] 体外测试反义寡核苷酸

[0385] 本文描述用反义寡核苷酸处理细胞的方法, 所述方法可被适当修改以用于用其他反义化合物进行的处理。

[0386] 通常, 当细胞在培养中达到约60%-80%汇合度时, 用反义寡核苷酸处理细胞。

[0387] 一种通常用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的试剂包括阳离子型脂质转染试剂LIPOFECTIN (Invitrogen, Carlsbad, CA)。可将反义寡核苷酸与LIPOFECTIN在OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中混合以达成反义寡核苷酸的所需最终浓度及通常在每100nM反义寡核苷酸2至12 μ g/mL范围内的LIPOFECTIN浓度。

[0388] 另一种用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的试剂包括LIPOFECTAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸与LIPOFECTAMINE在OPTI-MEM 1血清减少型培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中混合以达成反义寡核苷酸的所需浓度及通常在每100nM反义寡核苷酸2至12 μ g/mL范围内的LIPOFECTAMINE浓度。

[0389] 另一种用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的技术包括电穿孔。

[0390] 通过常规方法用反义寡核苷酸处理细胞。通常在反义寡核苷酸处理后16至24小时收获细胞, 此时通过本领域中已知及本文所述的方法测量靶核酸的RNA或蛋白质水平。一般

来说,当在多次重复实验中进行处理时,数据呈现为重复处理的平均值。

[0391] 所用的反义寡核苷酸浓度在细胞系之间有所不同。确定用于特定细胞系的最佳反义寡核苷酸浓度的方法在本领域中为熟知的。当用LIPOFECTAMINE转染时,通常使用浓度在1nM至300nM范围内的反义寡核苷酸。当使用电穿孔进行转染时,使用625nM至20,000nM范围内的较高浓度的反义寡核苷酸。

[0392] RNA分离

[0393] 可对总细胞RNA或聚(A)+mRNA进行RNA分析。RNA分离方法在本领域中是熟知的。RNA是使用本领域中熟知的方法,例如使用TRIZOL试剂(Invitrogen,Carlsbad,CA),根据制造商推荐的方案来制备。

[0394] 目标水平或表达的抑制的分析

[0395] 对C90RF72核酸的水平或表达的抑制可以本领域中已知的多种方式来测定。举例来说,靶核酸水平可通过例如RNA印迹分析、竞争性聚合酶链反应(PCR)或定量实时PCR来定量。可对总细胞RNA或聚(A)+mRNA进行RNA分析。RNA分离方法在本领域中是熟知的。RNA印迹分析在本领域中也是常规的。定量实时PCR可以使用可从PE-Applied Biosystems,Foster City,CA商购,并根据制造商说明书来使用的市售ABI PRISM 7600、7700或7900序列检测系统来方便地完成。

[0396] 对目标RNA水平的定量实时PCR分析

[0397] 可通过定量实时PCR,使用ABI PRISM 7600、7700或7900序列检测系统(PE-Applied Biosystems,Foster City,CA)根据制造商说明书来对靶RNA水平进行定量。定量实时PCR的方法在本领域中为熟知的。

[0398] 在实时PCR之前,使分离的RNA经历逆转录酶(RT)反应,产生互补的DNA(cDNA),其接着用作实时PCR扩增的底物。在同一样品孔中依序进行RT和实时PCR反应。RT和实时PCR试剂可获自Invitrogen(Carlsbad,CA)。RT实时PCR反应通过本领域技术人员熟知的方法进行。

[0399] 通过实时PCR获得的基因(或RNA)目标量是使用表达恒定的基因(如亲环素A(cyclophilin A))的表达水平或通过使用RIBOGREEN(Invitrogen,Inc.Carlsbad,CA)定量总RNA来标准化。亲环素A表达是通过实时PCR,通过与目标同时操作、复合操作或分开操作来定量。总RNA是使用RIBOGREEN RNA定量试剂(Invitrogen,Inc.Eugene,OR)来定量。通过RIBOGREEN定量RNA的方法是教导于Jones,L.J.等人,(Analytical Biochemistry,1998,265,368-374)中。使用CYTOFLUOR 4000仪器(PE Applied Biosystems)来测量RIBOGREEN荧光。

[0400] 探针和引物被设计来与C90RF72核酸杂交。用于设计实时PCR探针和引物的方法在本领域中是熟知的,且可包括使用软件,如PRIMER EXPRESS软件(Applied Biosystems,Foster City,CA)。

[0401] 分析蛋白质水平

[0402] 对C90RF72核酸的反义抑制可通过测量C90RF72蛋白质水平来评估。C90RF72的蛋白质水平可以本领域中熟知的多种方式来评价或定量,如免疫沉淀法、蛋白质印迹分析(免疫印迹法)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、定量蛋白质测定、蛋白质活性测定(例如卡斯蛋白酶活性测定)、免疫组织化学、免疫细胞化学或荧光活化细胞分选法(FACS)。针对靶标的抗

体可被识别且获自多种来源,如MSRS抗体目录(Aerie Corporation,Birmingham,MI),或可由本领域中熟知的常规单克隆或多克隆抗体生成方法来制备。适用于检测小鼠、大鼠、猴和人C90RF72的抗体是可商购的。

[0403] 体内测试反义化合物

[0404] 在动物体内测试反义化合物(例如反义寡核苷酸)以评估它们抑制C90RF72表达和产生表型改变(诸如,改善的运动功能和呼吸)的能力。在某些实施方案中,在动物中通过旋转杆、握力、爬杆、旷场表现、平衡木、后爪足迹测试来测量运动功能。在某些实施方案中,通过动物中的全身体积描记器、侵入性阻力和顺应性测量来测量呼吸。可在正常动物或实验疾病模型中进行测试。为了向动物施用,在药学上可接受的稀释剂如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或人工脑脊液(aCSF)中配制反义寡核苷酸。施用包括胃肠外施用途径,如腹膜内、静脉内和皮下,以及中心施用途径,如脑室内或鞘内。计算反义寡核苷酸剂量和给药频率在本领域技术人员的能力范围内,且取决于如施用途径及动物体重的因素。在用反义寡核苷酸处理一段时间后,自CNS组织或CSF分离RNA且测量C90RF72核酸表达的改变。

[0405] 靶向C90RF72

[0406] 本文所述的反义寡核苷酸可在RNA加工的任何阶段与C90RF72核酸杂交。例如,本文描述与前体mRNA或成熟mRNA互补的反义寡核苷酸。此外,本文所述的反义寡核苷酸可与C90RF72核酸的任何元件杂交。例如,本文描述与C90RF72核酸的外显子、内含子、5'UTR、3'UTR、重复区、六核苷酸重复序列扩增、剪接接合点、外显子:外显子剪接接合点、外显子剪接沉默子(ESS)、外显子剪接增强子(ESE)、外显子1a、外显子1b、外显子1c、外显子1d、外显子1e、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8、外显子9、外显子10、外显子11、内含子1、内含子2、内含子3、内含子4、内含子5、内含子6、内含子7、内含子8、内含子9或内含子10互补的反义寡核苷酸。

[0407] 在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸与C90RF72的所有变体杂交。在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸与C90RF72的某些变体选择性地杂交。在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸与C90RF72的含有六核苷酸重复序列扩增的变体选择性地杂交。在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸与含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体选择性地杂交。在某些实施方案中,C90RF72的含有六核苷酸重复序列扩增的前体mRNA变体包括SEQ ID NO:1-3和6-10。在某些实施方案中,这种六核苷酸重复序列扩增包含GGGGCC、GGGGGG、GGGGGC或GGGGCG中的任一种的至少24个重复序列。

[0408] 在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸抑制C90RF72的所有变体的表达。在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸同等地抑制C90RF72的所有变体的表达。在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸优先抑制C90RF72的一种或多种变体的表达。在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸优先抑制C90RF72的含有六核苷酸重复序列扩增的变体的表达。在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸选择性地抑制含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体的表达。在某些实施方案中,本文所述的反义寡核苷酸选择性地抑制C90RF72致病相关mRNA变体的表达。在某些实施方案中,C90RF72的含有六核苷酸重复序列扩增的前体mRNA变体包括SEQ ID NO:1-3和6-10。在某些实施方案中,这种六核苷酸重复序列扩增包含GGGGCC、GGGGGG、GGGGGC或GGGGCG中的任一种的至少24个重复序列。在某些实施方案中,六核苷酸重复序列扩增形成核灶。在某些实施方案中,本文描述的反义寡核苷酸

适用于减少核灶。核灶可就具有病灶的细胞的百分比以及每个细胞的病灶数量而言来减少。

[0409] 某些致病相关变体的选择性抑制

[0410] 在本文的某些实例中，引物探针集RTS3905检测从含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体加工的mRNA变体(例如NM_001256054.1)。mRNA变体从含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体(即，“C90RF72致病相关mRNA变体”)加工。当前体mRNA的转录在从外显子1A的起始位点至外显子1B的起始位点的区域，例如，基因组序列(SEQ ID NO:2,从核苷酸27535000至27565000截短的GENBANK登录号NT_008413.18的补体)的核苷酸1107至1520中开始时，前体mRNA包含六核苷酸重复序列。在此区域中设计寡核苷酸以选择性地靶向含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体。RTS3905测量含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体的mRNA产物(即C90RF72致病相关mRNA变体)，且因此测量含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体的减少。

[0411] C90RF72特征

[0412] 本文所述的反义寡核苷酸可在C90RF72基因的任何元件内的任何加工状态下与任何C90RF72变体杂交。例如，本文所述的反义寡核苷酸可与外显子、内含子、5'UTR、3'UTR、重复区、六核苷酸重复序列扩增、剪接接合点、外显子:外显子剪接接合点、外显子剪接沉默子(ESS)、外显子剪接增强子(ESE)、外显子1a、外显子1b、外显子1c、外显子1d、外显子1e、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8、外显子9、外显子10、外显子11、内含子1、内含子2、内含子3、内含子4、内含子5、内含子6、内含子7、内含子8、内含子9或内含子10杂交。例如，反义寡核苷酸可靶向针对下文描述的各种C90RF72变体在下面表1-5中表征的任何外显子。本文所述的反义寡核苷酸还可靶向未在下文表征的变体，并且此类变体在GENBANK中表征。此外，本文所述的反义寡核苷酸还可靶向除外显子以外的元件，并且此类元件在GENBANK中表征。

[0413] 表1

[0414] NM_001256054.1 (SEQ ID NO:1)的功能区段

[0415]

外显子编号	mRNA 起始 位点	mRNA 终止 位点	参考 SEQ ID NO: 2 的起 始位 点	参考 SEQ ID NO: 2 的终 止位 点
外显子 1C	1	158	1137	1294
外显子 2	159	646	7839	8326
外显子 3	647	706	9413	9472
外显子 4	707	802	12527	12622
外显子 5	803	867	13354	13418
外显子 6	868	940	14704	14776
外显子 7	941	1057	16396	16512
外显子 8	1058	1293	18207	18442
外显子 9	1294	1351	24296	24353
外显子 10	1352	1461	26337	26446
外显子 11	1462	3339	26581	28458

[0416] 表2

[0417] NM_018325.3 (SEQ ID NO:4) 的功能区段

[0418]

外显子编号	mRNA 起始 位点	mRNA 终止 位点	参考 SEQ ID NO: 2	参考 SEQ ID NO: 2
-------	------------------	------------------	--------------------------	--------------------------

[0419]

			的起 始位 点	的终 止位 点
外显子 1B	1	63	1510	1572
外显子 2	64	551	7839	8326
外显子 3	552	611	9413	9472
外显子 4	612	707	12527	12622
外显子 5	708	772	13354	13418
外显子 6	773	845	14704	14776
外显子 7	846	962	16396	16512
外显子 8	963	1198	18207	18442
外显子 9	1199	1256	24296	24353
外显子 10	1257	1366	26337	26446
外显子 11	1367	3244	26581	28458

[0420] 表3

[0421] NM_145005.5 (SEQ ID NO:6) 的功能区段

[0422]

外显子编号	mRNA 起始 位点	mRNA 终止 位点	参考 SEQ ID NO: 2 的起始 位点	参考 SEQ ID NO: 2 的终止 位点
外显子 1A	1	80	1137	1216
外显子 2	81	568	7839	8326
外显子 3	569	628	9413	9472
外显子 4	629	724	12527	12622
外显子 5B (进入内含 子 5 的外显子 5)	725	1871	13354	14500

[0423] 表4

[0424] DB079375.1 (SEQ ID NO:7) 的功能区段

[0425]

外显子编号	mRNA 起始 位点	mRNA 终止 位点	参考 SEQ ID NO: 2	参考 SEQ ID NO: 2
-------	------------------	------------------	--------------------------	--------------------------

			的起始位点	的终止位点
[0426]	外显子 1E	1	35	1135
	外显子 2	36	524	7839
	外显子 3 (EST 在完整外显子末端之前结束)	525	562	9413
				9450

[0427] 表5

[0428] BU194591.1 (SEQ ID NO:8) 的功能区段

外显子编号	mRNA 起始位点	mRNA 终止位点	参考 SEQ ID NO: 2 的起始位点	参考 SEQ ID NO: 2 的终止位点
[0429]				
外显子 1D	1	36	1241	1279
外显子 2	37	524	7839	8326
外显子 3	525	584	9413	9472
外显子 4	585	680	12527	12622
外显子 5B (进入内含子 5 的外显子 5)	681	798	13354	13465

[0430] 某些适应症

[0431] 在某些实施方案中,本文提供治疗个体的方法,所述方法包括施用本文所述的一种或多种药物组合物。在某些实施方案中,个体患有神经退行性疾病。在某些实施方案中,个体处于发展神经退行性疾病(包括但不限于ALS或FTD)的风险中。在某些实施方案中,个体已被鉴定为患有C90RF72相关疾病。在某些实施方案中,本文提供用于预防性减少个体的C90RF72表达的方法。某些实施方案包括通过向个体施用治疗有效量的靶向C90RF72核酸的反义化合物来治疗有需要的个体。

[0432] 在一个实施方案中,施用治疗有效量的靶向C90RF72核酸的反义化合物伴随监测个体中的C90RF72水平以测定个体对施用反义化合物的反应。个体对施用反义化合物的反应可由医师用于确定治疗性干预的量及持续时间。

[0433] 在某些实施方案中,施用靶向C90RF72核酸的反义化合物导致C90RF72表达降低至少约15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任两个所限定的范围。在某些实施方案中,在动物中施用靶向C90RF72核酸的反义化合物导致改善的运动功能和呼吸。在某些实施方案中,施用C90RF72反义化合物使运动功能和呼吸改善至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、

45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或由这些值中的任意两个所限定的范围。

[0434] 在某些实施方案中,包含靶向C90RF72的反义化合物的药物组合物用于制备用以治疗患有或易患神经退行性疾病(包括ALS和FTD)的患者的药物。

[0435] 某些组合疗法

[0436] 在某些实施方案中,本文描述的一种或多种药物组合物与一种或多种其他药剂共同施用。在某些实施方案中,所述一种或多种其他药剂被设计来与本文所述的一种或多种药物组合物治疗相同疾病、病症或条件。在某些实施方案中,所述一种或多种其他药剂被设计来与本文所述的一种或多种药物组合物治疗不同疾病、病症或条件。在某些实施方案中,所述一种或多种其他药剂被设计来治疗本文所述的一种或多种药物组合物的不期望的副作用。在某些实施方案中,本文描述的一种或多种药物组合物与另一药剂共同施用以治疗所述另一药剂的不期望的作用。在某些实施方案中,本文描述的一种或多种药物组合物与另一药剂共同施用来产生组合作用。在某些实施方案中,本文描述的一种或多种药物组合物与另一药剂共同施用来产生协同作用。

[0437] 在某些实施方案中,本文所述的一种或多种药物组合物与一种或多种其他药剂同时施用。在某些实施方案中,本文所述的一种或多种药物组合物与一种或多种其他药剂在不同时间施用。在某些实施方案中,本文描述的一种或多种药物组合物和一种或多种其他药剂一起制备成单个制剂。在某些实施方案中,本文所述的一种或多种药物组合物和一种或多种其他药剂是单独制备的。

[0438] 在某些实施方案中,可与本文所述的药物组合物共同施用的药剂包括利鲁唑(力如太)、力奥来素(力奥来素)和Dexpramipexole。

[0439] 在某些实施方案中,可与本文所述的C90RF72特异性抑制剂共同施用的药剂包括但不限于另外的C90RF72抑制剂。

[0440] 在某些实施方案中,可与本文所述的C90RF72特异性抑制剂共同施用的药剂包括但不限于C90RF72反义转录物特异性抑制剂。在某些实施方案中,C90RF72反义转录物特异性抑制剂是反义化合物。在某些实施方案中,反义化合物是修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸是单链的。

[0441] 在某些实施方案中,在施用本文所述的药物组合物之前施用共同施用的药剂。在某些实施方案中,在施用本文所述的药物组合物之后施用共同施用的药剂。在某些实施方案中,与本文所述的药物组合物同时施用共同施用的药剂。在某些实施方案中,共同施用的药剂的剂量与在单独施用共同施用的药剂时将施用的剂量相同。在某些实施方案中,共同施用的药剂的剂量比在单独施用共同施用的药剂时将施用的剂量低。在某些实施方案中,共同施用的药剂的剂量比在单独施用共同施用的药剂时将施用的剂量高。

[0442] 在某些实施方案中,第二化合物的共同施用增强第一化合物的作用,以使得所述化合物的共同施用产生的作用大于单独施用第一化合物的作用。在其他实施方案中,共同施用产生为单独施用时化合物的作用的相加的作用。在某些实施方案中,共同施用产生为单独施用时化合物的作用的超相加的作用。在某些实施方案中,第一化合物是反义化合物。在某些实施方案中,第二化合物是反义化合物。

[0443] 某些对比组合物

[0444] 在某些实施方案中,本文描述的化合物比ISIS 576816、ISIS 576974、ISIS 577061、ISIS 577065和/或ISIS 577083更耐受。ISIS 576816、ISIS 576974、ISIS 577061、ISIS 577065和ISIS 577083被选择为比较化合物,因为它们在W02014/062691中描述的各种研究中展现高水平的剂量依赖性C9ORF72 mRNA减少。因此,ISIS 576816、ISIS 576974、ISIS 577061、ISIS 577065和ISIS 577083被认为是高度有效和有力的化合物。另外,在W02014/062691中描述的ISIS 577065、ISIS 577056和ISIS 576816与本文描述的化合物是结构上类似的。例如,ISIS 577065与ISIS 801287具有16个核碱基的重叠;ISIS 577056与ISIS 806679具有16个核碱基的重叠;ISIS 576816与ISIS 802473具有18个核碱基的重叠(18聚体);并且ISIS 576816与ISIS 802459具有18个核碱基的重叠。

[0445] 在某些实施方案中,具有序列(从5'至3')GCCTTACTCTAGGACCAAGA(作为SEQ ID NO:21并入本文)的ISIS 576816(一种5-10-5MOE缺口聚物)是对比化合物,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,并且核苷1-5和16-20中的每个包含2'-O-甲氧基乙基,其先前描述于以引用的方式并入本文的W02014/062691中。ISIS 576816在小鼠中的急性耐受性研究中实现7.00的平均FOB分数(参见下文的实施例3)。本文所述的某些化合物在小鼠中的类似急性耐受性研究中实现较低FOB分数(参见下文的实施例2),包括ISIS 801287、ISIS 806679、ISIS 802473和ISIS 802459。因此,本文所述的某些化合物对比化合物ISIS 576816更耐受。

[0446] 在某些实施方案中,具有序列(从5'至3')GGGACACTACAAGGTAGTAT(作为SEQ ID NO:56并入本文)的ISIS 576974(一种5-10-5MOE缺口聚物)是对比化合物,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,并且核苷1-5和16-20中的每个包含2'-O-甲氧基乙基,其先前描述于以引用的方式并入本文的W02014/062691中。ISIS 576974在小鼠中的急性耐受性研究中实现5.67的平均FOB分数(参见下文的实施例3)。本文所述的某些化合物在小鼠中的类似急性耐受性研究中实现较低FOB分数(参见下文的实施例2),包括ISIS 801287、ISIS 806679、ISIS 802473和ISIS 802459。因此,本文所述的某些化合物对比化合物ISIS 576974更耐受。

[0447] 在某些实施方案中,具有序列(从5'至3')TACAGGCTGCGGTTGTTTCC(作为SEQ ID NO:57并入本文)的ISIS 577061(一种5-10-5MOE缺口聚物)是对比化合物,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,并且核苷1-5和16-20中的每个包含2'-O-甲氧基乙基,其先前描述于以引用的方式并入本文的W02014/062691中。ISIS 577061在小鼠中的急性耐受性研究中实现7.00的平均FOB分数(参见下文的实施例3)。本文所述的某些化合物在小鼠中的类似急性耐受性研究中实现较低FOB分数(参见下文的实施例2),包括ISIS 801287、ISIS 806679、ISIS 802473和ISIS 802459。因此,本文所述的某些化合物对比化合物ISIS 577061更耐受。

[0448] 在某些实施方案中,具有序列(从5'至3')CCCGGCCCTAGCGCGCGAC(作为SEQ ID NO:58并入本文)的ISIS 577065(一种5-10-5MOE缺口聚物)是对比化合物,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,并且核苷1-5和16-20中的每个包含2'-O-甲氧基乙基,其先前描述于以引用的方式并入本文的W02014/062691中。ISIS 577065在小鼠中的急性耐受性研究中实现6.00的平均FOB分数(参见下文的实施例3)。本文所述的某些化合物在小鼠中的类似急性耐受性研究中实现较低FOB分数(参见下文的实施例2),包

括ISIS 801287、ISIS 806679、ISIS 802473和ISIS 802459。因此,本文所述的某些化合物对比化合物ISIS 577065更耐受。

[0449] 在某些实施方案中,具有序列(从5'至3')GGTAACTTCAAACCTCTTGGG(作为SEQ ID NO:59并入本文)的ISIS 577083(一种5-10-5MOE缺口聚物)是对比化合物,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,并且核苷1-5和16-20中的每个包含2'-O-甲氧基乙基,其先前描述于以引用的方式并入本文的W02014/062691中。ISIS 577083在小鼠中的急性耐受性研究中实现7.00的平均FOB分数(参见下文的实施例3)。本文所述的某些化合物在小鼠中的类似急性耐受性研究中实现较低FOB分数(参见下文的实施例2),包括ISIS 801287、ISIS 806679、ISIS 802473和ISIS 802459。因此,本文所述的某些化合物对比化合物ISIS 577083更耐受。

[0450] 在某些实施方案中,具有序列(从5'至3')AATCTTTATCAGGTCTTTTC(作为SEQ ID NO:60并入本文)的ISIS 577056(一种5-10-5MOE缺口聚物)是对比化合物,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶,并且核苷1-5和16-20中的每个包含2'-O-甲氧基乙基,其先前描述于以引用的方式并入本文的W02014/062691中。ISIS 577056在小鼠中的急性耐受性研究中实现6.5的平均FOB分数(参见下文的实施例3)。本文所述的某些化合物在小鼠中的类似急性耐受性研究中实现较低FOB分数(参见下文的实施例2),包括ISIS 801287、ISIS 806679、ISIS 802473和ISIS 802459。因此,本文所述的某些化合物对比化合物ISIS 577056更耐受。

[0451] 某些人类治疗剂

[0452] 本文所述的人C90RF72反义寡核苷酸是人类治疗剂。正在研究效力、功效和/或耐受性的各种参数。此类参数包括体外抑制总C90RF72 RNA表达、体外抑制C90RF72致病相关RNA变体表达、体外剂量反应(IC50)、体内抑制在相关组织(例如,脑和/或脊髓)中含有人C90RF72转基因的转基因动物中的总或致病性RNA和/或蛋白质、在小鼠中的耐受性、在大鼠中的耐受性和/或在灵长类动物中的耐受性。可测量的耐受性标志物包括血液和血清化学参数、CSF化学参数、身体和器官重量、一般观察结果和/或行为测试和/或生物化学标志物如GFAP和/或AIF1。可测量急性或长期耐受性。

[0453] 某些组合物

[0454] 1. ISIS 801287

[0455] 在某些实施方案中,ISIS 801287被表征为4-8-6MOE缺口聚物,其具有序列(从5'至3')GCCCCTAGCGCGCGACTC(作为SEQ ID NO:33并入本文),其中核苷1-4和13-18中的每个是2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的核苷,并且核苷5-12中的每个是2'-脱氧核苷,其中在核苷2至3、3至4、13至14、14至15和15至16之间的核苷间键联是磷酸二酯键联,并且在核苷1至2、4至5、5至6、6至7、7至8、8至9、9至10、10至11、11至12、12至13、16至17和17至18之间的核苷间键联是硫代磷酸酯键联,并且其中每个胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶。

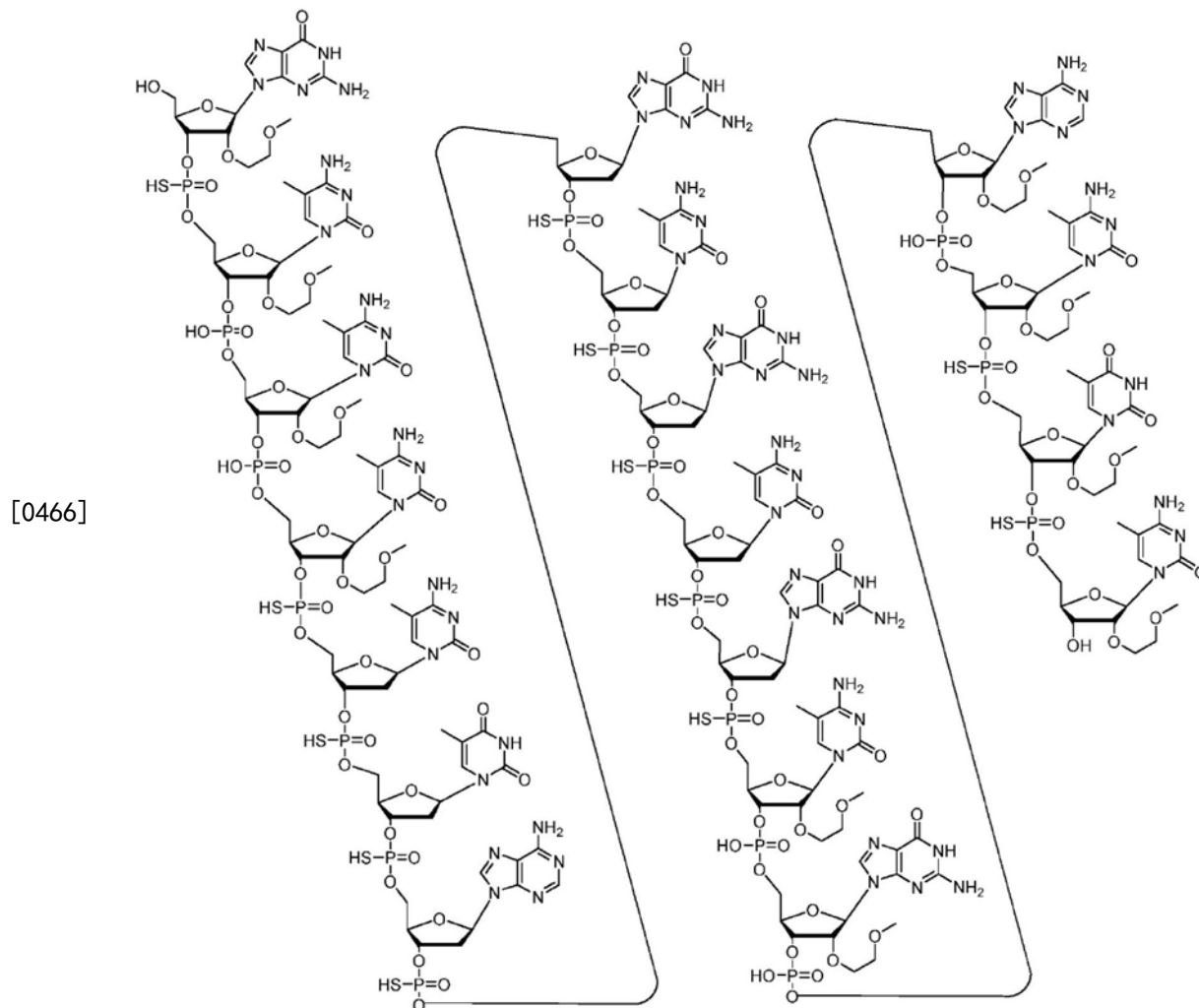
[0456] 在某些实施方案中,通过以下化学符号描述ISIS 801287:Ges mCeo mCeo mCes mCds Tds Ads Gds mCds Gds mCds Gds mCeo Geo AeO mCes Tes mCe;其中,

[0457] A=腺嘌呤,

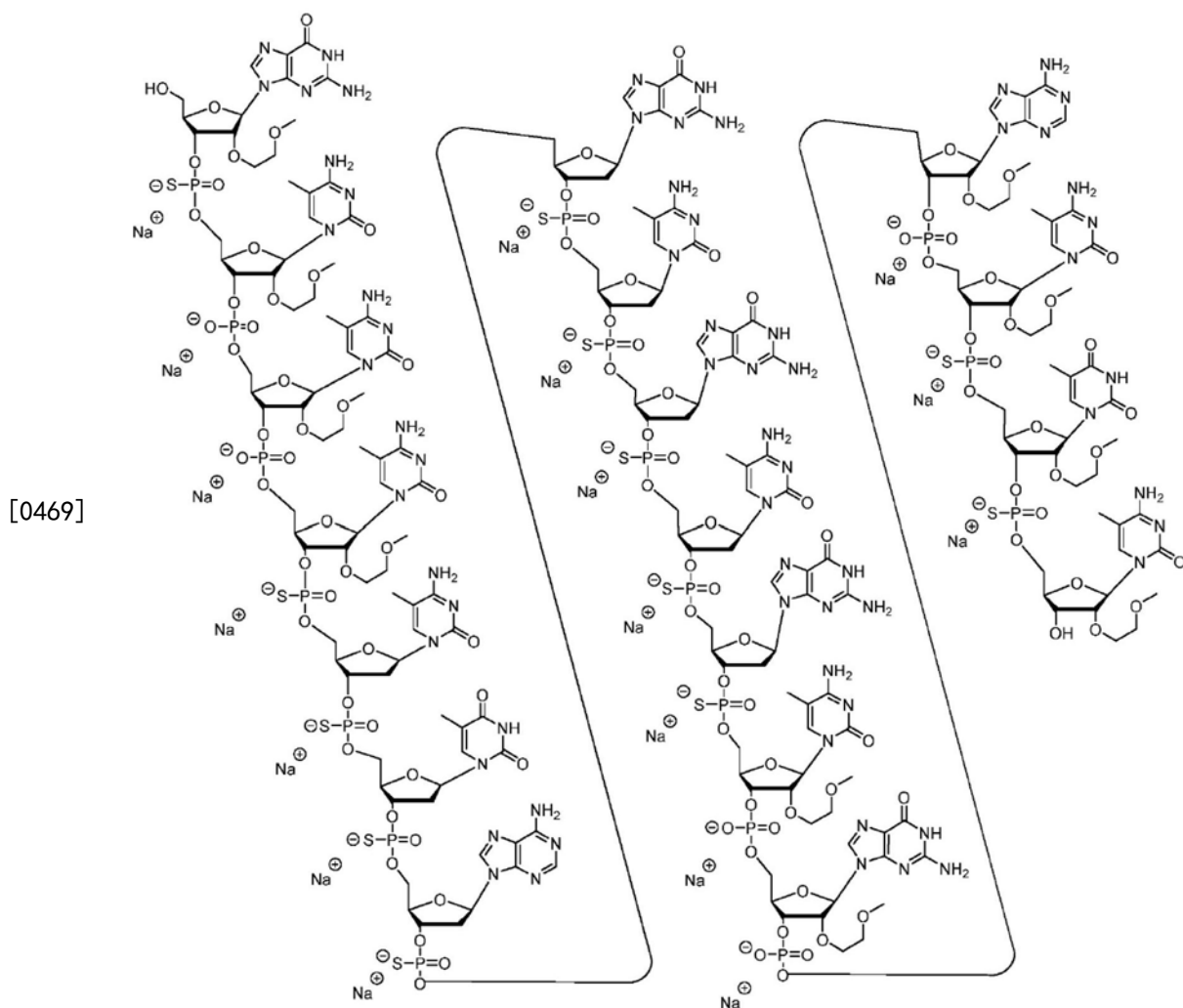
[0458] mC=5'-甲基胞嘧啶

[0459] G=鸟嘌呤,

- [0460] T=胸腺嘧啶，
 [0461] e=2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖
 [0462] d=2'-脱氧核糖，
 [0463] s=硫代磷酸酯核苷间键联，以及
 [0464] o=磷酸二酯核苷间键联。
 [0465] 在某些实施方案中，通过以下化学结构描述ISIS 801287，或其盐：



- [0467] 结构1.ISIS 801287
 [0468] 在某些实施方案中，通过以下化学结构描述ISIS 801287的钠盐：



[0470] 结构2.ISIS 801287的钠盐

[0471] 2.ISIS 806679

[0472] 在某些实施方案中,ISIS 806679被表征为6-10-4MOE缺口聚物,其具有序列(从5'至3')GGTTAATCTTTATCAGGTCT(作为SEQ ID NO:49并入本文),其中核苷1-6和17-20中的每个是2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的核苷,并且核苷7-16中的每个是2'-脱氧核苷,其中在核苷2至3、3至4、4至5、5至6、6至7和17至18之间的核苷间键联是磷酸二酯键联,并且在核苷1至2、7至8、8至9、9至10、10至11、11至12、12至13、13至14、14至15、15至16、16至17、18至19和19至20之间的核苷间键联是硫代磷酸酯键联,并且其中每个胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶。

[0473] 在某些实施方案中,通过以下化学符号描述ISIS 806679:Ges Geo Teo Teo Aeo Aeo Tds mCds Tds Tds Tds Ads Tds mCds Ads Gds Geo Tes mCes Te;其中,

[0474] A=腺嘌呤,

[0475] mC=5'-甲基胞嘧啶

[0476] G=鸟嘌呤,

[0477] T=胸腺嘧啶,

[0478] e=2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖

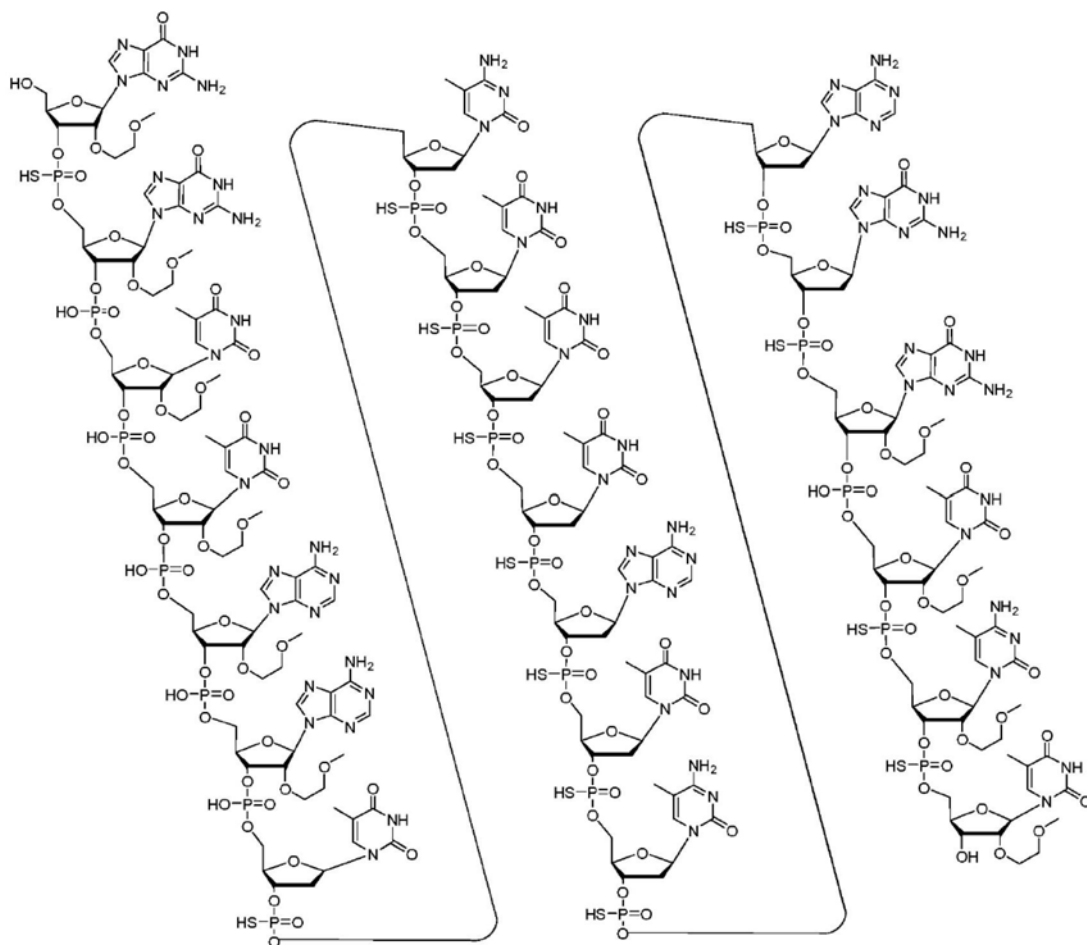
[0479] d=2'-脱氧核糖,

[0480] s=硫代磷酸酯核苷间键联,以及

[0481] o=磷酸二酯核苷间键联。

[0482] 在某些实施方案中,通过以下化学结构描述ISIS 806679,或其盐:

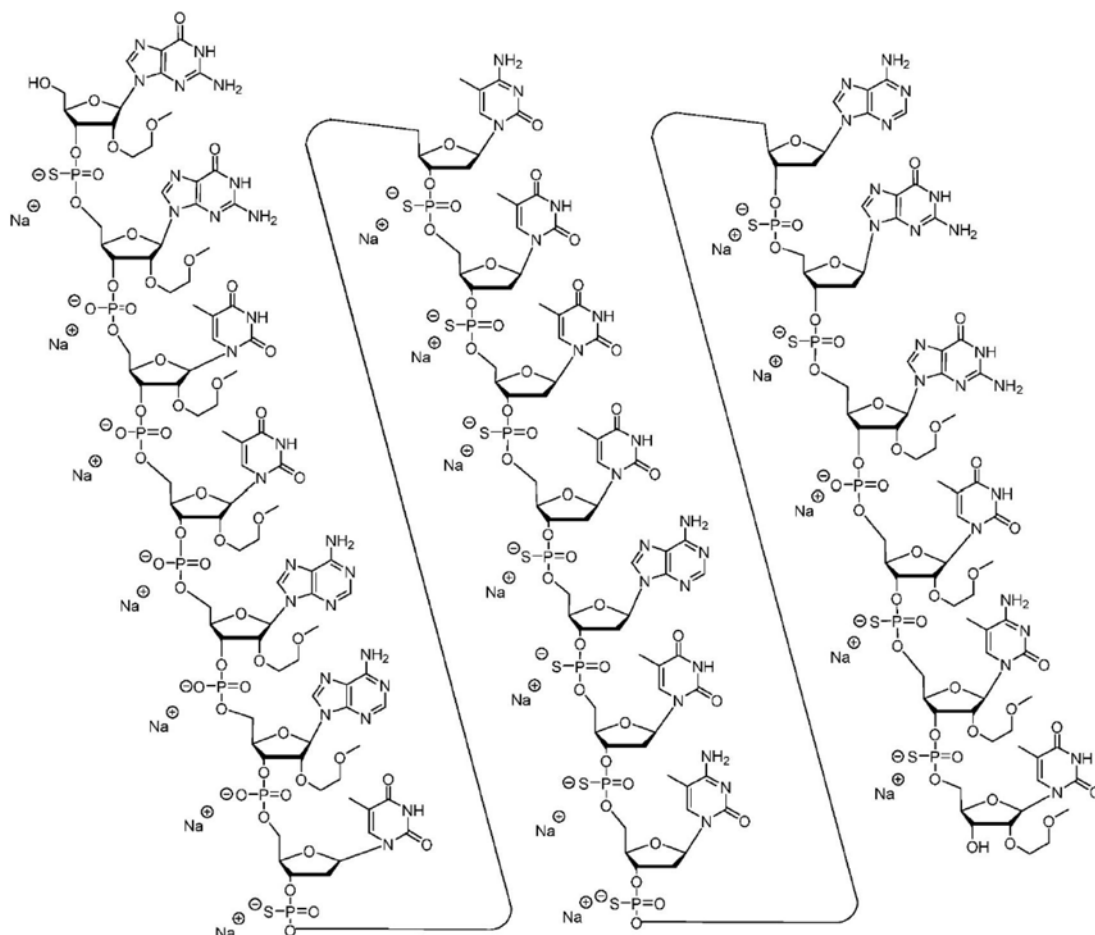
[0483]



[0484] 结构3.ISIS 806679

[0485] 在某些实施方案中,通过以下化学结构描述ISIS 806679的钠盐:

[0486]



[0487] 结构4.ISIS 806679的钠盐

[0488] 3.ISIS 802473

[0489] 在某些实施方案中, ISIS 802473被表征为4-8-6MOE缺口聚物, 其具有序列(从5'至3') GCCTTACTCTAGGACCAA (作为SEQ ID NO:47并入本文), 其中核苷1-4和13-18中的每个是2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的核苷, 并且核苷5-12中的每个是2'-脱氧核苷, 其中在核苷2至3、3至4、13至14、14至15和15至16之间的核苷间键联是磷酸二酯键联, 并且在核苷1至2、4至5、5至6、6至7、7至8、8至9、9至10、10至11、11至12、12至13、16至17和17至18之间的核苷间键联是硫代磷酸酯键联, 并且其中每个胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶。

[0490] 在某些实施方案中, 通过以下化学符号描述ISIS 802473: Ges mCeo mCeo Tes Tds Ads mCds Tds mCds Tds Ads Gds Geo AeO mCeo mCes Aes Ae; 其中,

[0491] A=腺嘌呤,

[0492] mC=5'-甲基胞嘧啶

[0493] G=鸟嘌呤,

[0494] T=胸腺嘧啶,

[0495] e=2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖

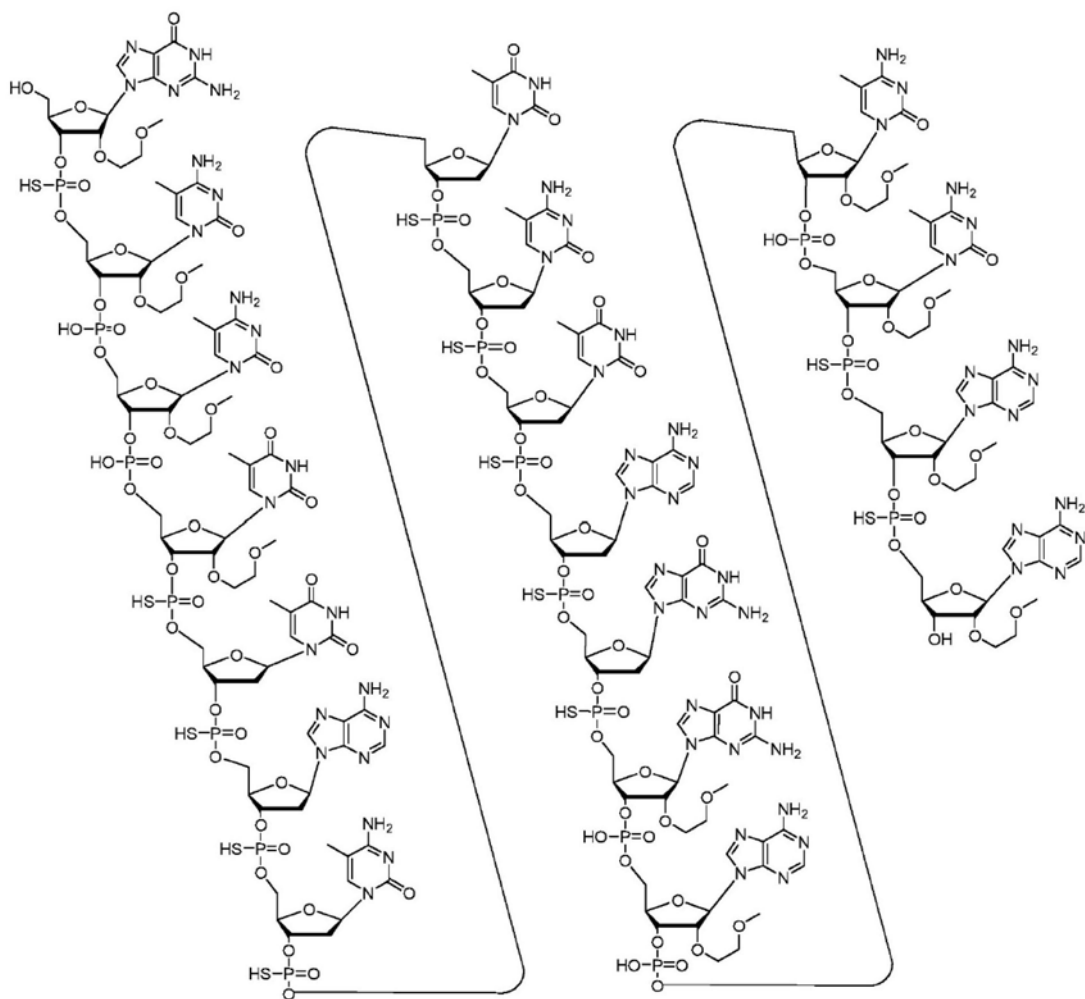
[0496] d=2'-脱氧核糖,

[0497] s=硫代磷酸酯核苷间键联, 以及

[0498] o=磷酸二酯核苷间键联。

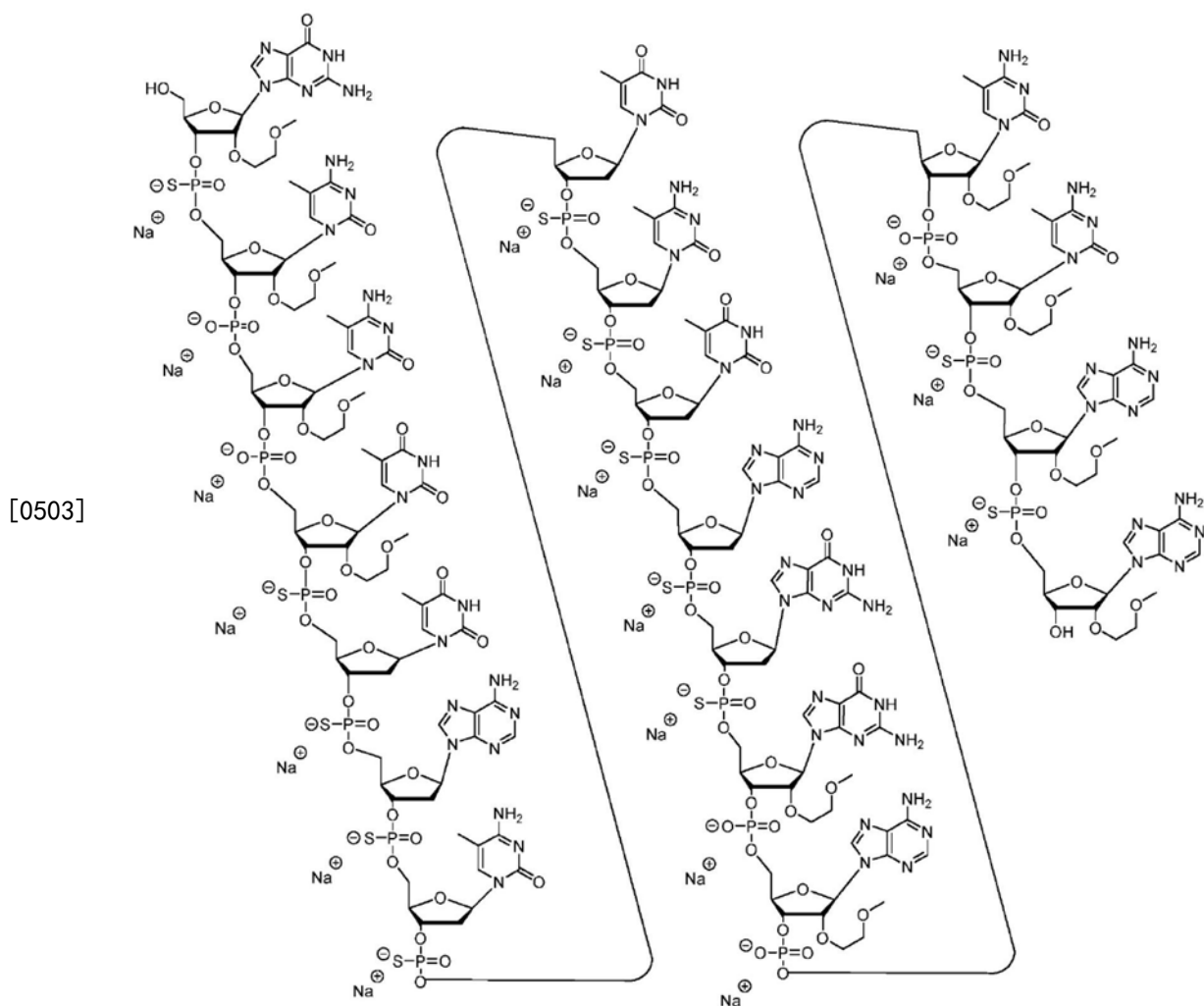
[0499] 在某些实施方案中, 通过以下化学结构描述ISIS 802473, 或其盐:

[0500]



[0501] 结构5.ISIS 802473

[0502] 在某些实施方案中,通过以下化学结构描述ISIS 802473的钠盐:



[0504] 结构6.ISIS 802473的钠盐

[0505] 4.ISIS 802459

[0506] 在某些实施方案中,ISIS 802459被表征为3-10-7MOE缺口聚物,其具有序列(从5'至3') GCCTTACTCTAGGACCAAGA(作为SEQ ID NO:21并入本文),其中核苷1-3和14-20中的每个是2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的核苷,并且核苷4-13中的每个是2'-脱氧核苷,其中在核苷2至3、3至4、14至15、15至16、16至17和17至18之间的核苷间键联是磷酸二酯键联,并且在核苷1至2、4至5、5至6、6至7、7至8、8至9、9至10、10至11、11至12、12至13、13至14、18至19和19至20之间的核苷间键联是硫代磷酸酯键联,并且其中每个胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶。

[0507] 在某些实施方案中,通过以下化学符号描述ISIS 802459:Ges mCeo mCeo Tds Tds Ads mCds Tds mCds Tds Ads Gds Gds Ae mCeo mCeo Ae Aes Ges Ae;其中,

[0508] A=腺嘌呤,

[0509] mC=5'-甲基胞嘧啶

[0510] G=鸟嘌呤,

[0511] T=胸腺嘧啶,

[0512] e=2'-O-甲氧基乙基核糖修饰的糖

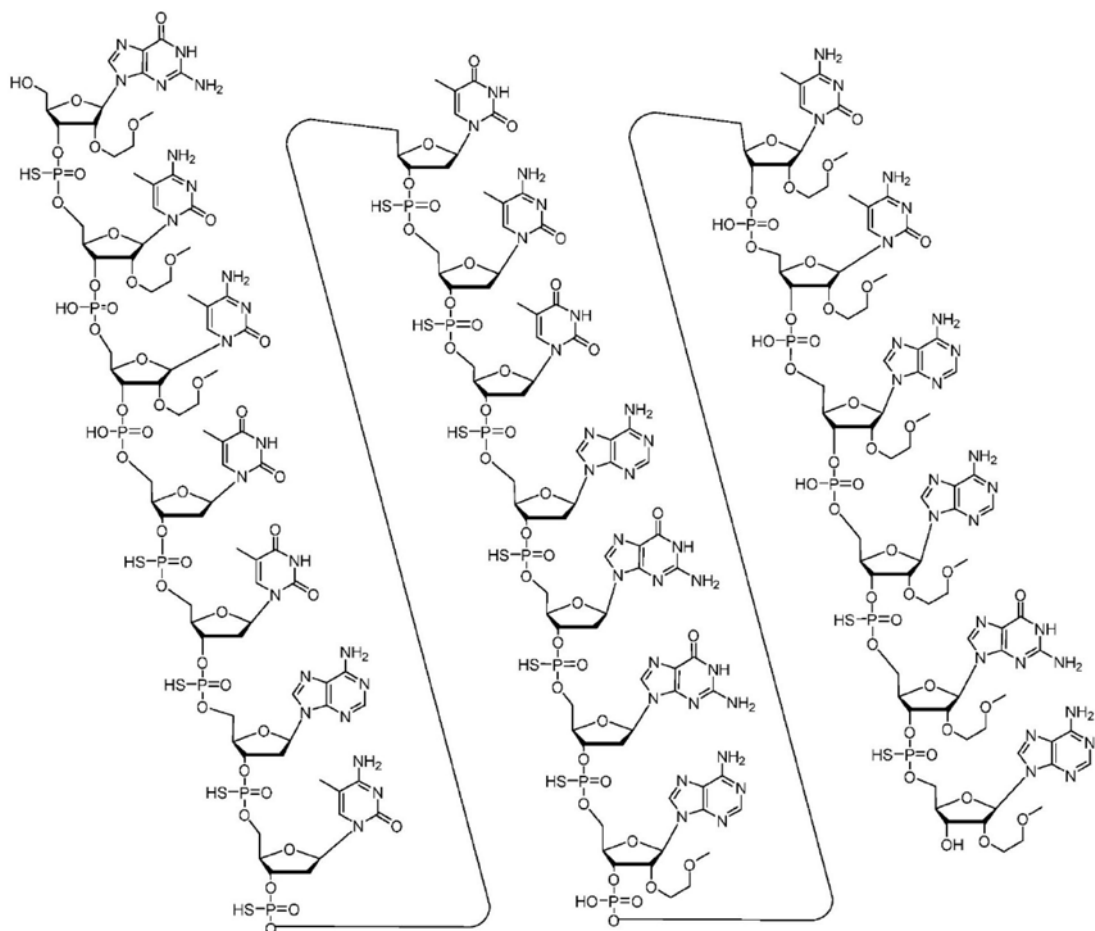
[0513] d=2'-脱氧核糖,

[0514] s=硫代磷酸酯核苷间键联,以及

[0515] o=磷酸二酯核苷间键联。

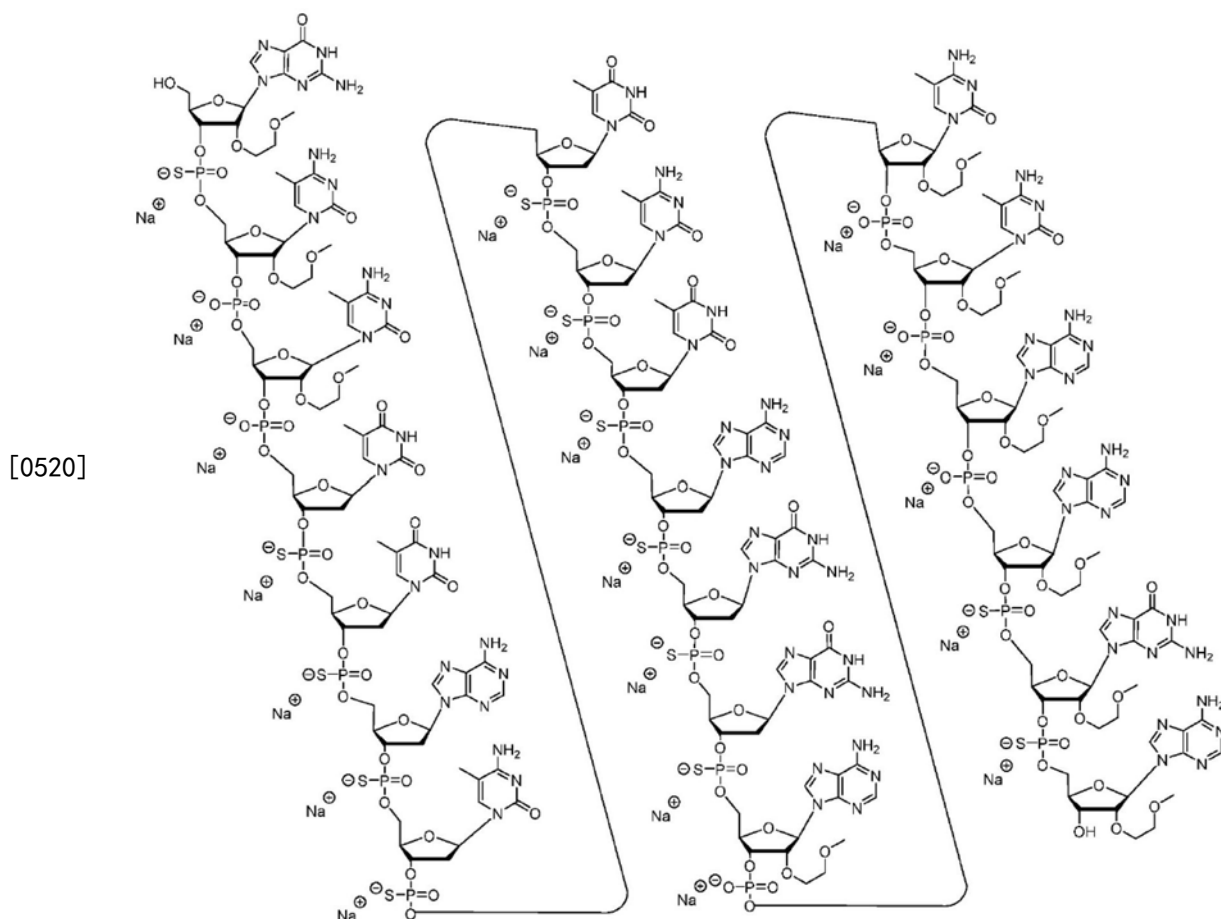
[0516] 在某些实施方案中,通过以下化学结构描述ISIS 802459,或其盐:

[0517]



[0518] 结构7.ISIS 802459

[0519] 在某些实施方案中,通过以下化学结构描述ISIS 802459的钠盐:



[0521] 结构8.ISIS 802459的钠盐

[0522] 本发明提供的各个方面的实施方案也通过以下任意一个段落进行了描述。

[0523] 实施方案1.一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接核苷组成并且具有核碱基序列,所述核碱基序列包含SEQ ID NO:22-55的任何核碱基序列的至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个或至少18个连续核碱基。

[0524] 实施方案2.如实施方案1所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸的所述核碱基序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。

[0525] 实施方案3.如实施方案1和2所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸是单链修饰的寡核苷酸。

[0526] 实施方案4.如实施方案1-3中任一项所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键联。

[0527] 实施方案5.如实施方案4所述的化合物,其中所述至少一个修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0528] 实施方案6.如实施方案4和5所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸包含至少一个磷酸二酯键联。

[0529] 实施方案7.如实施方案4所述的化合物,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷

间键联。

[0530] 实施方案8.如实施方案1-7中任一项所述的化合物,其中至少一个核苷包含修饰的核碱基。

[0531] 实施方案9.如实施方案8所述的化合物,其中所述修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

[0532] 实施方案10.如实施方案1-9中任一项所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸的至少一个核苷包含修饰的糖。

[0533] 实施方案11.如实施方案10所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸的每个核苷包含修饰的糖。

[0534] 实施方案12.如实施方案10或11所述的化合物,其中所述至少一个修饰的糖是双环糖。

[0535] 实施方案13.如实施方案12所述的化合物,其中所述双环糖包含在所述糖的4'位置与2'位置之间的化学桥,其中所述化学桥选自:4'-CH(R)-O-2'和4'-(CH₂)₂-O-2',其中R独立地是H、C₁-C₆烷基和C1-C6烷氧基。

[0536] 实施方案14.如实施方案13所述的化合物,其中所述化学桥是4'-CH(R)-O-2',并且其中R是甲基。

[0537] 实施方案15.如实施方案13所述的化合物,其中所述化学桥是4'-CH(R)-O-2',并且其中R是H。

[0538] 实施方案16.如实施方案13所述的化合物,其中所述化学桥是4'-CH(R)-O-2',并且其中R是-CH₂-O-CH₃。

[0539] 实施方案17.如实施方案10或11所述的化合物,其中所述至少一个修饰的糖包含2'-O-甲氧基乙基。

[0540] 实施方案18.如实施方案1-10或12-16中任一项所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸是缺口聚物。

[0541] 实施方案19.如实施方案18所述的化合物,其中所述缺口聚物是以下中的任一种:3-8-7MOE缺口聚物、3-10-7MOE缺口聚物、4-8-6MOE缺口聚物、4-10-6MOE缺口聚物、6-10-4MOE缺口聚物、6-8-4MOE缺口聚物、7-8-3MOE缺口聚物或7-10-3MOE缺口聚物。

[0542] 实施方案20.如实施方案5所述的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸包含呈以下型态中的任一种的核苷间键联:s o o s s s s s s s s s s s s o o o o s s、s o o o s s s s s s s s s s s s o o o o s s、s o o o o o s s s s s s s s s s s o s s、s o o o o o o s s s s s s s s s s s s s s、s o o o o s s s s s s s s s s s o o s s、s o o o s s s s s s s s s s s o o o s s、s o o o o o s s s s s s s s s s s o s s、s o o s s s s s s s s s s s o o o s s、s o s s s s s s s s s s s o o o o s s或s o o o o o s s s s s s s s s s s s s s,其中,

[0543] s=硫代磷酸酯键联,以及

[0544] o=磷酸二酯键联。

[0545] 实施方案19.一种组合物,其包含如前述实施方案中任一项所述的化合物或其盐,以及药学上可接受的载体或稀释剂中的至少一种。

[0546] 实施方案20.如实施方案19所述的组合物,其还包含C90RF72反义转录物特异性抑制剂。

[0547] 实施方案21.如实施方案20所述的组合物,其中所述C90RF72反义转录物特异性抑制剂是反义化合物。

[0548] 实施方案22.如实施方案21所述的组合物,其中所述反义化合物是修饰的寡核苷酸。

[0549] 实施方案23.如实施方案22所述的组合物,其中所述修饰的寡核苷酸是单链的。

[0550] 实施方案24.如实施方案22或23所述的组合物,其中所述修饰的寡核苷酸具有与C90RF72反义转录物至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补的核碱基序列。

[0551] 实施方案25.如实施方案24所述的组合物,其中所述C90RF72反义转录物具有SEQ ID NO:18的核碱基序列。

[0552] 实施方案26.一种方法,其包括向动物施用如前述实施方案中任一项所述的化合物或组合物。

[0553] 实施方案27.如实施方案26所述的方法,其中所述动物是人。

[0554] 实施方案28.如实施方案26和27所述的方法,其中施用所述化合物预防、治疗、改善C90RF72相关疾病或减缓所述疾病的进展。

[0555] 实施方案29.如实施方案28所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病由六核苷酸重复序列扩增引起。

[0556] 实施方案30.如实施方案28所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病是肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征和橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)。

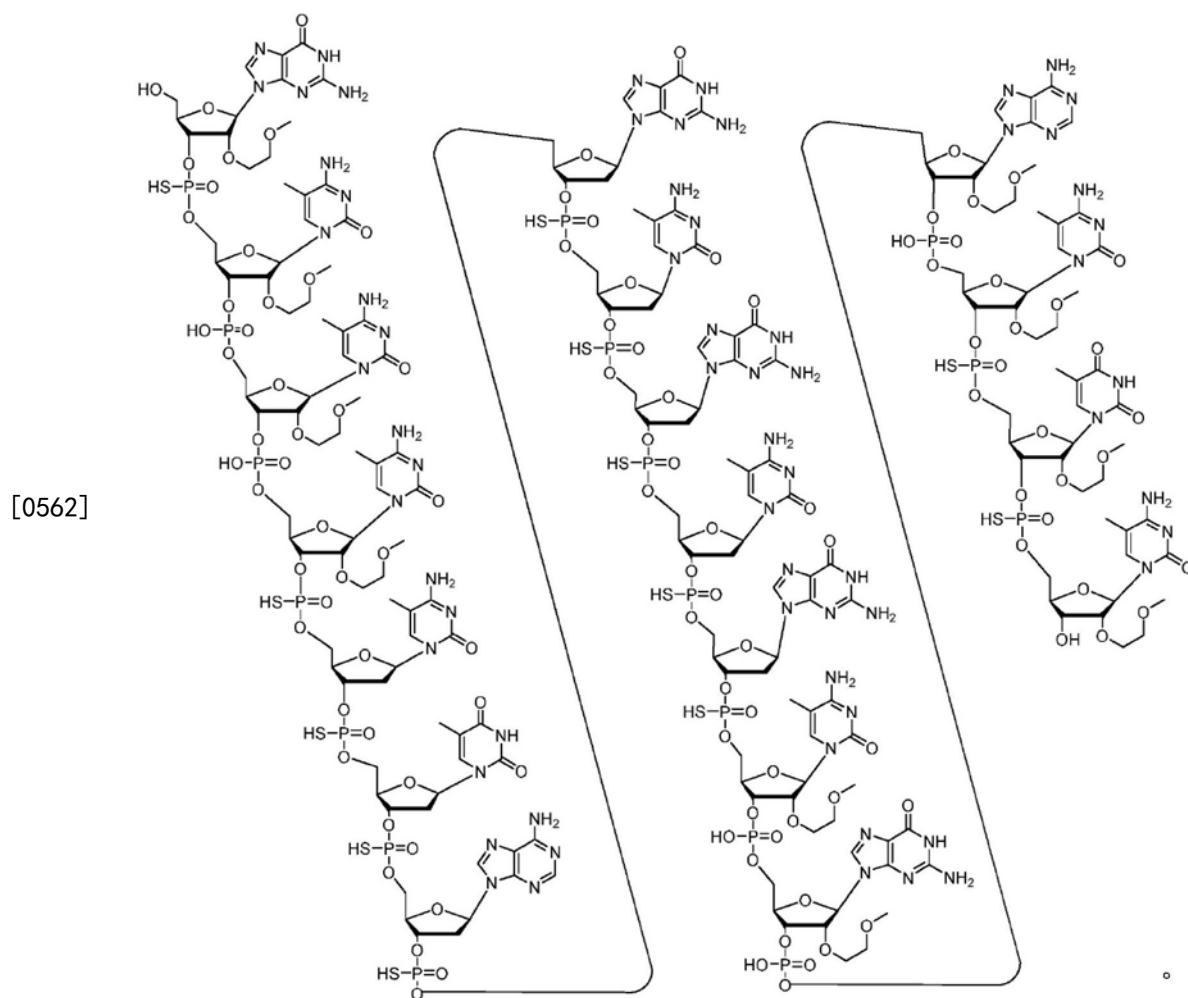
[0557] 实施方案31.如实施方案26-30所述的方法,其中所述施用减少核灶。

[0558] 实施方案32.如实施方案26-31所述的方法,其中所述施用降低C90RF72相关的RAN翻译产物的表达。

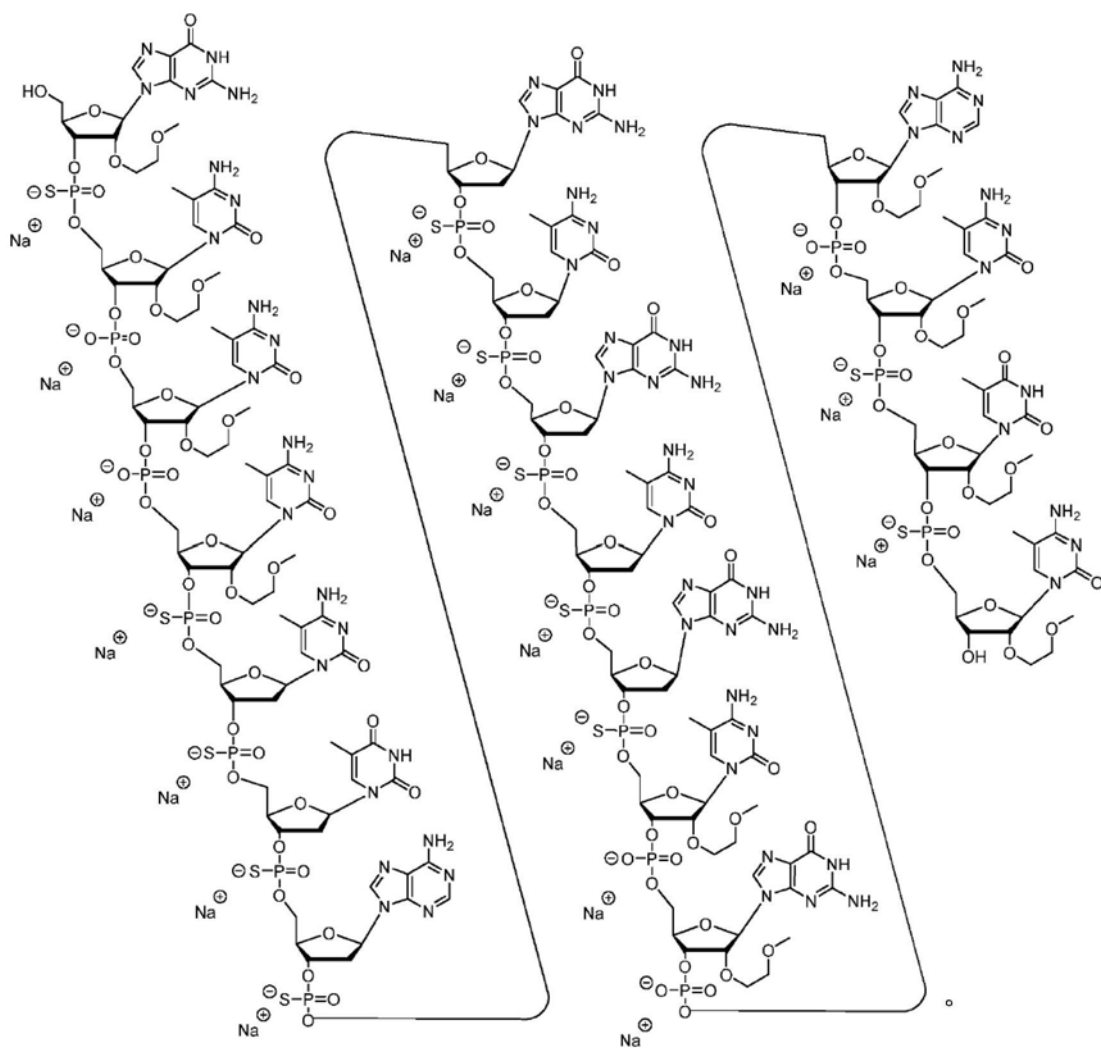
[0559] 实施方案33.如实施方案32所述的方法,其中所述C90RF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)中的任一种。

[0560] 实施方案34.如实施方案1-33中任一项所述的化合物或组合物的用途,其用于制造用于治疗神经退行性病症的药物。

[0561] 实施方案35.一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:

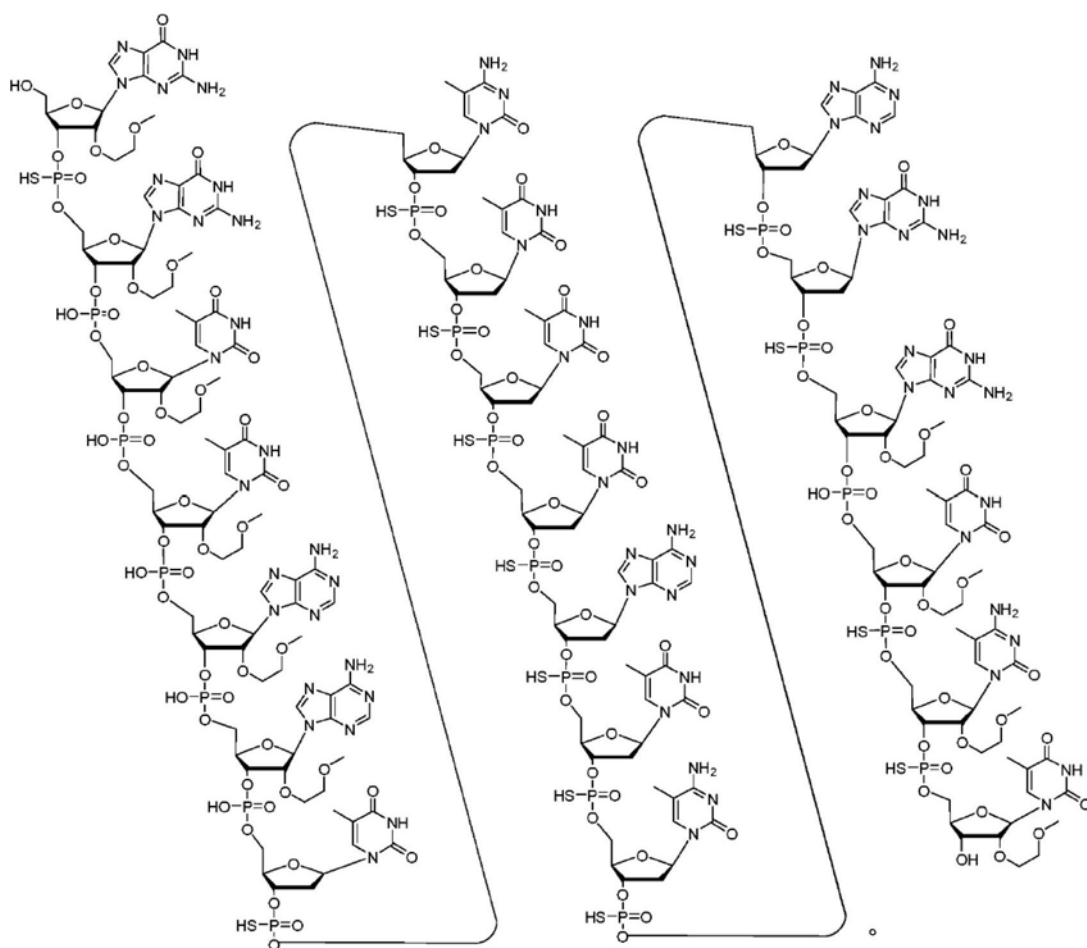


[0564]



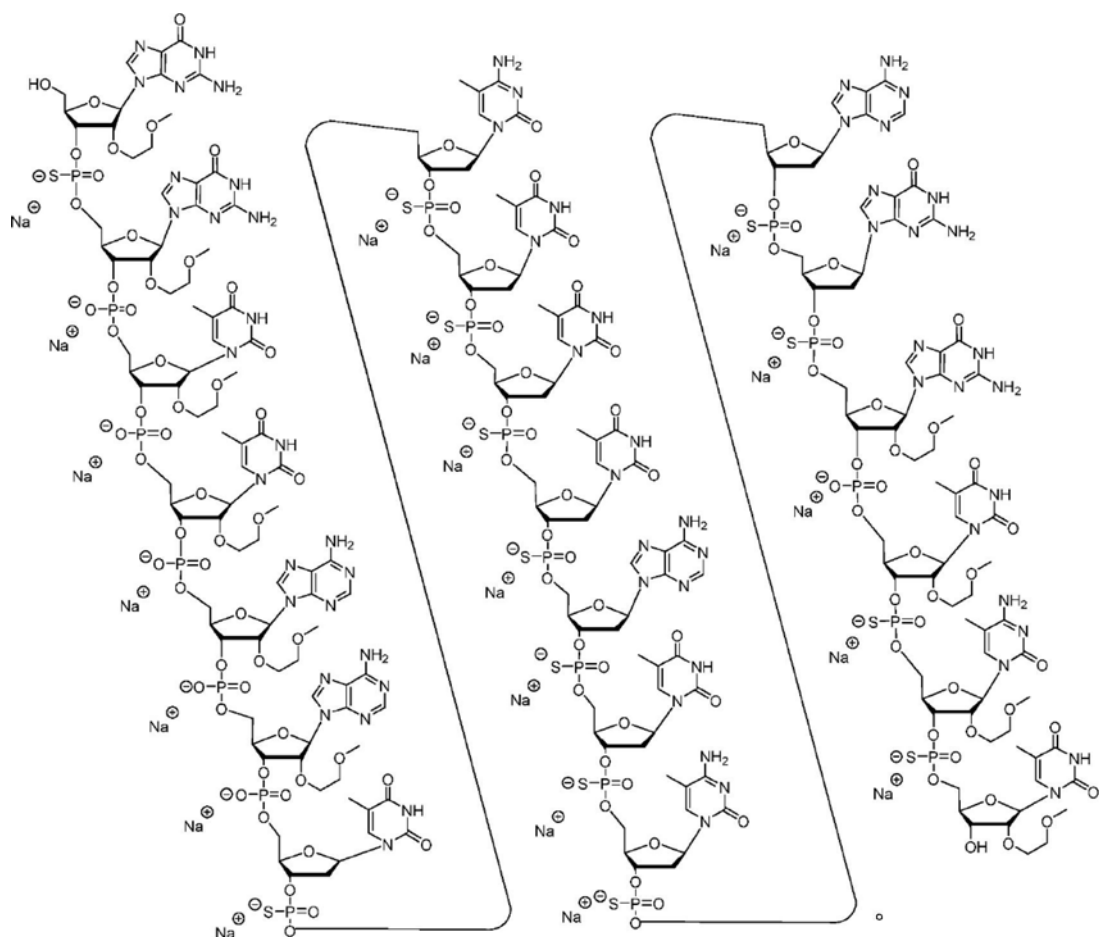
[0565] 实施方案37.一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:

[0566]



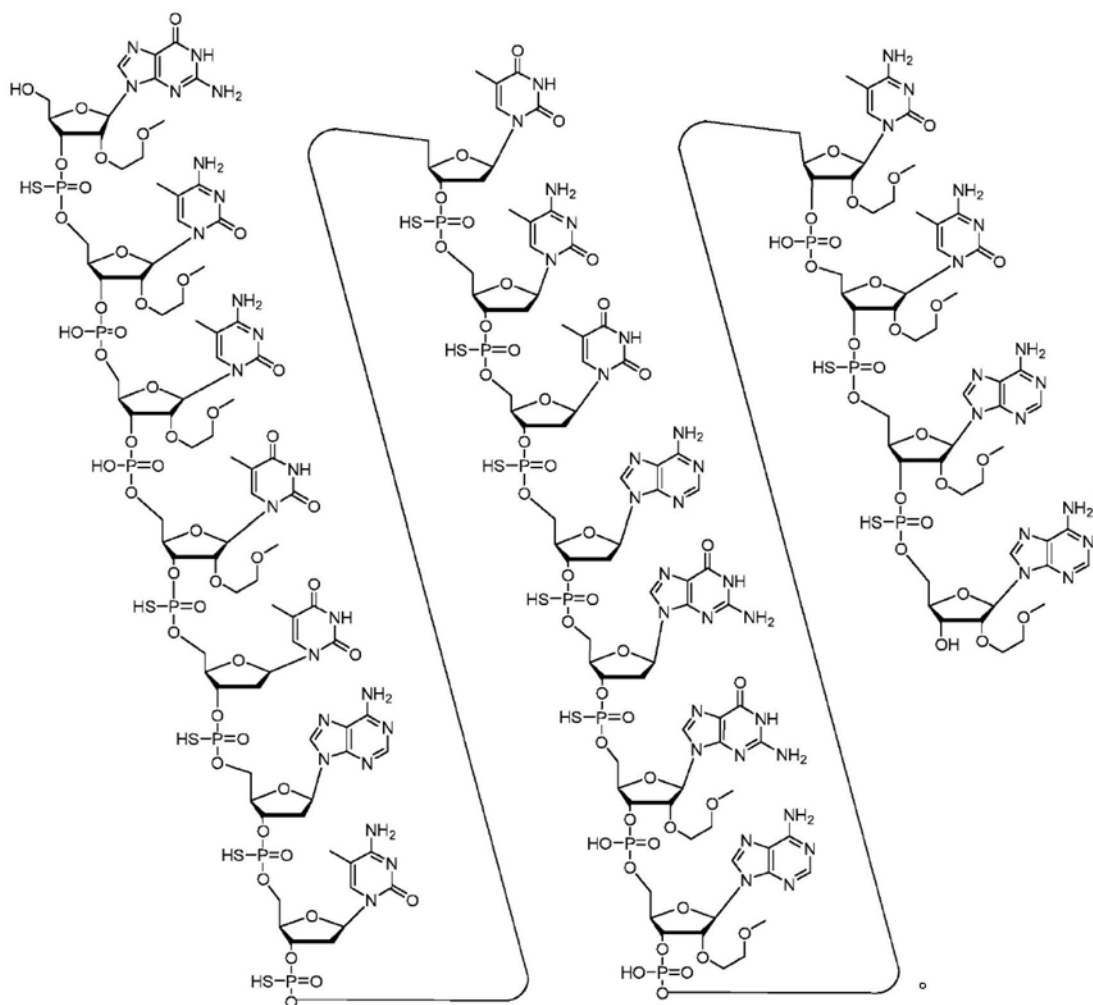
[0567] 实施方案38.一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:

[0568]



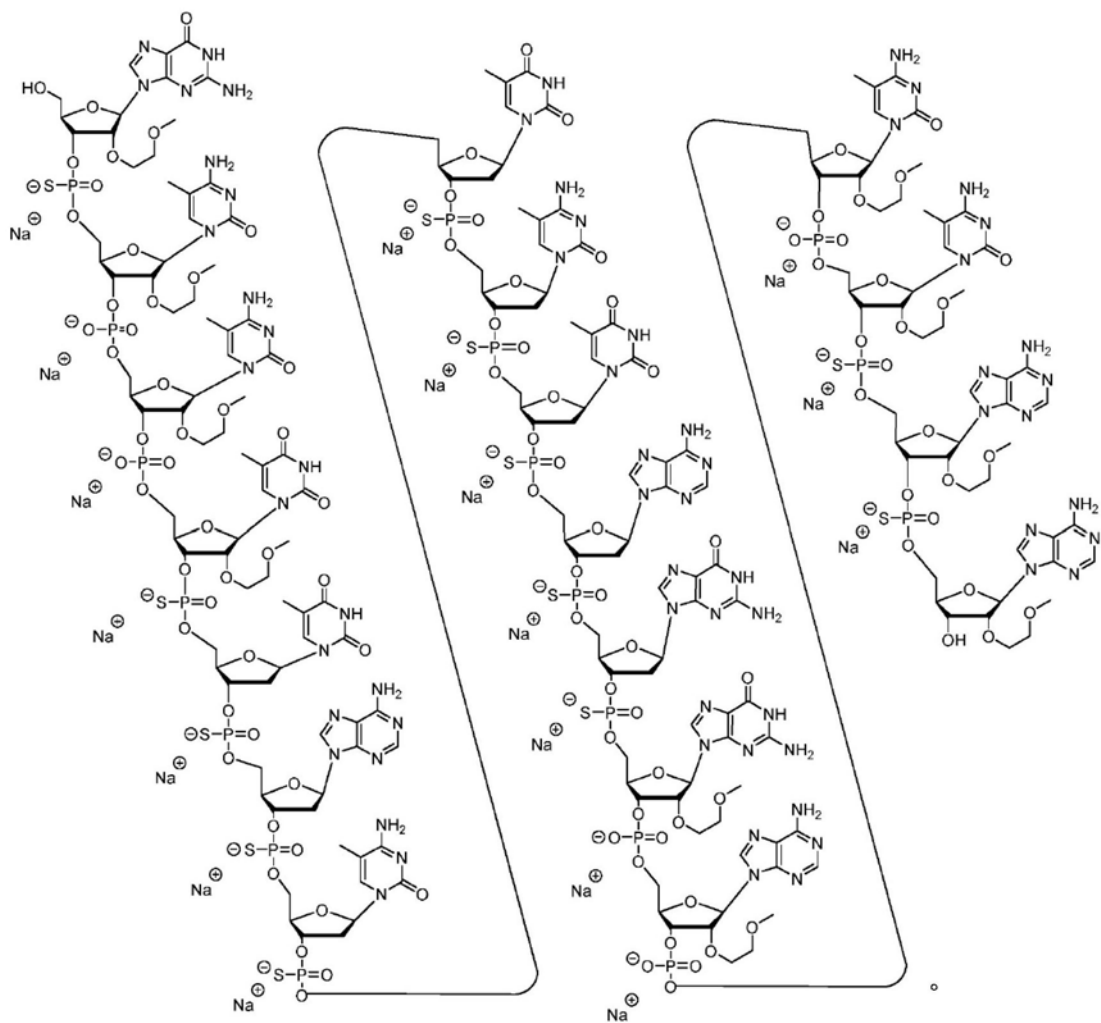
[0569] 实施方案39. 一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:

[0570]



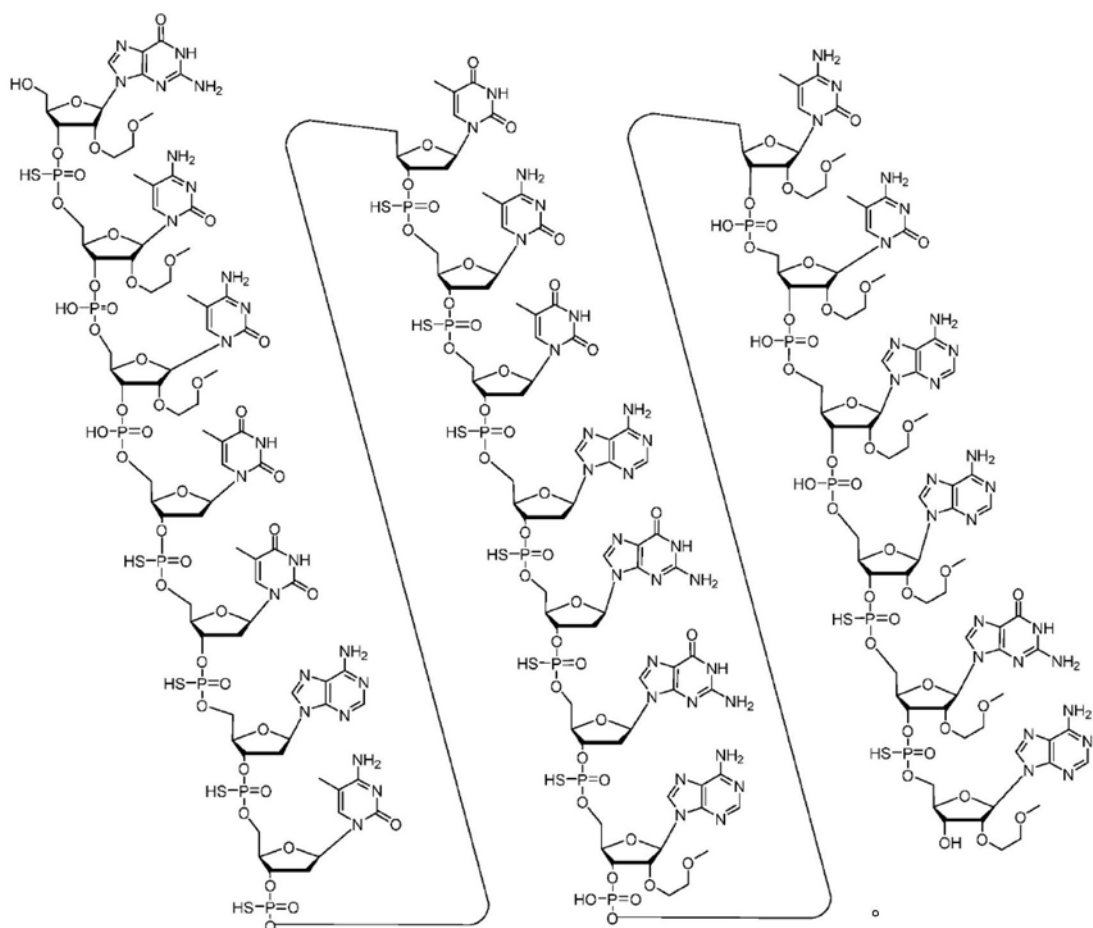
[0571] 实施方案40. 一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:

[0572]

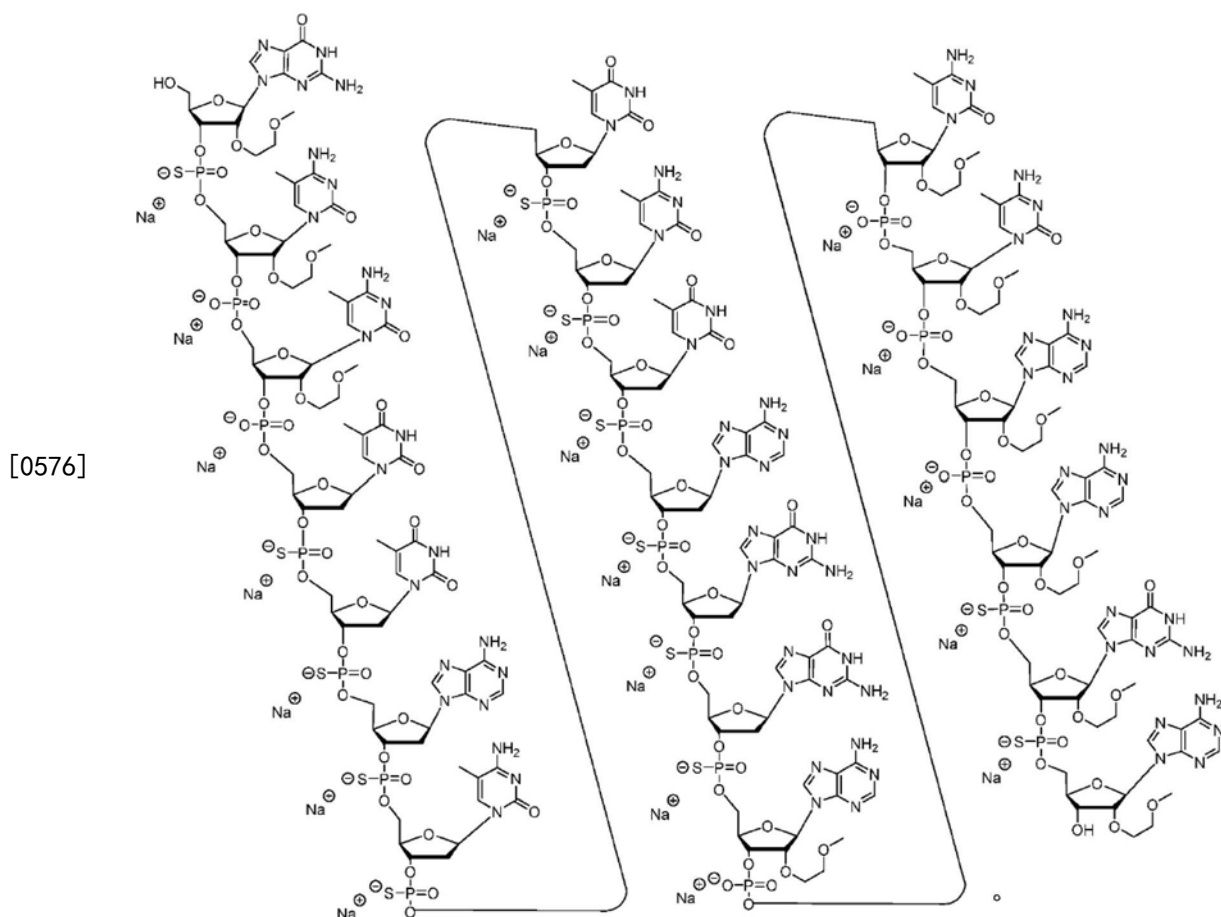


[0573] 实施方案41. 一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:

[0574]



[0575] 实施方案42.一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:



[0577] 实施方案43.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够降低哺乳动物中的人C90RF72 mRNA或蛋白质表达。

[0578] 实施方案44.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够改善肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征或橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)的至少一种症状。

[0579] 实施方案45.如实施方案44所述的化合物或组合物,其中所述ALS症状是运动缺陷、焦虑和去神经支配中的任一种。

[0580] 实施方案46.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够延迟疾病进展。

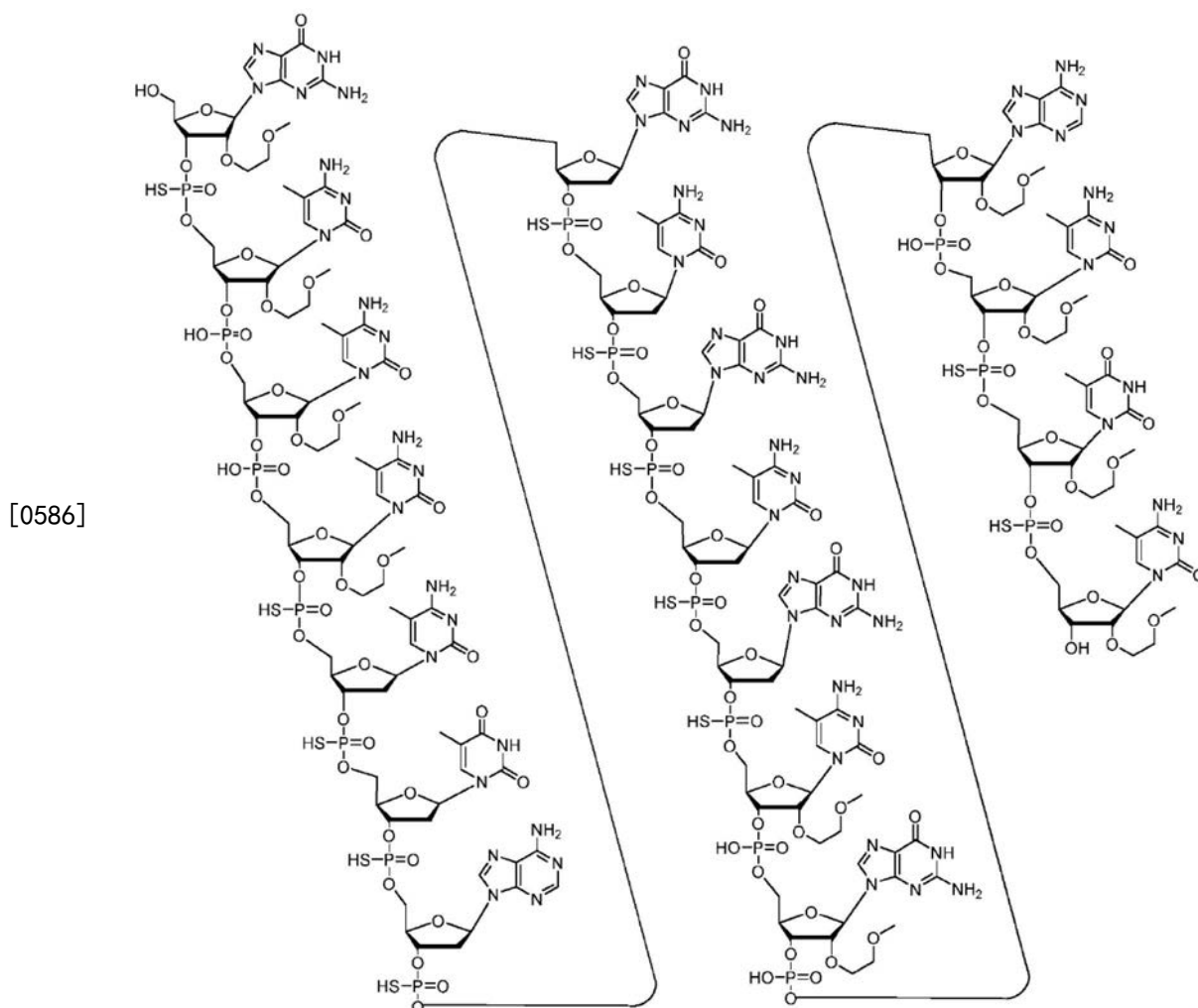
[0581] 实施方案47.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够延长存活。

[0582] 实施方案48.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够减少C90RF72相关的RAN翻译产物。

[0583] 实施方案49.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够选择性地减少C90RF72致病相关mRNA变体。

[0584] 实施方案50.如实施方案1-25或35-42中任一项所述的化合物或组合物,其中所述化合物或组合物能够减少核灶。

[0585] 实施方案51.一种根据下式由修饰的寡核苷酸组成的化合物,或其盐:



[0587] 实施方案52.一种方法,其包括向动物施用如实施方案51所述的化合物。

[0588] 实施方案53.如实施方案52所述的方法,其中所述动物是人。

[0589] 实施方案54.如实施方案53所述的方法,其中所述施用抑制C90RF72。

[0590] 实施方案55.如实施方案53所述的方法,其中所述施用预防、治疗、改善C90RF72相关疾病或减缓所述疾病的进展。

[0591] 实施方案56.如实施方案55所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病由六核苷酸重复序列扩增引起。

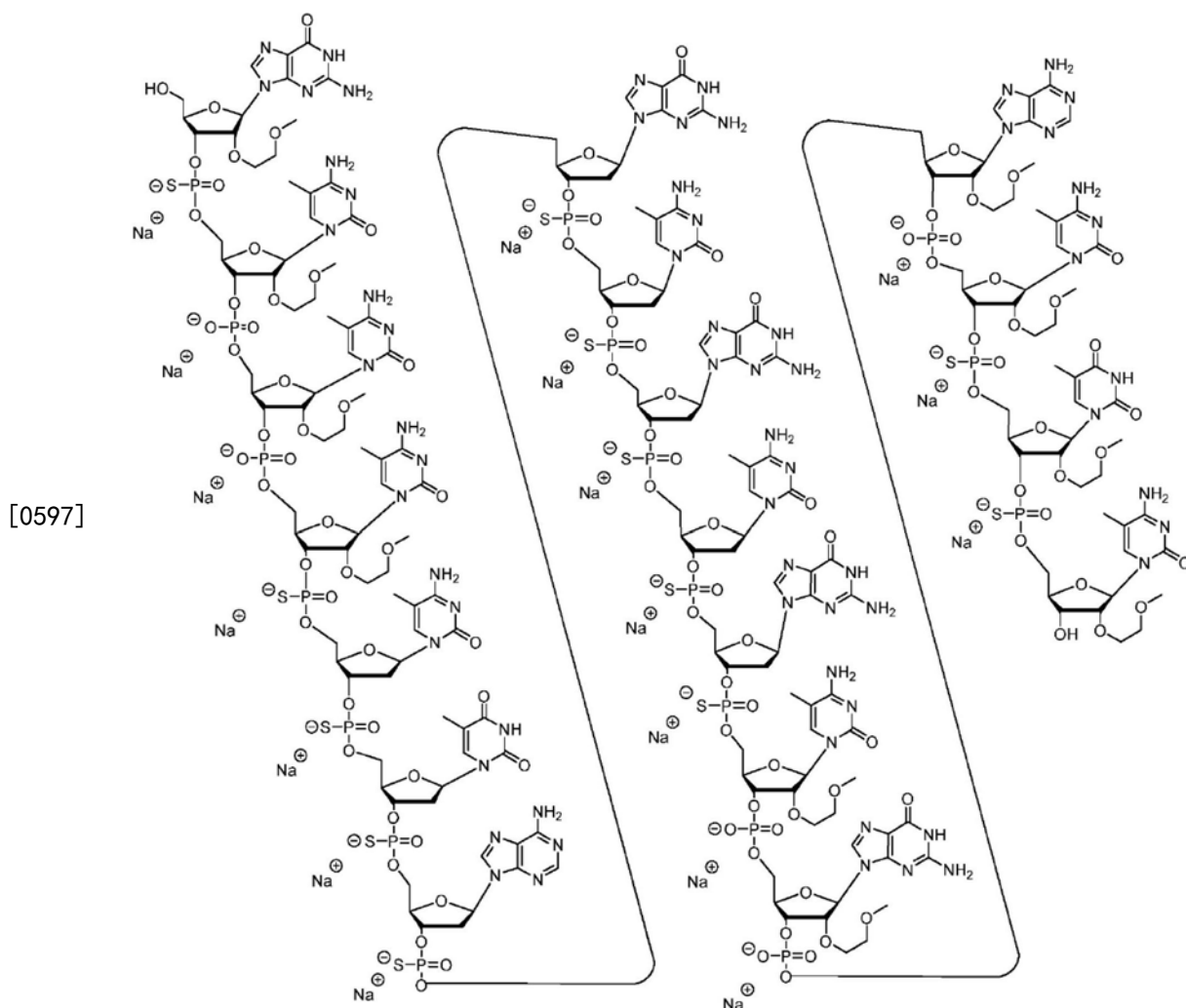
[0592] 实施方案57.如实施方案55所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病是肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征或橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)中的任一种。

[0593] 实施方案58.如实施方案53所述的方法,其中所述施用减少核灶。

[0594] 实施方案59.如实施方案53所述的方法,其中所述施用降低C90RF72相关的RAN翻译产物的表达。

[0595] 实施方案60.如实施方案59所述的方法,其中所述C90RF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)中的任一种。

[0596] 实施方案61.一种根据下式由修饰的寡核苷酸的钠盐组成的组合物:



[0598] 实施方案62.一种方法,其包括向动物施用如实施方案60所述的组合物。

[0599] 实施方案63.如实施方案62所述的方法,其中所述动物是人。

[0600] 实施方案64.如实施方案63所述的方法,其中所述施用抑制C90RF72。

[0601] 实施方案65.如实施方案62所述的方法,其中所述施用预防、治疗、改善C90RF72相关疾病或减缓所述疾病的进展。

[0602] 实施方案66.如实施方案65所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病由六核苷酸重复序列扩增引起。

[0603] 实施方案67.如实施方案65所述的方法,其中所述C90RF72相关疾病是肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、皮质基底变性综合征(CBD)、非典型帕金森综合征或橄榄体脑桥小脑退化症(OPCD)中的任一种。

[0604] 实施方案68.如实施方案63所述的方法,其中所述施用减少核灶。

[0605] 实施方案69.如实施方案63所述的方法,其中所述施用降低C90RF72相关的RAN翻译产物的表达。

[0606] 实施方案70.如实施方案69所述的方法,其中所述C90RF72相关的RAN翻译产物是聚-(甘氨酸-脯氨酸)、聚-(甘氨酸-丙氨酸)和聚-(甘氨酸-精氨酸)中的任一种。

实施例

[0607] 非限制性公开且以引用方式并入

[0608] 虽然已根据某些实施方案具体描述了本文所述的某些化合物、组合物和方法,但以下实施例仅用以说明本文所述的化合物并且不意图限制所述化合物。本申请中所述的各参考文献以引用的方式整体并入本文。

[0609] 实施例1:靶向人C90RF72的反义寡核苷酸

[0610] 下表中的反义寡核苷酸被设计为MOE缺口聚物。每个缺口聚物的中心缺口区段包含2'-脱氧核苷,并且由在5'端和3'端两者上含有各自包含2'-MOE基团的核苷的翼区段侧接。每个缺口聚物的特定基序列于下表,由通过连字符分隔的三个数字表示。这些数字分别表示5'-翼、缺口和和3'-翼中核苷的数目。整个各寡核苷酸中的所有胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。缺口聚物的核苷间键联是混合的硫代磷酸酯和磷酸二酯键联。每个缺口聚物的核苷间键联在键联列中呈现,其中'o'指示磷酸二酯键联,并且's'指示硫代磷酸酯键联。

[0611] 下表中列出的每个反义寡核苷酸靶向于人C90RF72基因组序列,本文中命名为SEQ ID NO:2 (从核苷27535000至27565000截短的GENBANK登录号NT_008413.18的补体)。“起始位点”表示人基因组序列中缺口聚物所靶向的最5'核苷酸。“终止位点”表示人基因组序列中缺口聚物所靶向的最3'核苷酸。

[0612] 表6靶向人C90RF72的反义寡核苷酸

[0613]

Isis No.	起始位点	终止位点	序列	键联	基序	SEQ ID NO
791656	1445	1464	CCGGCCCCTAGCGCGCGACT	SOOSSSSSSSSSOOOSS	3-10-7	22
791657	1445	1464	CCGGCCCCTAGCGCGCGACT	SOOSSSSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	22
791658	1445	1464	CCGGCCCCTAGCGCGCGACT	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	6-10-4	22
791659	1445	1464	CCGGCCCCTAGCGCGCGACT	SOOOOOSSSSSSSSSSSSS	7-10-3	22
791660	1445	1463	CGGCCCTAGCGCGCGACT	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	5-9-5	23
791661	1446	1464	CCGGCCCCTAGCGCGCGAC	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	5-9-5	24
791662	1445	1463	CGGCCCTAGCGCGCGACT	SOOSSSSSSSSSSSOOOSS	4-9-6	23
791663	1446	1464	CCGGCCCCTAGCGCGCGAC	SOOSSSSSSSSSSSOOOSS	4-9-6	24
791664	1445	1463	CGGCCCTAGCGCGCGACT	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	6-9-4	23
791665	1446	1464	CCGGCCCCTAGCGCGCGAC	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	6-9-4	24
801274	1440	1459	CCCTAGCGCGCGACTCCTGA	SOOSSSSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	25
801275	1441	1460	CCCCTAGCGCGCGACTCCTG	SOOSSSSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	26
801276	1442	1461	GCCCCTAGCGCGCGACTCCT	SOOSSSSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	27
801277	1443	1462	GGCCCCTAGCGCGCGACTCC	SOOSSSSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	28
801278	1444	1463	CGGCCCTAGCGCGCGACTC	SOOSSSSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	29
801279	1440	1459	CCCTAGCGCGCGACTCCTGA	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	6-10-4	25
801280	1441	1460	CCCCTAGCGCGCGACTCCTG	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	6-10-4	26
801281	1442	1461	GCCCCTAGCGCGCGACTCCT	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	6-10-4	27
801282	1443	1462	GGCCCCTAGCGCGCGACTCC	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	6-10-4	28
801283	1444	1463	CGGCCCTAGCGCGCGACTC	SOOOOOSSSSSSSSSSOSS	6-10-4	29
801284	1441	1458	CCTAGCGCGCGACTCCTG	SOOSSSSSSSSSOOOSS	4-8-6	30
801285	1442	1459	CCCTAGCGCGCGACTCCT	SOOSSSSSSSSSOOOSS	4-8-6	31

[0614]

801286	1443	1460	CCCCTAGCGCGCGACTCC	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-8-6	32
801287	1444	1461	GCCCCTAGCGCGCGACTC	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-8-6	33
801288	1445	1462	GGCCCCTAGCGCGCGACT	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-8-6	34
801289	1446	1463	CGGCCCTAGCGCGCGAC	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-8-6	35
801290	1441	1458	CCTAGCGCGCGACTCCTG	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	30
801291	1442	1459	CCCTAGCGCGCGACTCCT	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	31
801292	1443	1460	CCCCTAGCGCGCGACTCC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	32
801293	1444	1461	GCCCCTAGCGCGCGACTC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	33
801294	1445	1462	GGCCCCTAGCGCGCGACT	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	34
801295	1446	1463	CGGCCCTAGCGCGCGAC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	35
801296	1403	1422	AGGCTGCGGTTGTTTCCCTC	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-10-6	36
801297	1404	1423	CAGGCTGCGGTTGTTTCCCT	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-10-6	37
801298	1403	1421	GGCTGCGGTTGTTTCCCTC	SOOOOSSSSSSSSOSS	5-9-5	38
801299	1404	1422	AGGCTGCGGTTGTTTCCCT	SOOOOSSSSSSSSOSS	5-9-5	39
801300	1405	1423	CAGGCTGCGGTTGTTTCCC	SOOOOSSSSSSSSOSS	5-9-5	40
801301	1403	1421	GGCTGCGGTTGTTTCCCTC	SOOOOSSSSSSSSOSS	4-9-6	38
801302	1404	1422	AGGCTGCGGTTGTTTCCCT	SOOOOSSSSSSSSOSS	4-9-6	39
801303	1405	1423	CAGGCTGCGGTTGTTTCCC	SOOOOSSSSSSSSOSS	4-9-6	40
801304	1403	1421	GGCTGCGGTTGTTTCCCTC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-9-4	38
801305	1404	1422	AGGCTGCGGTTGTTTCCCT	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-9-4	39
801306	1405	1423	CAGGCTGCGGTTGTTTCCC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-9-4	40
801307	1403	1420	GCTGCGGTTGTTTCCCTC	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-8-6	41
801308	1404	1421	GGCTGCGGTTGTTTCCCT	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-8-6	42
801309	1405	1422	AGGCTGCGGTTGTTTCCC	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-8-6	43
801310	1406	1423	CAGGCTGCGGTTGTTTCC	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-8-6	44
801311	1403	1420	GCTGCGGTTGTTTCCCTC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	41
801312	1404	1421	GGCTGCGGTTGTTTCCCT	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	42
801313	1405	1422	AGGCTGCGGTTGTTTCCC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	43
801314	1406	1423	CAGGCTGCGGTTGTTTCC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-8-4	44
801315	1403	1422	AGGCTGCGGTTGTTTCCCTC	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-10-4	36
801316	1404	1423	CAGGCTGCGGTTGTTTCCCT	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-10-4	37
802459	7990	8009	GCCTTACTCTAGGACCAAGA	SOOSSSSSSSSSOOSS	3-10-7	21
802460	8012	8031	TCTGTCTTTGGAGCCCAAAT	SOOSSSSSSSSSOOSS	3-10-7	45
802461	8186	8205	CTGCGATCCCCATTCCAGTT	SOOSSSSSSSSSOOSS	3-10-7	46
802462	7990	8009	GCCTTACTCTAGGACCAAGA	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-10-6	21
802463	8012	8031	TCTGTCTTTGGAGCCCAAAT	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-10-6	45
802464	8186	8205	CTGCGATCCCCATTCCAGTT	SOOSSSSSSSSSOOSS	4-10-6	46
802465	7990	8009	GCCTTACTCTAGGACCAAGA	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-10-4	21
802466	8012	8031	TCTGTCTTTGGAGCCCAAAT	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-10-4	45
802467	8186	8205	CTGCGATCCCCATTCCAGTT	SOOOOSSSSSSSSOSS	6-10-4	46
802468	7990	8009	GCCTTACTCTAGGACCAAGA	SOOOOOOSSSSSSSSSS	7-10-3	21
802469	8012	8031	TCTGTCTTTGGAGCCCAAAT	SOOOOOOSSSSSSSSSS	7-10-3	45
802470	8186	8205	CTGCGATCCCCATTCCAGTT	SOOOOOOSSSSSSSSSS	7-10-3	46

[0615]

802471	7992	8009	GCCTTACTCTAGGACCAA	SOSSSSSSSSSOOOOSS	3-8-7	47
802472	8014	8031	TCTGTCTTTGGAGCCCAA	SOSSSSSSSSSOOOOSS	3-8-7	48
802473	7992	8009	GCCTTACTCTAGGACCAA	SOSSSSSSSSSOOOOSS	4-8-6	47
802474	8014	8031	TCTGTCTTTGGAGCCCAA	SOSSSSSSSSSOOOOSS	4-8-6	48
802475	7992	8009	GCCTTACTCTAGGACCAA	SOOOSSSSSSSSSOSS	6-8-4	47
802476	8014	8031	TCTGTCTTTGGAGCCCAA	SOOOSSSSSSSSSOSS	6-8-4	48
802477	7992	8009	GCCTTACTCTAGGACCAA	SOOOOOSSSSSSSSSS	7-8-3	47
802478	8014	8031	TCTGTCTTTGGAGCCCAA	SOOOOOSSSSSSSSSS	7-8-3	48
806673	1370	1389	GGTTAATCTTTATCAGGTCT	SOSSSSSSSSSOOOOSS	3-10-7	49
806674	1371	1390	TGGTTAATCTTTATCAGGTC	SOSSSSSSSSSOOOOSS	3-10-7	50
806675	1372	1391	CTGGTTAATCTTTATCAGGT	SOSSSSSSSSSOOOOSS	3-10-7	51
806676	1370	1389	GGTTAATCTTTATCAGGTCT	SOOOSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	49
806677	1371	1390	TGGTTAATCTTTATCAGGTC	SOOOSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	50
806678	1372	1391	CTGGTTAATCTTTATCAGGT	SOOOSSSSSSSSOOOSS	4-10-6	51
806679	1370	1389	GGTTAATCTTTATCAGGTCT	SOOOOOSSSSSSSSOSS	6-10-4	49
806680	1371	1390	TGGTTAATCTTTATCAGGTC	SOOOOOSSSSSSSSOSS	6-10-4	50
806681	1372	1391	CTGGTTAATCTTTATCAGGT	SOOOOOSSSSSSSSOSS	6-10-4	51
806682	1370	1389	GGTTAATCTTTATCAGGTCT	SOOOOOSSSSSSSSSS	7-10-3	49
806683	1371	1390	TGGTTAATCTTTATCAGGTC	SOOOOOSSSSSSSSSS	7-10-3	50
806684	1372	1391	CTGGTTAATCTTTATCAGGT	SOOOOOSSSSSSSSSS	7-10-3	51
806685	1371	1388	GTAAATCTTTATCAGGTC	SOSSSSSSSSSOOOOSS	4-8-6	52
806686	1372	1389	GGTTAATCTTTATCAGGT	SOSSSSSSSSSOOOOSS	4-8-6	53
806687	1373	1390	TGGTTAATCTTTATCAGG	SOSSSSSSSSSOOOOSS	4-8-6	54
806688	1440	1457	CTAGCGCGCGACTCCTGA	SOSSSSSSSSSOOOOSS	4-8-6	55
806689	1371	1388	GTAAATCTTTATCAGGTC	SOOOSSSSSSSSSOSS	6-8-4	52
806690	1372	1389	GGTTAATCTTTATCAGGT	SOOOSSSSSSSSSOSS	6-8-4	53
806691	1373	1390	TGGTTAATCTTTATCAGG	SOOOSSSSSSSSSOSS	6-8-4	54
806692	1440	1457	CTAGCGCGCGACTCCTGA	SOOOSSSSSSSSSOSS	6-8-4	55

[0616] 实施例2:小鼠中靶向人C90RF72的反义寡核苷酸的耐受性

[0617] 在小鼠中测试上述反义寡核苷酸以评估寡核苷酸的耐受性。野生型C57/B16小鼠各自接受700 μ g的下表中列出的反义寡核苷酸的单个ICV剂量。每个处理组由4只小鼠组成。在注射后3小时,根据7个不同的标准评价每只小鼠。所述7个标准是(1)小鼠敏捷、机警且有反应;(2)在无刺激时小鼠是站立的或蜷缩的;(3)在无刺激时小鼠表现出任何运动;(4)在被提起之后小鼠表现出向前的运动;(5)在被提起之后小鼠表现出任何运动;(6)小鼠对尾部夹痛有反应;(7)均匀呼吸。对于7个不同标准中的每一个,每只小鼠如果满足标准则给予其0的分项分数,如果不满足,则给予其1的分项分数。评价了所有7个标准之后,对每只小鼠的分项分数求和,且然后对每个组求平均值。例如,如果小鼠在700 μ g ICV剂量后3小时敏捷、机警且有反应,并且满足所有其他标准,则它将得到0的总和分数。例如,如果小鼠在700 μ g ICV剂量后3小时不是敏捷、机警且有反应的,但满足所有其他标准,则它将得到1的分数。结果表示为每个处理组的平均分数。

[0618] 表7

[0619] 急性耐受性分数

[0620]

Isis No.	分数
791656	3.25
791657	4.25
791658	3.50
791659	2.00
791660	4.00
791661	4.50
791662	5.25
791663	6.00
791664	3.00
791665	5.75
801274	1.75
801275	3.75
801276	1.25
801277	1.50
801278	1.75
801279	1.25
801280	6.00
801281	0.00
801282	1.25
801283	1.25
801284	3.00
801285	1.00
801286	1.00
801287	1.50
801288	2.50
801289	7.00
801290	6.00
801291	3.00
801292	2.00
801293	1.00
801294	3.25
801295	4.50
801296	6.25

[0621]

801297	4.75
801298	5.50
801299	6.25
801300	5.00
801301	6.00
801302	6.50
801303	4.00
801304	5.25
801305	6.00
801306	6.00
801307	5.00
801308	6.00
801309	7.00
801310	3.50
801311	5.50
801312	2.50
801313	5.25
801314	4.50
801315	4.00
801316	2.00
802459	2.00
802460	6.75
802461	1.75
802462	5.75
802463	6.75
802464	1.75
802465	2.25
802466	4.25
802467	0.25
802468	3.25
802469	2.00
802470	0.25
802471	1.25
802472	4.00
802473	0.25
802474	5.25
802475	1.00
802476	5.50
802477	2.50
802478	6.25
806673	0.00
806674	0.25
806675	0.00

[0622]

806676	0.00
806677	1.00
806678	0.00
806679	1.50
806680	1.00
806681	0.00
806682	5.75
806683	3.75
806684	2.25
806685	1.00
806686	1.00
806687	3.25
806688	3.25
806689	3.00
806690	1.25
806691	6.25

[0623] 实施例3:来自W0 2014/062691的寡核苷酸的耐受性

[0624] 在小鼠中的急性耐受性研究中测试在W0 2014/062691中描述的寡核苷酸。对3只野生型C57/B16小鼠的组进行测试且如在实施例2中所描述进行分析。所测试的寡核苷酸包括列于下表的那些,其是具有完整硫代磷酸酯主链的5'-10'-5MOE缺口聚物,并且每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。示出SEQ ID NO:2上的每个寡核苷酸所靶向的起始位点和终止位点。结果在下表中表示为每个处理组的平均分数。这些结果证明ISIS 576816、ISIS 576974、ISIS 577061、ISIS 577065、ISIS577083和ISIS 577056耐受性较差。

[0625] 表8

[0626] 在来自W0 2014/062691的反义寡核苷酸处理后第3小时的急性耐受性分数

[0627]

Isis No.	起始位点	终止位点	序列	分数	SEQ ID NO
576816	7990	8009	GCCTTACTCTAGGACCAAGA	7.00	21
576974	28251	28270	GGGACACTACAAGGTAGTAT	5.67	56
577061	1406	1425	TACAGGCTGCGGTTGTTTCC	7.00	57
577065	1446	1465	CCCGGCCCTAGCGCGCGAC	6.00	58
577083	3452	3471	GGTAACTTCAAACCTCTTGGG	7.00	59

[0628] 表9

[0629] 在来自W0 2014/062691的反义寡核苷酸处理后第3小时的急性耐受性分数

[0630]

Isis No.	起始位点	终止位点	序列	分数	SEQ ID NO
577056	1366	1385	AATCTTTATCAGGTCCTTTC	6.5	60

[0631] 实施例4:HepG2细胞中人C90RF72 mRNA变体的反义抑制

[0632] 将以上所述的反义寡核苷酸在体外针对其对C90RF72 mRNA的作用进行测试。用反义寡核苷酸电穿孔密度为每孔20,000个细胞的培养的HepG2细胞。在约24小时的处理期后,从所述细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量C90RF72 mRNA水平。使用人引物探针集RTS3905(正向引物序列GGGTCTAGCAAGAGCAGGTG,在本文中指定为SEQ ID NO:12;反向引物

序列GTCTTGGAACAGCTGGAGAT,在本文中指定为SEQ ID NO:13;探针序列TGATGTCGACTCTTTGCCACCGC,在本文中指定为SEQ ID NO:14-一种TAQ-man引物探针集)。RTS3905检测从含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体加工的mRNA变体(例如NM_001256054.1)。从含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体加工的mRNA变体在本文中是“C90RF72致病相关mRNA变体”。当前体mRNA的转录在从外显子1A的起始位点至外显子1B的起始位点的区域(一般来说,基因组序列:SEQ ID NO:2的核苷酸1107至1520,从核苷酸27535000至2756500截短的GENBANK登录号NT_008413.18的补体)中开始时,前体mRNA包含六核苷酸重复序列。因此,在此区域中设计的寡核苷酸选择性地靶向含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体。RTS3905测量含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体的mRNA产物(即C90RF72致病相关mRNA变体),且因此测量含有六核苷酸重复序列的前体mRNA变体的减少。将C90RF72致病相关mRNA变体的水平标准化至细胞的总RNA含量(如通过RIBOGREEN®所测量),然后将标准化的mRNA变体水平与未用反义寡核苷酸处理的细胞的那些mRNA变体水平进行比较。

[0633] 实施例5:人C90RF72 mRNA变体的剂量依赖性反义抑制

[0634] 在HepG2细胞中以各种剂量测试以上所述的反义寡核苷酸。将细胞以每孔20,000个细胞的密度接种且用反义寡核苷酸电穿孔。在约16小时或24小时的处理期后,从所述细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量C90RF72 mRNA水平。人C90RF72引物探针集RTS3905用于测量C90RF72致病相关mRNA变体。将C90RF72致病相关mRNA变体的水平根据总RNA含量进行调整,如通过RIBOGREEN®所测量。每种寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)基于在每个单独剂量的反义寡核苷酸下观察到的mRNA变体水平的抑制进行计算。

[0635] 实施例6:在LLC-MK2细胞中通过人-恒河猴交叉反应性反义寡核苷酸进行的C90RF72的反义抑制

[0636] 将以上描述的与恒河猴C90RF72核酸完全交叉反应的反义寡核苷酸针对其在体外对恒河猴C90RF72 mRNA的作用进行测试。用反义寡核苷酸电穿孔密度为每孔20,000个细胞的培养的恒河猴LLC-MK2细胞。在约24小时的处理期后,从所述细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量C90RF72 mRNA水平。使用引物探针集RTS3750(正向序列TGTGACAGTTGGAATGCAGTGA,在本文中指定为SEQ ID NO:15;反向序列GCCACTTAAAGCAATCTCTGTCTTG,在本文中指定为SEQ ID NO:16;探针序列TCGACTCTTTGCCACCGCCA,在本文中指定为SEQ ID NO:17-一种TAQ-man引物探针集)来测量总C90RF72mRNA水平。RTS3750靶向mRNA转录物的外显子2且因此测量总mRNA转录物。将C90RF72 mRNA水平根据总RNA含量(如通过RIBOGREEN®所测量)进行调整,然后将标准化的mRNA变体水平与未用反义寡核苷酸处理的细胞的那些mRNA变体水平进行比较。

[0637] 实施例7:LLC-MK2中人C90RF72 mRNA的剂量依赖性反义抑制

[0638] 在LLC-MK2细胞中以各种剂量测试以上所述的反义寡核苷酸。将细胞以每孔20,000个细胞的密度接种且用反义寡核苷酸电穿孔。在约16小时或24小时的处理期后,从所述细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量C90RF72 mRNA水平。引物探针集RTS3750用于测量总C90RF72 mRNA水平。将C90RF72 mRNA水平根据总RNA含量(如通过RIBOGREEN®所测量)进行调整,然后将标准化的mRNA变体水平与未用反义寡核苷酸处理的细胞的那些mRNA变体

水平进行比较。

[0639] 实施例8:转基因小鼠模型中人C9ORF72 mRNA的反义抑制

[0640] 将以上所述的反义寡核苷酸在两种BAC转基因小鼠系(在本文中指定为C9B41和C9B183)中进行测试,所述小鼠系各自表达包含外显子1-5的截短的人C9ORF72基因。C9B41和C9B183小鼠系的截短的人C9ORF72基因分别包含110和450个六核苷酸重复序列。每个处理组中的每只小鼠接受350 μ g的反义寡核苷酸,然后通过RT-PCR分析人C9ORF72 RNA的表达水平。还执行剂量反应。

[0641] 实施例9:患者成纤维细胞中C9ORF72 mRNA的反义抑制

[0642] 将以上所述的反义寡核苷酸在体外针对其对C9ORF72 mRNA的作用进行测试。将下表中列出的反义寡核苷酸添加至板中,之后以每孔20,000个细胞的密度添加患者成纤维细胞F09-152。在添加细胞后反义寡核苷酸的最终浓度列于下表。在30秒振荡后,将细胞电穿孔,然后转移至Primaria涂覆的培养板。在16小时后,从所述细胞分离RNA,且通过RT-qPCR测量总C9ORF72 mRNA(即,从外显子1A开始的mRNA和从外显子1B开始的mRNA)水平和致病相关mRNA的水平(参见实施例4)。人引物探针集RTS 3750(参见实施例6)和RTS3905(参见实施例4)分别用于检测总C9ORF72 mRNA和C9ORF72致病相关mRNA。将C9ORF72总mRNA和C9ORF72致病相关mRNA的水平标准化至细胞的总RNA含量(如通过 RIBOGREEN®所测量),然后将标准化的mRNA水平与未用反义寡核苷酸处理的细胞的那些mRNA变体水平进行比较。结果在下表中示出。条目“nd”是指未测定。列为“nd”的IC₅₀值未测定,因为靶标未被充分抑制来测定IC₅₀。结果表明,以下列出的所有寡核苷酸抑制致病相关C9ORF72 mRNA变体。不特异性地靶向重复序列变体前体mRNA的寡核苷酸抑制致病相关C9ORF72 mRNA和总C9ORF72mRNA两者。特异性地靶向重复序列变体前体mRNA的寡核苷酸选择性地抑制致病相关C9ORF72 mRNA。

[0643] 表10

[0644] 在患者成纤维细胞中反义抑制之后的C9ORF72 mRNA水平

Isis No.	浓度 (μ M)	总 C9ORF72 mRNA		致病相关C9ORF72 mRNA	
		水平(% UTC)	IC ₅₀ (μ M)	水平(% UTC)	IC ₅₀ (μ M)
791658	0.12	87	nd	26	< 0.1
	0.60	80		9	
	3.00	87		nd	
	15.00	105		4	
791664	0.12	85	nd	13	< 0.1
	0.60	101		7	
	3.00	125		4	
	15.00	114		3	
801278	0.12	91	nd	19	< 0.1
	0.60	71		7	
	3.00	85		nd	

[0645]

	15.00	90		nd	
801279	0.12	98	nd	57	0.12
	0.60	77		27	
	3.00	77		3	
	15.00	86		5	
801282	0.12	100	nd	51	0.08
	0.60	84		12	
	3.00	97		6	
	15.00	190		nd	
801283	0.12	87	nd	40	< 0.1
	0.60	75		8	
	3.00	94		4	
	15.00	111		4	
801285	0.12	103	nd	35	< 0.1
	0.60	78		23	
	3.00	75		7	
	15.00	79		6	
801286	0.12	94	nd	33	< 0.1
	0.60	85		14	
	3.00	97		5	
	15.00	88		3	
801287	0.12	85	nd	31	< 0.1
	0.60	76		11	
	3.00	77		9	
	15.00	87		2	
801288	0.12	77	nd	13	< 0.1
	0.60	86		11	
	3.00	123		5	
	15.00	177		3	
801292	0.12	69	nd	29	< 0.1
	0.60	71		12	
	3.00	82		3	
	15.00	71		nd	
801293	0.12	77	nd	51	0.09

[0646]

	0.60	70		10	
	3.00	74		3	
	15.00	81		1	
801294	0.12	75	nd	27	< 0.1
	0.60	67		9	
	3.00	107		7	
	15.00	146		2	
801316	0.12	73	nd	35	< 0.1
	0.60	68		7	
	3.00	65		1	
	15.00	78		1	
802459	0.12	58	0.10	75	0.18
	0.60	15		6	
	3.00	2		11	
	15.00	1		6	
802464	0.12	81	0.39	69	0.21
	0.60	31		23	
	3.00	6		7	
	15.00	2		3	
802465	0.12	40	< 0.1	35	< 0.1
	0.60	7		7	
	3.00	2		nd	
	15.00	1		nd	
802468	0.12	52	0.10	40	< 0.1
	0.60	15		13	
	3.00	3		7	
	15.00	2		nd	
802469	0.12	69	0.17	57	~ 0.5
	0.60	16		9	
	3.00	4		nd	
	15.00	1		nd	
802471	0.12	71	0.27	54	0.12
	0.60	29		20	
	3.00	6		6	

[0647]

	15.00	7		nd	
802473	0.12	63	0.18	48	< 0.1
	0.60	27		14	
	3.00	8		11	
	15.00	4		nd	
802477	0.12	54	0.12	32	< 0.1
	0.60	16		12	
	3.00	4		11	
	15.00	3		3	
806676	0.12	66	nd	20	< 0.1
	0.60	66		4	
	3.00	76		2	
	15.00	64		nd	
806679	0.12	71	nd	23	< 0.1
	0.60	68		2	
	3.00	78		1	
	15.00	84		1	
806680	0.12	89	nd	41	< 0.1
	0.60	76		13	
	3.00	65		7	
	15.00	84		nd	
806690	0.12	99	nd	44	< 0.1
	0.60	88		17	
	3.00	85		2	
	15.00	77		1	

[0648] 实施例10:转基因小鼠模型中人C90RF72 mRNA的反义抑制

[0649] 在BAC转基因小鼠系C9B41 (参见实施例8) 中测试了上述反义寡核苷酸,所述小鼠系通过外显子5和110个六核苷酸重复序列表达包含启动子区的人C90RF72基因。每个处理组由2-3只小鼠组成。每只小鼠接受350μg的下表所列的反义寡核苷酸的单个ICVB或PBS。两周后,将小鼠安乐死,并且通过RT-qPCR分析人致病相关C90RF72 mRNA变体和/或总人C90RF72 mRNA的表达水平,如实施例9中所述。对于不特异性地靶向C90RF72重复序列变体前体mRNA的寡核苷酸,未完成致病相关C90RF72变体mRNA水平的分析。下表中的结果示出相对于PBS处理组的标准化平均值,标准化的人C90RF72 mRNA水平的平均百分比。

[0650] 表11

[0651] 在转基因小鼠中反义抑制之后的人C90RF72 mRNA水平

Isis No.	脊髓(经% PBS处理)		皮质(经% PBS处理)	
	致病性变体	总计	致病性变体	总计
791658	6	69	12	47
791659	18	72	27	57
791664	13	55	15	39
801274	49	65	27	37
801276	10	47	12	29
801277	9	44	10	28
801278	8	39	10	27
801279	33	55	40	47
801281	16	48	17	32
801282	18	49	31	42
801283	15	46	17	31
801285	29	51	24	36
801286	37	61	37	47
801287	13	47	30	40
801288	18	52	39	48
801292	25	49	33	40
801293	20	50	29	38
801310	70	80	68	70
801312	43	61	46	55
801315	39	59	41	51
801316	27	56	50	58
806673	38	66	66	66
806674	78	88	98	96
806675	67	86	81	85
806676	29	64	52	58
806677	61	77	69	68
806678	83	96	95	102
806679	24	63	26	44
806680	29	62	41	56
806681	39	68	36	54
806684	44	69	62	64
806685	69	87	56	58
806686	59	75	57	68
806687	74	88	77	80
806688	34	62	42	51
806689	67	92	87	88
806690	28	61	57	68
806692	45	64	44	50

[0652]

[0653] 表12

[0654] 在转基因小鼠中反义抑制之后的人C9ORF72 mRNA水平

Isis No.	总人C9ORF72 mRNA (% PBS)	
	脊髓	皮质
802459	28	30
802461	22	19
802464	30	28
802465	25	25
802467	13	14
[0655] 802468	24	26
802469	24	20
802470	18	20
802471	36	44
802473	28	38
802475	15	15
802477	14	15

[0656] 实施例11:转基因小鼠模型中人C9ORF72 mRNA的剂量依赖性反义抑制

[0657] 将以上所述的反义寡核苷酸在两种BAC转基因小鼠系 (C9B41和C9B183) 中进行测试,所述小鼠系各自表达包含外显子1-5的截短的人C9ORF72基因。C9B41和C9B183小鼠系的截短的人C9ORF72基因分别包含110和450个六核苷酸重复序列 (参见实施例8)。每个处理组由2-4只小鼠组成。每只小鼠接受30 μ g、100 μ g、300 μ g或700 μ g的如下表所列的反义寡核苷酸的单个ICVB或PBS。两周后,将小鼠安乐死,并且通过RT-qPCR分析人致病相关C9ORF72 mRNA变体和/或总人C9ORF72 mRNA的表达水平,如实施例9中所述。下表中的结果示出相对于PBS处理组的标准化平均值,标准化的人C9ORF72 mRNA水平的平均百分比。100或更大的值意味着反义寡核苷酸不减少mRNA或增加mRNA的量。

[0658] 表13

[0659] 在C9B41转基因小鼠中剂量依赖性反义抑制之后的人C9ORF72 mRNA水平

[0660]

Isis No.	浓度 (μg)	脊髓(经% PBS处理)	皮质(经% PBS处理)
		总C9	总C9
802459	30	84	85
	100	63	61
	300	33	26
	700	29	17
802473	30	74	90
	100	60	77
	300	37	39
	700	28	26

[0661] 表14

[0662] 在C9B183转基因小鼠中剂量依赖性反义抑制之后的人C9ORF72 mRNA水平

[0663]

Isis No.	浓度 (μg)	脊髓(经% PBS处理)	皮质(经% PBS处理)
		致病性变体	致病性变体
801287	30	76	10
	100	37	75
	300	21	32
	700	11	15
806679	30	72	13
	100	59	100
	300	21	61
	700	10	16
806680	30	94	118
	100	72	97
	300	34	89
	700	30	56
806690	30	52	125
	100	60	131
	300	43	119
	700	19	49

[0664] 实施例12:小鼠中靶向人C9orf72的反义寡核苷酸的耐受性

[0665] 野生型C57/B16小鼠各自接受700 μg 的下表中列出的反义寡核苷酸的单个ICV剂量,如实施例2中所述。每个处理组由4只小鼠组成。在注射后8周,根据7个不同的标准评估小鼠。所述标准是(1)小鼠敏捷、机警且有反应;(2)在无刺激时小鼠是站立的或蜷缩的;(3)在无刺激时小鼠表现出任何运动;(4)在被提起之后小鼠表现出向前的运动;(5)在被提起之后小鼠表现出任何运动;(6)小鼠对尾部夹痛有反应;(7)均匀呼吸。对于7个标准中的每个,小鼠如果满足标准则给予其0的分项分数,如果不满足则给予其1的分项分数。评价了所有7个标准之后,对每只小鼠的分数求和,且然后在每个处理组内求平均值。结果在下表中呈现。

[0666] 在8周时处死动物。从每只动物收集皮质和脊髓,并进行RT-PCR。测定同种异体移植炎症因子(AIF1)的表达水平作为炎症的量度。还测定胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达水平作为胶质细胞活化的量度。将结果标准化至Gpadh,并且在下表中相对于PBS对照(1.0)呈现。“N.D.”表示没有数据,因为未进行实验。星号表示对应结果是1-3只小鼠的平均值。

[0667] 表15:小鼠中靶向C9orf72的反义寡核苷酸的耐受性

[0668]

ISIS No.	注射8周后的分数	AIF1 (脊髓)	AIF1 (小脑)	GFAP (脊髓)	GFAP (皮质)	SEQ ID NO.
791656	3.5	1.1*	1.3*	1.0*	1.3*	22
791657	3.5	2.3*	1.0*	1.4*	0.8*	22
791658	0.0	1.9	1.2	1.4	1.3	22
791659	0.0	1.8	1.3	1.5	2.5	22
791660	1.8	2.5*	1.4*	1.9*	0.8*	23
791661	1.8	1.7*	1.3*	1.5*	1.1*	24
791662	5.3	1.1*	1.2*	1.1*	0.8*	23
791663	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	24
791664	0.0	1.6	1.6	1.2	0.9	23
791665	3.5	1.9*	1.5*	1.9*	0.9*	24
801274	0.0	1.2	1.3	1.3	1.1	25
801275	3.5	1.4*	1.7*	1.6*	2.1*	26
801276	0.0	13.1	2.6	3.7	1.2	27
801277	0.0	2.9	1.4	2.3	1.5	28
801278	0.0	2.0	1.3	1.8	1.1	29
801279	0.0	1.2	1.4	1.3	1.0	25
801280	5.3	1.5*	1.5*	1.4*	1.2*	26
801281	0.0	3.6	2.2	2.4	1.6	27
801282	0.0	1.2	1.2	1.2	1.0	28
801283	0.0	1.4	1.4	1.0	0.9	29
801284	1.8	1.2*	1.5*	0.9*	1.0*	30
801285	0.0	1.2	1.2	1.1	0.8	31
801286	0.0	1.1	1.2	1.0	1.1	32
801287	0.0	1.3	1.2	1.1	1.4	33
801288	0.0	1.3	1.3	1.1	0.9	34
801289	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	35
801290	3.5	1.2*	1.3*	1.0*	1.1*	30
801291	0.0	2.2	2.2	1.5	1.1	31
801292	0.0	1.3	1.3	1.2	0.9	32
801293	0.0	1.6	1.6	1.3	1.5	33
801294	0.0	1.2	1.2	1.0	1.1	34
801295	1.8	1.4*	1.4*	1.0*	0.9*	35
801296	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	36
801297	3.5	1.0*	1.0*	0.9*	0.8*	37
801307	5.3	1.2*	0.9*	1.1*	0.8*	41
801308	5.3	1.2*	1.2*	0.9*	1.1*	42
801309	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	43
801310	1.8	1.2*	1.2*	1.0*	1.0*	44
801311	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	41
801312	0.0	2.0	1.3	1.0	1.4	42
801313	3.5	1.7*	1.1*	0.9*	0.9*	43

[0669]

801314	0.0	1.9	1.2	1.0	2.9	44
801315	1.8	1.4*	1.3*	1.0*	1.1*	36
801316	0.0	1.5	1.4	1.0	1.2	37
801298	3.5	1.4*	1.0*	1.1*	1.3*	38
801299	5.3	1.2*	1.2*	1.0*	1.0*	39
801300	3.5	1.2*	1.1*	0.9*	1.0*	40
801301	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	38
801302	5.3	1.0*	1.1*	0.8*	0.8*	39
801303	1.8	1.1*	1.0*	1.0*	1.1*	40
801304	4.8	14.3*	5.4*	2.2*	3.5*	38
801305	5.3	3.6*	1.7*	1.6*	1.6*	39
801306	0.0	4.7	1.8	1.8	1.8	40
806673	0.0	1.1	1.0	1.0	9.1	49
806674	0.0	1.0	1.0	0.8	8.2	50
806675	0.0	1.0	1.0	0.8	10.3	51
806676	0.0	1.0	1.0	0.8	1.5	49
806677	0.0	0.9	1.0	0.9	1.5	50
806678	0.0	1.0	0.9	1.1	1.2	51
806679	0.0	1.2	1.1	1.1	1.3	49
806680	0.0	1.0	1.1	0.8	1.0	50
806681	0.0	1.0	1.0	0.9	1.4	51
806682	1.8	1.4*	1.2*	1.0*	1.2*	49
806683	0.0	1.2	1.2	0.9	1.2	50
806684	0.0	1.2	1.1	0.9	2.0	51
806685	0.0	1.0	0.9	0.8	1.5	52
806686	0.0	0.9	0.9	0.8	1.1	53
806687	0.0	1.0	1.0	0.8	1.0	54
806688	1.8	1.1*	1.0*	0.8*	1.8*	55
806689	0.0	1.1	1.0	0.8	1.3	52
806690	0.0	1.0	1.1	0.9	1.1	53
806691	5.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	54
802459	0.0	0.9	0.9	0.9	1.2	21
802460	5.3	1.1*	1.1*	1.0*	1.4*	45
802461	3.5	1.4*	1.4*	0.9*	0.9*	46
802462	3.5	0.8*	0.9*	0.9*	1.1*	21
802463	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	45
802464	1.8	1.4*	1.2*	1.5*	1.4*	46
802465	0.0	0.9	1.1	1.1	1.6	21
802466	1.8	1.0*	1.0*	1.0*	1.4*	45
802467	1.3	4.9	2.4	2.7	2.8	46
802468	0.0	1.4	1.3	1.2	2.2	21
802469	0.0	1.0	1.0	1.0	1.2	45
802470	1.5	3.2	3.4	2.6	3.4	46
802471	0.0	0.9	0.9	0.9	1.2	47
802472	3.5	1.6*	1.4*	0.9*	1.5*	48
802473	0.0	1.0	0.9	0.9	1.3	47
802474	1.8	1.3*	1.2*	1.0*	1.8*	48
802475	7.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	47
802476	1.8	1*	1.2*	0.8*	1.8*	48
802477	0.0	1.9	1.7	1.3	2.1	47
802478	3.5	1.4*	1.1*	1.1*	1.3*	48

[0670] 实施例13:大鼠中靶向人C9orf72的反义寡核苷酸的耐受性

[0671] 将Sprague Dawley大鼠分成4或6只大鼠的组。对每个大鼠组中的每只大鼠施用单一3mg鞘内 (IT) 剂量的下表中所指示的寡核苷酸。在IT剂量后3小时和8周,对每只大鼠评价身体的7个不同部位的活动。7个身体部位为:(1) 大鼠尾部;(2) 大鼠后位姿;(3) 大鼠后肢;

(4) 大鼠后爪; (5) 大鼠前爪; (6) 大鼠前位姿; (7) 大鼠头部。对于7个不同身体部位的每个部位, 如果这个身体部位是活动的, 那么为每只大鼠给出0的分项分数, 如果这个身体部位是瘫痪的, 那么给出1的分项分数。在评价了7个身体部位中的每个部位之后, 对每只大鼠的分项分数求和, 然后对每个组求平均值。例如, 如果在3mg IT剂量之后3小时大鼠的尾部、头部和所有其他被评价的身体部位是活动的, 那么它将得到0的求和分数。如果在3mg IT剂量之后3小时另一只大鼠的尾部是不活动的, 但所有其他被评价的身体部位是活动的, 那么它将得到1的分数。盐水处理的大鼠通常得到0的分数。在范围顶端的分数将表明有急性毒性。结果在下表中呈现为每个处理组的平均分数。

[0672] 在8周时处死动物。从每只动物收集皮质和脊髓, 并进行RT-PCR。测定AIF1的表达水平作为炎症的量度。还测定 (GFAP) 的表达水平作为胶质细胞活化的量度。星号表示对应结果是2-3只小鼠的平均值。将结果标准化至Gapdh, 并且在下表中相对于PBS对照 (1.0) 呈现。

[0673] 表16: 大鼠中靶向C9orf72的反义寡核苷酸的耐受性

ISIS No.	注射3 小时后的 分数	注射8周 后的分数	AIF1 (脊髓)	AIF1 (皮质)	GFAP (脊髓)	GFAP (皮质)	SEQ ID NO.
801287	2.5	0.0	1.9	1.2	1.3	1.3	33
801288	4.0	3.5	1.3*	1.3*	1.2*	1.3*	34
806676	2.0	1.8	1.6*	1.5*	1.3*	2.5*	49
806679	1.2	0.0	1.4	1.3	1.3	1.8	49
806680	2.0	0.3	1.4	1.4	1.3	1.3	50
806690	1.3	0.0	1.5	1.4	1.3	2.0	53
802459	2.0	0.0	1.4	1.2	1.5	1.5	21
802473	2.0	2.3	1.8*	1.6*	1.7*	1.6*	47

[0675] 实施例14: 非人灵长类动物中靶向人C9ORF72的反义寡核苷酸的耐受性

[0676] 通过鞘内快速浓注 (1mL缓慢浓注, 然后0.25mL冲洗), 在第1天、第14天和第28天向雌性食蟹猴 (2-6kg) 给予35mg反义寡核苷酸的3个剂量。每个处理组包括4只猴。在最终剂量后两周, 将动物处死并对各种CNS组织进行RT-PCR。测定AIF1的表达水平作为炎症的量度, 并且测定GFAP的表达水平作为胶质细胞活化的量度。将结果标准化至GADPH, 并且对于ISIS No. 801287、802459和806679相对于下表中的PBS对照 (1.0) 呈现。

[0677] 表17: 食蟹猴中靶向C9ORF72的反义寡核苷酸的耐受性

脑区域	AIF1			GFAP		
	801287	802459	806679	801287	802459	806679
颈脊髓	1.0	0.9	0.9	1.1	1.0	1.1
胸部脊髓	1.1	0.9	0.9	1.2	1.2	1.2
颞叶皮质	1.0	1.0	1.5	1.2	1.1	1.7
运动皮质	1.0	1.0	1.2	1.2	0.7	1.3
腰部脊髓	1.2	0.9	0.9	1.3	0.9	1.1
海马	1.0	1.0	1.3	1.9	1.9	1.7
额叶皮质	1.3	0.9	1.3	1.0	0.7	1.3

序列表

<110> IONIS制药公司

<120> 用于调节C90RF72表达的组合物

<130> BIOL0269W0

<150> 62/148,691

<151> 2015-04-16

<150> 62/232,941

<151> 2015-09-25

<150> 62/239,400

<151> 2015-10-09

<160> 60

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 3339

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

acgtaaccta cgggtgtcccg ctaggaaaga gaggtgctgc aaacagcgac aagttccgcc 60
cacgtaaaag atgacgcttg gtgtgtcagc cgtccctgct gcccggttgc ttctcttttg 120
ggggcgggggt ctagcaagag caggtgtggg tttaggagat atctccggag catttgata 180
atgtgacagt tggaatgcag tgatgtcgac tctttgccca ccgccatctc cagctgttgc 240
caagacagag attgctttaa gtggcaaadc acctttatta gcagctactt ttgcttactg 300
ggacaatatt cttgggtccta gagtaaggca catttgggct ccaaagacag aacaggtact 360
tctcagtgat ggagaaataa cttttcttgc caaccacact ctaaattggag aaatccttcg 420
aaatgcagag agtgggtgcta tagatgtaaa gttttttgtc ttgtctgaaa agggagtgat 480
tattgtttca ttaatctttg atggaaactg gaatggggat cgcagcacat atggactatc 540
aattatactt ccacagacag aacttagttt ctacctccca cttcatagag tgtgtgttga 600
tagattaaca catataatcc ggaaaggaag aatatggatg cataaggaaa gacaagaaaa 660
tgtccagaag attatcttag aaggcacaga gagaatggaa gatcagggtc agagtattat 720
tccaatgctt actggagaag tgattcctgt aatggaactg ctttcatcta tgaaatcaca 780
cagtgttcct gaagaaatag atatagctga tacagtactc aatgatgatg atattggtga 840
cagctgtcat gaaggcttct ttctcaatgc catcagctca cacttgcaaa cctgtggctg 900
ttccgttgta gtaggtagca gtgcagagaa agtaaataag atagtcagaa cattatgcct 960
ttttctgact ccagcagaga gaaaatgtc caggttatgt gaagcagaat catcatttaa 1020
atatgagtca gggctctttg tacaaggcct gctaaaggat tcaactggaa gctttgtgct 1080
gcctttccgg caagtcatgt atgtccata tcccaccaca cacatagatg tggatgtcaa 1140
tactgtgaag cagatgccac cctgtcatga acatatttat aatcagcgta gatacatgag 1200
atccgagctg acagccttct ggagagccac ttcagaagaa gacatggctc aggatacgat 1260

```

catctacact gacgaaagct ttactcctga tttgaatatt tttcaagatg tcttacacag 1320
agacactcta gtgaaagcct tcctggatca ggtctttcag ctgaaacctg gcttatctct 1380
cagaagtact ttccttgacac agtttctact tgccttcac agaaaagcct tgacactaat 1440
aaaatatata gaagacgata cgcagaaggg aaaaaagccc tttaaatctc ttcggaacct 1500
gaagatagac cttgatttaa cagcagaggg cgatcttaac ataataatgg ctctggctga 1560
gaaaattaaa ccaggcctac actcttttat ctttgggaaga cttttctaca ctagtgtgca 1620
agaacgagat gttctaataa ctttttaaat gtgtaactta ataagcctat tccatcacaa 1680
tcatgatcgc tggtaaagta gctcagtggg gtggggaaac gttcccctgg atcactactcc 1740
agaattctgc tctcagcaat tgcagttaag taagttaacac tacagttctc acaagagcct 1800
gtgaggggat gtcaggtgca tcattacatt ggggtgtctct tttcctagat ttatgctttt 1860
gggatacaga cctatgttta caatataata aatattattg ctatctttta aagatataat 1920
aataggatgt aaacttgacc acaactactg tttttttgaa atacatgatt catggtttac 1980
atgtgtcaag gtgaaatctg agttggcttt tacagatagt tgactttcta tcttttgcca 2040
ttctttgggtg tgtagaatta ctgtaatact tctgcaatca actgaaaact agagccttta 2100
aatgatttca attccacaga aagaaagtga gcttgaacat aggatgagct ttagaaagaa 2160
aattgatcaa gcagatgttt aattggaatt gattattaga tcctactttg tggatttagt 2220
ccctgggatt cagtctgtag aaatgtctaa tagttctcta tagtccttgt tcctggtgaa 2280
ccacagttag ggtgttttgt ttattttatt gttcttgcta ttgttgatat tctatgtagt 2340
tgagctctgt aaaaggaaat tgtattttat gttttagtaa ttgttgccaa ctttttaaat 2400
taattttcat tatttttgag ccaaattgaa atgtgcacct cctgtgcctt ttttctcctt 2460
agaaaatcta attacttga acaagttcag atttactgg tcagtcattt tcatcttggt 2520
ttcttcttgc taagtcttac catgtacctg ctttggcaat cattgcaact ctgagattat 2580
aaaatgcctt agagaatata ctaactaata agatcttttt ttcagaaaca gaaaatagtt 2640
ccttgagtac ttccttcttg catttctgcc tatgtttttg aagttgttgc tgtttgcctg 2700
caataggcta taaggaatag caggagaaat tttactgaag tgctgttttc ctaggtgcta 2760
ctttggcaga gctaagttaa cttttgtttt cttaatgcgt ttggaccatt ttgctggcta 2820
taaaataact gattaatata attctaacac aatgttgaca ttgtagttac acaaacacaa 2880
ataaatattt tatttaaaat tctggaagta atataaaagg gaaaatatat ttataagaaa 2940
gggataaagg taatagagcc cttctgcccc ccaccacca aatttacaca acaaatgac 3000
atgttcgaat gtgaaaggtc ataataagctt tcccatcatg aatcagaaag atgtggacag 3060
cttgatgttt tagacaacca ctgaactaga tgactgttgt actgtagctc agtcatttaa 3120
aaaatatata aatactacct tgtagtgtcc cactactgtgt tttttacatg gtagattctt 3180
atttaagtgc taactggtta ttttctttgg ctggtttatt gtactgttat acagaatgta 3240
agttgtacag tgaaataagt tattaaagca tgtgtaaaca ttgttatata tcttttctcc 3300
taaattggaga attttgaata aaatatattt gaaattttg 3339

<210> 2

<211> 30001

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

caaagaaaag ggggaggttt tgtaaaaaa gagaaatgtt acatagtgtt ctttgagaaa 60
attcattggc actattaagg atctgaggag ctggtagatt tcaactgggt agtgatgggt 120
gtagataaaa ttagagctgc agcagggtcat ttagcaact attagataaa actgggtctca 180
ggtcacaacg ggcagttgca gcagctggac ttggagagaa ttacactgtg ggagcagtg 240
catttgtcct aagtgtcttt ctaccccta cccccactat tttagttggg tataaaaaga 300
atgacccaat ttgtatgatc aactttcaca aagcatagaa cagtaggaaa agggctctgtt 360
tctgcagaag gtgtagacgt tgagagccat tttgtgtatt tattcctccc tttcttctc 420
ggatgaatgat taaaacgttc tgtgtgattt ttagtgatga aaaagattaa atgctactca 480
ctgtagtaag tgccatctca cacttgcaga tcaaaaggca cacagtttaa aaaacctttg 540
tttttttaca catctgagtg gtgtaaagtc tactcatctg tagtaagtgg aatctataca 600
cctgcagacc aaaagacgca aggtttcaaa aatctttgtg ttttttacac atcaaacaga 660
atggtagctt tttcaaaaagt taaaaaaaa caactcatcc acatattgca actagcaaaa 720
atgacattcc ccagtgtgaa aatcatgtct gagagaattc ttacatgtaa aggcaaaatt 780
gcgatgactt tgcaggggac cgtgggattc ccgcccgcag tgccggagct gtcccctacc 840
agggtttgca gtggagtttt gaatgcactt aacagtgtct tacggtaaaa acaaaatttc 900
atccaccaat tatgtgttga gcgcccactg cctaccaagc acaaacaaaa ccattcaaaa 960
ccacgaaatc gtcttcactt tctccagatc cagcagctc ccctattaag gttcgcacac 1020
gctattgcgc caacgtcctt ccagagcggg tcttaagata aaagaacagg acaagttgcc 1080
ccgccccatt tcgctagcct cgtgagaaaa cgtcatcgca catagaaaac agacagacgt 1140
aacctacggg gtcccgttag gaaagagagg tgcgtcaaac agcgacaagt tccgccacg 1200
taaaagatga cgcttgggtg gtcagccgtc cctgctgccc ggttgcttct cttttggggg 1260
cggggtctag caagagcagg tgtgggttta ggaggtgtgt gtttttgttt ttcccacct 1320
ctctccccac tacttgctct cacagtactc gctgagggtg aacaagaaaa gacctgataa 1380
agattaacca gaagaaaaca aggagggaaa caaccgcagc ctgtagcaag ctctggaact 1440
caggagtcgc gcgctagggg ccggggccgg ggccggggcg tggtcggggc gggccgggg 1500
gcggggccgg ggccgggctg cggttgcggt gcctgcgccc gcggcgcgcg aggcgcaggc 1560
gggtggcgagt gggtgagtga ggaggcggca tcctggcggg tggctgtttg gggttcggct 1620
gccgggaaga ggcgcgggta gaagcggggg ctctcctcag agctcgacgc atttttactt 1680
tccctctcat ttctctgacc gaagctgggt gtcgggcttt cgctcttagc gactgggtga 1740
attgcctgca tccgggcccc gggcttcccg gcggcggcgg cggcggcggc ggcgagggga 1800
caagggatgg ggatctggcc tcttccttgc tttcccgccc tcagtaccgc agctgtctcc 1860
ttcccgggga cccgctggga gcgctgccgc tgcgggctcg agaaaaggga gcctcgggta 1920
ctgagaggcc tcgctggggg gaaggccgga gggtagggcg cgcgcggctt ctgcggacca 1980
agtcgggggt cgctaggaac ccgagacggt ccctgccggc gaggagatca tgcgggatga 2040
gatgggggtg tggagacgcc tgcacaattt cagcccaagc ttctagagag tggtagtgac 2100
ttgcatatga gggcagcaat gcaagtcggt gtgctcccca ttctgtggga catgacctgg 2160
ttgcttcaca gctccgagat gacacagact tgcttaaagg aagtactat tgtgacttgg 2220
gcatcacttg actgatggta atcagttgtc taaagaagtg cacagattac atgtccgtgt 2280

gctcattggg tctatctggc cgcgttgaac accaccaggc tttgtattca gaaacaggag 2340
 ggaggtcctg cactttccca ggaggggtgg ccctttcaga tgcaatcgag attgttaggc 2400
 tctgggagag tagttgcctg gttgtggcag ttggtaaatt tctattcaaa cagttgccat 2460
 gcaccagttg ttcacaacaa gggtagctaa tctgtctggc attacttcta cttttgtaca 2520
 aaggatcaaa aaaaaaaaaag atactgttaa gatatgattt ttctcagact ttgggaaact 2580
 tttaacataa tctgtgaata tcacagaaac aagactatca tataggggat attaataacc 2640
 tggagtcaga atacttgaaa tacgggtgtca tttgacacgg gcattgttgt caccacctct 2700
 gccaaaggcct gccacttttag gaaaaccctg aatcagttgg aaactgctac atgctgatag 2760
 tacatctgaa acaagaacga gagtaattac cacattccag attgttcact aagccagcat 2820
 ttacctgctc caggaaaaaa ttacaagcac cttatgaagt tgataaaata ttttgtttgg 2880
 ctatgttggc actccacaat ttgctttcag agaaacaaag taaaccaagg aggacttctg 2940
 tttttcaagt ctgccctcgg gttctattct acgttaatta gatagttccc aggaggacta 3000
 ggtagccta cctattgtct gagaaacttg gaactgtgag aaatggccag atagtatat 3060
 gaacttcacc ttccagtctt ccctgatgtt gaagattgag aaagtgttgt gaactttctg 3120
 gtactgtaaa cagttcactg tccttgaagt ggtcctgggc agctcctgtt gtggaaagtg 3180
 gacggttttag gatcctgctt ctctttgggc tgggagaaaa taaacagcat ggttacaagt 3240
 attgagagcc aggttggaga aggtggctta cacctgtaat gccagagctt tgggaggcgg 3300
 aggcaagagg atcacttgaa gccaggagtt caagctcaac ctgggcaacg tagaccctgt 3360
 ctctacaaaa aattaaaaac ttagccgggc gtggtgatgt gcacctgtag tcctagctac 3420
 ttgggaggct gaggcaggag ggtcatttga gccaagagt ttgaagttac cgagagctat 3480
 gatcctgcca gtgcattcca gcctggatga caaacgaga ccctgtctct aaaaaacaag 3540
 aagtgagggc tttatgattg tagaattttc actacaatag cagtggacca accacctttc 3600
 taaataccaa tcagggaaga gatggttgat ttttaacag acgtttaaag aaaaagcaaa 3660
 acctcaaact tagcactcta ctaacagttt tagcagatgt taattaatgt aatcatgtct 3720
 gcatgtatgg gattatttcc agaaagtgtt ttgggaaacc tctcatgaac cctgtgagca 3780
 agccaccgtc tcaactcaatt tgaatcttgg cttccctcaa aagactggct aatgttttgt 3840
 aactctctgg agtagacagc actacatgta cgtaagatag gtacataaac aactatttgt 3900
 tttgagctga tttttttcag ctgcatttgc atgtatggat ttttctcacc aaagacgatg 3960
 acttcaagta ttagtaaaat aattgtacag ctctcctgat tatacttctc tgtgacattt 4020
 catttcccag gctattttctt ttggtaggat ttaaaactaa gcaattcagt atgatctttg 4080
 tccttcatatt tctttcttat tctttttgtt tgtttgtttg tttgtttttt tcttgaggca 4140
 gagtctctct ctgtcgccca ggctggagtg cagtggcgcc atctcagctc attgcaacct 4200
 ctgccacctc cgggttcaag agattctcct gcctcagcct cccgagtagc tgggattaca 4260
 ggtgtccacc accacacccg gctaattttt tgtattttta gtagaggtgg ggtttcacca 4320
 tgttggccag gctggtcttg agtcctgac ctcaggtgat ccacctgcct cggcctacca 4380
 aagagctggg ataacagtg tgaccacca tgccccgcc attttttttt tcttattctg 4440
 ttaggagtga gagtgttaact agcagtataa tagttcaatt ttcacaacgt ggtaaaagtt 4500
 tcctataaat tcaatcagat tttgtccag gtttcagttc tgtttttagga aatactttta 4560
 ttttcagttt aatgatgaaa tattagagtt gtaatattgc ctttatgatt atccaccttt 4620

```

ttaacctaaa agaattgaaag aaaaatatgt ttgcaatata attttatggt tgtatgttaa 4680
cttaattcat tatgttggcc tccagtttgc tgttgtagt tatgacagca gtagtgtcat 4740
taccatttca attcagatta cattcctata tttgatcatt gtaaactgac tgcttacatt 4800
gtattaaaaa cagtggatat tttaaagaag ctgtacggct tataatctagt gctgtctctt 4860
aagactatta aattgataca acatatttaa aagtaaatat tacctaaatg aatttttgaa 4920
attacaaata cacgtgttaa aactgtcggt gtgttcaacc atttctgtac ataccttagag 4980
ttaactgttt tgccaggctc tgtatgccta ctcataatat gataaaagca ctcatctaata 5040
gctctgtaaa tagaagtcag tgctttccat cagactgaac tctcttgaca agatgtggat 5100
gaaattcttt aagtaaaatt gtttactttg tcatacattt acagatcaaa tgtagtctcc 5160
caaagcaatc atatggcaaa gataggtata tcatagtttg cctattagct gctttgtatt 5220
gctattatta taaatagact tcacagtttt agacttgctt aggtgaaatt gcaattcttt 5280
ttactttcag tcttagataa caagtcttca attatagtag aatcacacat tgcttaggaa 5340
tgcattcatta ggcgattttg tcattatgca aacatcatag agtgtactta cacaaacct 5400
gatagtatag cctttatgta cctaggccgt atggtatagt ctgttgctcc taggccacaa 5460
acctgtacaa ctgttactgt actgaatact atagacagtt gtaacacagt ggtaaataatt 5520
tatctaaata tatgcaaaca gagaaaaggt acagtaaaag tatggtataa aagataatgg 5580
tataacctgt taggccactt accacgaatg gagcttgtag gactagaagt tgctctgggt 5640
gagtcagtga gtgagtgggt aattaatgtg aaggcctaga aactgtaca ccactgtaga 5700
ctataaacac agtacgtga agctacacca aatttatctt aacagttttt cttcaataaa 5760
aaattataac tttttaactt tgtaaaactt ttaatttttt aacttttaa atacttagct 5820
tgaaacacaa atacattgta tagctataca aaaatatatt ttctttgtat cttatttcta 5880
gaagcttttt tctattttct attttaaatt ttttttttta cttgttagtc gtttttgta 5940
aaaactaaaa cacacacact ttcacctagg catagacagg attaggatca tcagtatcac 6000
tcccttccac ctactgcct tccacctcca catcttgctt cactggaagg ttttagggg 6060
caataacaca catgtagctg tcacctatga taacagtgtt ttctgttgaa tacctcctga 6120
aggacttgcc tgaggctgtt ttacatttaa cttaaaaaaa aaaaaagtag aaggagtga 6180
ctctaaaata acaataaaaag gcatagtata gtgaatacat aaaccagcaa tgtagtagtt 6240
tattatcaag tgtgttacac tgtaataatt gtatgtgcta tactttaaat aacttgcaaa 6300
atagtactaa gaccttatga tggttacagt gtcactaagg caatagcata ttttcaggtc 6360
cattgtaatc taatgggact accatcatat atgcagtcta ccattgactg aaacgttaca 6420
tggcacataa ctgtatttgc aagaatgatt tgttttacat taatatcaca taggatgtac 6480
cttttttagag tggtagttt atgtggatta agatgtacaa gttgagcaag gggaccaaga 6540
gccctgggtt ctgtcttgga tgtgagcgtt tatgtttctt tctcatgtc tgttttctca 6600
ttaaattcaa aggcttgaac gggccctatt tagcccttct gttttctacg tgttctaaat 6660
aactaaagct tttaaattct agccatttag tgtagaactc tctttgcagt gatgaaatgc 6720
tgtattgggt tcttggttag catattaaat atttttatct ttgtcttgat acttcaatgt 6780
cgttttaaac atcaggatcg ggcttcagta ttctcataac cagagagttc actgaggata 6840
caggactgtt tgccatttt ttgttatggc tccagacttg tggtagttcc atgtcttttt 6900
tttttttttt ttttttgacc ttttagcggc tttaaagtat ttctgttggt aggtgttgta 6960

```

```

ttacttttct aagattactt aacaaagcac cacaaactga gtggctttaa acaacagcaa 7020
tttattctct cacaattcta gaagctagaa gtccgaaatc aaagtgttga caggggcatg 7080
atcttcaaga gagaagactc tttccttgcc tcttcctggc ttctggtggt taccagcaat 7140
cctgagtggt cctttcttgc cttgtagttt caacaatcca gtatctgcct tttgtcttca 7200
catggctgtc taccatttgt ctctgtgtct ccaaattctc ctccttataa acacagcagt 7260
tattggatta ggccccactc taatccagta tgaccccatc ttaacatgat tacacttatt 7320
tctagataag gtcacattca cgtacaccaa gggttaggaa ttgaacatat ctttttgggg 7380
gacacaattc aaccacaaag tgtcagtctc tagctgagcc tttcccttcc tgtttttctc 7440
cttttttagtt gctatggggt aggggccaac tctccagtca tactagaatt gcacatggac 7500
tggaatattg ggaatactgc gggctctatt tatgagcttt agtatgtaac atttaatatc 7560
agtgtaaaga agcccttttt taagttattt ctttgaattt ctaaattgat gccctgaata 7620
taagtaacaa gttaccatgt cttgtaaaat gatcatatca acaaactttt aatgtgcacc 7680
tactgtgcta gttgaatgtc tttatcctga taggagataa caggattcca catctttgac 7740
ttaagaggac aaaccaaata tgtctaaatc atttgggggt ttgatggata tcttttaaatt 7800
gctgaacctc atcattgggt tcatatgtca ttgttttagat atctccggag catttgata 7860
atgtgacagt tggaatgcag tgatgtcgac tctttgccc ccccatctc cagctgttgc 7920
caagacagag attgctttaa gtggcaaatc acctttatta gcagctactt ttgcttactg 7980
ggacaatatt cttggtccta gagtaaggca catttgggct ccaaagacag aacaggtact 8040
tctcagtgat ggagaaataa cttttcttgc caaccacact ctaaattggag aaatccttcg 8100
aaatgcagag agtggtgcta tagatgtaaa gttttttgtc ttgtctgaaa aggagtgat 8160
tattgtttca ttaatctttg atggaaactg gaatggggat cgcagcacat atggactatc 8220
aattatactt ccacagacag aacttagttt ctacctcca cttcatagag tgtgtgttga 8280
tagattaaca catataatcc ggaaaggaag aatatggatg cataaggtaa gtgatttttc 8340
agcttattaa tcatgttaac ctatctgttg aaagcttatt ttctggtaca tataaatctt 8400
atttttttaa ttatatgcag tgaacatcaa acaataaatg ttattttatt tgcatttacc 8460
ctattagata caaatacatc tggcttgata cctgtcatct tcatattaac tgtggaaggt 8520
acgaaatggg agctccacat tatagatgaa aagctaaagc ttagacaaat aaagaaactt 8580
ttagaccctg gattcttctt gggagccttt gactctaata ccttttgttt ccctttcatt 8640
gcacaattct gtcttttgct tactactatg tgtaagtata acagttcaaa gtaatagttt 8700
cataagctgt tggatcatga gcctttggtc tctttaacct ctttgccaag ttcccagggt 8760
cataaaatga ggaggttgaa tggaatgggt cccaagagaa ttccttttaa tcttacagaa 8820
attattgttt tcctaaatcc tgtagttgaa tatataatgc tatttacatt tcagtatagt 8880
tttgatgtat ctaaagaaca cattgaattc tcttctctgt gttccagttt gatactaacc 8940
tgaaagtcca ttaagcatta ccagttttta aaggttttg cccaatagta aggaaaaata 9000
atatctttta aaagaataat tttttactat gtttgcaggc ttacttctt ttttctcaca 9060
ttatgaaact cttaaaatca ggagaatctt ttaaacaaca tcataatgtt taatttgaaa 9120
agtgcagtc attcttttcc tttttgaaac tatgcagatg ttacattgac tgttttctgt 9180
gaagtatct ttttttact gcagaataaa ggttgttttg attttatttt gtattgttta 9240
tgagaacatg catttggttg gttaatttcc taccctgcc cccatttttt ccctaaagta 9300

```

gaaagtat ttttctgtgaa ctaaattact acacaagaac atgtctattg aaaaataagc 9360
 aagtatcaaa atgttgtggg ttgttttttt aaataaattt tctcttgctc aggaaagaca 9420
 agaaaatgtc cagaagatta tcttagaagg cacagagaga atggaagatc aggtatatgc 9480
 aaattgcata ctgtcaaatg tttttctcac agcatgtatc tgtataaggt tgatggctac 9540
 atttgtcaag gccttggaga catacgaata agcctttaat ggagctttta tggaggtgta 9600
 cagaataaac tggaggaaga tttccatata ttaaacccaa agagttaa at cagtaaaca 9660
 aggaaaatag taattgcatc tacaaaattaa tatttgctcc cttttttttt ctgtttgccc 9720
 agaataaatt ttggataact tgttcatagt aaaaataaaa aaaattgtct ctgatatgtt 9780
 ctttaaggta ctacttctcg aacctttccc tagaagtagc tgtaacagaa ggagagcata 9840
 tgtacccttg aggtatctgt ctggggtgta ggcccaggct cacacaatat ttcttctaag 9900
 tcttatgttg tatcgtaag actcatgcaa ttacatttt attccataac tatttttagta 9960
 ttaaaatttg tcagtatat ttcttaccct ctctcttagg aaaatgtgcc atgtttatcc 10020
 cttggctttg aatgcccctc aggaacagac actaagagtt tgagaagcat ggttacaagg 10080
 gtgtggcttc ccctgcggaa actaagtaca gactatttca ctgtaaagca gagaagttct 10140
 tttgaaggag aatctccagt gaagaaagag ttcttcactt ttacttccat ttctctttgt 10200
 gggtgaccct caatgctcct tgtaaaactc caatatttta aacatggctg ttttgccctt 10260
 ctttgcttct ttttagcatg aatgagacag atgatacttt aaaaaagtaa ttaaaaaaaa 10320
 aaacttgtga aaatacatgg ccataatata gaaccaata caatgatctc ctttaccaaa 10380
 ttgttatgtt tgtacttttg tagatagctt tccaattcag agacagttat tctgtgtaaa 10440
 ggtctgactt aacaagaaaa gatttccctt tacccaaaga atcccagtc ttttttgctg 10500
 gtcaataagc aggggtccca ggaatggggt aactttcagc accctctaac ccactagtta 10560
 ttagtagact aattaagtaa acttatcgca agttgaggaa acttagaacc aactaaaatt 10620
 ctgcttttac tgggattttg ttttttcaaa ccagaaacct ttacttaagt tgactactat 10680
 taatgaattt tgggtctctt ttaagtgtc cttcttaaaa atgttatctt actgctgaga 10740
 agttcaagtt tgggaagtac aaggaggaat agaaacttaa gagattttct ttagagcct 10800
 ctctctgtatt tagccctgta ggattttttt tttttttttt ttttttggtg ttgttgagct 10860
 tcagttaggc tattcattca cttatactga taatgtctga gatactgtga atgaaatact 10920
 atgtatgctt aaacctaaga ggaaatattt tcccaaaatt attcttcccg aaaaggagga 10980
 gttgcctttt gattgagttc ttgcaaactc cacaacgact ttattttgaa caatactgtt 11040
 tggggatgat gcattagttt gaaacaactt cagttgtagc tgtcatctga taaaattgct 11100
 tcacagggaa ggaaatttaa cacggatcta gtcattatc ttgttagatt gaatgtgtga 11160
 attgtaattg taaacaggca tgataattat tacttttaaaa actaaaaaca gtgaatagtt 11220
 agttgtggag gttactaaag gatggttttt ttttaataa aactttcagc attatgcaaa 11280
 tgggcatatg gcttaggata aaacttccag aagtagcatc acatttaaat tctcaagcaa 11340
 ctttaataata tggggctctg aaaaactggg taaggttact ccaaaaatgg ccctgggtct 11400
 gacaaagatt ctaacttaaa gatgcttatg aagactttga gtaaaatcat ttcataaaat 11460
 aagtgaggaa aaacaactag tattaattc atcttaata atgtatgatt taaaaatat 11520
 gtttagctaa aaatgcatg tcatttgaca atttcattta tatctcaaaa aatttactta 11580
 accaagttgg tcacaaaact gatgagactg gtggtgtag tgaataaatg aggaccatc 11640

catatttgag acactttaca tttgtgatgt gttatactga attttcagtt tgattctata 11700
 gactacaaat ttcaaaatta caatttcaag atgtaataag tagtaatatc ttgaaatagc 11760
 tctaaaggga atttttctgt tttattgatt cttaaaatat atgtgctgat tttgatttgc 11820
 atttgggtag attatacttt tatgagtatg gaggttaggt attgattcaa gttttcctta 11880
 cctatttggg aaggatttca aagtcctttt gtgcttgggt ttcctcattt ttaaatatga 11940
 aatatattga tgacctttta caaatTTTTT ttatctcaaa ttttaaagga gatcttttct 12000
 aaaagaggca tgatgactta atcattgcat gtaacagtaa acgataaacc aatgattcca 12060
 tactctctaa agaataaaaag tgagcttttag ggccgggcat ggtcagaaat ttgacaccaa 12120
 cctggccaac atggcgaaac cccgtctcta ctaaaaatac aaaaatcagc cgggcatggt 12180
 ggcggcacct atagtcccag ctacttggga ggatgagaca ggagagtcac ttgaacctgg 12240
 gaggagaggt tgcagtgagc tgagatcacg ccattgcact ccagcctgag caatgaaagc 12300
 aaaactccat ctcaaaaaaa aaaaaagaaa agaaagaata aaagtgagct ttggattgca 12360
 tataaatcct ttagacatgt agtagacttg tttgatactg tgtttgaaca aattacgaag 12420
 tattttcatc aaagaatggt attgtttgat gttatTTTTT ttttttattg cccagcttct 12480
 ctcatattac gtgattttct tcacttcatg tcactttatt gtgcagggtc agagtattat 12540
 tccaatgctt actggagaag tgattcctgt aatggaactg ctttcatcta tgaaatcaca 12600
 cagtgttcct gaagaaatag atgtaagttt aaatgagagc aattatacac tttatgagtt 12660
 ttttgggggt atagtattat tatgtatatt attaatatc taattttaat agtaaggact 12720
 ttgtcataca tactattcac atacagtatt agccacttta gcaaataagc acacacaaaa 12780
 tcctggattt tatggcaaaa cagaggcatt tttgatcagt gatgacaaaa ttaaattcat 12840
 tttgtttatt tcattacttt tataattcct aaaagtggga ggatcccagc tcttatagga 12900
 gcaattaata tttaatgtag tgtcttttga aacaaaactg tgtgccaaag tagtaacat 12960
 taatggaagt ttactttag tagcacaattt agtttctta atcatttggt gaggacgttt 13020
 tgaatcacac actatgagt ttaagagata ctttaggaa actattcttg ttgttttctg 13080
 attttgtcat ttaggttagt ctcttgattc tgacagctca gaagaggaag ttgttcttgt 13140
 aaaaattggt taacctgctt gaccagcttt cacatttggt cttctgaagt ttatggtagt 13200
 gcacagagat tgtttttttg ggagtcttga ttctcggaat tgaaggcagt gtgttatatt 13260
 gaatccagac ttccgaaaac ttgtatatta aaagtgttat ttcaacacta tgttacagcc 13320
 agactaatTT ttttattttt tgatgcattt tagatagctg atacagtact caatgatgat 13380
 gatattgggtg acagctgtca tgaaggcttt cttctcaagt aagaattttt cttttcataa 13440
 aagctggatg aagcagatac catcttatgc tcacctatga caagatttgg aagaaagaaa 13500
 ataacagact gtctacttag attgttctag ggacattacg tatttgaact gttgcttaaa 13560
 tttgtgttat ttttcaacta ttatatttct atatataatt ggtgttatc catttgctat 13620
 ttaaagaaac cgagtttcca tcccagacaa gaaatcatgg ccccttgctt gattctgggt 13680
 tcttgTTTTT cttctcatta aagctaacag aatcctttca tattaagttg tactgtagat 13740
 gaacttaagt tatttaggcg tagaacaaaa ttattcatat ttatactgat ctttttccat 13800
 ccagcagtg agtttagtac ttaagagttt gtgcccttaa accagactcc ctggattaat 13860
 gctgtgtacc cgtgggcaag gtgcctgaat tctctataca cctatttcct catctgtaaa 13920
 atggcaataa tagtaatagt acctaatgtg tagggttggt ataagcattg agtaagataa 13980

ataataaaa gcacttagaa cagtgcctgg aacataaaaa cacttaataa tagctcatag 14040
 ctaacatttc ctatttacat ttcttctaga aatagccagt atttggtgag tgcctacatg 14100
 ttagttcctt tactagttgc ttacatgta ttatcttata ttctgtttta aagtttcttc 14160
 acagttacag attttcatga aattttactt ttaataaaaag agaagtaaaa gtataaagta 14220
 ttcactttta tgttcacagt cttttccttt aggctcatga tggagtatca gaggcatgag 14280
 tgtgtttaac ctaagagcct taatggcttg aatcagaagc acttttagtcc tgtatctgtt 14340
 cagtgtcagc ctttcataca tcattttaaa tcccatttga ctttaagtaa gtcacttaat 14400
 ctctctacat gtcaatttct tcagctataa aatgatggta tttcaataaa taaatacatt 14460
 aattaaatga tattatactg actaattggg ctgttttaag gctcaataag aaaatttctg 14520
 tgaaaggctc ctagaaaaatg taggttcta tacaataaa agataacatt gtgcttatag 14580
 cttcgggtgt tatcatataa agctattctg agttatttga agagctcacc tacttttttt 14640
 tgttttttagt ttgttaaatt gttttatagg caatgttttt aatctgtttt ctttaactta 14700
 cagtgccatc agctcacact tgcaaacctg tggctgttcc gttgtagtag gtagcagtgc 14760
 agagaaagta aataaggtag tttattttat aatctagcaa atgatttgac tctttaagac 14820
 tgatgatata tcatggattg tcatttaaat ggtaggttgc aattaaaatg atctagtagt 14880
 ataaggaggc aatgtaatct catcaaattg ctaagacacc ttgtggcaac agtgagtttg 14940
 aaataaactg agtaagaatc atttatcagt ttattttgat agctcgaaa taccagtgtc 15000
 agtagtgtat aaatggtttt gagaatatat taaaatcaga tatataaaaa aaattactct 15060
 tctattttccc aatgttatct ttaacaaatc tgaagatagt catgtacttt tggtagtagt 15120
 tccaaagaaa tgttatttgt ttattcatct tgatttcatt gtcttcgctt tccttctaaa 15180
 tctgtccctt ctagggagct attgggatta agtggtcatt gattattata ctttattcag 15240
 taatgtttct gacccttcc ttcagtgcata ctgagttaa ttaaggatta atgaacagtt 15300
 acattttcaa gcattagcta ataaactaaa ggattttgca cttttcttca ctgaccatta 15360
 gttagaaaga gttcagagat aagtatgtgt atctttcaat ttcagcaaac ctaatttttt 15420
 aaaaaaagtt ttacatagga aatatgttgg aaatgatact ttacaaagat attcataatt 15480
 tttttttgta atcagctact ttgtatattt acatgagcct taattttatat ttctcatata 15540
 accatttatg agagcttagt atacctgtgt catttatatt catctacgaa ctagtgacct 15600
 tattccttct gttacctcaa acaggtggct ttccatctgt gatctccaaa gccttaggtt 15660
 gcacagagtg actgccgagc tgctttatga agggagaaag gctccatagt tggagtgttt 15720
 tttttttttt ttttaaacat ttttccatc ctccatctc ttgagggaga atagcttacc 15780
 ttttatcttg ttttaatttg agaaagaagt tgccaccact ctaggttgaa aaccactcct 15840
 ttaacataat aactgtggat atggtttgaa tttcaagata gttacatgcc tttttatttt 15900
 tcctaataga gctgtaggtc aaatattatt agaatcagat ttctaaatcc cacccaatga 15960
 cctgcttatt ttaaatcaaa ttcaataatt aattctcttc tttttggagg atctggacat 16020
 tctttgatat ttcttacaac gaatttcatg tgtagacca ctaaacagaa gctataaaag 16080
 ttgcatggtc aaataagtct gagaaagtct gcagatgata taattcacct gaagagtcac 16140
 agtatgtagc caaatgttaa aggttttgag atgccataca gtaaatttac caagcatttt 16200
 ctaaatttat ttgaccacag aatccctatt ttaagcaaca actgttacat cccatggatt 16260
 ccaggtgact aaagaatact tatttcttag gatatgtttt attgataata acaattaaaa 16320

tttcagatat ctttcataag caaatcagtg gtcttttttac ttcatgtttt aatgctaaaa 16380
tatttttcttt tatagatagt cagaacatta tgcctttttc tgactccagc agagagaaaa 16440
tgctccaggt tatgtgaagc agaatcatca tttaaatatg agtcagggtt ctttgtacaa 16500
ggcctgctaa aggtatagtt tctagttatc acaagtgaac ccacttttct aaaatcattt 16560
ttgagactct ttatagacaa atcttaaata ttagcattta atgtatctca tattgacatg 16620
cccagagact gacttccttt acacagttct gcacatagac tatatgtctt atggatttat 16680
agtttagtatc atcagtgaac caccatagaa taccctttgt gttccaggtg ggtccctgtt 16740
cctacatgtc tagcctcagg actttttttt ttttaacaca tgcttaaatac aggttgcaca 16800
tcaaaaaataa gatcatttct ttttaactaa atagatttga attttattga aaaaaattt 16860
taaacatctt taagaagctt ataggattta agcaattcct atgtatgtgt actaaaatat 16920
atatatttct atatataata tatattagaa aaaaattgta tttttctttt atttgagtct 16980
actgtcaagg agcaaaacag agaaatgtaa attagcaatt atttataata cttaaaggga 17040
agaaagttgt tcacctgtt gaatctatta ttgttatttc aattatagtc ccaagacgtg 17100
aagaaatagc tttcctaata gttatgtgat tgtctcatag tgactacttt cttgaggatg 17160
tagccacggc aaaaatgaaat aaaaaaattt aaaaattgtt gcaaatacaa gttatattag 17220
gcttttgtgc attttcaata atgtgctgct atgaactcag aatgatagta tttaaatata 17280
gaaactagtt aaaggaaaac tagtttctat ttgagttata catatctgta aattagaact 17340
tctcctgtta aaggcataat aaagtgccta atacttttgt ttcctcagca ccctctcatt 17400
taattatata attttagttc tgaaaggac ctataccaga tgcctagagg aaatttcaaa 17460
actatgatct aatgaaaaaa tatttaatatg ttctccatgc aaatacaaat catatagttt 17520
tccagaaaat accttgaca ttatacaaag atgattatca cagcattata atagtaaaaa 17580
aatggaaata gcctcttct tctgttctgt tcatagcaca gtgcctcata cgcagtaggt 17640
tattattaca tggtaactgg ctacccaac tgattaggaa agaagtaaata ttgttttata 17700
aaaatacata ctcatgagg tgcatagaat aattaagaaa ttaaaagaca cttgtaattt 17760
tgaatccagt gaataccac tgtaatatatt tggatatatc ctttctagtc ttttttccc 17820
ttttgcatgt attttcttta agactccac cccactgga tcatctctgc atgttctaata 17880
ctgctttttt cacagcagat tctaagcctc tttgaatatc aacacaaact tcaacaactt 17940
catctataga tgccaaataa taaattcatt tttatttact taaccacttc ctttgatgc 18000
ttaggtcatt ctgatgttt gctattgaaa ccaatgctat actgaacact tctgtcacta 18060
aaactttgca cacactcatg aatagcttct taggataaat ttttagagat ggatttgcta 18120
aatcagagac cattttttta aattaaaaaa caattattca tatcgtttgg catgtaagac 18180
agtaaatttt ctttttattt tgacaggatt caactggaag ctttgtgctg ctttccggc 18240
aagtcatgta tgctccatat cccaccacac acatagatgt ggatgtcaat actgtgaagc 18300
agatgccacc ctgtcatgaa catatttata atcagcgtag atacatgaga tccgagctga 18360
cagccttctg gagagccact tcagaagaag acatggctca ggatacgatc atctacactg 18420
acgaaagctt tactcctgat ttgtacgtaa tgctctgctt gctggtagtg tagtcaagca 18480
atatgaaatt gtgtctttta cgaataaaaa caaacagaa gttgcattta aaaagaaaga 18540
aatattacca gcagaattat gcttgaagaa acatttaatac aagcattttt ttcttaaatg 18600
ttcttctttt tccatacaat tgtgtttacc ctaaaatagg taagattaac ctttaaagta 18660

```

aatatttaac tatttgttta ataaatatat attgagctcc taggcactgt tctaggtacc 18720
gggcttaata gtggccaacc agacagcccc agccccagcc cctacattgt gtatagtcta 18780
ttatgtaaca gttattgaat ggacttatta acaaaaccaa agaagtaatt ctaagtcttt 18840
tttttcttga catatgaata taaaatacag caaaactggt aaaatatatt aatggaacat 18900
ttttttactt tgcattttat attgttattc acttcttatt tttttttaa aaaaaagcc 18960
tgaacagtaa attcaaaaagg aaaagtaatg ataattaatt gttgagcatg gacccaactt 19020
gaaaaaaaa atgatgatga taaatctata atcctaaaac cctaagtaaa cacttaaaag 19080
atgttctgaa atcaggaaaa gaattatagt atacttttgt gtttctcttt tatcagttga 19140
aaaaaggcac agtagctcat gcctgtaaga acagagcttt gggagtgcaa ggcaggcgga 19200
tcacttgagg ccaggagttc cagaccagcc tgggcaacat agtgaaaccc catctctaca 19260
aaaaataaaa aagaattatt ggaatgtgtt tctgtgtgcc tgtaatccta gctattccga 19320
aagctgaggc aggaggatct tttgagccca ggagttttag gttacaggga gttatgatgt 19380
gccagtgtac tccagcctgg ggaacaccga gactctgtct tatttaaaaa aaaaaaaaaa 19440
aaaatgcttg caataatgcc tggcacatag aaghtaacag taagtgttaa ctgtaataac 19500
ccaggtctaa gtgtgtaagg caatagaaaa attggggcaa ataagcctga cctatgtatc 19560
tacagaatca gtttgagctt aghtaacaga cctgtggagc accagtaatt acacagtaag 19620
tgtaaccaa aagcatagaa taggaatatc ttgttcaagg gacccccagc cttatacatc 19680
tcaagggtgca gaaagatgac ttaatatagg acccattttt tcctagttct ccagagtttt 19740
tattggttct tgagaaagta gtaggggaat gtttagaaa atgaattggt ccaactgaaa 19800
ttacatgtca gtaagttttt atatatgggt aaattttagt agacatgtag aagttttcta 19860
attaatctgt gccttgaaac attttctttt ttcctaaagt gcttagtatt tttccgttt 19920
tttgattggg tacttgggag cttttttgag gaaatttagt gaactgcaga atgggtttgc 19980
aaccatttgg tatttttggt ttgtttttta gaggatgtat gtgtatttta acatttctta 20040
atcattttta gccagctatg tttgttttgc tgatttgaca aactacagtt agacagctat 20100
tctcattttg ctgatcatga caaaataata tcctgaattt ttaaattttg catccagctc 20160
taaattttct aaacataaaa ttgtccaaaa aatagtattt tcagccacta gattgtgtgt 20220
taagtctatt gtcacagagt cttttactt ttaagtatat gtttttacct gtttaattatg 20280
tttgttattt ttaattttta ctttttaaaa taattccagt cactgccaat acatgaaaaa 20340
ttgggtcactg gaattttttt tttgactttt attttaggtt catgtgtaca tgtgcaggtg 20400
tgttatacag gtaaattgctg tgtcatgagg gtttggtgta caggtgattt cattaccag 20460
gtaataagca tagtacccaa taggtagttt tttgatectc acccttctcc caccctcaag 20520
taggccctgg tgttgctgtt tccttctttg tgtccatgta tactcagtgt ttagctccca 20580
cttagaagtg agaacatgctg gtagttggtt ttctgttctt ggattagttc acttaggata 20640
atgacctcta gctccatctg gtttttatgg ctgcatagta ttccatggtg tatatgtatc 20700
acattttctt tatccagctt accattgata ggcatttagg ttgattccct gtctttgtta 20760
tcatgaatag tgctgtgatg aacatacaca tgcattgtct tttatggtag aaaaatttgt 20820
attccttttag gtacatatag aataatgggg ttgctagggt gaatggtagt tctattttca 20880
gttatttgag aaatcttcaa actgcttttc ataatagcta aactaattta cagtcccgcc 20940
agcagtgtat aagtgttccc ttttctccac aaccttgcca acatctgtga ttttttgact 21000

```

```

ttttaataat agccattcct agagaattga tttgcaattc tctatttagtg atattaagca 21060
ttttttcata tgcttttttag ctgtctgtat atattcttct gaaaaatttt catgtccttt 21120
gcccagtttg tagtgggggtg ggttgttttt tgcttggttaa ttagtttttaa gttccttcca 21180
gattctgcat atccctttgt tggatacatg gtttgcatg atttttctcc cattgtgtag 21240
gttgtctttt actctgttga tagtttcttt tgccatgcag gagctcgta ggtcccatth 21300
gtgtttgttt ttgttgcagt tgcttttggc gtcttcatca taaaatctgt gccagggcct 21360
atgtccagaa tggattttcc taggttgtct tccagggttt ttacaatttt agattttacg 21420
tttatgtctt taatccatct tgagttgatt tttgtatatg gcacaaggaa ggggtccagt 21480
ttcactccaa ttcctatggc tagcaattat cccagcacca tttattgaat acggagtcct 21540
ttccccattg cttgtttttt gtcaactttg ttgaagatca gatggttgta agtgtgtggc 21600
tttatttctt ggctctctat tctccattgg tctatgtgtc tgtttttata acagtacct 21660
gctgttcagg ttcctatagc ctttttagtat aaaatcggt aatgtgatgc ctccagcttt 21720
gttctttttg cttaggattg ctttggtctat ttgggtcct ttttgggtcc atattaattt 21780
taaaacagtt ttttctggtt ttgtgaagga tatcattggt agtttatagg aatagcattg 21840
aatctgtaga ttgctttggg cagtatggc attttaacaa tattaattct tcctatctat 21900
gaatatggaa tgtttttcca tgtgtttgtg tcatctcttt atacctgatg tataaagaaa 21960
agctgggtatt attcctactc aatctgttcc aaaaaattga ggaggaggaa ctcttcctta 22020
atgaggccag catcattctg ataccaaaac ctggcagaga cacaacagaa aaaagaaaac 22080
ttcaggccaa tatccttgat gaatatagat gcaaaaatcc tcaacaaaat actagcaaac 22140
caaatccagc agcacatcaa aaagctgatc tactttgatc aagtaggctt tatccctggg 22200
atgcaagggt gggtcaacat acacaaatca ataagtgtga ttcatcacat aaacagagct 22260
aaaaacaaaa accacaagat tatctcaata ggtagagaaa aggttgtcaa taaaatttaa 22320
catcctccat gtaaaaaacc ttcagtaggt caggtgtagt gactcacacc tgtaatccca 22380
gcactttggg aggccaaggc gggcatatct ctaagccca ggagttcaag acgagcctag 22440
gcagcatggt gaaaccccat ctctacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaatta gcttggtatg 22500
gtgacatgca cctatagtcc cagctattca ggaggttgag gtgggaggat tgtttgagcc 22560
cgggaggcag aggttggcag cgagctgaga tcatgccacc gcactccagc ctgggcaacg 22620
gagtgagacc ctgtctcaaa aaagaaaaat cacaacaat cctaaacaaa ctaggcattg 22680
aaggaacatg cctcaaaaaa ataagaacca tctatgacag acctagacc aatatcttac 22740
caaatgggca aaagctggaa gtatttctct tgagaaccgt aacaagacaa ggatgtccac 22800
tctcaccact ctttttcagc atagttcttg aagtcctagc cagagcaatc aggaaagaga 22860
aagaaagaaa gacattcaga taggaagaga agaagtcaaa ctatttctgt ttgcaggcag 22920
tataattctg tacctagaaa atctcatagt ctctgccag aaactcctaa atctgttaaa 22980
aatttcagca aagttttggc attctctata ctccaacacc ttccaaagt agagcaaaat 23040
caagaacaca gtccattca caatagccgc aaaacgaata aaatacctag gaatccagct 23100
aaccagggag gtgaaagatc tctatgagaa ttacaaaaca ctgctgaaag aaatcagaga 23160
tgacacaaac aaatggaaat gttctttttt aacaccttgc tttatctaata tcacttatga 23220
tgaagatact cattcagtg aacaggtata ataagtccac tcgattaaat ataagcctta 23280
ttctctttcc agagcccaag aaggggcact atcagtgcc agtcaataat gacgaaatgc 23340

```

```

taatatTTTT cccctttacg gtttctttct tctgtagtgt ggtacactcg tttcttaaga 23400
taaggaaact tgaactacct tcctgtttgc ttctacacat acccattctc tttttttgcc 23460
actctgggtca ggtataggat gatccctacc actttcagtt aaaaactcct cctcttacta 23520
aatgtttctct taccctctgg cctgagtaga acctagggaa aatggaagag aaaaagatga 23580
aagggagggtg gggcctggga agggaataag tagtcctgtt tgtttggtg tttgctttag 23640
cacctgctat atcctagggtg ctgtgttagg cacacattat ttttaagtggc cattatatta 23700
ctactactca ctctggtcgt tgccaaggta ggtagtactt tcttgatag ttggttcattg 23760
ttacttacag atggtgggct tggtgaggca aaccagtggt ataatcatcg gagtgtgttc 23820
tctaactctca ctcaaatttt tcttcacatt ttttggtttg ttttggtttt tgatggtagt 23880
ggcttatTTTT tgttgctggt ttgttttttg ttttttttg agatggcaag aattggtagt 23940
tttatTTtatt aattgcctaa gggctctctac tttttttaa agatgagagt agtaaaatag 24000
attgatagat acatacatac cttactggg gactgcttat attctttaga gaaaaatta 24060
catattagcc tgacaaacac cagtaaaatg taaatatatc cttgagtaaa taaatgaatg 24120
tatatTTTgt gtctccaaat atatatatct atattcttac aaatgtgttt atatgtaata 24180
tcaatttata agaacttaaa atgttggtc aagtgaggga ttgtggaagg tagcattata 24240
tgGCCatttc aacatttgaa cttttttctt ttcttcattt tcttcttttc ttcaggaata 24300
tttttcaaga tgtcttacac agagacactc tagtgaaagc cttcctggat caggtaaatg 24360
ttgaacttga gattgtcaga gtgaatgata tgacatgttt tcttttttaa tatatcctac 24420
aatgcctggt ctatatatTT atattcccct ggatcatgcc ccagagttct gctcagcaat 24480
tgcagttaag ttagttacac tacagttctc agaagagtct gtgaggcat gtcaagtga 24540
tcattacatt ggttgccctc tgcctagat ttatgcttcg ggaattcaga cttttgttta 24600
caatataata aatattattg ctatctttta aagatataat aataagatat aaagttgacc 24660
acaactactg ttttttgaaa catagaattc ctggtttaca tgtatcaaag tgaaatctga 24720
cttagctttt acagatataa tatatacata tatatattct gcaatgcttg tactatatat 24780
gtagtacaag tatatatata tgtttggtg tgatatata tatagtacga gcatatatac 24840
atattaccag cattgtagga tatatatatg tttatatatt aaaaaaaagt tataaactta 24900
aaaccctatt atgttatgta gagtatatgt tatatatgat atgtaaaata tataacatat 24960
actctatgat agagtgtaat atatttttta tatatatTTT aacatttata aaatgataga 25020
attaagaatt gagtcctaatt ctgttttatt aggtgctttt tgtagtgtct ggtcttttcta 25080
aagtgtctaa atgatttttc cttttgactt attaattgggg aagagcctgt atattaacaa 25140
ttaagagtgc agcattccat acgtcaaaca acaaacattt taattcaagc attaacctat 25200
aacaagtaag tttttttttt ttttttgaga aagggagggt gtttatttgc ctgaaatgac 25260
tcaaaaaatat ttttgaaaca tagtgtactt atttaaataa catctttatt gtttcattct 25320
tttaaaaaat atctacttaa ttacacagtt gaaggaaatc gtagattata tggaacttat 25380
ttcttaatat attacagttt gttataataa cattctgggg atcaggccag gaaactgtgt 25440
catagataaa gctttgaaat aatgagatcc ttatgtttac tagaaatttt ggattgagat 25500
ctatgagggtc tgtgacatat tgcgaagttc aaggaaaatt cgtaggcctg gaatttcattg 25560
cttctcaagc tgacataaaa tccctccac tctccacctc atcatatgca cacattctac 25620
tcctacccac ccactccacc ccctgcaaaa gtacaggtat atgaatgtct caaaaccata 25680

```

```

ggctcatcctt ctaggagcctt caatgttatt tgaagatttg ggcagaaaaa attaagtaat 25740
acgaaataac ttatgtatga gttttaaaag tgaagtaaac atggatgtat tctgaagtag 25800
aatgcaaaaat ttgaatgcat ttttaaagat aaattagaaa acttctaaaa actgtcagat 25860
tgtctgggcc tgggtggctta tgcctgtaat cccagcactt tgggagtccg aggtgggtgg 25920
atcacaaggt caggagatcg agaccatcct gccaacatgg tgaaaccccc tctctactaa 25980
gtatacaaaa attagctggg cgtggcagcg tgtgcctgta atcccagcta cctgggaggc 26040
tgaggcagga gaatcgcttg aacccaggag gtgtaggttg cagtgagtca agatcgcgcc 26100
actgcacttt agcctgggtga cagagctaga ctccgtctca aaaaaaaaaa aaaatatcag 26160
attgttccta cacctagtgc ttctatacca cactcctgtt agggggcatc agtggaaatg 26220
gttaaggaga tgtttagtgt gtattgtctg ccaagcactg tcaacactgt catagaaact 26280
tctgtacgag tagaatgtga gcaaattatg tgttgaaatg gttcctctcc ctgcaggtct 26340
ttcagctgaa acctggctta tctctcagaa gtactttcct tgcacagttt ctacttgtcc 26400
ttcacagaaa agccttgaca ctaataaaaat atatagaaga cgatacgtga gtaaaactcc 26460
tacacggaag aaaaaccttt gtacattgtt tttttgtttt gtttcctttg tacattttct 26520
atatcataat ttttgcgctt cttttttttt tttttttttt tttttttcca ttatttttag 26580
gcagaaggga aaaaagccct ttaaattctt tcggaacctg aagatagacc ttgatttaac 26640
agcagagggc gatcttaaca taataatggc tctggctgag aaaattaaac caggcctaca 26700
ctctttttatc tttggaagac ctttctacac tagtgtgcaa gaacgagatg ttctaatac 26760
tttttaaatg tgtaacttaa taagcctatt ccatcacaat catgatcgct ggtaaagtag 26820
ctcagtgggtg tggggaaacg ttcccctgga tcatactcca gaattctgct ctcagcaatt 26880
gcagttaagt aagttacact acagttctca caagagcctg tgaggggatg tcaggtgcat 26940
cattacattg ggtgtctctt ttccctagatt tatgcttttg ggatacagac ctatgtttac 27000
aatataataa atattattgc tatcttttaa agatataata ataggatgta aacttgacca 27060
caactactgt ttttttgaaa tacatgattc atggtttaca tgtgtcaagg tgaaatctga 27120
gttggctttt acagatagtt gactttctat cttttggcat tctttgggtg gtagaattac 27180
tgtaataactt ctgcaatcaa ctgaaaacta gagcctttta atgatttcaa ttccacagaa 27240
agaaagtgag cttgaacata ggatgagcct tagaaaagaa attgatcaag cagatgttta 27300
attggaattg attattagat cctactttgt ggatttagtc cctgggattc agtctgtaga 27360
aatgtctaata agttctctat agtccttggt cctgggtgaac cacagttagg gtgttttggt 27420
tattttattg ttcttgctat tgttgatatt ctatgtagtt gagctctgta aaaggaaatt 27480
gtattttatg ttttagtaat tgttgccaac tttttaaatt aattttcatt atttttgagc 27540
caaattgaaa tgtgcacctc ctgtgccttt tttctcctta gaaaatctaa ttacttgga 27600
caagttcaga tttcactggg cagtcatttt catcttggtt tcttcttgct aagtcttacc 27660
atgtacctgc tttggcaatc attgcaactc tgagattata aaatgcctta gagaatatac 27720
taactaataa gatctttttt tcagaaacag aaaatagttc cttgagtact tccttcttg 27780
atttctgcct atgtttttga agttgttgct gtttgctgc aataggctat aaggaatagc 27840
aggagaaatt ttactgaagt gctgttttcc taggtgctac tttggcagag ctaagttatc 27900
ttttgttttc ttaatgcgtt tggaccattt tgctggctat aaaataactg attaatataa 27960
ttctaacaca atgttgacat ttagtttaca caaacacaaa taaatatattt atttaaaatt 28020

```

```

ctggaagtaa tataaaaggg aaaatatatt tataagaaag ggataaaggt aatagagccc 28080
ttctgcccc caccaccaa atttacaca caaatgaca tggtcgaatg tgaaaggtca 28140
taatagcttt cccatcatga atcagaaaga tgtggacagc ttgatgtttt agacaaccac 28200
tgaactagat gactgttgta ctgtagctca gtcatttaaa aaatatataa atactacctt 28260
gtagtgtccc atactgtgtt ttttacatgg tagattctta ttttaagtgc aactggttat 28320
tttctttggc tggtttattg tactgttata cagaatgtaa gttgtacagt gaaataagtt 28380
attaaagcat gtgtaaacat tggtatata cttttctcct aaatggagaa ttttgaataa 28440
aatatatattg aaattttgcc tctttcagtt gttcattcag aaaaaaatac tatgatattt 28500
gaagactgat cagcttctgt tcagctgaca gtcatgctgg atctaaactt tttttaaata 28560
taattttgtc ttttcaaaga aaaaatattt aaagaagctt tataatataa tcttatgtta 28620
aaaaaacttt ctgcttaact ctctggattt cattttgatt tttcaaatta tatattaata 28680
tttcaaatgt aaaatactat ttagataaat tgtttttaaa cattcttatt attataatat 28740
taatataacc taaactgaag ttattcatcc caggtatcta atacatgtat ccaaagtaaa 28800
aatccaagga atctgaacac tttcatctgc aaagctagga ataggtttga cattttcact 28860
ccaagaaaaa gttttttttt gaaaatagaa tagttgggat gagaggtttc tttaaaagaa 28920
gactaactga tcacattact atgattctca aagaagaaac caaaacttca tataatacta 28980
taaagtaaat ataaaaatag tcttctata gtatatttct ataatgctac agtttaaaca 29040
gatcactctt atataatact attttgattt tgatgtagaa ttgcacaaat tgatatttct 29100
cctatgatct gcagggtata gcttaaagta acaaaaacag tcaaccacct ccatttaaca 29160
cacagtaaca ctatgggact agttttatta cttccatttt acaaatgagg aaactaaagc 29220
ttaagatgt gtaatacacc gcccaaggtc acacagctgg taaaggtgga tttcatccca 29280
gacagttaca gtcattgcca tgggcacagc tcctaactta gtaactccat gtaactggta 29340
ctcagtgtag ctgaattgaa aggagagtaa ggaagcaggt tttacaggtc tacttgcact 29400
attcagagcc cgagtgtgaa tccctgctgt gctgcttggga gaagttactt aacctatgca 29460
aggttcattt tgtaaatatt ggaaatggag tgataatacg tacttcacca gaggatttaa 29520
tgagacctta tacgatcctt agttcagtag ctgactagtg cttcataaat gctttttcat 29580
ccaatctgac aatctccagc ttgtaattgg ggcatttaga acatttaata tgattattgg 29640
catggtaggt taaagctgtc atcttgcgtt tttctatttg ttctttttgt tttctcctta 29700
cttttggtatt tttttattct actatgtctt ttctattgtc ttattaacta tactctttga 29760
tttattttag tggttgtttt agggttatac ctctttctaa tttaccagtt tataaccagt 29820
ttatatacta cttgacatat agcttaagaa acttactgtt gttgtctttt tgctgttatg 29880
gtcttaacgt ttttatttct acaaacatta taaactccac actttattgt tttttaattt 29940
tacttataca gtcaattatc ttttaaagat atttaaatat aaacattcaa aacaccccaa 30000

```

t 30001

<210> 3

<211> 1031

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

attccccggga tacgtaacct acggtgtccc gctaggaaag agaggtgcgt caaacagcga 60
 caagttccgc ccacgtaaaa gatgacgctt ggtgtgtcag ccgtccctgc tgcccggttg 120
 cttctctttt gggggcgggg tctagcaaga gcaggtgtgg gtttaggaga tatctccgga 180
 gcatttggat aatgtgacag ttggaatgca gtgatgtcga ctctttgccc accgccatct 240
 ccagctgttg ccaagacaga gattgcttta agtggcaaat cacctttatt agcagctact 300
 tttgcttact gggacaatat tcttggtcct agagtaaggc acatttgggc tccaaagaca 360
 gaacaggtac ttctcagtga tggagaaata acttttcttg ccaaccacac tctaaatgga 420
 gaaatccttc gaaatgcaga gagtgggtgct atagatgtaa agttttttgt cttgtctgaa 480
 aaggggagtga ttattgtttc attaatcttt gatggaaact ggaatgggga tcgcagcaca 540
 tatggactat caattatact tccacagaca gaacttagtt tctacctccc acttcataga 600
 gtgtgtgttg atagattaac acatataatc cggaaaggaa gaatatggat gcataaggaa 660
 agacaagaaa aatgtccaga agattatctt agaaggcaca gagagaatgg aagatcaggg 720
 tcagagtatt attccaatgc ttactggaga agtgattcct gtaatggaaa ctgctttcct 780
 ctatgaaatt cccccgggtt cctggaggaa atagatatag gctgatacag ttaccaatg 840
 atggatgaat attggggggac cgccttgtca ttgaaaggct ttcttttctc caggaaagaa 900
 atttttttcc ttttccataa aaagcttggg aatggaagac aacaattccc attctttttt 960
 tgcgttccac ccctatgtga caacagaaat ttttggggaa acaacaacga aaaaatttta 1020
 tcccgcgcg a 1031

<210> 4

<211> 3244

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4

gggcggggct gcggttgcgg tgcctgcgcc cgcggcggcg gaggcgcagg cggtggcgag 60
 tggatatctc cggagcattt ggataatgtg acagttggaa tgcagtgatg tcgactcttt 120
 gcccaccgcc atctccagct gttgccaaga cagagattgc tttaaagtggc aaatcacctt 180
 tatttagcagc tacttttgct tactgggaca atattcttgg tcctagagta aggcacattt 240
 gggctccaaa gacagaacag gtactttctca gtgatggaga aataactttt cttgccaacc 300
 acactctaaa tggagaaaatc cttcgaaatg cagagagtgg tgctatagat gtaaagtttt 360
 ttgtcttgtc tgaaaaggga gtgattattg tttcattaat ctttgatgga aactggaatg 420
 gggatcgag cacatatgga ctatcaatta tacttccaca gacagaactt agtttctacc 480
 tcccacttca tagagtgtgt gttgatagat taacacatat aatccgaaa ggaagaatat 540
 ggatgcataa ggaaagacaa gaaaatgtcc agaagattat cttagaaggc acagagagaa 600
 tggaagatca gggtcagagt attattccaa tgcttactgg agaagtgatt cctgtaatgg 660
 aactgctttc atctatgaaa tcacacagtg ttctgaaga aatagatata gctgatacag 720
 tactcaatga tgatgatatt ggtgacagct gtcatgaagg ctttcttctc aatgccatca 780
 gctcacactt gcaaacctgt ggctgttccg ttgtagtagg tagcagtgca gagaaagtaa 840
 ataagatagt cagaacatta tgcctttttc tgactccagc agagagaaaa tgctccaggt 900
 tatgtgaagc agaatcatca tttaaatatg agtcagggt ctttgtacaa ggcctgctaa 960

```

aggattcaac tggaagcttt gtgctgcctt tccggcaagt catgtatgct ccatatccca 1020
ccacacacat agatgtggat gtcaatactg tgaagcagat gccaccctgt catgaacata 1080
tttataatca gcgtagatac atgagatccg agctgacagc cttctggaga gccacttcag 1140
aagaagacat ggctcaggat acgatcatct acactgacga aagctttact cctgatttga 1200
atatttttca agatgtctta cacagagaca ctctagttaa agccttcctg gatcaggtct 1260
ttcagctgaa acctggctta tctctcagaa gtactttcct tgcacagttt ctacttgtcc 1320
ttcacagaaa agccttgaca ctaataaaaat atatagaaga cgatacgagc aagggaaaaa 1380
agccctttta atctcttcgg aacctgaaga tagaccttga tttaacagca gagggcgatc 1440
ttaacataat aatggctctg gctgagaaaa ttaaccagg cctacactct tttatctttg 1500
gaagaccttt ctacactagt gtgcaagaac gagatgttct aatgactttt taaatgtgta 1560
acttaataag cctattccat cacaatcatg atcgctggta aagtagctca gtgggtgtggg 1620
gaaacgttcc cctggatcat actccagaat tctgctctca gcaattgcag ttaagtaagt 1680
tacctacag ttctcacaag agcctgtgag gggatgtcag gtgcatcatt acattgggtg 1740
tctcttttcc tagatttatg cttttgggat acagacctat gtttacaata taataaatat 1800
tattgctatc ttttaaagat ataataatag gatgtaaact tgaccacaac tactgttttt 1860
ttgaaataca tgattcatgg ttacatgtg tcaagtgaa atctgagttg gcttttacag 1920
atagttgact ttctatcttt tggcattctt tgggtgttag aattactgta atacttctgc 1980
aatcaactga aaactagagc ctttaaata tttcaattcc acagaaagaa agtgagcttg 2040
aacataggat gagctttaga aagaaaattg atcaagcaga tgtttaattg gaattgatta 2100
ttagatccta ctttgtggat ttagtccctg ggattcagtc ttagaaatg tctaatagtt 2160
ctctatagtc ctgttccctg gtgaaccaca gttagggtgt tttgtttatt ttattgttct 2220
tgctattggt gatattctat gtagttgagc tctgtaaaag gaaattgtat tttatgtttt 2280
agtaattggt gccaaacttt taaattaatt ttcatattt ttgagccaaa ttgaaatgtg 2340
cacctcctgt gccttttttc tccttagaaa atctaattac ttggaacaag ttcagatttc 2400
actggtcagt cattttcatc ttgttttctt cttgctaagt cttaccatgt acctgctttg 2460
gcaatcattg caactctgag attataaaaat gccttagaga atatactaac taataagatc 2520
tttttttcag aaacagaaaa tagttccttg agtacttctt tcttgcatth ctgcctatgt 2580
ttttgaagtt gttgctgttt gcctgcaata ggctataagg aatagcagga gaaattttac 2640
tgaagtgtg ttttcctagg tgctactttg gcagagctaa gttatctttt gttttcttaa 2700
tgcgttttga ccattttgct ggctataaaa taactgatta atataattct aacacaatgt 2760
tgacattgta gttacacaaa cacaataaaa tattttattt aaaattctgg aagtaatata 2820
aaagggaaaa tatatttata agaaagggat aaaggtaata gagcccttct gccccccacc 2880
caccaaattt acacaacaaa atgacatgtt cgaatgtgaa aggtcataat agctttccca 2940
tcatgaatca gaaagatgtg gacagcttga tgttttagac aaccactgaa ctagatgact 3000
gttgactgt agctcagtca tttaaaaaat atataaatac taccttgtag tgtcccatac 3060
tgtgtttttt acatggtaga ttcttattta agtgctaact gggtattttt tttggctggt 3120
ttattgtact gttatacaga atgtaagttg tacagtgaat taagttatta aagcatgtgt 3180
aaacattggt atatatcttt tctcctaaat ggagaatttt gaataaaata tatttgaaat 3240
tttg 3244

```

<210> 5

<211> 761

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (693) .. (693)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (722) .. (722)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 5

```

cacgaggctt tgatatttct tacaacgaat ttcatgtgta gaccactaa acagaagcta 60
taaaagtgtc atggtcaaat aagtctgaga aagtctgcag atgatataat tcacctgaag 120
agtcacagta ttagccaaa tgtaaagggt tttagatgc catacagtaa atttaccag 180
cattttctaa atttatttga ccacagaatc cctattttta gcaacaactg ttacatcca 240
tggtattccag gtgactaaag aatacttatt tcttaggata tgttttattg ataataaaa 300
ttaaattttc agatatcttt cataagcaaa tcagtgtgtc ttttacttca tgttttaatg 360
ctaaaatatt ttcttttata gatagtcaga acattatgcc tttttctgac tccagcagag 420
agaaaatgct ccagggtatg tgaagcagaa tcatcattta aatatgagtc agggctcttt 480
gtacaaggcc tgctaaagga ttcaactgga agctttgtgc tgcctttccg gcaagtcag 540
tatgtccat atcccaccac acacatagat gtggatgtca atactgtgaa gcagatgcc 600
ccctgtcatg aacatattta taatcagcgt agatacatga gatccgagct gacagccttc 660
tgtagagcca cttcagaaga agacatggct cangatacga tcatctacac tgacgaaagc 720
tntactcctg atttgaatat ttttcaagat gtcttacaca g 761

```

<210> 6

<211> 1901

<212> DNA

<213> 智人

<400> 6

```

acgtaacctc cgggtgtccc ctaggaaaga gaggtgcgtc aaacagcgac aagttccgcc 60
cacgtaaaaag atgacgcttg atatctccgg agcatttgga taatgtgaca gttggaatgc 120
agtgatgtcg actctttgcc caccgccatc tccagctgtt gccaaagacag agattgcttt 180
aagtggtcaa tcacctttat tagcagctac ttttgcttac tgggacaata ttcttggtcc 240
tagagtaagg cacatttggg ctccaaagac agaacaggtc cttctcagtg atggagaaat 300
aacttttctt gccaaaccaca ctctaaatgg agaaatcctt cgaaatgcag agagtgtgtc 360
tatagatgta aagttttttg tcttgtctga aaaggagtg attattgttt cattaatctt 420
tgatggaaac tggaatgggg atcgagcac atatggacta tcaattatac ttccacagac 480

```

```

agaacttagt ttctacctcc cacttcatag agtgtgtgtt gatagattaa cacatataat 540
ccggaagga agaatatgga tgcataagga aagacaagaa aatgtccaga agattatctt 600
agaaggcaca gagagaatgg aagatcaggg tcagagtatt attccaatgc ttactggaga 660
agtgattcct gtaatggaac tgctttcatc tatgaaatca cacagtgttc ctgaagaaat 720
agatatagct gatacagtac tcaatgatga tgatattggg gacagctgtc atgaaggctt 780
tctttctcaag taagaatttt tcttttcata aaagctggat gaagcagata ccatcttatg 840
ctcacctatg acaagatttg gaagaaagaa aataacagac tgttacttta gattgttcta 900
gggacattac gtatttgaac tgttgcttaa atttgtgtta tttttcactc attatatttc 960
tatatatatt tgggtgttatt ccatttgcta tttaaagaaa ccgagtttcc atcccagaca 1020
agaaatcatg gccccttgct tgattctggg ttcttgtttt acttctcatt aaagctaaca 1080
gaatcctttc atattaagtt gtactgtaga tgaacttaag ttatttaggc gtagaacaaa 1140
attattcata tttatactga tctttttcca tccagcagtg gagtttagta cttagagtt 1200
tgtgccctta aaccagactc cctggattaa tgctgtgtac ccgtgggcaa ggtgcctgaa 1260
ttctctatac acctatttcc tcatctgtaa aatggcaata atagtaatag tacctaattg 1320
gtagggttgt tataagcatt gagtaagata aataatataa agcacttaga acagtgcctg 1380
gaacataaaa acacttaata atagctcata gctaacattt cctatttaca tttcttctag 1440
aaatagccag tatttgttga gtgcctacat gttagttcct ttactagttg ctttcatgt 1500
attatcttat attctgtttt aaagtttctt cacagttaca gattttcatg aaattttact 1560
tttaataaaa gagaagtaaa agtataaagt attcactttt atgttcacag tcttttcctt 1620
taggctcatg atggagtatc agaggcatga gtgtgtttta cctaagagcc ttaatggctt 1680
gaatcagaag cactttagtc ctgtatctgt tcagtgtcag cttttcatac atcattttta 1740
atcccatttg actttaagta agtcacttaa tctctctaca tgtcaatttc ttcagctata 1800
aaatgatggg atttcaataa ataaatacat taattaaatg atattatact gactaattgg 1860
gctgttttta ggcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1901

```

<210> 7

<211> 562

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (166) .. (166)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 7

```

agacgtaacc tacggtgtcc cgctaggaaa gagagatata tccggagcat ttggataatg 60
tgacagttgg aatgcagtga tgtcgactct ttgcccaccg ccactctccag ctgttgccaa 120
gacagagatt gctttaagt gcaaatcacc tttattagca gctacntttt gcttactggg 180
acaatattct tggtcctaga gtaaggcaca tttgggctcc aaagacagaa caggtacttc 240
tcagtgatgg agaaataact tttcttgcca accacactct aaatggagaa atccttcgaa 300
atgcagagag tgggtgctata gatgtaaagt tttttgtctt gtctgaaaag ggagtgatta 360

```

ttgtttcatt aatctttgat ggaaactgga atggggatcg cagcacatat ggactatcaa 420
 ttatacttcc acagacagaa cttagtcttct acctcccact tcatagagtg tgtgttgata 480
 gattaacaca tataatccgg aaaggaagaa tatggatgca taaggaaaga caagaaaatg 540
 tccagaagat tatcttagaa gg 562

<210> 8

<211> 798

<212> DNA

<213> 智人

<400> 8

gggctctctt ttggggcggt ggtctagcaa gagcagatat ctccggagca tttggataat 60
 gtgacagttg gaatgcagtg atgtcgactc tttgccacc gccatctcca gctgttgcca 120
 agacagagat tgctttaagt ggcaaatcac ctttattagc agctactttt gcttactggg 180
 acaatattct tggctcctaga gtaaggcaca tttgggctcc aaagacagaa caggtacttc 240
 tcagtgatgg agaaataact tttcttgcca accacactct aaatggagaa atccttcgaa 300
 atgcagagag tggtgctata gatgtaaagt tttttgtctt gtctgaaaag ggagtgatta 360
 ttgtttcatt aatctttgat ggaaactgga atggggatcg cagcacatat ggactatcaa 420
 ttatacttcc acagacagaa cttagtcttct acctcccact tcatagagtg tgtgttgata 480
 gattaacaca tataatccgg aaaggaagaa tatggatgca taaggaaaga caagaaaatg 540
 tccagaagat tatcttagaa ggcacagaga gaatggaaga tcagggtcag agtattattc 600
 caatgcttac tggagaagtg attcctgtaa tgggactgct ttcatttatg aaatcacaca 660
 gtgttcctga agaaatagat atagctgata cagtactcca tgatgatgat atttggtgac 720
 agctgtcatg aaaggctttc ttctcaagta ggaatTTTTT cttttcataa aagctgggat 780
 gaagccagat tcccatct 798

<210> 9

<211> 169

<212> DNA

<213> 智人

<400> 9

aaacagcgac aagttccgcc cacgtaaaag atgatgettg gtgtgtcagc cgtccctgct 60
 gcccggttgc ttctcttttg gggcggggt ctagcaagag cagatatctc cggagcattt 120
 ggataatgtg acagttggaa tgcggtgatg tcgactcttt gccaccgc 169

<210> 10

<211> 176

<212> DNA

<213> 智人

<400> 10

aaaacgtcat cgcacataga aaacagacag acgtaaccta cgggtgtccc ctaggaaaga 60
 gaggtgcgtc aaacagcgac aagttccgcc cacgtaaaag atgacgcttg atatctccgg 120
 agcatttggg taatgtgaca gttggaatgc agtgatgtcg actctttgcc caccgc 176

<210> 11
 <211> 30001
 <212> DNA
 <213> 猕猴
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26113) .. (26155)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28797) .. (29186)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 11
 aatctctaag caattttttg gggaagaaag aattgcaatt agggcatacg ttagatcag 60
 atggctcttcg gtatatccaa cgacaaagaa aaggtgggag gtttcgttaa aaaagagaaa 120
 tgttacatag tacttttaga gaaaattcac tggcactatt aaggtctga ggagctggta 180
 agtttcaatt ggtgagtgat ggtggtagat aaaattagag ctgcagcagg tcatttcagc 240
 aactatcaga taaaactggt ctgaggtcac aacgggcagt ttcagcagct agacttgaaa 300
 gaattacact gcgggagcaa tgtcatttgt cctgcatgct tttctacccc ctacccccac 360
 ttttttagtt ggggtataaca agaacgaccc aaattgtatg atcaactttc acaaagcata 420
 gaacagtagg aaaagggtct gtttctgcag aagatgtaga cgttgagagc cattttatgt 480
 attttatttct ccctttcttc atcgggtgaat gattaaaatg ttctgtatga tttttagtga 540
 tgagaaagggt taaacgccac tcatctgtag taagtgtaat ctacacactt gcagacccaa 600
 aggcataagg tttaaaaaac ctttgttttt ttacacatca aacagagtgg tataaatgct 660
 actcatctgt agtaagtga atctatacac ctgcagacca acgacgcaag gtttcaaaaa 720
 tctttgtgtt ttttacacat caaacagaat ggtacatttt tcaaaagttt aaaaaaaaaa 780
 aaaatccaca tatcacaact agcaaaaatg acattcccca gtgtgaaaat catgcttgag 840
 agaattctta catgtaaagg caaaattgca gtgactttac aaggacctg gggattcccg 900
 cccacagtgt ggagctgtcc cctaccaggg tttgcggcgg agttttgaat gtacttaaca 960
 gtgtctcacg gtaaaaaaca aacttcatec accaaatatt tgttgagcgc cactgcctg 1020
 ccaagcaca acaaaaccat tcaaaaccac gaaatcgtct gcactttctc cggatccagc 1080
 agcctctgcg attaagggtt gcacacgcta ttgcgccaac gctcctccag agcgcgtctt 1140
 aagataaaaag aatgggacaa gttgcccctc cccctttcac gggcctcgtg cgtcaacgct 1200
 atcgcataata gaaaacacac agacgtaacc tacggtgtcc cgctaggaaa gagaggcgcg 1260
 tcaaacagcg acaagttccg cccacgtaaa agatgacgct tgggtcgtca gccgtccctg 1320
 ctgcccgggt ccttctctct gggggcgggg cctggctaga gcaggtgtgg gtttaggagg 1380
 tgtgtgtttt tgtttttcct accctctccc ctctacttgc tctcacagta ctcgtgagg 1440
 gtgaacaaga aaagacctga taaagattaa ccagaagaaa acaaagaggg aaacaactgc 1500
 agcctgtagc gggctctgga gcttaagaga ggcgcgctag gcgccgggcc gtgggcgtgg 1560

```

tcggggcggg gtcgggccag gggcggggct gcggttgccg tccctgcgcc cgcggcggcg 1620
gcggcgggcg cagcggaggc gcaggcggtg gcgagtgggt gagtgaagag gcggcgctct 1680
ggcggggtgtc tgtttggcgt ccggttgccg ggaagagacg cgggtagcag ccggggctct 1740
cctcagagct cgacacatct ttactttccc tctcgtttct ctgaccgaag tcgggtgtcc 1800
ggcttttcgcc tctagcgact ggtggaattg cctgcatctg ggccccgggc ttgcggcgcg 1860
cgcagggacg agggatggga atctggcctc ttctcgtctt tcccggccgc agtgcgctgc 1920
cccagctgtc tccttcccgg ggacctgtg ggagcgctgc cgctacagac tcgagagaaa 1980
ggagcctcgg gcaactgagag gcctcgcccc ggggaaggcc ggagggcggg cgcgggcgcg 2040
cgagcggctc ctgcggacca agtctgggtt ctctgggaac ccgagacggt ccctgatggc 2100
gaggagatca tgcgggggtg tatgggggtg tggagacgtc tgcagaattt tagcccaagc 2160
ttctaaggag tgctgatgac ttgcatatga gggcagcaat gccagtcggt gtactcccta 2220
ttctgtggga catgatgtgg ttgcttcaca gctccgagat gacacagact tgcttaaagg 2280
aagtgaccat tgtgacttgg gcatcacttg actgatggtg atcagttgca gacagaagtg 2340
cacagattac atgtctgtgt ccacactgga tcagtctggc cacgaggaa accacaggct 2400
ttgtattgag aaacaggagg gaggtcctgc actttccag gaggggtggc cttttcagat 2460
gcaatcgaga ttgttaggct ctggtagagt ggttgccctg ttgtggcagt tggcaaattc 2520
ctattcaaac tgttgccgtg cgtcaccagt taacaacaag ggtacacgat ctgtctggca 2580
ttacttctac tttgtacaaa ggatcaaaaa tactgttaga tatgattttt ctcagacttt 2640
gggaaacttt taacgtaatc tgtgaatatc acagaagcaa gactgtcata tagaggatat 2700
taataacctg gagtccgaat acttgaaata tgggtgcatt tgacacgggc tctgttatca 2760
ccacctttgc caagcccttt cacttgagga aaacctcaa tcagttggaa actgcctcat 2820
gctgacagta catctgaaac aaaaacgaga gtagttacca cattccagat tgttactaa 2880
ggcagcatct atctgtctca ggaaaacatt acaagcaact tatgaagttg ataaaaatatt 2940
ttgtttggct atgttggtac tccaaaagtt gctttcagag aaacaaagta aaccaaggag 3000
gacttctgtt gttcacgtct gcccttgggc tctattctac gttaattagg tagttccag 3060
gaggactaga ttagcctacc tattgtctga gaaacttggg tctgtgagaa atggccagat 3120
agtatacga acttcacctc ccagtccttc ctgatgttta agattgagaa agtgttgtga 3180
actttctggt gctgtaagca gttcactgtc cttaaagtgg tcctgggcag ctctgttgt 3240
ggaaagtggg ccgatttagg attctgcttg gctttggact gggagaaaat aaactgcatg 3300
gttacaagta ttgagagcca agttggagaa ggtggcttac acctataatg ccagagcctt 3360
aggaggcagg ggcaagagga tcaactggaag tcaggagtgc aagcccaacc tgggcagcct 3420
agaccctgtc tctacaaaaa attaaaaact tagccgggcg cgggtggtgtg cacctgtagt 3480
cctagctact tgggaggctg aggcaggagg gtcttttgag cccaggagt tgaagttaca 3540
gggagctatg atcctgccag tgcaactccg cctggatggc aaaacgagac cctgtctcta 3600
aaaaacaaga agtgagggtt ttatgatcgt agaaattttg cttacaatag cagtggacca 3660
accacctttc taaataccaa tcagggaaga catagttgat ttttaacaaa catttaagga 3720
aaaagcaaaa cctcaaaact agcactctac taacagtttt agccgatgct aattaaggta 3780
atcatgtctg catatatggg attactttca gaaagtgtat tgggaaacct ctcatgaacc 3840
ctgtgcaacc ctgagcaagc caccgtctca ctcagtttga atcttggctt ccctcaaaag 3900

```

```

actctgtggc taatgtttgg taactctctg gagtagccag cactgcatgt acataggata 3960
ggtacataaa acaattattg gttttgagct gatttttttc agctgcattt gcgtgtatgg 4020
atttttctca ccaaagacaa tgacttcaag tgtaataaa ataattgtac agctctccta 4080
attatacttc tctgtaacat ttcatttctc agactatttc ttttggtagg atttaaaact 4140
aaacaattca gtatgatcct tgttcttcat tttctttctt attctttttt ttttcgagac 4200
agagtctccc tctgttgtgc catctcagcc cattgcaacc tccgccacct gggttcaagt 4260
gattctcctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag gtgcccgcga ccacacctac 4320
ctaatttttt gtatttttag tagaggcggg gtttcacat gttggctagg ctggctctta 4380
actcctgacc tcagatgac cacctgcctc ggctcccaa agagctggga tgataggcgt 4440
gacccacat gcccgccca tttttttct tattctgtta ggagtgagag tgtaactagc 4500
agtctataat agttcaattt tcacaacgtg gtaaaaattt tccctgtaat tcaacgagat 4560
tttgcttcag ggctcagttc tgttttagga aatactttta ttttcagttt gatgatgaaa 4620
tattagagtt gtgatattgc ctttatgatt acctacctt ttaacctaaa agaataaag 4680
aaaaatatgt ttacagtata attgtatggt tgcgtgttaa ctttaattcat tatgttggcc 4740
tccagtttgc tgttgttcgt tatgacagca gtagtgtcat taccatttca attcagatta 4800
cattcctgta tttgatcatt gtaaaactgat tgcttaaatt gtattaaaaa cagtggatat 4860
tttaacaag ctgtactgct tatatccagt gctgtctcct aagactatta aattgatata 4920
acatatataa aagtaaatat ttcctaaatg aatttttgaa attaaaaata cacgtgttaa 4980
aactgtcttt gtgttcaacc atttctgtac gtacttagag ttaactgttt tgccaggctc 5040
tgtatgccta ctcataatgt gataaaagca ctcatcta at gctctataaa tagaagtcag 5100
tgctttccat cagactgaac actcttggca agatgtggat aaaattattt aagtaaaatt 5160
gtttactttg tcatacat ttcacatcaa tgtagctcc caaagcaatc atatggcaaa 5220
gataggcata tcataatttg cctattagct gctttgtatt gctattatga tagatttcac 5280
agtttttagat ctgcttagat gaaaatgtaa ttctttttac tgtcagtcct agatataagt 5340
cttcaattat agtacagtca cacattgctt aggaatgcat cattaggcga ttttgtcatt 5400
atgcaaacat catagagtat acttacataa acctatatag tacagccttt acgtacgtag 5460
gccatatggt atagtctatt gctcctagc tacaatctg tacagctgtt actgtactga 5520
atactataga cagttgtaac acagtggat ttatttatct aaatatatcc aaacatagaa 5580
aaggtacagt taaagtatgg tataaaaaat aatgatatac ctatataggc cacttacgt 5640
gaatggagct tgcaggacta gaagttgctc tgggtgagtc agtaagtaag tggatgaatga 5700
atgtgaaggc ctagaacatt actgtacaca ctgtagactt tataaacaca gtatgcttaa 5760
gctacaccaa atttatcttt acagtttttc ttcaataaaa aattaatgtg aacctactat 5820
aactttttaa ctttgtaaac tttttaattt tttaactttt aaaatactta gcttgaaaca 5880
caaacacgca tagctataca aaaatatatt ttctttatat ccttattcta gaagcttttt 5940
cctattttta actttttttt ttttacttgt tagtcgtttt tgtaaaaaac taaaacacac 6000
acactttcac ctaagcatag acaggattag gatcatcagt ttcactccct tccacctcac 6060
tgccttcac ctccacatct tgtccactg gaacgttttt aggggaata acacacatgt 6120
agctgtcacc tgctatgata acagtgtttt ctgttgata cctcctgaag gacctgcctg 6180
aggctgtttt acatttaact taaaaaaaaa aataagtaga aggagtacac tctaaaataa 6240

```

caataaaagg tatagtctag tgaatacata aaccagcaac atagtagttt attatcaagt 6300
 gttgtatact gtaataattg tatgtgctat actttaaatg acttgaaaaa ttgtactaag 6360
 accttatgat ggftacagtg tcactaaggc gatagcatat tttcaggtcc attgtaatct 6420
 aatgggacca ccatcatata tgcagtccac cattgactga aatgttacat ggtacgtaac 6480
 tgtatttgca agaattgattt gttttacatt aatatcacat aggatgtacc ttttttagagt 6540
 gatatgttta tgtggattaa gatgtacaag tggagcaagg ggacaagagc ctttggttct 6600
 gtcttggatg tgagctttta tgctcttctc atcatgtctg ttttcttatt aaattcaaag 6660
 gcttggacag gccctattta gcccttggtt tctatgtgtt ctaaataact aaagctttta 6720
 aattctagcc atttagtgga gaactctctt tgcaatggta aaatgctgta ttggtttctt 6780
 gactagcata ttaaataatat ttatctttgt cttagatattt caatgtcatt ttaaacaatca 6840
 ggattgggct ttagtattct cataccaga gagttcactg aggatacagg actgtttgcc 6900
 ctttttttgt tatggctcca gacttgtggt atttcgatgt cttttttttt tttttttttt 6960
 ttttaacctt tagcagcttt aaagtatttc tgttgtagg tgttgtagg ctttttctaag 7020
 attactgtaa caaagcacca caaactgagt ggctttaaac aacagcaatt tattctctca 7080
 caattctaga agctagaagt ccgaaatgga agtgttgatg gggcatgatc ctcaaagag 7140
 agaagactct ttccttgcc ttccttggt tctggtggt accagcaatc ctgagcgttc 7200
 ctttcttgct tcgtagtctc agcagtcag tatctgcctt ttgtcttcac atggatgtct 7260
 accccttgct tctgtgtctc cagatctctc tccttataaa cacagaagtt actggattag 7320
 gccccactct aatccagtat gacccattt taacacgatt acacctattt ctaaataagg 7380
 tcacattcac atataccaag ggtaggaat tgagcatatc ttttgcaggg acacaattca 7440
 acccacaagt gtcagtctct agctgagcct ttcccttctt ggttttctcc ttttttagttg 7500
 ctgtgggtta ggggccaat ctccagtcac actagacttg cacatggact ggagatttg 7560
 gaatactgct ggtctattct atgagcttta gtatgtaaca tttaatatca gtgtaaagaa 7620
 gccatttttt cagttcacta tttctttgaa tttcttaatg tatgccctga atataagtaa 7680
 caagttacta tgtctcataa aatgatcata tcaacaaaca tttaatgtgc acctactgtg 7740
 ctagttgaat gtctttatcc tgataggaga taacaggctt ccgcatcttt gacttaagag 7800
 gacaaaccaa gtatgtctga atcatttggg gttttgatgg atatctttaa attgctgaac 7860
 ctaatcattg gttttatatg tcattgttta gatatctcag gagcatttg ataatgtgac 7920
 agttggaatg cagtgatgtc gactctttgc ccaccgcat ctccagctgt tgccaagaca 7980
 gagattgctt taagtggatg atcaccttta ttagcagcta cttttgctta ctgggacaat 8040
 attcttggtc ctagagtaag gcacatttg gtcctaaaga cagaacaggt acttctcagt 8100
 gatggagaaa taacttttct tgccaaccac actctaaatg gagaaatcct tcgaaatgca 8160
 gagagtgggt ctatagatgt aaagtttttt gtcttgtctg aaaaggaggt gattattgtt 8220
 tcattaatct ttgatggaat ctggaatggg gatcgagca ctagcgact atcaattata 8280
 cttccacaga cagaacttag tttctacctc ccacttcata gagtgtgtgt tgatagatta 8340
 acacataata tccggaaagg aagaatatgg atgcataagg taagtgattt ttcagcttat 8400
 taatcatgtt aacctatctt ttgaaagctt attttctgat acatataaat cttattttta 8460
 aattatatgc agtgaacatc aaacaataga tattatttat tttgcattta tcctgttaga 8520
 taaaaataca tctggtctga tgcctgtcat cttcatatta actgtggaag gtaggaaatg 8580

gtagctccac attacagatg aaaagctaaa gcttaaacia atgcagaaac ttttagatcc 8640
 tggattcttc ttgggagcct ttgactctaa taccttttgt ttccctttca ttgcacaatc 8700
 ctgtctttcg ctactacta tgtgtaagta taacagttca aaaaaatagt ttcataagct 8760
 gttggttatg tagcctttgg tctctttaac ctctttgcc agttcccagg ttcataaaat 8820
 gaggaggttg aaccgcatgg ttcccaagag aattcctttt aattttacag aaattattgt 8880
 tttccccgaa gtcctatagt tcaatatata atgatattta catttcagta tagttttggc 8940
 atatctaaaag aacacattaa gttctccttc ctgtgttcca gtttgatact aacctggaag 9000
 tccattaagc attaccaatt ttaaaaggct tttgcccaat agtaaggaaa aataatatct 9060
 tttaaaagaa taatttttta ctatgtttgc aggettactt ccttttttct cacattatga 9120
 aactcttaaa atcaggagaa tcttttaaac atcataatgt ttaatttgaa aagtgcaggt 9180
 cattcttttc ctttttgaaa ctatgcagat gttacattga ctattttctg tgaagttatc 9240
 ttttttttcc ctgcagaata aagggtgttt tgattttatt ttgtgttgtt tataagaaca 9300
 tacattcgtt ggggttaattt cctgccctg ccccggtttt ttccctaaag tagaaagtat 9360
 ttttcttggt aactaaatta ctacacaaga acatgtctat tgaaaaataa gtatcaaaat 9420
 gttgtgggtt gtttttttaa ataaattctt tcttgctcag gaaagacaag aaaatgtcca 9480
 gaagattatc ttagaaggca cagagagaat ggaagatcag gtatatgcag attgcatact 9540
 gtcaaatatt attctcatgg catgtatctg tgtaaagttg atggctacat ttgtgaaggc 9600
 cttggggaca tacagagtaa gccttaatgg agcttttatg gaggtgtaca gaataaacta 9660
 gaggaagatt tccatatctt agacctgaag agttaaatca gtaaacaag gaaaatagta 9720
 attgcatcta caaattaata ttgctccct ttttttttct gtttgaacag aataaatttt 9780
 ggataacttg ttactagtaa aaaatttaaa aattgtctgt gatatgttct ttaaggtact 9840
 acttctcgaa ctttttccta gaagtagctg taacaggagg agagcatatg taccctaaag 9900
 gtatctgggg tataggccca tgtccaaaca atatttcttt taagtcttgt gttgtatctt 9960
 taagactcat gcaatttaca ttttattcca tgatataact attttaatat taaaatttgt 10020
 cagtgatatt tcttaccctc tcctctagga aaatgtgcc tgtttatact ttggctttga 10080
 gtgccccga ggaacagaca ctagagtttg agaagcatgg ttacacaggc gtggcttccc 10140
 ctgcagaaat taagtacaga ctatttcagt gtaaagcaga gaagttcttt tgaaggggaa 10200
 tctccagtga agaaagggtt cttactttt acttccattt cctcttgagg gtgacctca 10260
 ttgctccttg taaaactccg atatttttaa catggetgtt ttgctttcct ctggttcttt 10320
 ttaacatgag tgagacagat gatactttaa aaagtaattt taaaaaaaag tgttaaaata 10380
 tatggccata atgcagaacc ctatgctgtg atctccttta ccaaattgtt gtgtttgtac 10440
 tttttagat agctttccag tccagagaca gttattctgt gtaaaggtct gactcaaca 10500
 gaaaagattt ccctttaccc aaagaatgcc agtctttatt tgctggtcaa taagcagggt 10560
 cccaggaata ggggttaactt tcaccacct ctaaccact gggtattagt aaactaatta 10620
 agtagactta tctcaagatg aggaaactta aaaccaagta aaattctgct tttactggga 10680
 ttttattttt tgaaaccaga aacgtttact taagttgact actattaatg aattttgggtc 10740
 tctcttttaa gtactcttct taaaaatgtt atcctactgc tgagaagttc aagtttgaga 10800
 agtacaagga ggaatagaaa cttgagagat tttcttttct ttttagagcc tcttctgtat 10860
 ttagccctgt aggaattttt tttttcccc aagattcttc ttcgtgaaaa ggaggagttg 10920

```

ccttttgatt gagttcttgc aaatctcaca acgactttat tttgaacaat actgtttggg 10980
gatgatgcat gagtctgaaa caacttcagt ttagctgtc atctgataaa attgcttcac 11040
agggaaggaa atttagcacg gatctagtca ttattcttgt tagattgaat gtgttaatca 11100
taattgtaaa caggcatgat aattattact ttaaaaactg aaaacagtga atagttagtt 11160
gtggaggtta ctaaagcatg atttttttta aataaaactt tcagcatttt gcaaatatgc 11220
atatggttta ggatagaact tccagaggta gcatcacatt taaattctca agcaacttag 11280
taatacgagg ctctgaaaaa ctggttaaag ttactccaga aatggccctg ggtctgacag 11340
acattctaac ttaaagatgc atatgaagac tttgaataaa atcatttcat atgaagacat 11400
tgaataaaat catttcataa aataagttag gaaaaacaac tactattgaa ttcattctta 11460
tgtatgattt taaaaatatg tttagctaaa aattcataga catttgacaa tttcgtttat 11520
atctcaaaaa gttgacttac ccaagttgat cacaaaactg atgagactgg tgggtgtagt 11580
gaataaatga gggaccaccc atatttgaga cactttacat ttgtgatgtg ttatactgaa 11640
ttttcagttt gattctataa actaccaatt tcaaaattac aatttcaagg tgtaataagt 11700
agtggatta tcttgaaata ggtctaaagg gaacttttct gttttaaaat attcttaaac 11760
tatatgtgct gattttgatt tgcatttggg tagattatac tcttatgaat cggggggctg 11820
ggtattgatt caggttttcc ttacctattt ggtaaggatt tcaaagtctt tttgtgcttg 11880
attttcctcg tttttaaata tgaaacatat tgatgacttt taattaacaa atgtttttat 11940
ctcgaataaa ttttaaagga gatcttttct aaaagaggta tgatgactta attattgcat 12000
ataacaataa atgagaaacc agtgattcca tactctctaa agaataaaaag tgagcttttag 12060
gcccaggcat ggtggctcat gcctgtaatc ccagcacttt ggaaggccga ggcaggcgga 12120
tcacctgagg tcaggaaattc gacaccagcc tggccaaatg gcaaaaccct gtctctacta 12180
caaatacaaa aattagctgg gcatggtggc agcccctata gtcccagcta cttggaagac 12240
tgagacagga gagtcactcg aacccgagag gcagagggtg cagtaagctg aaatcacacc 12300
attgcactcc agcctgggca acaagagcaa aactccgtct caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 12360
aaaaagaata aaagttagct ttggattgct tataaatcct ttagacaagt agtagacttg 12420
tttgatactg tgtttgaaca aattacaaag tattttcatc aaagaatgtt attgtttgct 12480
gttattttta ttttttattg cccagcttct ctcatattca ttatgtgatt ttcttcactt 12540
catgttactt tattgtgcag ggtcagagta ttattccaat gcttactgga gaagtgattc 12600
ctgtaatgga actgctttca tctatgaaat cacacagtgt tcctgaagaa atagatgtaa 12660
gtttttatat ttttaaatga gagcaattat accctttatc agtttttttg ggttatatta 12720
ttattatgta tattattaat attctaattt taactactag cacttcgtcg tacgtactat 12780
ccacatgcag tattagccac ttgaacagat aagcacacac aaaatcctgg attttatggc 12840
ataacagagg catttttgat cagtgatgac aaaactaaat ttattttgtt tatttcacta 12900
cttttataat tcctaaaagt gggaggatcc cagctcttat aggagcaatt aatatttaat 12960
gcagtacctt ttgaaacaaa actgtgtgcc aaagcagtaa ccattaatgg aagttgactt 13020
atagtcacaa atttagtttc cttaatcatt tgttgaggat gttttgaatc acacactatg 13080
agtgttaaga gatatttta ggacactatt cttgttgttt tattgtcatt taggttagtc 13140
tcctgtctga cagctcagaa gaggaagttg ttcttgtaaa aattgtttac acaacctgat 13200
tgaccagctt tcacatttgt tcttctgaaa gctgatggta gtgcacagat tgttttatgg 13260

```

```

ggagtcttga ttctcagaaa tgaaggcagt gtgttatatt gaatccagac ttcagaaaac 13320
ttgtatatta aaagtgtttt ttcaacacta tgttatagcc agactaattt ttttattttt 13380
ttgatgcatt ttagatagct gatacagtac tcaatgatga tgatattggc gacagttgtc 13440
atgaaggctt tcttctcaag taagaatttt tcttttcata aaacctggat gaagcatatg 13500
ttcacctatg acaagatttg gaaggaagaa aataacagac tgtctactta gattgttcta 13560
gggacaacat tgcataattg aattgttgct taaatttggt ttatttttca ttcgttatat 13620
ttctataata tatttgatgt tattccattt gctattttaa gaaactgagt ttccatattt 13680
cccagacaag aaatcatggc cccttgcttg attctggttt cttgtttttac ttctcattaa 13740
agctaaaaaga accctttcaa attaagttgt actgtagatg aacttaagtt atttaggcct 13800
agaaaaaaaa aattcatatt tatactgac tttttccatc cagcagtggg gtttagtact 13860
taagagtttg tgcccttaaa ccagactccc tgggttaatg ctgtgtacct gtgggcaagg 13920
tccctgaatt ctctatacac ctatttctc atctgtaaaa tggcaataat aataatagta 13980
cctaattgat agagttgta taagcattga gtaagataa taatataaag cacttagaac 14040
agtgcctgga acataagaac acttaataat agctaacatt ttctattttac atttcttcta 14100
aggaaaagg taaacagaaat agccaatatt tgttcagtcg ctacatgtta gttcctatac 14160
taagtgtttt acatgtatta tcttatattc tattttaatg tttcttcaca gttgcagatt 14220
atcatgaaat tttatttttt aaaaaagaga agtaaaagga taaagtattc acttttatgt 14280
ccacagtctt ttcttttagg ctcatgatgg agtatcagag gcatgaatgt gtttaaccta 14340
agagccttaa tggcttgaat cagaagcact ttagtcctgt atctgttcag tgtcagcctt 14400
tcaaacatca ttttaaattc catttgactt taagtaaatt acttaattct tctacatgtc 14460
aatttcttca gctataaaat gatggtattt caataaataa atacattaat taaatgatat 14520
tttaciaaact aattgggctg ttttaaggct caataagaaa atttctgtga aaggctctta 14580
gcaaatgtag gggtctatac aaataaaaga taacattatg cttatatctt cgggtgtttat 14640
catgcaaagc tcttctgagt tttttgaaga gtcacctac tttttttgt ttttagtttg 14700
ttaaattggt ttataggcaa tgtttttaat ctgttttctt taacttacag tgccatcagc 14760
tcacacttgc aaacctgtgg ctgttccgtt gtagtaggta gcagtgcaga gaaagtaaat 14820
aaggtagttt attttataat ctagcaaatg atttgactct ttaagactga tgatatatca 14880
tggtttgtca tttaaatggt aggttgcaat taaaatgac taatagtata aggaggcaat 14940
gtaatctcat cgaattgtg agacaacttg tggcaacagt gagtttgaaa taaagtgaat 15000
aggagtcatt tatcagttta ttttgataac ttgtaatac cagtgtcaga tgtgtataaa 15060
tggttttgag aatatattaa aatcaggtat ttaaaaaaac actattcttc tatttcccaa 15120
tgtaattctt aacaaatctg aaggtagtca tgtactttcg gtactagttc tgaagaaatg 15180
ttatttggtt attcatcttg atttcattgt cttggcttcc cttctaaatc tatcccttct 15240
tgggagctat tgggattaag tggtcattga tgattatact ttattcagta atgtttctga 15300
ccctttcctt cagtgtact tgagttaata aaggattaat gaacagttac atttccaagc 15360
attagctaat aaactaaagg attttgcaat tttcttccat gaccattagt taaaacagc 15420
tcagagataa gtacatgtat ctttcaattc tagcaaacct aattttttta aagaagtttt 15480
acataggaaa tatgttgga atgattattt actttacaaa gatattcata atttattttt 15540
tctgtaacta gctactttgt atatttacat gaggcttaat ttatcaaaat tatatttctc 15600

```

atataacccat ttatgagagc ttagtattcc tctgtcatta tattgcgtct acggactagt 15660
gatcttacta cttctgttac ctggaacaag tggttcccg tctgtgacct ccaaagccgt 15720
aggttccaca gagtgactgc tgagctgctt tatgaaggga gaaaggctcc atagttgggt 15780
ttttggtttt gcttttgttt ttgttttaaa catttttccct atcctccatc ctcttgaggc 15840
agagtagctt accttttatac ttgttttaaat ttgagaaaaga agttgccact gctctagatt 15900
gaaaaccact gctttaacat aataactctg aatatgggtt gaatttcaag atagtacat 15960
gcctttttat ttttactaat agagctgtag gtcgaatatt attagatttc taaacccac 16020
ccaatgacct ccttatttta aatcaaattt aataattaat tatcttctta ttggaggatc 16080
tggaacattct ttgatgttct ttacaatgaa ttccacatgt agaccacta aacagaagtt 16140
ataaagggtc catgggtcaaa taagtctgag aaagtctgca tattatataa ttcacctaaa 16200
gagtcacagt atgtacccaa atgttaaagg ttttgagatg ccatacagta aatttaccac 16260
gcattttcta aatttatttg accacagaat ccctatttta agcaacaact gttatatccc 16320
ataggttcca ggtgactaaa gaatacttat tgcttaggat atgttttatt gataataaca 16380
attaaaatgt cagatatctt tcataagcag atcagtggtc tttttaaaac tttgtatttt 16440
aatgctaaaa tcttttcttt ttagatagat cagaacatta tgcctttttc tgactgcagc 16500
agagagaaaa tgctccaggc tatgtgaagc agaatcatca tttaaatatg agtcagggt 16560
ctttgtacag ggctgctaa aggtatagtt tctacttatc acaagggaaa ccaattttct 16620
aaaatcattt ttgagactct ttgtagacaa atattaaata ttagcattta atgtatctca 16680
tattgacatg cccagtgcact gacttccttt gcacagttct gcgcatacac tatatgtctt 16740
atggatttat agttagtatc atcagtgtaa caccatagaa taccctttgt tttccagggt 16800
ggctccctgta cctacatgct tagcatcagg tgttggtttt tttttttttt tttaaaacat 16860
atgcttaaat cagggtgcac atctaaaata agatcatttc tttttaacta aatagatttg 16920
aattttattg aaaaaaattt taaaacatct ttaagaagca tataggattt aagcagttac 16980
tatgtatgtg tactaaaata tatatatatt cctaaatata tttcctata tataatatat 17040
gtatttctat atataatata tattagaaaa aacttagagt tttctttcat ttgagtctac 17100
tgttcaagga gcaaacaga gaaatgtaaa ttagcaatta tttacaataa ttaaagggaa 17160
gaaagtgtgt cacctgtgtg gatctattat tgttggttta attatagtcc caagacgtga 17220
agaaatagct ttcctaattg ttatgtgatt gtctcatagt gactactttc ttgaggatgt 17280
agccacagca aatgaaaatt taaaaaattt aaaaattgtt gcaataaaaa gttatattag 17340
gcttttgtgc aatttcaata atgtgctgct atgaactcag aatgatagta tttaaatata 17400
gaaactagtt aaaggaaaaca cagtttctat ttgagttata caaatctgta aattagaact 17460
tctcctgtta aggcattata aagtgttaa tacttttgtt tctcagcac cctctcattt 17520
aattatataa ttttagctct gaaaggacc tataccagat gtgtagagga aatttcaaaa 17580
ctatgatcta atgaaaaaat atttaatagt tctccatgca aatacaaat atatagtttt 17640
ctggaaaata cctttgacat tatacaaaga tgattatcac agcattataa tagtgaaaaa 17700
atggaaaatag cctctttctt ctgttctgtt cacagcatat ggcacagtac ctcatatgca 17760
gtaggttatt atgacctgtt aactggctcc cccaactgat taggaaagaa gtaaatgtgt 17820
tatttataaa aatacgtgtt cattgagatg catagaataa ttaagaaatt aaaagacact 17880
tgtaatttca aatccagtga ataccactg ttaatatttg gcatactctt ttctagtctt 17940

tttttccctt ttgcatgtat tttctttaag actcccaccc ccactggatc atctctgcat 18000
attctaatact gcttttttca cagcagattc taagcctttt tgcatatcaa cacaaacttc 18060
aacaacttca tcttttagatg ctaaataatg aattcatttt tatttactta accactttct 18120
ttggatgctc aggttattct gatgttttgc cattaaaacc aatgctatac tgaacacttc 18180
tgtcactaaa acttgaacac actcatgaat aatttcttag gataaatttt tagagatgga 18240
tttgctaaat caaagaccat tttttaaaaa ttgaaaaaca attatatcgt ttggcatgta 18300
agacagtaca ttttcccttt attttgacag gattcaactg gaagctttgt gctgcctttc 18360
cggcaagtca tgtatgctcc atatcccacc acacacatag atgtggatgt caatactgtg 18420
aagcagatgc caccctgtca tgaacatatt tataatcagc gtagatacat gagatccgag 18480
ctgacagcct tctggagagc cacttcagaa gaagacatgg ctcaggatac gatcatctac 18540
actgacgaaa gctttactcc tgatttgtac gtaatgctct gcgtgctggg actgtagtca 18600
agcaatatga aactgtgtct tttatgaata aaaacaaaac agaagttgca ttcaaaaaga 18660
aagaaatatt actagcagaa ttatgcttga agaaacattt aatcaagcat ttttttctta 18720
aatgttcttc tttttccata cgatttgttt taccctaaaa taagtaagat taacccttaa 18780
agtgaatatt taactatttg ttttaataaat atatattgag ctctaagca ctgttctagg 18840
tactgggctt aatagtggct aaccacacag ctccagcccc tacattgcat atagtctatt 18900
gtataagtta ctgaatggac ttactaacia aaccagagaa gtaattctaa gtcttttttt 18960
tcttgacata tgaatataaa atacaacaaa actggtaaaa tatattaata gagcattctt 19020
ttactttgca ttttatattg ttactcactt cgtatttaag aaaaacagtc tgatcaggaa 19080
attcaaaagg aaaagtaatg ataattaatt gagcatagac ccaacttgaa aagaaaaaaa 19140
aggatgatga taaatctata atcctaaaac ctaagtaaa cacttaaatg atgttctgaa 19200
atcaggaaaa gaattatagt atatttttgt ggttctcttt tattagtga aaaaaggcac 19260
agtagctcat gcctataaga acagagcttt gggattccaa ggcaggcaga tcaattgagg 19320
ccaggagttc cagaccagcc tgggcaacat agtgaaaccc catctctaca aaaataaaaa 19380
agaattagtt gaatgtgttt ctgtgtgcct ataatcctag ctattcagaa agctgaggca 19440
ggaggatctc ttgagcccag gagtttgagg ttacatggag ttatgatgtg ccagtgtact 19500
ccagcctgcg ggacaatgag actctgtctt gttaaaaaaa aaagtgcctg gaataatgtt 19560
tggcatatag aaggtaacia cagtaaatgt taactgtaat aaccaggta taagtgtgta 19620
aggtgataga aaaattgggg caaacaaccc tgacctgtgt ctctacagaa taagtttgag 19680
ttgaggcaac agacatgtgg agcaccagta attacacact aaatgttaac caaaagcggt 19740
gaatagtaac atcttattca agggaccccc agccttatat atctcaaggt gcagaaagat 19800
gacttaatat aggaccatt ttttccgagt tctccagagt ttttattggg tcttgagaaa 19860
gtagtggggg aattgtttta gaaaaatgaat tgggtcaaact gaaattccat gtcagtaagt 19920
ttttacatat tggtaaatth tgatagacat gtagaagttt tctaattaat ctgcgccttg 19980
aaacatthtc cthtttccta aagtgttag tathththtc cthththtgat tggttgcttg 20040
ggagctthth tgaggaaatt tagtgaactg cagaatgagt ttgcaacct ttagtathth 20100
tgththtggt tthtagaggag gtatgtgtat thtaacathh cthaatcatt thtagccagc 20160
tatgtthgtt thgtgattg acaaaactata attaaacagc taththcatt thgtgatca 20220
tgacaaagta atatcctgaa thththaaatt thgcatccag ctctaaathh ththththth 20280

```

ctaaacataa aattgttcaa aaaatagtat ttttagccac tagatttgtgt gttgttaagt 20340
ctgttgtcac agactcattt tacttttcag tgttgtgttt tacatgttaa ttatgtttgt 20400
catttttaaat ttttaactttt taaaataatt ccagtcactg ccaaaacatg aaaaattggt 20460
cactggaaat ttttttttta actttttatt taggttcatg tgtacatgtg caggtttgtt 20520
atacaggtaa attgcgtgtc gtgagggttt ggtgtaccca ggtaataagg gtagtaccca 20580
ataggtagtt ttttgatcct tacccttctc ccacccttct ttcaccctcg agtaggcctt 20640
ggtgttgctg tttccttctt tgtgtccatg tgtactcaat ggtagctcc tacttagaag 20700
tgagaacatg cggatatttg ttttctgttc ctggattagt tctactcagga taatggcctc 20760
tagctccatc tgttttttat ggctgcatag tattccatgg tgtatatgta tcatgttttc 20820
tttatccagt ctaccattga tagacattta ggttgattct ctgtctttac tatcatgaat 20880
agcgtgtga tgaacatata cacatgcatg tgtccttatg gtggaacaat ttgtattcct 20940
ttaagtatat acagaataat ggggttgcta gggatgaatg tagttctatt gtaagttatt 21000
tgtgaaatct tcaaactgct tttcacaata gctaaactaa tttacagtcc caccagcagt 21060
gtataagtgt tcccttttct ccacaacctt gccaacatgt tattttttta cttttcaata 21120
ataggcattc ctagagaatt gatttgcaat tctctaataa ttagtgatat tgagcatttt 21180
ttcgtatgct ttttagctgt gtgtatata tcttttgaaa aatgttaatg tcccttgccc 21240
agtttgtaat ggggttggtt gtttttgctt gttaattaaa gttccttcca gattctggat 21300
atccctttgt cagatgcgtg gtttgcatg atttttctcc ccttggttag gttgtctttt 21360
tactctgttg atagtttctt ttgccgggca ggagctcatt aggtctcatt tgtgtttgtt 21420
tttgttgcat ttgcttttgg cgtcttcac ataaaaatctg tgccagggcc tatgtccaga 21480
atggtatttc ctagtttgtc ttccagggtt ttacaattt tagattttac gtttatgtct 21540
ttaatccgtc ttgagttgat taaggaagg gtccagtttc actctaattc ctatggctaa 21600
caattatccc agcaccattt attgaatacg gagtccttcc cccattgctt gtttttgcca 21660
attttggtga agatctgatg gttgtaggtg ctatgtggct ttatttcttg gctctctatt 21720
ctccactggc ctgtctgttt ttataccagt accctgctgt taaggttcct atagcctttt 21780
agtataaggc cggctaattg gatgcctcca gctttgttct ttttgcttag gattgctttg 21840
gctatttggt ctcctttttg gttccatatt aattttaaaa tagttttttc tagttttgtg 21900
aagaatgtca ttgatagttt agaggaatag cgttgaatct gtagattgct ttgggcaaat 21960
ggccattttt acaatatgta ttcttctat ctatgaacat ggaatgtttt tccatgtgtt 22020
tgtgtcatct ctttatacct gatgtataaa gaaaaaccag tattattgct actcaatctg 22080
ttccaaaaaa ttgaggagga ggaactcttc cctaataaga ccggcttcct tctgatacca 22140
aaacctggca gagatacaac agaaaaaaga aaacttcagg ccaatatcct tgatgaatat 22200
agatgcaaaa atcctcaaca aaataactagc aaccaaatcc agcagtacgt caaaaagcta 22260
atctacttta agtaggcttt atccctggga tgcaagggtg gttcaacata cacaatcaa 22320
taagtgtgat tcatcacata aacagagcta aaaacaaaaa ccacaagatt atctcaatag 22380
gtgcagaaaa ggctttcaat acaatttaac atccttcacg ttaaaaacct tcatgagtc 22440
aggtgcagt actcacacct gtaatcccag cactttggga ggccaaggcg gacgtatctc 22500
ttaagcccag gaggttcaaga ccagcctagg cagcatggtg aaaccccatc tctacaggaa 22560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agcttaatat ggcgcatgc acctatagtc 22620

```

```

ccagctactc aggaggttga ggtgggagga ttgcttgagc ccaggaggca gaggttgcag 22680
cgagctgaga tcgtgccact gcactccaac ctgggcaata aagtgagacc ctgtctcaaa 22740
aagaaaaaca aaaataatcc taaaccaact aggcatgtga ggaatatgcc tcaaaaaaat 22800
aagaaccatc tatgacagac ccacagccaa tatcttacca aatgggcaaa agctggaagt 22860
attctccttg agaaccgtaa caagacaagg atacacactc tcatccctcc ttttcagcat 22920
agttctggaa gtcctcgcca gagcagtcag gaaagagaaa gaaagaaaag gcattcagat 22980
aggaagagaa gaagtcaaac tatttctgtt tgcaggcagt ataattctat acctagaaaa 23040
tgccatagtt tctgcccaga agctcctaca tctgttaaaa atttcagcaa agtttttagca 23100
ttgtctgtat tccaacagct tccagggtga gagtgaatc aggaacacag tcccgttcac 23160
aatagccgca aaaagaataa aataccttgg aatccagcta accagggagg tgaaacatct 23220
ctacgagaat tacaaaacgc tgetgaaaga aatcagagat gacacaaaca aatggaaatg 23280
ttgtttttaa caccttgett tatctaattc acttataact aagatattca ttcagtggaa 23340
caggtataat aagaccactc gacttaaata taagccttat tctctttcca gagcccaaga 23400
aggggcacta tcagtgccca gtcaataatg ataaaatgct gatatttttc ccctttactg 23460
tttctttctt ctgtagtgtg gtacactcat ttcttaagat tagaaaactt gacctacctt 23520
cctgtttgct tctacacacc cccattctct ttttttgcca ctccggtcag gtataggatg 23580
atccctacca cttttagtta aaacctcctt cccttattaa atgttctctt accactctgg 23640
cctgagtaga acctagggaa aatggaagag aaaagatgaa agggaggtgg gggctgggaa 23700
gggaatagtc ttgtttgtgt gtttgcttta gcacctacta taccctaggt gctgtgttag 23760
gcacacatta ttttaagtgg ccattatatt gctacatctc actctggtca ttgccaaggt 23820
aggtagtact ttcttggata gttggttcat gttacttata ggtggtggac ttgttgaggc 23880
aaccccaatg gataatcatc tgagtgtgtt ctctaactc agatttttct tcatattttt 23940
tggtttgttt tggtttttga tgggtgttgt tgtgtgctta tttttgttgc tggcttgttt 24000
ttttgttttg tttttgatat ggcaagaatt ggtagtttta tttattaatt gcctaagggt 24060
ctctactttt tttaaaagat gagagtacta aaatagattg ataggtacat acataccttt 24120
atgggggact gcttatattc cttagagaaa aaaattactt attagcctga caaacaccag 24180
taaaatgtaa atatatccgt gagtaaataa atgaatgtat gctttgtatc tccaaatata 24240
tacatctata ttcttacaaa tatgttttta tgtaatacca atttataaga acttaaaatg 24300
ttggctcaag tgagggatgg tggaaagtag cattatatag ccatttcaac atttgaactt 24360
ttttcttcat tttcttcttt tcttcaggaa tatttttcaa gatgtcttac acagagacac 24420
tctagtgaat gccttcctgg atcaggtaaa tgttgaactt gagattgtca gagtgaatga 24480
tatgacatgt tttctttttt aatatactct acaatgcctg ttctctctct ctatatatat 24540
atatattatat atttccctgg atcatgcccc agagtctctg tgagcaattg cagttaagtt 24600
agttacacta cagttctcac aagagtctgt gaggggatgt caggtgcac attacattgg 24660
atgcctcttg tcctagattt atgtttcggg aattcagacc tatgtttaca atataataaa 24720
tattgttgct gccttttaca gataaaataa taagatataa acttgaccac aactactgtt 24780
ttttgaaaca tagagttcat ggtttacatg tatcaaagtg aaatctgagt tagcttttac 24840
agatataata tatacatata tatatcctac aatgcttgta ctatatatgt agtacaagta 24900
tatatatgtg tgtgtgtgtg tgtatatata ttatggcact gtagtatata tatgtttata 24960

```

```

tggttaaaaaa tatataaata tatgttacat atttaacata aacatatata catatatgtt 25020
aaatatataa catatactct atatatgaca aatagagtat aatatatatt tttatTTTTT 25080
atatatatat aaaacatgat agaattaaga attaagtcct aatctgtttt attaggtgct 25140
ttttgtagtg ttcagtcctt ctaaagtgtc taaatgattt ttccttttga cttattaatg 25200
gggaagagcc tctatattaa caattaaggc tgcagcattg attacttcaa acaacaaaca 25260
ttttaattca agcattaacc tataactcaa gtaagttttt tttttttttt ttttgagaaa 25320
gggaggttgt ttatttgcct gaattgagtc aaaaatattt ttgaaacatc atgtactcat 25380
ttaaatgata acatctttat tgtttcattc ttttaaaaaa tatctactta attacacagt 25440
tgaaggaaat tgtagattat atggaactta tttcttaata tattacagtt ttgttataat 25500
aacattctgg ggatcaggcc aggaaactgt gtcatagata aagctttgaa ataatgagat 25560
ccttatgttt actagaaaatt ttggattgag atctatgtgg tctgtgacat attgcaaagt 25620
tcaaggaaaa ttcgtaggca tggaaatttct caaactgaaa atccctccca ctgtccacct 25680
catcacatgc acacattcta ctcttaccba cccactccac cccttgcaaa agtacagata 25740
tatgaatgtc tcaaaaccat gggctcatct tctagaagct tcaatgttat ttgaagattt 25800
gggcagagga agttaagaaa tatgaaatag cttacatatg agttttaata gtgaaacaaa 25860
catggatgta ttctgaagta gaatgcaaaa tttgagtga tttttttttt tttgagactg 25920
agtctggctc tgtcgcccag gctggagtgc agtggccgga tctcagctca ctgcaagctc 25980
cacctcccgg gtttacgcca ttctcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gaccacaggc 26040
gcccgccact tcgcccggct agtttgtttg tatttttttag tagagatggg gtttcaccgt 26100
gtagccagg gannnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnccatt 26160
gagtgcattt ttaaagataa atcagaaaac ttcgaaaaac tatcagattg gccggacatg 26220
gtggcctatg cctgtaatcc tagcactttg ggaggctgag gtgggtggat cacgaggtca 26280
ggagatcgag accatcctgc caacatgggt aaaccccatc tctactaagt atacaaaaat 26340
tagctgggcg tgacagcacg tgcctgtaat cccagctact tgggaggctg aggagagaga 26400
atcgcttgaa cccgggagggt ggaggttgca gtgagtcaag atcacaccac tgcacttcag 26460
cttggtgaca gagctagact ccatacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagaa gtcagattgt 26520
tcctacaccc agtgcttcta taccacactc ctactagggg gcatcagtg aaatggttaa 26580
ggagatgttt agtgtgtatt gtctgccaag cactgttaac actgtcctag aaacattgct 26640
gtacaagtag aatgtgagca aattatgtat tgaaatggtt cctctccctg caggtctttc 26700
agctgaaacc tggcttatct ctcaggagta ctttccttgc acagttttta cttgtccttc 26760
acagaaaagc cttgacacta ataaaatata tagaagatga tacgtgagta caactcctac 26820
atggaggaaa aaccttttgt acgttgtttt ttgttttatt tcctttgtac attttctgta 26880
tcataatttt tgcttttttt tttttttttt ttttctccat tactttcagg cagaaggga 26940
aaaagccctt taaatctctt cggaacctga agatagacct tgatttaaca gcagaggcg 27000
atcttaacat aataatggct ctggctgaga aaattaaacc aggcctacac tcttttatct 27060
ttggaagacc tttctacact agtgtacaag aacgagatgt tctaatact ttttaaatgt 27120
gtaacttaat aagcctattc catcacaatc gtgatcgctg ctaaagtagc tcggtggtgt 27180
ggggaaacat tcccctggat catactccag agctctgctc ggcagttgca gttaagttag 27240
ttacactaca gttctcacia gagtctgtga ggggatgtca ggtgcatcat tacattggat 27300

```

```

gtctcttttc ctagatttat gcttttggga tacagaccta tgtttacaat ataataggta 27360
ttattgctgt cttttaaata tataataata ggatataaac ttgaccacaa ctgctgtttt 27420
tttgaaatat atgattcatg gtttacatgt attaagggtga aatccgagtt cgctttttaca 27480
gatattagtt gactttctat cttttggcat tctttggtgt gtggaattac tgtaataactt 27540
ctgcaatcaa ctgaaaatta gagcctttta atgatttcag ttccacagaa agaaagtgag 27600
cttcaacata ggataagctt tagaaagaga attgatcaag cagatgttta attggaattg 27660
attattagat cctgctttgt ggatttagcc ctcgggattc agtctgtaga aatgtctgat 27720
agttctctat agtccctgct catggtgaac cacagttagg atgttttgtt tgttttattg 27780
ttgttgctat tgttgatgtt ctatatagtt gagctctata aaaggaaatt gtattttatg 27840
tttttagtagt tgttgccaac tttttaaatt aattttcatt atttttgagc caaattgaaa 27900
tgtgcacctc ctgtgccttt tttttccttg gaaaatcgaa ttacttggaa gaagttcaga 27960
tttcaactgt cagtcgtttt catcttgttt tcttcttgca gagtcttacc atgtacctgc 28020
tttggcaatc attgtaactc tgagattata aaatgcatta gagaatatat taactaataa 28080
gatctttttt ttcaggaaca gaaaatagtt ccttgagtac ttccttctta catttctgcc 28140
catgtttttg aagtgtgtgc catttgctg caataggcta taaggaatag caggagaaat 28200
tttactgaag tgctattttt ctaggtgcta ctttggcaga gctaagtggg ctgtttcttt 28260
tgtttcttta atgcgttttg accattttgc tggctgtaaa ataactgatt aatataattc 28320
taacacaata ttgacattgt aggttacaca aacacaaata ttttatttaa aactggaagt 28380
aacataaaag ggaaaatata tttataagaa aggaataaag gtaatagagc tcttctgtcc 28440
cccagccacc aaatttacac aacaaaatca tatgttctaa tgtgaaaggc cataatagct 28500
ttcccatcat taatcagaaa gatgtggcag cttgattttt tagacaaccc ctgaactaga 28560
tgactgttgt actgtagctc agtcatttaa aaaatatata aatactatct cgtagtgtcc 28620
catactatgt tttttacatg atagattctt atttaagtgc taactgggta ttttctttgg 28680
ctggtttatt gtactgttat atagaatgta agttgtacag tgaaataagt tattaaagca 28740
tgtgtaaaca ttgttatata tcttttctcc tagatggaga attttgaata aaatatnnnn 28800
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 28860
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 28920
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 28980
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 29040
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 29100
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 29160
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnagaa gactaattga tcatatcact atgattctca 29220
aagaagaacc aaaacttcat ataatactac aaatatgaga tagttacttc tgtagtatat 29280
ttctgtaatg ctacaggta aacaggtcac tcttatataa cactattttg attttgatgt 29340
agaattgcac aaattgatat ttcttctatg atctgtaggg tatagcttaa agtagcaaaa 29400
acagtccacc acctccagtt aacacacagt aacactatgg gactagtatt attatttcca 29460
ttttacaaag gaggaaacta aagcttaaag atgtgtaata tacagcccaa ggtcacacag 29520
ctggtaaagg tagatttcat cccagacagt tacagtcatt gccgtgggca cagctcctaa 29580
cttattaact ccatgtaact ggtactcagt ttagttgaat tgaaaggaga gtagggaagc 29640

```

aggtctgttt gcactattca gagcccaagt gtgaatccct gctgtgctgc ttggagaagt 29700
tacttaacct atgcaagggt cattttttaa atatttgaaa cggaatgata atacatactt 29760
caccagtggg tttaatgaga ccttataaga tcgttagttc agtacctgac cagtgcctca 29820
taaagtcttt ttcatccaat ctgacaatct ctagcttgta attggggcat ttagaacatt 29880
taatattgatt attggcatgg taggttaaag ttgtcatctt gctgttttct ctttgttctt 29940
ttttctcctt tcttttggat tttttttaa ttttactgtg tcttctctgt tgtcttatta 30000

a 30001

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12

gggtctagca agagcaggtg 20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

gtcttggcaa cagctggaga t 21

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<400> 14

tgatgtcgac tctttgcca ccgc 24

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 15

tgtgacagtt ggaatgcagt ga 22

<210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物
 <400> 16
 gccacttaaa gcaatctctg tcttg 25
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 探针
 <400> 17
 tcgactcttt gccaccgcc a 21
 <210> 18
 <211> 783
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 18
 gcctctcagt acccgaggct cccttttctc gagcccgag cggcagcgct cccagcgggt 60
 ccccggaag gagacagctc gggtagtgag ggcggaag caaggaagag gccagatccc 120
 catcccttgt ccctgcgccg ccgccgccgc cgccgccgcc gggaagcccc gggcccgat 180
 gcaggcaatt ccaccagtcg ctagaggcga aagcccgaca cccagcttcg gtcagagaaa 240
 tgagagggaa agtaaaaatg cgtcgagctc tgaggagagc ccccgcttct acccgcgctt 300
 cttcccgga gccgaacccc aaacagccac ccgccaggat gccgcctcct cactcaccca 360
 ctgcgccaccg cctgcgcctc cgccgccgcg ggcgaggca ccgcaaccgc agccccgccc 420
 cgggccccgccc cccgggcccc ccccgaccac gccccggccc cggccccggc cccggccccg 480
 gccctagcgc cgcgactcct gagttccaga gcttgctaca ggctgcggtt gtttccctcc 540
 ttgttttctt ctggttaatc tttatcaggt cttttcttgt tcaccctcag cgagtactgt 600
 gagagcaagt agtggggaga gaggggtgga aaaacaaaa cacacacctc ctaaaccac 660
 acctgctctt gctagacccc gccccaaaa gagaagcaac cgggcagcag ggacggctga 720
 cacaccaagc gtcatctttt acgtgggcgc aacttgctgc tgtttgacgc acctctcttt 780
 cct 783
 <210> 19
 <400> 19
 000
 <210> 20

<400> 20
000
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 21
gccttactct aggaccaaga 20
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 22
ccggccccta gcgcgcgact 20
<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 23
cggcccctag gcgcgcgact 19
<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 24
ccggccccta gcgcgcgac 19
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 25

ccctagcgcg cgactcctga 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 26

cccctagcgc gcgactcctg 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 27

gcccctagcg cgcgactcct 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 28

ggcccctagc gcgcgactcc 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 29

cggcccctag cgcgcgactc 20

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 30
cctagcgcgc gactcctg 18
<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 31
ccctagcgcg cgactcct 18
<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 32
cccctagcgc gcgactcc 18
<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 33
gccccctagcg cgcgactc 18
<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 34
ggccccctagc gcgcgact 18
<210> 35
<211> 18
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 35
cggccccctag cgcgcgac 18
<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 36
aggctgcggt tgtttccctc 20
<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 37
caggctgcgg ttgtttccct 20
<210> 38
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 38
ggctgcggtt gtttccctc 19
<210> 39
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 39
aggctgcggt tgtttccct 19
<210> 40
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 40
caggctgcgg ttgtttccc 19
<210> 41
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 41
gctgcggttg tttccctc 18
<210> 42
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 42
ggctgcggtt gtttccct 18
<210> 43
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 43
aggctgcggt tgtttccc 18
<210> 44
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 44
caggctgcgg ttgtttcc 18
<210> 45

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 45
tctgtcttttg gagcccaa 20
<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 46
ctgcatccc cattccagtt 20
<210> 47
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 47
gccttactct aggaccaa 18
<210> 48
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 48
tctgtcttttg gagcccaa 18
<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 49
ggttaatctt tatcaggtct 20

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 50
tgggtaatatct ttatcaggtc 20
<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 51
ctgggtaatc tttatcaggt 20
<210> 52
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 52
gttaatcttt atcaggtc 18
<210> 53
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 53
gggtaatctt tatcaggt 18
<210> 54
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 54

tggttaatct ttatcagg 18

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 55

ctagcgcgcg actcctga 18

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 56

gggacactac aaggtagtat 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 57

tacaggctgc gggtgtttcc 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 58

cccgccccct agcgcgcgac 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 59

ggtaacttca aactcttggg 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 60

aatctttatc aggtcttttc 20