



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107429250 B

(45) 授权公告日 2022. 03. 01

(21) 申请号 201680015815.4

(22) 申请日 2016.04.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107429250 A

(43) 申请公布日 2017.12.01

(30) 优先权数据
62/142,986 2015.04.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/025883 2016.04.04

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2016/161429 EN 2016.10.06

(73) 专利权人 IONIS制药公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 郭淑玲 M·阿格哈简
埃里克·E·斯威兹

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517

代理人 赵昊 顾云峰

(51) Int.Cl.
C12N 15/113 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103813810 A, 2014.05.21
US 2014309286 A1, 2014.10.16
CN 103813810 A, 2014.05.21
GenBank.Homo sapiens transmembrane
protease, serine 6 (TMPRSS6), transcript
variant 2, mRNA.《GenBank》.2015,第1-4页.
Shuling Guo等.Reducing TMPRSS6
ameliorates hemochromatosis and beta-
thalassemia in mice.《The Journal of
clinical investigation》.2013,第123卷(第4
期),第1531-1541页.

审查员 王娟

权利要求书5页 说明书92页
序列表59页

(54) 发明名称

用于调节TMPRSS6表达的化合物和方法

(57) 摘要

本文公开用于调节TMPRSS6和调节有需要的个体中的铁积聚疾病、病症和/或病状的组合物和化合物,所述组合物和化合物包含修饰的寡核苷酸。通过施用靶向TMPRSS6的反义化合物,可治疗、改善、延迟或预防个体中的铁积聚疾病,如红细胞增多症、血色素沉着症或β-地中海贫血。

1. 一种化合物, 所述化合物由缀合物基团、可裂解部分和修饰的寡核苷酸组成, 其中所述修饰的寡核苷酸具有下式: mCes Teo Teo Teo AeO Tds Tds mCds mCds Ads Ads Ads Gds Gds Gds mCeO AeO Ges mCes Te; 其中

A = 腺嘌呤核碱基,

mC = 5-甲基胞嘧啶核碱基,

G = 鸟嘌呤核碱基,

T = 胸腺嘧啶核碱基,

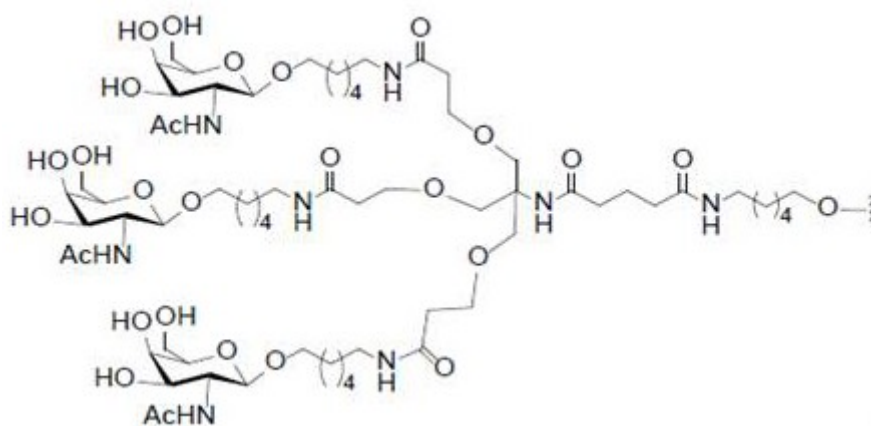
e = 2'-O(CH₂)₂-OCH₃呋喃糖基修饰的糖部分,

d = 2'-脱氧呋喃糖基糖部分,

s = 硫代磷酸酯核苷间键联, 和

o = 磷酸二酯核苷间键联,

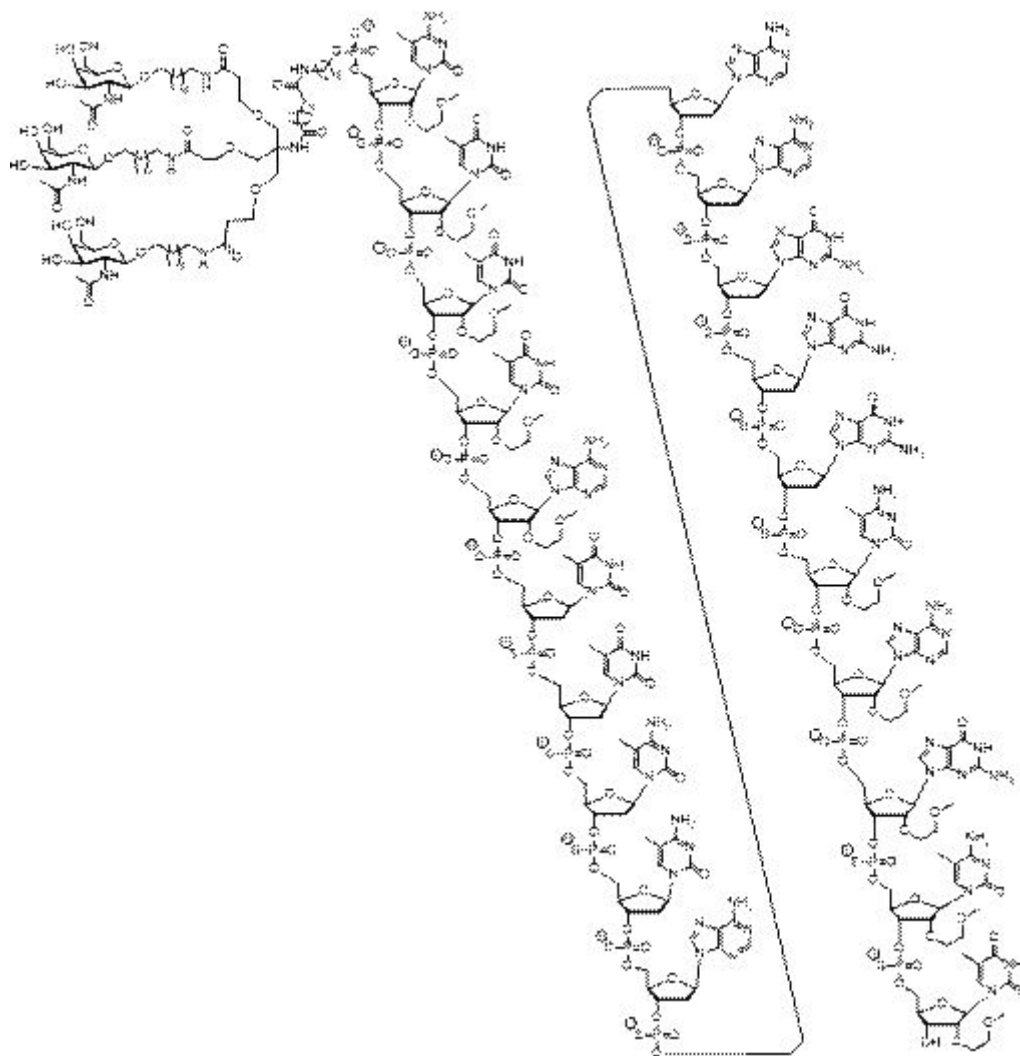
其中所述缀合物基团由5'-三己基氨基-(THA)-C6 GalNAc₃缀合物组成, 其连接点位于5'-末端核苷, 其中所述5'-三己基氨基-(THA)-C6 GalNAc₃缀合物的结构式如下所示:



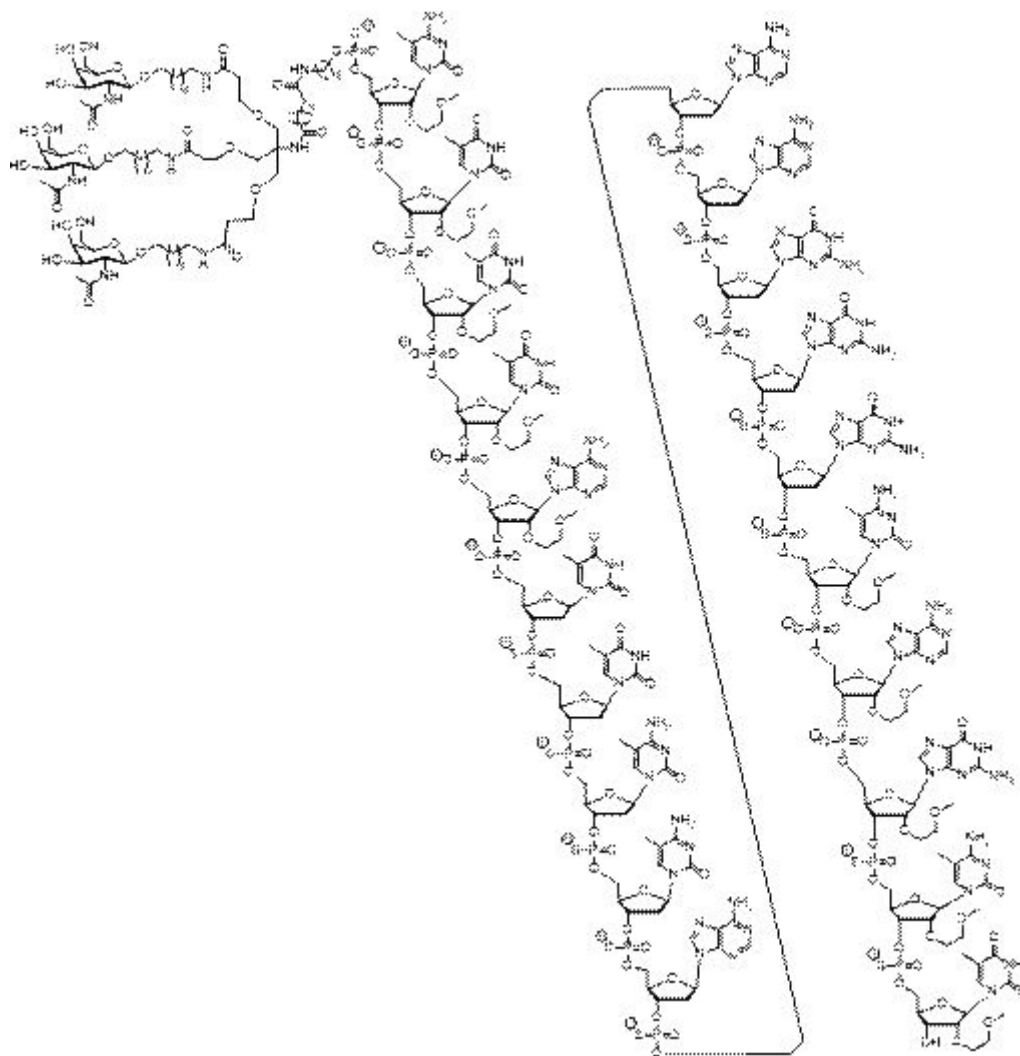
其中所述修饰的寡核苷酸通过所述可裂解部分连接至所述5'-三己基氨基-(THA)-C6 GalNAc₃缀合物, 并且其中所述可裂解部分是5'-P(OH)(=O)-O-3'。

2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中所述连接点为5'末端核苷的5'-羟基的5'-氧原子。

3. 一种化合物, 其中所述化合物的阴离子形式具有以下化学结构:



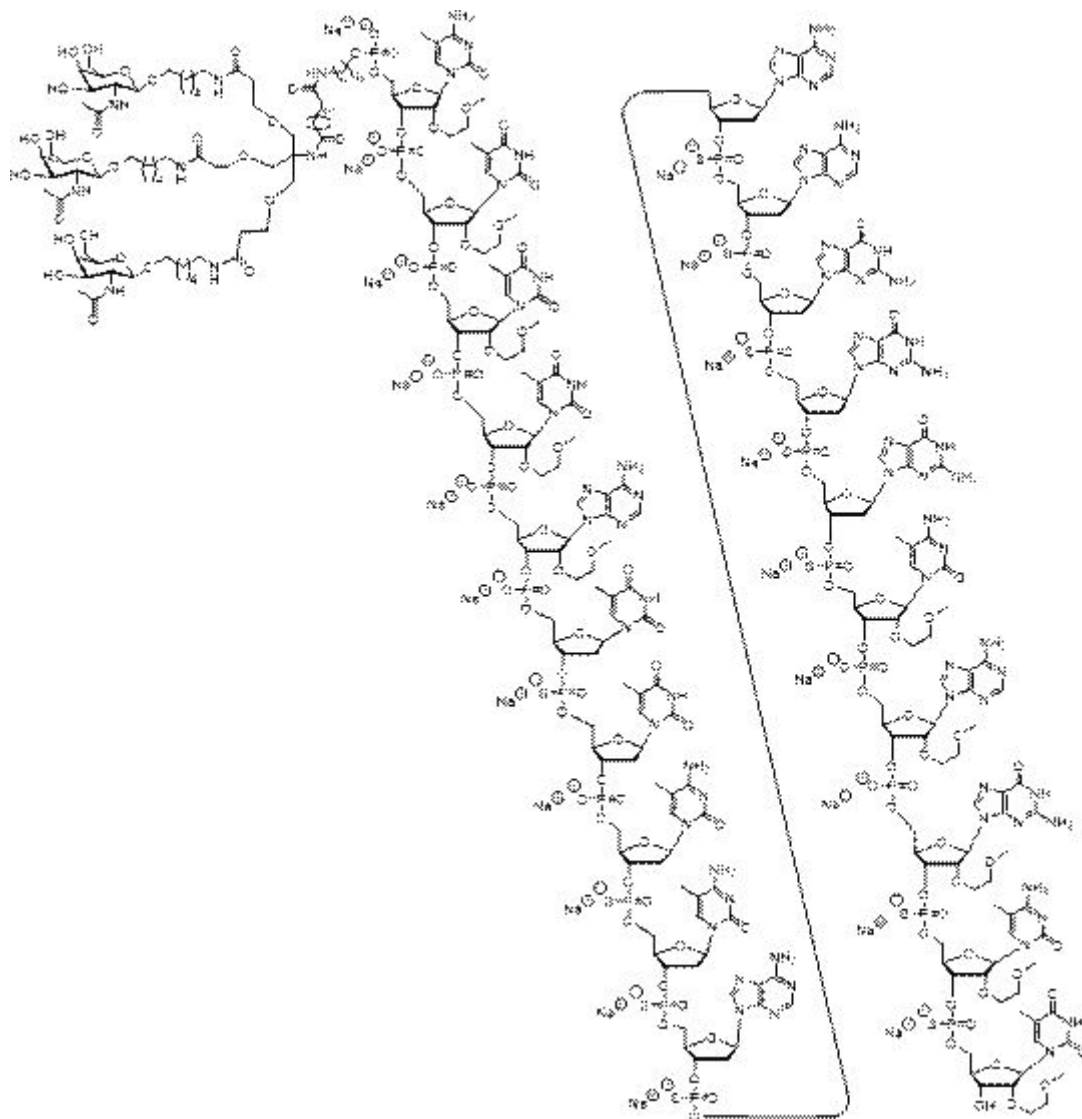
4. 一种根据以下化学结构的化合物：



或其盐。

5. 根据权利要求4所述的化合物, 其为钠盐或钾盐。

6. 一种根据以下化学结构的化合物:



7. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-6中任一项所述的化合物,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述药学上可接受的稀释剂为盐水或水。

9. 包含如权利要求1-6中任一项所述的化合物的组合物在制备用于治疗的药物中的用途。

10. 如权利要求1-6中任一项所述的化合物在制备用于减少细胞、组织、器官或动物中的TMPRSS6的药物中的用途。

11. 如权利要求1-6中任一项所述的化合物在制备用于在动物中减少铁积聚、提高铁调素表达水平和/或降低转铁蛋白饱和度百分比的药物中的用途。

12. 如权利要求1-6中任一项所述的化合物在制备用于治疗或预防动物中与过量铁积聚相关的疾病、病症或病状的药物中的用途。

13. 如权利要求12所述的化合物的用途,其中所述疾病、病症或病状选自红细胞增多症、血色素沉着症和贫血。

14. 如权利要求1-6任一项所述的化合物在制备用于治疗或预防红细胞增多症的药物中的用途。

15. 如权利要求14所述的化合物所述的用途,其中所述红细胞增多症是真性红细胞增多症。

16. 如权利要求1-6中任一项所述的化合物在制备用于治疗或预防疾病、病症或病状中的用途,所述疾病、病症或病状选自遗传性贫血、骨髓增生异常综合征和严重慢性溶血。

17. 如权利要求16所述的化合物的用途,其中所述遗传性贫血选自镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血、戴-布二氏贫血、舒-戴二氏综合征、红细胞膜障碍、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏和遗传性出血性毛细血管扩张症。

18. 如权利要求1-6中任一项所述的化合物在制备用于治疗或预防地中海贫血的药物中的用途。

19. 如权利要求18所述的化合物的用途,其中所述地中海贫血选自 α -地中海贫血、 β -地中海贫血和 δ -地中海贫血。

20. 如权利要求19所述的化合物的用途,其中所述 β -地中海贫血是轻度的、中度的或重度的。

用于调节TMPRSS6表达的化合物和方法

[0001] 序列表

[0002] 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 3月23日创建的名称为BIOL0271W0SEQ_ST25.txt的文件提供,所述文件的大小为148kb。电子格式的序列表中的信息以引用的方式整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明提供为了减少动物中的铁积聚的目的,用于调节 TMPRSS6表达的方法、化合物和组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 由于铁吸收和排泄的人体生理学的能力有限,所以人体铁平衡的维持是脆弱的(Finch,C.A.和Huebers,H.N.Engl.J. Med.1982.306:1520-1528)。铁缺乏是一种广泛病症,并且是由其中膳食铁摄入不满足身体需求的任何病状产生。通常,病理性失血导致负铁平衡。铁超负荷也是常见的病状,并且可能由遗传学原因引起,例如铁代谢的不同基因的突变(Camaschella,C. Blood.2005.106:3710-3717)。肝肽激素铁调素在身体铁代谢中起关键作用,因为它控制铁吸收和再循环(Ganz,T.Am.Soc.Hematol.Educ. Program 2006.507:29-35;Kemna,E.H.等人,Clin.Chem.2007.53: 620-628)。包括HFE(血色素沉着症蛋白)(Ahmad,K.A.等人,Blood Cells Mol Dis.2002.29:361)、转铁蛋白受体2(Kawabata,H.等人, Blood 2005.105:376)和血幼素(Papanikolaou,G.等人, Nat.Genet.2004. 36:77)在内的几种蛋白质也调控身体的铁水平。

[0006] 跨膜蛋白酶丝氨酸6 (TMPRSS6) 是II型跨膜丝氨酸蛋白酶并且 主要在肝中表达(Velasco,G.等人,J. Biol.Chem.2002.277:37637-37646)。TMPRSS6中的突变一直牵涉于缺铁性贫血中(Finberg,K.E.等人,Nat.Genet.2008.40:569-571),其中发现铁调素水平异常升高。对患有小红细胞性贫血的人群体的研究发现 TMPRSS6基因中的功能丧失性突变导致铁调素的过度产生,这进而 导致有缺陷的铁吸收和利用(Melis,M.A.等人, Hematologica 2008.93: 1473-1479)。TMPRSS6参与由铁缺乏触发的跨膜信号传导途径并且 抑制Hamp活化(编码铁调素的基因)的不同途径(Du,X.等人,Science 2008.320:1088-1092)。HFE^{-/-}小鼠中TMPRSS6的杂合性缺失降低全身铁超负荷,而HFE^{-/-}小鼠中TMPRSS6的纯合性缺失引起全身铁缺乏和铁调素的肝表达升高(Finberg,K.E.等人,Blood 2011.117:4590-4599)。

[0007] 铁超负荷病症的一个实例是血色素沉着症。血色素沉着症(例如1型血色素沉着症或遗传性血色素沉着症)是导致胃肠道对膳食铁过量 肠吸收的病症(Allen,K.J.等人, N.Engl.J.Med.2008.358:221-230)。这 导致全身铁贮量的病理性增加。过量铁在组织和器官,特别是肝、肾 上腺、心脏、皮肤、性腺、关节和胰腺中积聚,并且破坏其正常功能。二次并发症,如肝硬化(Ramm,G.A.和Ruddell,R.G.Semin.Liver Dis. 2010.30:271-287)、多关节病(Carroll,G.J.等人,Arthritis Rheum.2011. 63:286-294)、肾上腺功能不全、心力衰竭和糖尿病(Huang,J.等人, Diabetes 2011.60:80-87)是常见的。铁超负荷病症的另一个

实例是 β -地中海贫血,其中患者可能发展由用于治疗 β -地中海贫血的红细胞生成或输血无效引起的铁超负荷。

[0008] 迄今为止,用于治疗铁超负荷病症的治疗策略一直受到限制。已经提出或开发了诸如siRNA和反义寡核苷酸的核酸抑制剂,但是直接靶向TMPRSS6的化合物(PCT公布W02014/076195、W02012/135246、W02014/190157、W02005/0032733、W02013/070786和W02013/173635;美国专利号8,090,542;Schmidt等人Blood.2013,121(7):1200-8)没有一种已被批准用于治疗铁超负荷病症。因此,对于用于抑制TMPRSS6的高度有效和耐受的化合物存在尚未满足的需求。本文公开的本发明涉及发现TMPRSS6表达的新颖高效抑制剂及其在治疗中的用途。

[0009] 本申请中引用的所有文献或文献的部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍及论文)关于本文所论述的文献部分明确地以引用的方式特此并入以及以引用的方式特此整体并入。

[0010] 发明概述

[0011] 本文提供用于调节动物中的TMPRSS6 mRNA和/或蛋白质的水平的组合物、化合物和方法。本文提供用于降低TMPRSS6水平的组合物、化合物和方法。

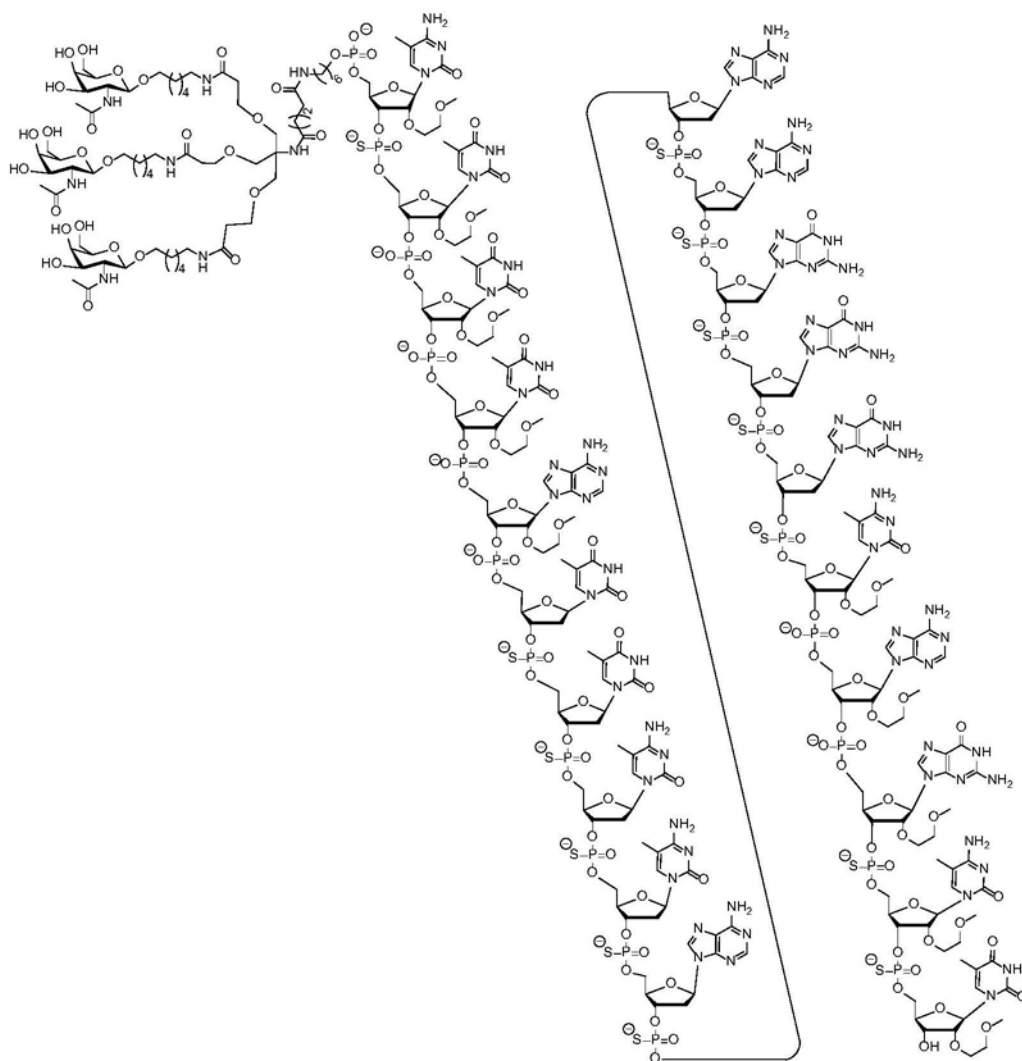
[0012] 本文公开的某些实施方案提供包含靶向编码TMPRSS6的核酸序列的修饰的寡核苷酸的化合物。在某些实施方案中,所述化合物靶向如在SEQ ID NO:1-6中的任一个的核碱基序列中所示的TMPRSS6序列。

[0013] 本文公开的某些实施方案提供包含修饰的寡核苷酸的化合物,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且包含核碱基序列,所述核碱基序列包含与SEQ ID NO:1的核碱基3162至3184的等长部分互补的至少8个连续核碱基的部分,其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1至少80%互补。

[0014] 本文公开的某些实施方案提供包含修饰的寡核苷酸的化合物,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成且具有包含SEQ ID NO:23、36、37、63、77的核碱基序列中的任一个的至少8个连续核碱基的核碱基序列。

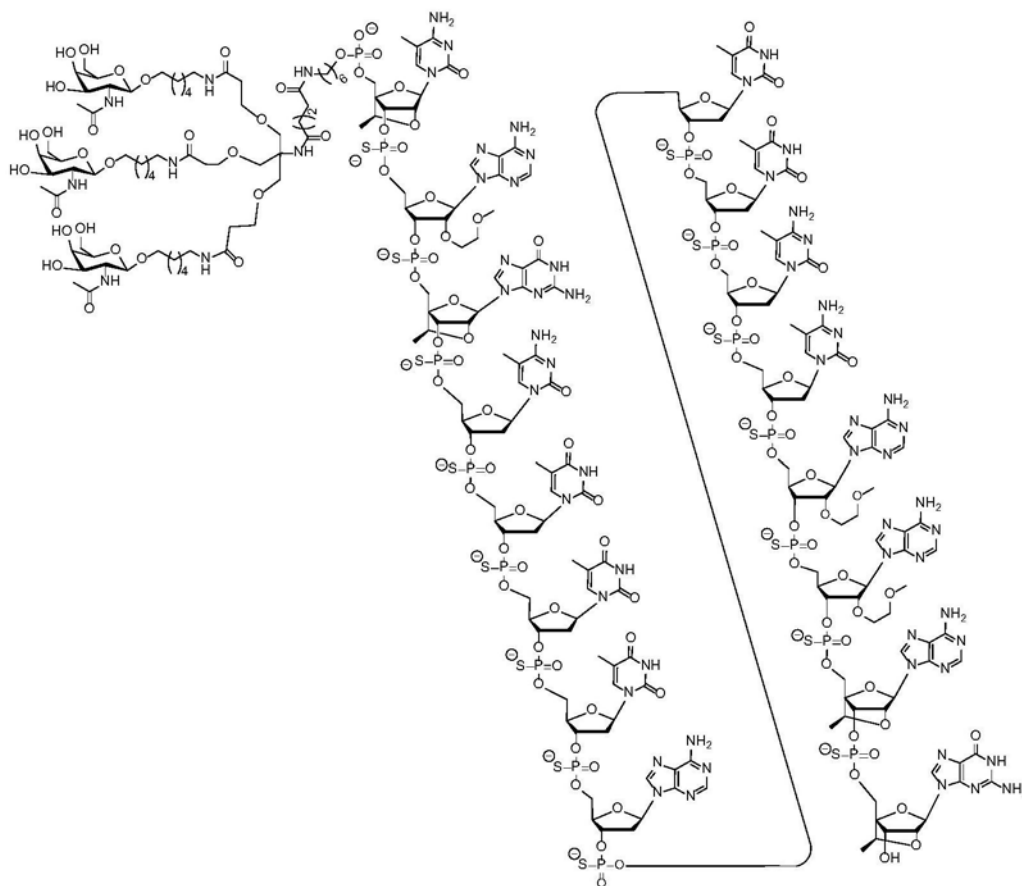
[0015] 本文公开的某些实施方案提供包含具有下式的修饰的寡核苷酸的化合物:

[0016]



[0017] 本文公开的某些实施方案提供包含具有下式的修饰的寡核苷酸的化合物:

[0018]



[0019] 发明详述

[0020] 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,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。

[0021] 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。本申请中引用的所有文献或文献的部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍及论文)关于本文所论述的文献部分明确地以引用方式特此并入以及以引用方式特此整体并入。

[0022] 定义

[0023] 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。在允许的情况下,贯穿本文的公开内容所提及的所有专利、申请、公布的申请及其他公布、可经由数据库(如美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI))获得的GENBANK登录号及相关序列信息及其他数据关于本文所论述的文献部分以引用的方式并入本文以及以引用的方式整体并入本文。

[0024] 除非另外指出,否则以下术语具有以下含义:

[0025] “2'-O-甲氧基乙基”(又为2'-MOE和2'-O(CH₂)₂-OCH₃)是指呋喃糖基环的2'位的

0-甲氧基-乙基修饰。2'-0-甲氧基乙基修饰的糖是修饰的糖。

[0026] “2'-0-甲氧基乙基核苷酸”是指包含2'-0-甲氧基乙基修饰的糖部分的核苷酸。

[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] “约”是指在值的 $\pm 10\%$ 以内。例如,如果陈述“标志物可增加约50%”,则意味着标志物可增加45%-55%之间。

[0029] “活性药剂”或“药剂”是指当施用给个体时药物组合中提供治疗益处的一种或多种物质。例如,在某些实施方案中,靶向TMPRSS6的反义寡核苷酸为活性药剂。

[0030] “活性靶区域”或“靶区域”是指一种或多种活性反义化合物所靶向的区域。

[0031] “活性反应化合物”是指降低靶核酸水平或蛋白质水平的反义化合物。

[0032] “伴随施用”是指在相同时间以任何方式共同施用两种药剂,其中两种药剂的药理作用均在患者中显现。伴随施用不要求以单一的药物组合、以相同剂型或通过相同的施途径来施用两种药剂。这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。

[0033] “施用”是指向个体提供药剂,且包括但不限于由医学专业人员施用及自行施用。

[0034] “药剂”是指在施用给动物时可提供治疗益处的活性物质。“第一药剂”是指本文提供的治疗性化合物。例如,第一药剂是靶向TMPRSS6的反义寡核苷酸。“第二药剂”是指本文所述的第二治疗性化合物。例如,第二药剂可以是靶向TMPRSS6或非TMPRSS6靶标的第二反义寡核苷酸。或者,第二药剂可以是除反义寡核苷酸以外的化合物。

[0035] “改善(Amelioration)”或“改善(ameliorate)”是指相关疾病、病症和/或病状的至少一种指标、标志物、体征或症状的减轻。在某些实施方案中,改善包括延缓或减缓病状、病症和/或疾病的一个或多个指标的进展。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。

[0036] “贫血”是以血液中红血细胞(红细胞)低于正常数量为特征的疾病,通常通过血红蛋白的量的降低来测量。贫血的原因可包括慢性炎症、慢性肾病、肾透析治疗、遗传(遗传性)病症、慢性感染、急性感染、癌症和癌症治疗。这些疾病、病症和/或病状中改变的铁稳态和/或红细胞生成还可导致减少的红细胞产生。贫血的临床体征包括低血清铁(血铁过少)、低血红蛋白水平、低血细胞比容水平、红血细胞减少、网织红细胞减少、可溶性转铁蛋白受体增加和铁限制性红细胞生成。贫血的实例包括地中海贫血(即 α -地中海贫血、 β -地中海贫血(轻型、中间型和重型)和 δ -地中海贫血)、镰状细胞性贫血、再生障碍性贫血、范可尼贫血(Fanconi anemia)、戴-布二氏贫血(Diamond Blackfan anemia)、舒-戴二氏综合征(Shwachman Diamond syndrome)、红细胞膜障碍、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏、遗传性出血性毛细血管扩张症、溶血性贫血、慢性病性贫血等。

[0037] “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,包括但不限于猴和黑猩猩。

[0038] “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。

[0039] “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。

[0040] “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。

[0041] “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 下的靶核酸水平或靶蛋白质水平相比,在存在反义化合物的情况下靶 核酸水平或靶蛋白质水平的降低。

[0042] “反义寡核苷酸”是指具有允许与靶核酸的对应区域或片段杂交 的核碱基序列的单链寡核苷酸。

[0043] “双环糖”是指通过两个非孪位环原子桥接而修饰的呋喃糖基环。双环糖是修饰的糖。

[0044] “双环核酸”或“BNA”是指其中核苷或核苷酸的呋喃糖部分包括 连接呋喃糖环上的两个碳原子的桥联从而形成双环系统的核苷或核 苷酸。

[0045] “输血”是指将血液制品静脉内注射到人体血液循环中的过程。输 血用于各种医学疾病、病症和/或病状中以取代丢失的血液组分。

[0046] “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。

[0047] “cEt”或“限制性乙基”是指包含连接4'-碳与2'-碳的桥的双环糖部 分,其中所述桥具有下式:4'-CH(CH₃)-O-2'。

[0048] “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。

[0049] “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 核苷酸的区域化学上不同于具有无2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸的 区域。

[0050] “嵌合反义化合物”是指具有至少两个化学上不同的区域的反义 化合物。

[0051] “共同施用”是指向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 包括伴随、并行或相继施用。

[0052] “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。在 某些实施方案中,第一核酸是反义化合物且第二核酸是靶核酸。

[0053] “连续核碱基”是指彼此紧邻的核碱基。

[0054] “脱氧核糖核苷酸”是指在核苷酸的糖部分的2' 位具有氢的核苷 酸。脱氧核糖核苷酸可用多种取代基中的任一种进行修饰。

[0055] “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,所注射组合物中的稀释剂可以是液体,例如磷酸盐 缓冲盐水(PBS)。

[0056] “剂量单位”是指所提供的药剂的形式,例如丸剂、片剂或本领域 中已知的其他剂量单位。在某些实施方案中,剂量单位为含有冻干反 义寡核苷酸的小瓶。在某些实施方案中,剂量单位为含有重构反义寡 核苷酸的小瓶。

[0057] “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。

[0058] “有效量”或“治疗有效量”是指足以在需要活性药剂的个体中实现所需生理学结果的药剂的量。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。

[0059] “完全互补”或“100%互补”是指第一核酸的核碱基序列的每个核碱基在第二核酸的第二核碱基序列中具有互补核碱基。在某些实施方案中,第一核酸是反义化合物且第二核酸是靶核酸。

[0060] “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“缺口区段”,且外部区域可被称为“翼区段”。

[0061] “缺口加宽的”是指具有定位于具有一个至六个核苷的5'和3'翼区段之间且与所述5'和3'翼区段紧邻的12个或多个连续2'-脱氧核苷的缺口区段的嵌合反义化合物。

[0062] “血色素沉着症”是一种铁代谢病症,其导致从胃肠道吸收过量铁,从而导致过量铁积聚和沉积在身体的各种组织中。原发性或遗传性经典血色素沉着症是由(例如HFE基因中的)遗传突变引起的。患有这种疾病的受试者具有过量的铁,其被吸收在胃肠道中并积聚在身体组织中,特别是肝中。继发性或获得性血色素沉着症可由频繁输血、铁补充剂的高口服或胃肠外摄入或其他疾病的继发作用引起。

[0063] “血细胞生成”是指源于造血干细胞的血液细胞组分的形成。这些干细胞驻留在骨髓的髓质中,并且具有产生所有不同成熟血细胞类型的独特能力。

[0064] “溶血”是指红细胞或红血细胞的破裂以及其内容物释放到周围流体中。动物中的溶血可由于大量医疗条件,包括细菌感染、寄生虫感染、自身免疫性病症和遗传病症而发生。

[0065] “铁调素”是指响应于炎症或血液中的铁水平上升而由肝细胞产生的mRNA以及由所述mRNA编码的蛋白质。铁调素的主要作用是通过促进这些血液铁水平的降低来调控血液铁水平。铁调素表达在急性和慢性炎症的情况下增加,从而导致用于红细胞生成的铁利用率降低。“铁调素”还称为铁调素抗微生物肽;HAMP;HAMP1;HEPC;HFE2;LEAP-1;LEAP1;和肝表达的抗微生物肽。

[0066] “遗传性贫血”是指由遗传性病状引起的贫血,其导致身体中的红细胞比正常人更快死亡,从肺部输送氧至身体的不同部位无效,或根本不产生。实例包括但不限于镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血、戴-布二氏贫血、舒-戴二氏综合征、红细胞膜障碍、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏,或遗传性出血性毛细血管扩张症。

[0067] “HFE”是指人血色素沉着症基因或蛋白质。

[0068] “HFE基因突变”是指HFE基因中的突变,其可能导致遗传性血色素沉着症。

[0069] “杂交”是指互补核酸分子的退火。在某些实施方案中,互补核酸分子包括反义化合物和靶核酸。

[0070] “鉴定处于患有与铁过量积聚相关的疾病、病症和/或病状的风险的动物”是指鉴定已被诊断为患有与铁过量积聚相关的疾病、病症和/或病状的动物或鉴定易发展与铁过量积聚相关的疾病、病症和/或病状的动物。例如,如果动物具有血色素沉着症家族史,则

所述动物可能易发展与铁过量积聚相关的疾病、病症和/或病状。这种鉴定可通过包括评估动物的医疗史和标准临床测试或评定的任何方法来实现。

[0071] “紧邻”是指在紧邻的要素之间没有插入要素。

[0072] “个体”或“受试者”或“动物”是指对于治疗或疗法所选择的人或非人动物。

[0073] “抑制表达或活性”是指RNA或蛋白质的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。

[0074] “核苷间键联”是指核苷之间的化学键。

[0075] “静脉内施用”是指进入静脉中的施用。

[0076] “铁积聚”或“铁超负荷”指示由任何原因引起的铁在体内的积聚和沉积。最常见的原因是遗传性原因、输血铁超负荷,其可由重复输血或过量膳食铁摄入所致。

[0077] “铁补充剂”是指出于治疗患者的铁缺乏的医疗原因而开处方的补充剂。铁可通过口服途径补充或胃肠外给予。

[0078] “连接的核苷”是指键合在一起的相邻核苷。

[0079] “标志物”或“生物标志物”是充当健康或生理学相关评定的指标的任何可测量和可量化的生物学参数。例如,转铁蛋白饱和度百分比的增加、铁水平的升高或铁调素水平的降低可被认为是铁超负荷疾病、病症和/或病状的标志。

[0080] “MCH”是指“平均红细胞血红蛋白”或“平均细胞血红蛋白”,其是表示血液样品中每个红血细胞的血红蛋白(Hb)的平均质量的值。

[0081] “MCV”是指“平均红细胞体积”或“平均细胞体积”,其是表示平均红血细胞大小的值。

[0082] “错配”或“非互补核碱基”或“MM”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。

[0083] “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。

[0084] “修饰的核碱基”是指不是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸苷或尿嘧啶的任何核碱基。例如,修饰的核碱基可以是5-甲基胞嘧啶。“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)。

[0085] “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。

[0086] “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。

[0087] “修饰的寡核苷酸”是指包含修饰的核苷间键联、修饰的糖和/或修饰的核碱基的寡核苷酸。

[0088] “修饰的糖”是指来自天然糖的取代或改变。例如,修饰的糖可以是2'-MOE。

[0089] “调节”是指改变或调整细胞、组织、器官或生物体的特征。例如,调节TMPRSS6水平可是指增加或降低细胞、组织、器官或生物体中的TMPRSS6 mRNA和/或TMPRSS6蛋白质的水平。“调节剂”实现细胞、组织、器官或生物体的改变。例如,TMPRSS6反义寡核苷酸可以是增加或减少细胞、组织、器官或生物体中的TMPRSS6 mRNA或TMPRSS6蛋白质的量的调节剂。

[0090] “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及核

苷酸。

[0091] “基序”是指反义化合物中化学上不同的区域的模式(pattern)。

[0092] “突变”是指核酸序列中的变化。突变可以各种方式引起,所述方式包括但不限于辐射、病毒、转座子和致突变化学品,以及在减数分裂、DNA复制、RNA转录和转录后加工过程中发生的错误。突变可导致序列中的若干不同变化;它们可没有作用、改变基因的产物或阻止基因正常或完全地发挥作用。例如,HFE突变可导致基因产物的不正常功能,从而导致肠中的过量铁吸收。

[0093] “骨髓增生异常综合征”是指一组不同的血液学医学疾病、病症和/或病状,其涉及骨髓类血细胞的无效产生。该综合征由骨髓中干细胞的病症引起。在骨髓增生异常综合征中,血细胞生成无效,并且血细胞的数量和质量不可逆地下降,从而进一步损害血液产生。因此,患有骨髓增生异常综合征的患者发展严重贫血并且需要频繁输血。

[0094] “天然存在的核苷间键联”是指3'至5'磷酸二酯键联。

[0095] “天然糖部分”是指DNA(2'-H)或RNA(2'-OH)发现的糖。

[0096] “核酸”是指由单体核苷酸组成的分子。核酸包括核糖核酸(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)。

[0097] “核碱基”是指能够与另一核酸的碱基配对的杂环部分。

[0098] “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。

[0099] “核苷”是指连接至糖的核碱基。

[0100] “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。

[0101] “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。

[0102] “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连接的N-吗啉基)。

[0103] “低聚化合物”或“低聚物”是指包含两个或多个子结构(单体)且能够与核酸分子的区域杂交的多聚结构。在某些实施方案中,低聚化合物为寡核苷。在某些实施方案中,低聚化合物为寡核苷酸。在某些实施方案中,低聚化合物为反义化合物。在某些实施方案中,低聚化合物为反义寡核苷酸。在某些实施方案中,低聚化合物为嵌合寡核苷酸。

[0104] “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。

[0105] “胃肠外施用”是指通过注射或输注来施用。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。施用可以是连续的,或长期的,或短期的或间歇的。

[0106] “肽”是指通过由酰胺键连接至少两个氨基酸而形成的分子。肽是指多肽和蛋白质。

[0107] “转铁蛋白的饱和度百分比”是指血清铁与总铁结合能力的比值乘以100。关于可用于结合铁的转铁蛋白分子,该数值告诉临床医生实际结合了多少血清铁。

[0108] “药物组合物”是指适于向个体施用的物质的混合物。例如,药物组合物可包含一

种或多种活性药剂和无菌水溶液。

[0109] “药学上可接受的载体”是指不干扰寡核苷酸的结构的介质或稀释剂。某些所述载体使得药物组合物能够配制成例如由受试者经口摄取的片剂、丸剂、糖衣药丸、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、浆料、混悬液及锭剂。例如，药学上可接受的载体可以是无菌水溶液，如PBS。

[0110] “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。

[0111] “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。

[0112] “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。

[0113] “红细胞增多症”是指在指定体积中由于红血细胞数量增加(绝对红细胞增多症)或血浆体积减小(相对红细胞增多症)所致的红血细胞(RBC)增加的病状。血容量与红血细胞比例可被测量为血细胞比容(Hct)水平。RBC的比例增加可使血液粘稠，这可导致通过循环系统的较慢血液流动以及血凝块的潜在形成。较慢血液流动可使输送至细胞、组织和/或器官的氧气减少，从而导致诸如心绞痛或心力衰竭的疾病、病症或病状。在循环系统中形成血凝块可导致细胞、组织和/或器官损伤，从而导致诸如心肌梗塞或中风的疾病、病症或病状。红细胞增多症的治疗包括静脉切开术或减少RBC产生的药物(例如，INF- α 、羟基脲、阿那格雷)。红细胞增多症的实例包括但不限于真性红细胞增多症(PCV)、真性红细胞增多(PRV)和红细胞增多症。在某些情况下，红细胞增多症可进展成受试者的红细胞白血病。

[0114] “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。

[0115] “预防”是指延迟或阻止疾病、病症或病状的发作、发展或进展达数分钟到无限期的时间段。预防还是指降低发展疾病、病症或病状的风险。

[0116] “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。

[0117] “副作用”是指可归因于治疗的非所需作用的生理应答。在某些实施方案中，副作用包括注射部位反应、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、肌病和不适。例如，血清中的转氨酶水平升高可指示肝中毒或肝功能异常。

[0118] “单链寡核苷酸”是指未与互补链杂交的寡核苷酸。

[0119] “可特异性杂交”是指反义化合物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状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。

[0120] “皮下施用”是指刚好在皮肤下方的施用。

[0121] “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。

[0122] “靶核酸”、“靶RNA”和“靶RNA转录物”均是指能够由反义化合物靶向的核酸。

[0123] “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。

[0124] “地中海贫血”是指由导致红血细胞的破坏或降解的异常血红蛋白分子形成引起的贫血亚组(例如, α -地中海贫血、 β -地中海贫血、 δ -地中海贫血、非输血依赖性地中海贫血(NTDT))。地中海贫血的并发症包括过量铁(即由地中海贫血本身或用于治疗地中海贫血的频繁输血造成的血液中的铁超负荷)、感染风险增加、骨畸形、脾脏增大(脾肿大)、生长速率减慢和心脏问题(例如,充血性心力衰竭和心律不齐)。

[0125] “治疗有效量”是指向动物提供治疗益处的药剂的量。

[0126] “TMPRSS6”(还称为“蛋白裂解酶-2”)是指TMPRSS6的任何核酸或蛋白质。

[0127] “TMPRSS6核酸”是指编码TMPRSS6的任何核酸。例如,在某些实施方案中,TMPRSS6核酸包括编码TMPRSS6的DNA序列,从编码TMPRSS6的DNA(包括含有内含子和外显子的基因组DNA转录的RNA序列,以及编码TMPRSS6的mRNA序列。“TMPRSS6 mRNA”是指编码TMPRSS6蛋白的mRNA。

[0128] “TMPRSS6特异性抑制剂”是指能够在分子水平上特异性地抑制TMPRSS6基因、TMPRSS6RNA和/或TMPRSS6蛋白的表达的任何试剂。例如,TMPRSS6特异性抑制剂包括核酸(包括反义化合物)、肽、抗体、小分子和其他能够抑制TMPRSS6的水平试剂。在某些实施方案中,通过特异性地调节TMPRSS6,TMPRSS6特异性抑制剂可影响铁积聚途径的组分。

[0129] “治疗”是指向动物施用药物组合物以便实现动物的疾病、病症或病状的改变或改善。在某些实施方案中,可向动物施用一种或多种药物组合物。

[0130] “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,未修饰的核苷酸为RNA核苷酸(即, β -D-核糖核苷酸)或DNA核苷酸(即, β -D-脱氧核糖核苷酸)。

[0131] 某些实施方案

[0132] 在本文公开的某些实施方案中,TMPRSS6具有如在以下中列出的序列:GenBank登录号NM_153609.2(作为SEQ ID NO:1并入本文);从16850000至16897000截短的GENBANK登录号NT_011520.12的补体(作为SEQ ID NO:2并入本文);GENBANK登录号CR456446.1(作为SEQ ID NO:3并入本文);GENBANK登录号BC039082.1(作为SEQ ID NO:4并入本文);GENBANK登录号AY358398.1(作为SEQ ID NO:5并入本文);以及GENBANK登录号DB081153.1(作为SEQ ID NO:6并入本文)。

[0133] 本文公开的某些实施方案提供包含靶向编码TMPRSS6的核酸序列的修饰的寡核苷酸的化合物。在某些实施方案中,所述化合物靶向如在SEQ ID NO:1-6中的任一个的核碱基序列中所示的TMPRSS6序列。

[0134] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且具有核碱基序列,所述核碱基序列包含与SEQ ID NO:1-6的等长部分互补的至少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20个连续核碱基。

[0135] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且具有核碱基序列,所述核碱基序列包含与SEQ ID NO:1的核碱基3162至3184的等长部分互补的至少8个连续核碱基的部分,其中所述修

饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1至少80%互补。

[0136] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且具有核碱基序列,所述核碱基序列包含与SEQ ID NO:1的核碱基1286至1305 的等长部分互补的至少8个连续核碱基的部分,其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1至少80%互补。

[0137] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且具有核碱基序列,所述核碱基序列包含与SEQ ID NO:1的核碱基3162至3184 的等长部分互补的至少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个连续核碱基的部分,其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1至少80%互补。

[0138] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且具有核碱基序列,所述核碱基序列包含与SEQ ID NO:1的核碱基1286至1305 的等长部分互补的至少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个连续核碱基的部分,其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1至少80%互补。

[0139] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的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:7-85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20个连续核碱基。

[0140] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的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:23、36、37、63、77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20个连续核碱基。

[0141] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的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:36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20个连续核碱基。

[0142] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的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:77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20个连续核碱基。

[0143] 在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与SEQ ID NO:1-6中的任一个的等长部分至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98% 或至少99%互补。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸包含与SEQ ID NO:1-6中的任一个的等长部分100%互补的核碱基序列。

[0144] 在某些实施方案中,所述化合物包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由8

至80个、20至80个、10至50个、20至35个、10至30个、12至30个、15至30个、16至30个、20至30个、20至29个、20至28个、20至27个、20至26个、20至25个、20至24个、20至23个、20至22个、20至21个、15至25个、16至25个、15至24个、16至24个、17至24个、18至24个、19至24个、19至22个、16至21个、18至21个或16至20个连接的核碱基组成。在某些实施方案中,所述化合物包含由16个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,所述化合物包含由20个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸。

[0145] 在某些实施方案中,所述化合物包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由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个连接的核碱基长度,或处于由任何两个上述值所界定的范围组成。

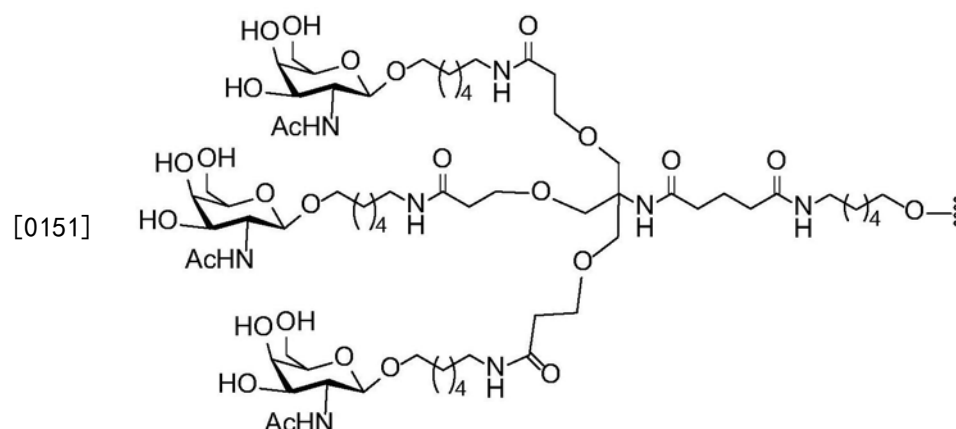
[0146] 在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸是单链的。

[0147] 在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键联。在某些实施方案中,所述修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中,至少一个修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中,每个修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0148] 在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸包含至少一个包含修饰的糖的核苷。在某些实施方案中,至少一个修饰的糖包含双环糖。在某些实施方案中,至少一个修饰的糖包含2'-O-甲氧基乙基、受限的乙基、3'-氟-HNA或4'-(CH₂)_n-O-2'桥,其中n是1或2。

[0149] 在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸包含至少一个包含修饰的核碱基的核苷。在某些实施方案中,修饰的核碱基为5-甲基胞嘧啶。

[0150] 在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸包含缀合物基团。在某些实施方案中,所述缀合物是碳水化合物部分。在某些实施方案中,所述缀合物是GalNAc部分。在某些实施方案中,GalNAc是5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃。在某些实施方案中,所述缀合物具有式



[0152] 在某些实施方案中,所述化合物包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且靶向SEQ ID NO:1的区域3162至3184的等长部分或与SEQ ID

N0:1的区域3162至3184 的等长部分互补,其中所述修饰的寡核苷酸包含:(a)由连接的脱氧核 苷组成的缺口区段;(b)由连接的核苷组成的5'翼区段;以及(c)由连 接的核苷组成的3'翼区段;其中所述缺口区段位于紧邻且介于5'翼区 段与3'翼区段之间,并且其中每个翼区段的每个核苷包含修饰的糖。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含至少一个硫代磷酸酯 核苷间键联。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含GalNAc 缀合物。在某些实施方案中,所述缀合物是5'-三己基氨基-(THA)-C6 GalNAc₃缀合物。

[0153] 在某些实施方案中,所述化合物包含修饰的寡核苷酸,所述修饰 的寡核苷酸由12至30个连接的核苷组成并且靶向SEQ ID N0:1的 区域1286至1305的等长部分或与SEQ ID N0:1的区域1286至1305 的等长部分互补,其中所述修饰的寡核苷酸包含:(a)由连接的脱氧核 苷组成的缺口区段;(b)由连接的核苷组成的5'翼区段;以及(c)由连 接的核苷组成的3'翼区段;其中所述缺口区段位于紧邻且介于5'翼区 段与3'翼区段之间,并且其中每个翼区段的每个核苷包含修饰的糖。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含至少一个硫代磷酸酯 核苷间键联。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含GalNAc 缀合物。在某些实施方案中,所述缀合物是5'-三己基氨基-(THA)-C6 GalNAc₃缀合物。

[0154] 在某些实施方案中,所述化合物包含修饰的寡核苷酸,所述修饰 的寡核苷酸由20个连接的核苷组成并且靶向SEQ ID N0:1的区域 3162至3181的等长部分或与SEQ ID N0:1的区域3162至3181的等 长部分互补,其中所述修饰的寡核苷酸包含:(a)由10个连接的脱氧 核 苷组成的缺口区段;(b)由5个连接的核苷组成的5'翼区段;以及(c) 由5个连接的核苷组成的3'翼区段;其中所述缺口区段位于紧邻且介 于5'翼区段与3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含2'-O- 甲氧基乙基糖,其中至少一个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,并且其 中每个胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,所述修饰的 寡核苷酸还包含GalNAc缀合物。在某些实施方案中,所述缀合物是 5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃缀合物。

[0155] 在某些实施方案中,所述化合物包含修饰的寡核苷酸,所述修饰 的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且靶向SEQ ID N0:1的区域 3169至3184的等长部分或与SEQ ID N0:1的区域3169至3184的等 长部分互补,其中所述修饰的寡核苷酸包含:(a)由9个连接的脱氧核 苷组成的缺口区段;(b)由3个连接的核苷组成的5'翼区段;以及(c) 由4个连接的核苷组成的3'翼区段;其中所述缺口区段位于紧邻且介 于5'翼区段与3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含修饰的 糖,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,并且其中每个胞嘧啶残 基是5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含 GalNAc缀合物。在某些实施方案中,所述缀合物是5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃缀合物。

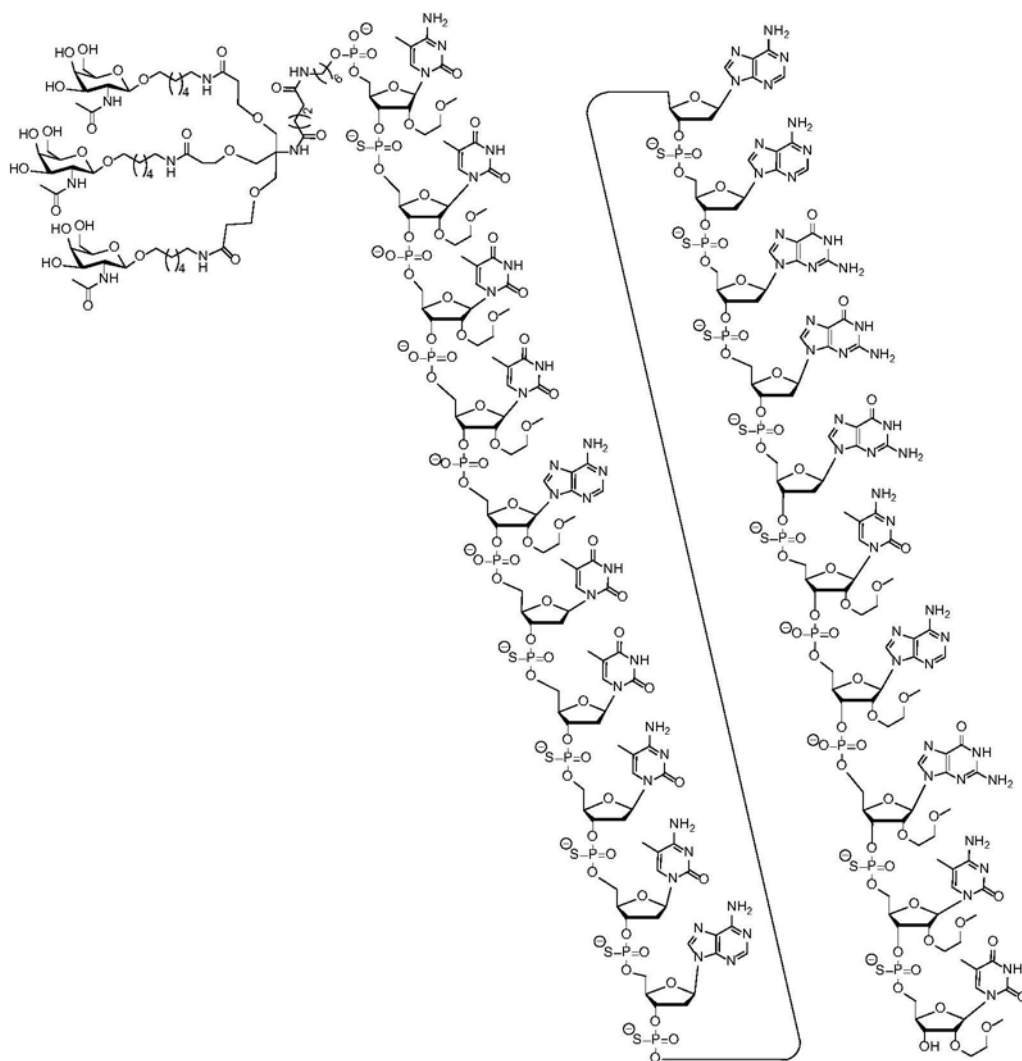
[0156] 在某些实施方案中,所述化合物包含修饰的寡核苷酸,所述修饰 的寡核苷酸由20个连接的核苷组成并且具有包含SEQ ID N0:36的 至少8个连续核碱基的核碱基序列,其中所述修饰的寡核苷酸包含:(a)由10个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;(b)由5个连接的 核苷组 成的5'翼区段;以及(c)由5个连接的核苷组成的3'翼区段;其中所 述缺口区段位于紧邻且介于5'翼区段与3'翼区段之间,其中每个翼区 段的每个核苷包含2'-O-甲氧基乙基糖,其中至少一个核苷间键联是 硫代磷酸酯键联,并且其中每个胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。在某些 实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含GalNAc缀合物。在某些实 施方案中,所述缀合物是5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃缀合物。

[0157] 在某些实施方案中,所述化合物包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成并且具有包含SEQ ID NO:77的至少8个连续核碱基的核碱基序列,其中所述修饰的寡核苷酸包含:(a)由9个连接的脱氧核苷组成的缺口区段;(b)由3个连接的核苷组成的5'翼区段;以及(c)由4个连接的核苷组成的3'翼区段;其中所述缺口区段位于紧邻且介于5'翼区段与3'翼区段之间,其中每个翼区段的每个核苷包含修饰的糖,其中每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,并且其中每个胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含GalNAc缀合物。在某些实施方案中,所述缀合物是5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃缀合物。

[0158] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含根据下式的修饰的寡核苷酸:mCes Teo Teo Teo Aeo Tds Tds mCds mCds Ads Ads Ads Gds Gds Gds mCeo Aeo Ges mCes Te (SEQ ID NO:36);其中,A是腺嘌呤核碱基,mC是5-甲基胞嘧啶核碱基,G是鸟嘌呤核碱基,T是胸腺嘧啶核碱基,e是2'-O-(CH₂)₂-OCH₃呋喃糖基修饰的糖部分,d是2'-脱氧呋喃糖基糖部分,s是硫代磷酸酯核苷间键联,并且o是磷酸二酯核苷间键联。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含GalNAc缀合物。在某些实施方案中,所述缀合物是5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃缀合物。

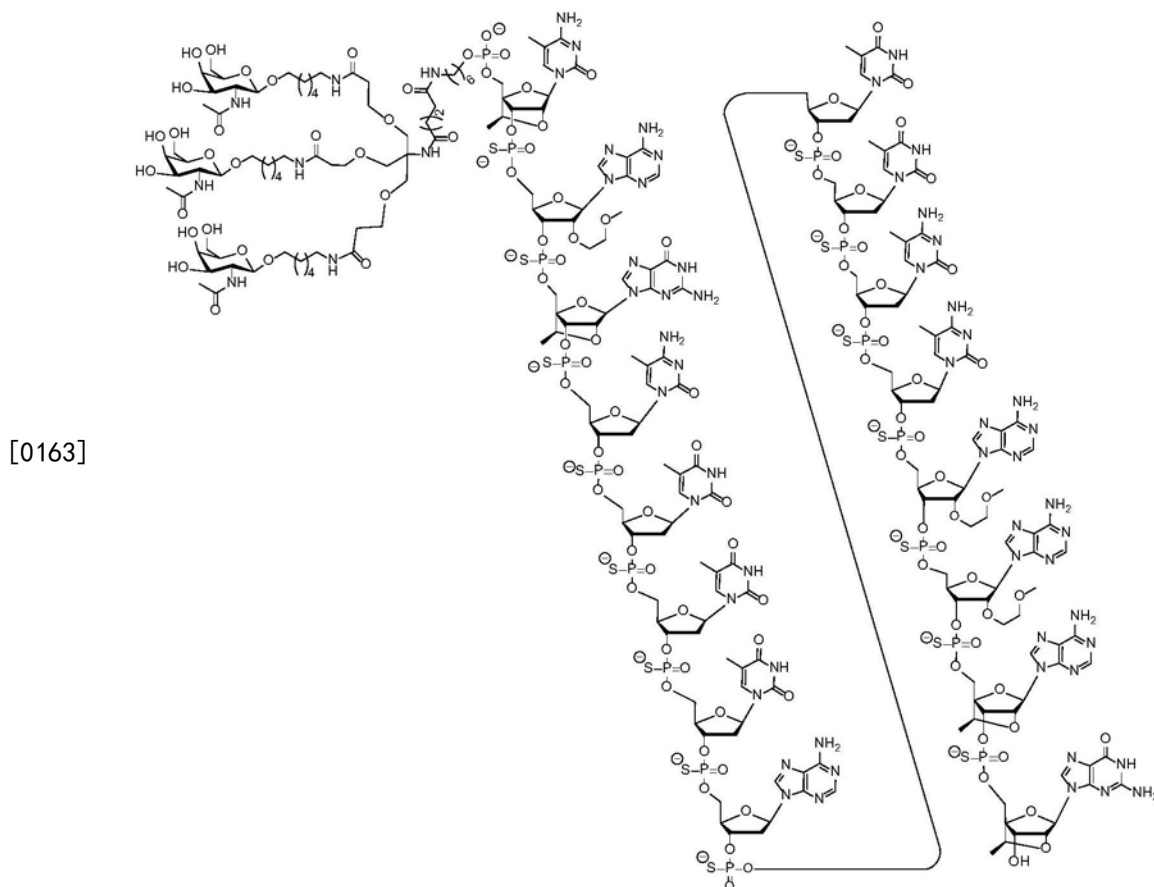
[0159] 本文公开的某些实施方案提供包含具有下式的修饰的寡核苷酸的化合物:

[0160]



[0161] 本文公开的某些实施方案提供一种化合物,其包含根据下式的修饰的寡核苷酸: mCks Aes Gks mCds Tds Tds Tds Ads Tds Tds mCds mCds Aes Aes Aks Gk (SEQ ID NO: 77);其中,A是腺嘌呤核碱基,mC是5-甲基胞嘧啶核碱基,G是鸟嘌呤核碱基,T是胸腺嘧啶核碱基,e是2'-O-(CH₂)₂-OCH₃呋喃糖基修饰的糖部分,d是2'-脱氧呋喃糖基糖部分,s是硫代磷酸酯核苷间键联,并且k是cEt。在某些实施方案中,所述修饰的寡核苷酸还包含GalNAc缀合物。在某些实施方案中,所述缀合物是5'-三己基氨基-(THA)-C6 GalNAc₃缀合物。

[0162] 本文公开的某些实施方案提供包含具有下式的修饰的寡核苷酸的化合物:



[0164] 在某些实施方案中,本文公开的化合物或组合物包含修饰的寡核苷酸的盐。

[0165] 在某些实施方案中,本文公开的化合物或组合物还包含药学上可接受的载体或稀释剂。

[0166] 在某些实施方案中,动物是人。

[0167] 某些实施方案提供包含如本文所述的修饰的寡核苷酸的组合物或化合物,其中粘度水平小于40cP。在某些实施方案中,所述组合物具有小于15cP的粘度水平。在某些实施方案中,所述组合物具有小于12cP的粘度水平。在某些实施方案中,所述组合物具有小于10 cP的粘度水平。

[0168] 本文公开的某些实施方案提供包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的化合物和组合物,其用于减少细胞、组织、器官或动物中的 TMPRSS6。

[0169] 本文公开的某些实施方案提供包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的化合物和组合物,其用于降低细胞、组织、器官或动物中的铁水平。在某些实施方案中,所述化合物

和组合物降低血清铁水平。在某些实施方案中,所述化合物和组合物降低肝铁水平。在某些实施方案中,所述化合物和组合物降低铁吸收。在某些实施方案中,所述化合物和组合物降低铁超负荷或积聚。在某些实施方案中,降低铁超负荷/积聚改善、治疗、预防或延迟与铁超负荷相关的疾病、病症或病状。

[0170] 本文公开的某些实施方案提供包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的化合物和组合物,其用于提高动物中的铁调素水平,如mRNA或蛋白质表达水平。

[0171] 本文公开的某些实施方案提供包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的化合物和组合物,其用于降低动物中的转铁蛋白饱和度百分比。在某些实施方案中,降低转铁蛋白饱和度导致用于红细胞生成的铁供应的降低。在某些实施方案中,红细胞生成的减少可治疗、预防动物中的红细胞增多症或其症状,延迟动物中的红细胞增多症或其症状的发作,改善和/或减轻动物中的红细胞增多症或其症状。在某些实施方案中,红细胞增多症是真性红细胞增多症。在某些实施方案中,用靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸治疗预防或延迟红细胞增多症进展成红细胞白血病。

[0172] 本文公开的某些实施方案提供用于减少动物中的铁积聚的化合物和组合物,所述化合物和组合物包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的化合物和组合物用于治疗、预防与动物中的铁过量积聚相关的疾病、病症和/或病状或其症状,减缓所述疾病、病症和/或病状或其症状的进展,延迟所述疾病、病症和/或病状或其症状的发作,改善和/或减轻所述疾病、病症和/或病状或其症状。

[0173] 在某些实施方案中,铁积聚是动物中的疾病、病症或病状的结果或原因。在某些实施方案中,所述疾病、病症或病状是无效红细胞生成、红细胞增多症、血色素沉着症或贫血。在某些实施方案中,血色素沉着症是遗传性血色素沉着症。在某些实施方案中,贫血是遗传性贫血、骨髓增生异常综合征或严重慢性溶血。在某些实施方案中,遗传性贫血是镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血、戴-布二氏贫血、舒-戴二氏综合征、红细胞膜障碍、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏,或遗传性出血性毛细血管扩张症。在某些实施方案中,地中海贫血是 β -地中海贫血。在某些实施方案中, β -地中海贫血是重型 β -地中海贫血、中间型 β -地中海贫血或轻型 β -地中海贫血。在某些实施方案中,所述疾病、病症或病状与HFE基因中的突变相关。在其他实施方案中,所述疾病与血幼素基因中的突变相关。在其他实施方案中,所述疾病与铁调素基因中的突变相关。

[0174] 在某些实施方案中,铁积聚是用于治疗动物中的疾病、病症或病状的疗法的结果。在某些实施方案中,所述疗法是静脉切开术或输血疗法。在某些实施方案中,所述疾病、病症和/或病状可以是由于多次输血所致。在某些实施方案中,多次输血可导致红细胞增多症。在某些实施方案中,多次输血与患有贫血的动物相关。需要多次输血的贫血实例是遗传性贫血、骨髓增生异常综合征和严重慢性溶血。

[0175] 在某些实施方案中,所述疾病、病症和/或病状与过量胃肠外铁补充剂摄入或过量膳食铁摄入相关。

[0176] 在某些实施方案中,提供包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的化合物和组合物,其用于疗法中。在某些实施方案中,所述包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的化合物和组合物以治疗有效量施用至动物。

[0177] 在某些实施方案中,提供包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的化合物和组合物,其用于制备药物。在某些实施方案中,所述药物用于治疗、预防与动物中的铁过量积聚相关的疾病、病症和/或病状或其症状,减缓所述疾病、病症和/或病状或其症状的进展,延迟所述疾病、病症和/或病状或其症状的发作,和/或减轻所述疾病、病症和/或病状或其症状。

[0178] 在某些实施方案中,所述包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的组合物或化合物与一种或多种第二药剂共同施用。在某些实施方案中,第二药剂是铁螯合剂或铁调素激动剂。在其他实施方案中,铁螯合剂包括FBS0701 (FerroKin)、地拉罗司 (Exjade)、除铁灵 (Desferal) 或去铁酮 (Deferiprone) (DFP)。在某些实施方案中,第二药剂是第二反义化合物。在其他实施方案中,第二反义化合物靶向TMPRSS6。在其他实施方案中,第二反义化合物靶向非TMPRSS6化合物。在其他实施方案中,所述包含靶向TMPRSS6的修饰的寡核苷酸的组合物或化合物在静脉切开术或输血疗法之前、期间或之后施用。

[0179] 反义化合物

[0180] 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。

[0181] 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段的反向互补序列的核碱基序列。

[0182] 在某些实施方案中,靶向TMPRSS6核酸的反义化合物的长度为10至30个核苷酸。换句话说,反义化合物为10至30个连接的核碱基。在其他实施方案中,反义化合物包含由8至80个、10至80个、12至50个、15至30个、18至24个、19至22个或20个连接的核碱基组成的修饰的寡核苷酸。在某些这类实施方案中,反义化合物包含由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个连接的核碱基长度,或处于由任何两个上述值所界定的范围组成的修饰的寡核苷酸。在一些实施方案中,反义化合物为反义寡核苷酸。

[0183] 在某些实施方案中,反义化合物包括缩短或截短的修饰的寡核苷酸。缩短或截短的修饰的寡核苷酸可从5'端(5'截短)、中心部分或可替代地3'端(3'截短)缺失单个核苷。缩短或截短的寡核苷酸可从5'端缺失两个或多个核苷、从中心部分缺失两个或多个核苷,或可替代地可从3'端缺失两个或多个核苷。或者,缺失的核苷可散布于整个修饰的寡核苷酸中,例如在从5'端缺失一个或多个核苷、从中心部分缺失一个或多个核苷和/或从3'端缺失一个或多个核苷的反义化合物中。

[0184] 当单一额外核苷存在于延长的寡核苷酸中时,额外核苷可位于寡核苷酸的5'端、3'端或中心部分。当存在两个或多个额外核苷时,所添加的核苷可彼此邻近,例如在寡核苷酸的5'端(5'添加)、3'端(3'添加)中心部分添加有两个核苷的寡核苷酸中。或者,所添

加的核苷可散布于整个反义化合物中,例如在5'端添加有一个或多个核苷、3'端添加有一个或多个核苷和/或中心部分添加有一个或多个核苷的寡核苷酸中。

[0185] 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引导靶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。

[0186] Gautschi等人(J.Natl.Cancer Inst.93:463-471,March 2001)表明与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,这种寡核苷酸展现有效的体内抗肿瘤活性。

[0187] 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织红细胞测定中阻止人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。

[0188] 某些反义化合物基序和机制

[0189] 在某些实施方案中,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,以赋予反义化合物以诸如抑制活性增强、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。

[0190] 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赋予另一个所需的性质,例如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。

[0191] 反义活性可以从涉及反义化合物(例如,寡核苷酸)与靶核酸的杂交的任何机制获得,其中杂交最终产生生物作用。在某些实施方案中,调节靶核酸的量和/或活性。在某些实施方案中,减少靶核酸的量和/或活性。在某些实施方案中,反义化合物与靶核酸的杂交最终导致靶核酸降解。在某些实施方案中,反义化合物与靶核酸的杂交未导致靶核酸降解。在某些实施方案中,反义化合物与靶核酸杂交的出现(占位)导致反义活性的调节。在某些实施方案中,具有特定化学基序或化学修饰的模式反义化合物特别适合采用一种或多种机制。在某些实施方案中,反义化合物通过一种以上的机制和/或通过从未被阐述的机制起作用。因此,本文所述的反义化合物不限于特定机制。

[0192] 反义机制包括但不限于RNA酶H介导的反义;RNAi机制,其利用RISC途径并且包括但不限于siRNA、ssRNA和微RNA机制;以及占位型机制。某些反义化合物可通过一种以上的此机制和/或通过另外的机制起作用。

[0193] RNA酶H介导的反义

[0194] 在某些实施方案中,反义活性通过RNA酶H导致靶RNA的至少部分地裂解。RNA酶H为裂解RNA:DNA双链体的RNA链的细胞核酸内切酶。本领域已知“DNA样”的单链反义化合物在哺乳动物细胞中引发RNA酶H活性。因此,包含DNA或DNA状核苷的至少一部分的反义化

合物可激活RNA酶H,导致靶核酸的裂解。在某些实施方案中,利用RNA酶H的反义化合物包含一种或多种修饰核苷。在某些实施方案中,此类反义化合物包含至少一个1-8修饰核苷的嵌段。在某些实施方案中,修饰核苷不支持RNA酶H活性。在某些实施方案中,此类反义化合物为如本文所述的缺口聚物。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含DNA核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含DNA样核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含DNA核苷和DNA样核苷。

[0195] 具有缺口聚物基序的某些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情况下,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每个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(此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(此双环糖修饰的核苷可包括具有限制性乙基的核苷)。在某些实施方案中,翼中的核苷可包括若干修饰的糖部分,包括例如2'-MOE和双环糖部分,如限制性乙基(cEt)或LNA。在某些实施方案中,翼可包括若干修饰的和未修饰的糖部分。在某些实施方案中,翼可包括2'-MOE核苷、双环糖部分(如限制性乙基核苷或LNA核苷)及2'-脱氧核苷的各种组合。

[0196] 每个相异区可包含均一糖部分、变体或交替的糖部分。翼-缺口-翼基序常被描述为“X-Y-Z”,其中“X”表示5'翼的长度,“Y”表示缺口的长度,且“Z”表示3'翼的长度。“X”及“Z”可包含均一、变体或交替的糖部分。在某些实施方案中,“X”和“Y”可包含一个或多个2'-脱氧核苷。“Y”可包含2'-脱氧核苷。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位于紧邻5'翼及3'翼中的每一个。因此,在5'翼与缺口之间,或缺口与3'翼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可为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个核苷中的任一个。

[0197] 在某些实施方案中,靶向TMPRSS6核酸的反义化合物具有其中缺口由6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个连接的核苷组成的缺口聚物基序。

[0198] 在某些实施方案中,反义寡核苷酸具有由如下的式A描述的糖基序: $(J)_m - (B)_n - (J)_p - (B)_r - (A)_t - (D)_g - (A)_v - (B)_w - (J)_x - (B)_y - (J)_z$

[0199] 其中:

[0200] 每个A独立地为2'-取代的核苷;

[0201] 每个B独立地为双环核苷;

[0202] 每个J独立地为2'-取代的核苷或2'-脱氧核苷;

[0203] 每个D为2'-脱氧核苷;

[0204] m为0-4;n为0-2;p为0-2;r为0-2;t为0-2;v为0-2;w为0-4;x为0-2;y为0-2;z为0-4;g为6-14;

[0205] 其限制条件为:

[0206] m、n及r中的至少一个不为0;

[0207] w和y中的至少一个不为0;

[0208] m、n、p、r及t的总和为2至5;并且

[0209] v、w、x、y及z的总和为2至5。

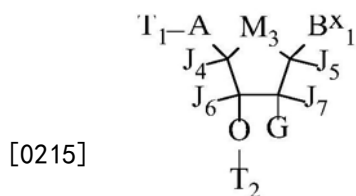
[0210] RNAi化合物

[0211] 在某些实施方案中,反义化合物干扰RNA化合物(RNAi),所述RNA化合物包括双链RNA化合物(也称为短干扰RNA或siRNA)和单链RNAi化合物(或ssRNA)。此化合物至少部分地通过RISC途径起作用以降解和/或螯合靶核酸(因此包括微RNA/微RNA模拟化合物)。在某些实施方案中,反义化合物包含使其特别适合于此机制的修饰。

[0212] i:ssRNA化合物

[0213] 在某些实施方案中,包括特别适合用作单链RNAi化合物(ssRNA)的那些的反义化合物包含修饰的5'末端。在某些实施方案中,5'末端包含修饰的磷酸酯部分。在某些实施方案中,此修饰的磷酸酯是稳定的(例如,与未修饰的5'磷酸酯相比,对降解/裂解有抗性)。在某些实施方案中,此5'末端核苷使5'磷酸酯部分保持稳定。某些修饰的5'末端核苷可见于本领域,例如W02011/139702中。

[0214] 在某些实施方案中,ssRNA化合物的5'核苷具有式IIc:

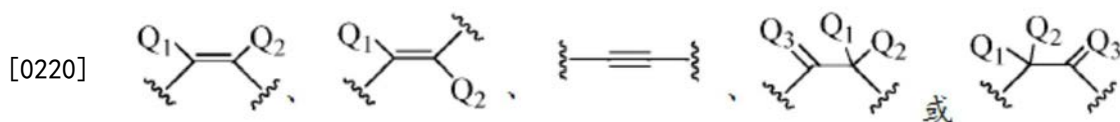


[0216] 其中:

[0217] T₁为任选保护的磷部分;

[0218] T₂为连接式IIc的化合物与低聚化合物的核苷间连接基团;

[0219] A具有下式的一个:



[0221] Q₁和Q₂各自独立地为H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、取代的C₂-C₆炔基或N(R₃)(R₄);

[0222] Q₃为O、S、N(R₅)或C(R₆)(R₇);

[0223] 各R₃、R₄、R₅、R₆和R₇独立地为H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基或C₁-C₆烷氧基;

[0224] M₃为O、S、NR₁₄、C(R₁₅)(R₁₆)、C(R₁₅)(R₁₆)C(R₁₇)(R₁₈)、C(R₁₅)=C(R₁₇)、OC(R₁₅)(R₁₆)或OC(R₁₅)(Bx₂);

[0225] R₁₄为H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基;

[0226] R₁₅、R₁₆、R₁₇和R₁₈各自独立地为H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基;

[0227] Bx₁为杂环碱基部分;

[0228] 或如果 B_{x_2} 存在,则 B_{x_2} 为杂环碱基部分且 B_{x_1} 为H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 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;

[0229] J_4 、 J_5 、 J_6 和 J_7 各自独立地为H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 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;

[0230] 或 J_4 与 J_5 或 J_7 中的一个形成桥,其中所述桥包含1至3个选自以下的连接的双基:
O、S、 NR_{19} 、 $C(R_{20})(R_{21})$ 、 $C(R_{20})=C(R_{21})$ 、 $C[=C(R_{20})(R_{21})]$ 和 $C(=O)$,且 J_5 、 J_6 和 J_7 中的其他两个各自独立地为H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 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;

[0231] 各 R_{19} 、 R_{20} 和 R_{21} 独立地为H、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 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;

[0232] G为H、OH、卤素或 $O-[C(R_8)(R_9)]_n-[C(=O)]_m-X_1]_j-Z$;

[0233] 各 R_8 和 R_9 独立地为H、卤素、 C_1-C_6 烷基或取代的 C_1-C_6 烷基;

[0234] X_1 为O、S或N(E_1);

[0235] Z为H、卤素、 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、取代的 C_2-C_6 炔基或N(E_2)(E_3);

[0236] E_1 、 E_2 和 E_3 各自独立地为H、 C_1-C_6 烷基或取代的 C_1-C_6 烷基;

[0237] n为1至约6;

[0238] m为0或1;

[0239] j为0或1;

[0240] 每个取代基包含一个或多个任选受保护的取代基,所述取代基独立地选自卤素、 OJ_1 、 $N(J_1)(J_2)$ 、 $=NJ_1$ 、 SJ_1 、 N_3 、CN、 $OC(=X_2)J_1$ 、 $OC(=X_2)N(J_1)(J_2)$ 以及 $C(=X_2)N(J_1)(J_2)$;

[0241] X_2 为O、S或 NJ_3 ;

[0242] 各 J_1 、 J_2 和 J_3 独立的为H或 C_1-C_6 烷基;

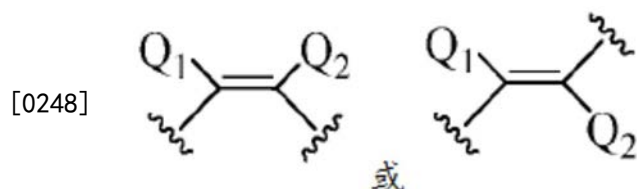
[0243] 当j为1时,则Z不为卤素或N(E_2)(E_3);以及

[0244] 其中所述低聚化合物包含8至40个单体亚单位并且与靶核酸的至少一部分是可杂交的。

[0245] 在某些实施方案中, M_3 为O、 $CH=CH$ 、 OCH_2 或 $OC(H)(B_{x_2})$ 。在某些实施方案中, M_3 为O。

[0246] 在某些实施方案中, J_4 、 J_5 、 J_6 和 J_7 各自为H。在某些实施方案中, J_4 与 J_5 或 J_7 中的一者形成桥。

[0247] 在某些实施方案中,A具有下式的一个:

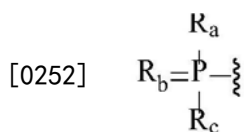


[0249] 其中:

[0250] Q_1 和 Q_2 各自独立的为H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基或取代的 C_1-C_6 烷氧基。在某些实施方案中, Q_1 和 Q_2 各自为H。在某些实施方案中, Q_1 和 Q_2 各自独立地为

H或卤素。在某些实施方案中, Q_1 和 Q_2 为H, 并且 Q_1 和 Q_2 中的另一者为F、 CH_3 或 OCH_3 。

[0251] 在某些实施方案中, T_1 具有下式:



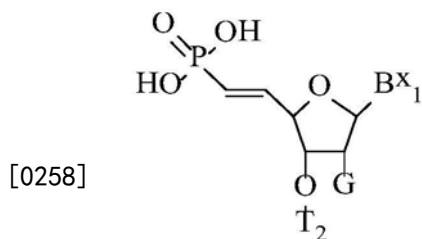
[0253] 其中:

[0254] R_a 和 R_c 各自独立地为保护的羟基、保护的巯基、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、取代的 C_1 - C_6 烷氧基、保护的氨基或取代的氨基; 以及

[0255] R_b 为O或S。在某些实施方案中, R_b 为O且 R_a 和 R_c 各自独立地为 OCH_3 、 OCH_2CH_3 或 $CH(CH_3)_2$ 。

[0256] 在某些实施方案中, G为卤素、 OCH_3 、 OCH_2F 、 $OCHF_2$ 、 OCF_3 、 OCH_2CH_3 、 $O(CH_2)_2F$ 、 OCH_2CHF_2 、 OCH_2CF_3 、 $OCH_2-CH=CH_2$ 、 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 、 $O(CH_2)_2-SCH_3$ 、 $O(CH_2)_2-OCF_3$ 、 $O(CH_2)_3-N(R_{10})(R_{11})$ 、 $O(CH_2)_2-ON(R_{10})(R_{11})$ 、 $O(CH_2)_2-O(CH_2)_2-N(R_{10})(R_{11})$ 、 $OCH_2C(=O)-N(R_{10})(R_{11})$ 、 $OCH_2C(=O)-N(R_{12})-(CH_2)_2-N(R_{10})(R_{11})$ 或 $O(CH_2)_2-N(R_{12})-C(=NR_{13})[N(R_{10})(R_{11})]$, 其中 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地为H或 C_1 - C_6 烷基。在某些实施方案中, G为卤素、 OCH_3 、 OCF_3 、 OCH_2CH_3 、 OCH_2CF_3 、 $OCH_2-CH=CH_2$ 、 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 、 $O(CH_2)_2-O(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ 、 $OCH_2C(=O)-N(H)CH_3$ 、 $OCH_2C(=O)-N(H)-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ 或 $OCH_2-N(H)-C(=NH)NH_2$ 。在某些实施方案中, G为F、 OCH_3 或 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 。在某些实施方案中, G为 $O(CH_2)_2-OCH_3$ 。

[0257] 在某些实施方案中, 5' 末端核苷具有式IIe:



IIe

[0259] 在某些实施方案中, 反义化合物(包括特别适合于ssRNA的那些) 包含以限定的模式或糖修饰基序沿着寡核苷酸或其区布置的一种或多种类型的修饰的糖部分和/或天然存在的糖部分。所述基序可包括 本文讨论的任何糖修饰和/或其他已知的糖修饰。

[0260] 在某些实施方案中, 寡核苷酸包含具有均匀糖修饰的区或者由具有均匀糖修饰的区组成。在某些实施方案中, 所述区的每一个核苷均包含相同的RNA样糖修饰。在某些实施方案中, 所述区的每一个核苷均为2'-F核苷。在某些实施方案中, 所述区的每一个核苷均为2'-OMe核苷。在某些实施方案中, 所述区的每一个核苷均为2'-MOE核苷。在某些实施方案中, 所述区的每一个核苷均为cEt核苷。在某些实施方案中, 所述区的每一个核苷均为LNA核苷。在某些实施方案中, 统一区构成了寡核苷酸的全部或基本上全部。在某些实施方案中, 所述区构成了全部寡核苷酸, 除1-4个末端核苷之外。

[0261] 在某些实施方案中, 寡核苷酸包含重复糖修饰的一个或多个区, 其中所述核苷在具有第一类型的糖修饰的核苷与具有第二类型的糖修饰的核苷之间交替。在某些实施方案中,

案中,两种类型的核苷均为RNA 样核苷。在某些实施方案中,交替核苷选自2'-OMe、2'-F、2'-MOE、LNA以及cEt。在某些实施方案中,交替修饰为2'-F和2'-OMe。此类区可以是连续的或可以夹杂不同修饰的核苷或缀合核苷。

[0262] 在某些实施方案中,交替修饰的交替区各自由单个核苷组成(即 模式为 $(AB)_x A_y$, 其中A为具有第一类型的糖修饰的核苷并且B为具有第二类型的糖修饰的核苷;x为1-20并且y为0或1)。在某些实施方案中,交替基序中的一个或多个交替区包括不只一种类型的单个核苷。例如,寡核苷酸可包括以下核苷基序中的任一个的一个或多个区:

[0263] AABBA、

[0264] ABBAB、

[0265] AABAAB、

[0266] ABBABAAB、

[0267] ABABAA、

[0268] AABABAB、

[0269] ABABAA、

[0270] ABBAABBABABAA、

[0271] BABBAABBABABAA或

[0272] ABABBAABBABABAA;

[0273] 其中,A为第一类型的核苷并且B为第二类型的核苷。在某些实施方案中,A和B各自选自2'-F、2'-OMe、BNA以及MOE。

[0274] 在某些实施方案中,具有此交替基序的寡核苷酸还包含修饰的 5' 末端核苷,诸如式IIc或IIe的那些。

[0275] 在某些实施方案中,寡核苷酸包含具2-2-3基序的区。此类区包含以下基序:

[0276] $-(A)_2-(B)_x-(A)_2-(C)_y-(A)_3-$

[0277] 其中:A为第一类型的修饰核苷;

[0278] B和C为具有与A不同修饰的核苷,然而,B和C两者彼此可具有相同或不同的修饰;

[0279] x和y为1至15。

[0280] 在某些实施方案中,A为2'-OMe修饰核苷。在某些实施方案中,B和C两者均为2'-F修饰核苷。在某些实施方案中,A为2'-OMe修饰核苷并且B和C两者均为2'-F修饰核苷。

[0281] 在某些实施方案中,寡核苷酸具有以下糖基序:

[0282] $5'-(Q)-(AB)_x A_y-(D)_z$

[0283] 其中:

[0284] Q为包含稳定的磷酸酯部分的核苷。在某些实施方案中,Q为具有式IIc或IIe的核苷;

[0285] A为第一类型的修饰核苷;

[0286] B为第二类型的修饰核苷;

[0287] D为包含与其邻近的核苷不同的修饰的经修饰核苷。因此,如果y为0,那么D与B必须是不同修饰的并且如果y为1,那么D与A必须是不同修饰的。在某些实施方案中,D不同于A和B两者。

[0288] X为5-15;

[0289] Y为0或1；

[0290] Z为0-4。

[0291] 在某些实施方案中，寡核苷酸具有以下糖基序：

[0292] $5' - (Q) - (A)_x - (D)_z$

[0293] 其中：

[0294] Q为包含稳定的磷酸酯部分的核苷。在某些实施方案中，Q为具有式IIc或IIe的核苷；

[0295] A为第一类型的修饰核苷；

[0296] D为包含不同于A的修饰的修饰核苷。

[0297] X为11-30；

[0298] Z为0-4。

[0299] 在某些实施方案中，以上基序中的A、B、C以及D选自：2'-OMe、2'-F、2'-MOE、LNA以及cEt。在某些实施方案中，D表示末端核苷。在某些实施方案中，此类末端核苷不被设计来与靶核酸杂交（尽管一个或多个可能偶然杂交）。在某些实施方案中，每个D核苷的核碱基为腺嘌呤，与靶核酸的相应位置处的核碱基的同一性无关。在某些实施方案中，每个D核苷的核碱基为胸腺嘧啶。

[0300] 在某些实施方案中，包括特别适合用作ssRNA的那些的反义化合物包含以限定的模式或修饰的核苷间键联基序沿着寡核苷酸或其区布置的修饰的核苷间键联。在某些实施方案中，寡核苷酸包含具有交替的核苷间键联基序的区。在某些实施方案中，寡核苷酸包含具有统一修饰的核苷间键联的区。在某些所述实施方案中，寡核苷酸包含通过硫代磷酸酯核苷间键联统一连接的区。在某些实施方案中，寡核苷酸通过硫代磷酸酯核苷间键联统一连接。在某些实施方案中，寡核苷酸的每个核苷间键联选自磷酸二酯和硫代磷酸酯。在某些实施方案中，寡核苷酸的每个核苷间键联选自磷酸二酯和硫代磷酸酯并且至少一个核苷间键联为硫代磷酸酯。

[0301] 在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少6个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少8个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少10个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个具有至少6个连续的硫代磷酸酯核苷间键联的嵌段。在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个具有至少8个连续的硫代磷酸酯核苷间键联的嵌段。在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个具有至少10个连续的硫代磷酸酯核苷间键联的嵌段。在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个具有至少12个连续的硫代磷酸酯核苷间键联的嵌段。在某些所述实施方案中，至少一个所述嵌段位于寡核苷酸的3'末端。在某些所述实施方案中，至少一个所述嵌段位于寡核苷酸的3'末端的3个核苷内。

[0302] 具有本文所述的各种糖基序中的任一个的寡核苷酸可以具有任何键联基序。例如，包括但不限于以上所述的那些的寡核苷酸可以具有选自非限制性下表的键联基序：

[0303]

5' 最末端键联	中心区	3' 区
PS	交替P0/PS	6PS
PS	交替P0/PS	7PS
PS	交替P0/PS	8PS

[0304] ii.siRNA化合物

[0305] 在某些实施方案中,反义化合物为双链RNAi化合物(siRNA)。在此类实施方案中,一条或两条链可以包含针对ssRNA的以上所述 的任何修饰基序。在某些实施方案中,ssRNA化合物可以是未修饰的 RNA。在某些实施方案中,siRNA化合物可以包含未修饰的RNA核苷,但是是修饰的核苷间键联。

[0306] 若干实施方案涉及双链组合物,其中每条链包含由一个或多个修 饰或未修饰的核苷的位置限定的基序。在某些实施方案中,提供包含 完全或至少部分杂交以形成双链体的第一和第二低聚化合物并且还 包含与核酸目标互补并且杂交的区的组合物。此组合物包含第一低聚 化合物(其为与核酸目标具有完全或部分互补性的反义链)和第二低聚 化合物(其为与第一低聚化合物的一个或多个区具有互补性并且形成 至少一个双链体区的有义链)是合适的。

[0307] 若干实施方案的所述组合物通过与核酸目标杂交调节基因表达, 从而导致正常功能的损失。在一些实施方案中,靶核酸是TMPRSS6。在某些实施方案中,通过用本发明的组合物形成的活化的RISC复合 物促进靶向TMPRSS6的降解。

[0308] 若干实施方案涉及双链组合物,其中所述链中的一条用于例如影 响相反的链优选装载入(或裂解)RISC复合物中。所述组合物用于靶向 所选择的核酸分子并且调节一个或多个基因的表达。在一个实施方案 中,本发明的组合物与靶RNA的一部分杂交,导致靶RNA的正常 功能的损失。

[0309] 若干实施方案涉及双链组合物,其中两条链均包括半修饰基序、完全修饰的基序、定位修饰的基序或交替基序。本发明的组合物的每 条链可被修饰以在例如siRNA途径中充当特定的角色。使用每条链 中的不同基序或每条链中具有不同化学修饰的相同基序使得靶向 RISC复合物的反义链,同时抑制有义链的并入。在该模型中,每条 链可以独立地被修饰以使得增强其特定的作用。反义链可以在5'末端 进行修饰以增强在RISC的一个区的作用,而3'末端可以进行不同修 饰以增强在RISC的不同区域的作用。

[0310] 双链寡核苷酸分子可以是包含自身互补的有义和反义区的双链 多核苷酸分子,其中反义区包含与靶核酸分子或其一部分中的核苷酸 序列互补的核苷酸序列,并且有义区具有与靶核酸序列或其一部分对 应的核苷酸序列。双链寡核苷酸分子可以由两个单独的寡核苷酸组 装,其中一条链是有义链并且另一条链是反义链,其中反义链和有义 链是自身互补的(即,每条链包含与另一条链中的核苷酸序列互补的 核苷酸序列;诸如其中反义链和有义链形成双链体或双链结构,例如 其中双链区为约15至约30,例如约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个碱基对;反义链包括与靶 核酸分子或其一部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列,并且有义链 包含与靶核酸序列或其一部分对应的核苷酸序列(例如,双链寡核甘 酸分子的约15至约25个或多个核苷酸与靶核酸或其一部分互补)。或者,双链寡核苷酸由单一寡核苷酸组装,其中siRNA的自身互补 的有义和反义区借助于基于核酸或不基于核酸的接头连接。

[0311] 双链寡核苷酸可以是具有双链体、不对称双链体、发夹或不对称 发夹二级结构的多核苷酸,其具有自身互补的有义和反义区,其中反 义区包含与单独的靶核酸分子或其一部分中的核苷酸序列互补的核 苷酸序列,并且有义区具有与靶核酸序列或其一部分对应的核苷酸序 列。双链寡核苷酸可以是具有两个或多个环结构以及茎的环形单链多 核苷

酸,所述主干包含自身互补的有义和反义区,其中反义区包括与靶核酸分子或其一部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列,并且有义区具有与靶核酸序列或其一部分对应的核苷酸序列,并且其中环形多核苷酸可以在体内或体外处理产生能够介导RNAi的活性siRNA分子。

[0312] 在某些实施方案中,双链寡核苷酸包含分开的有义和反义序列或区,其中有义和反义区通过如本领域已知的核苷酸或非核苷酸接头分子共价连接,或者可替代地通过离子相互作用、氢键合、范德华相互作用、疏水性相互作用和/或堆积相互作用非共价连接。在某些实施方案中,双链寡核苷酸包含与靶基因的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在另一个实施方案中,双链寡核苷酸以引起靶基因表达抑制的方式来与靶基因的核苷酸序列相互作用。

[0313] 如本文所用,双链寡核苷酸无需限于仅含有RNA的那些分子,而是进一步涵盖化学修饰的核苷酸和非核苷酸。在某些实施方案中,短干扰核酸分子缺乏含有2'-羟基(2'-OH)的核苷酸。在某些实施方案中,短干扰核酸任选地不包括任何核糖核苷酸(例如,具有2'-OH基团的核苷酸)。然而,不要求分子内存在核糖核苷酸来支持RNAi的这类双链寡核苷酸可以具有连接的一个或多个接头或其他连接或缔合的基团、部分或含有一个或多个具有2'-OH基团的核苷酸的链。任选地,双链寡核苷酸可以在约5%、10%、20%、30%、40%或50%的核苷酸位置上包括核糖核苷酸。如本文所用,术语siRNA是指等同于用来描述能够介导序列特异性RNAi的核酸分子的其他术语,例如,短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、短干扰寡核苷酸、短干扰核酸、短干扰修饰寡核苷酸、化学修饰的siRNA、转录后基因沉默RNA(ptgsRNA)以及其他。此外,如本文所用,术语RNAi是指等同于用来描述序列特异性RNA干扰,诸如转录后基因沉默、转录抑制或表观遗传的其他术语。例如,双链寡核苷酸可以以转录后水平和转录前水平二者用于表观遗传学沉默基因。在非限制性实例中,通过本发明的siRNA分子表观遗传学调节基因表达可以由染色质结构的siRNA介导的修饰或甲基化模式以改变基因表达导致(参见例如,Verdel等,2004,Science,303,672-676;Pal-Bhadra等,2004,Science,303,669-672;Allshire,2002,Science,297,1818-1819;Volpe等,2002,Science,297,1833-1837;Jenuwein,2002,Science,297,2215-2218以及Hall等,2002,Science,297,2232-2237)。

[0314] 可以设想本文提供的若干实施方案的化合物和组合物可以通过dsRNA介导的基因沉默或RNAi机制靶向TMPRSS6,包括例如“发夹”或茎-环双链RNA效应分子,其中具有自身互补序列的单个RNA链能够形成双链构型或包含两个单独的RNA链的双链体dsRNA效应分子。在各种实施方案中,dsRNA完全由核糖核苷酸组成或由核糖核苷酸和脱氧核苷酸的混合物(诸如例如通过2000年4月19日提交的WO 00/63364或1999年4月21日提交的美国序列号60/130,377所公开的RNA/DNA杂合体)组成。dsRNA或dsRNA效应分子可以是具有自身互补性的区的单个分子使得分子的一个区段中的核苷酸与分子的另一个区段中的核苷酸进行碱基配对。在各种实施方案中,由单个分子组成的dsRNA完全由核糖核苷酸组成或包括与脱氧核糖核苷酸的区互补的核糖核苷酸的区。或者,dsRNA可以包括具有彼此互补的区的两个不同的链。

[0315] 在各种实施方案中,两条链完全由核糖核苷酸组成,一条链完全由核糖核苷酸组成并且一条链完全由脱氧核糖核苷酸组成,或者一条或两条链含有核糖核苷酸和脱氧核

糖核苷酸的混合物。在某些实施方案中,互补的区彼此或与靶核酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、98%或100%互补性。在某些实施方案中,以双链构型存在的dsRNA的区包括至少19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、50、75、100、200、500、1000、2000或5000个核苷酸或者包括所有的cDNA中或由dsRNA表示的其他靶核酸序列中的核苷酸。在一些实施方案中,dsRNA不含有任何单链区诸如单链区末端或者dsRNA为发夹。在其他实施方案中,dsRNA具有一个或多个单链区或突出端。在某些实施方案中,RNA/DNA杂合体包括为反义链或区的DNA链或区(例如,与靶核酸具有至少70、80、90、95、98或100%互补性)以及为有义链或区的RNA链或区(例如,与靶核酸具有至少70、80、90、95、98或100%互补性),并且反之亦然。

[0316] 在各种实施方案中,RNA/DNA杂合体是使用酶法或化学合成方法诸如本文所述的那些或在2000年4月19日提交的WO 00/63364或1999年4月21日提交的美国序列号60/130,377中所述的那些在体外制成的。在其他实施方案中,体外所合成的DNA链在其转化进入细胞之前、之后或同时与体内或体外所制成的RNA链复合。在其他实施方案中,dsRNA为含有有义和反义区的单环核酸,或者dsRNA包括环状核酸和第二个环状核酸或线性核酸(参见,例如2000年4月19日提交的WO 00/63364或1999年4月21日提交的美国序列号60/130,377)。示例性环状核酸包括套索结构,其中核苷酸的游离5'磷酸基以环回方式连接到另一个核苷酸的2'羟基。

[0317] 在其他实施方案中,dsRNA包括其中糖的2'位含有卤素(诸如氟基)或者含有烷氧基(诸如甲氧基)的一个或多个修饰的核苷酸,其相比于其中相应的2'位含有氢或羟基的相应的dsRNA增加了体外或体内dsRNA的半衰期。在其他实施方案中,dsRNA包括相邻核苷酸之间的一个或多个键而非自然存在的磷酸二酯键联。此类键联的实例包括磷酸胺、硫代磷酸酯以及二硫代磷酸酯键联。dsRNA还可以是如美国专利号6,673,661中所教导的化学修饰的核酸分子。在其他实施方案中,dsRNA含有一个或两个加帽链,如例如由2000年4月19日提交的WO 00/63364或1999年4月21日提交的美国序列号60/130,377所公开的。

[0318] 在其他实施方案中,dsRNA可以是任何WO 00/63364中所公开的至少部分dsRNA分子,以及任何美国临时申请60/399,998以及美国临时申请60/419,532和PCT/US2003/033466中所述的dsRNA分子,所述申请的教义以引用的方式并入本文。任何dsRNA可使用本文所述的方法或标准方法诸如WO 00/63364中所述的那些在体外或体内进行表达。

[0319] 占位

[0320] 在某些实施方案中,预期反义化合物或靶核酸不通过RNA酶H导致裂解或者通过RISC途径导致裂解或螯合。在某些此类实施方案中,反义活性可以由占位产生,其中杂交反义化合物的存在破坏了靶核酸的活性。在某些此类实施方案中,反义化合物可以是统一修饰的或者可以包含修饰的混合和/或包含修饰的和未修饰的核苷酸。

[0321] 靶核酸、靶区域和核苷酸序列

[0322] 编码TMPRSS6的核苷酸序列包括但不限于以下:GENBANK登录号NM_153609.2(作为SEQ ID NO:1并入本文),从16850000至16897000截短的GENBANK登录号NT_011520.12的补体(作为SEQ ID NO:2并入本文),GENBANK登录号CR456446.1(作为SEQ ID NO:3并入本文),GENBANK登录号BC039082.1(作为SEQ ID NO:4并入本文),GENBANK登录号AY358398.1(作为SEQ ID NO:5并入本文),或GENBANK登录号DB081153.1(作为SEQ ID NO:6并入本

文)。在某些实施方案中,本文所述的反义化合物靶向编码TMPRSS6 的核酸序列。在某些实施方案中,本文所述的反义化合物靶向SEQ ID NO:1-6中的任一个的序列。

[0323] 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。

[0324] 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TMPRSS6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' 靶位点到所述靶区域内另 一靶区段的3' 靶位点的序列。

[0325] 在某些实施方案中,“靶区段”是核酸内的靶区域的较小分部分。例如,靶区段可以是一种或多种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。

[0326] 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。

[0327] 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。

[0328] 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。

[0329] 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。

[0330] 反义化合物在活性靶区内的活性(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,TMPRSS6 mRNA水平的 降低指示对TMPRSS6表达的抑制。TMPRSS6蛋白质水平的降低还 指示靶TMPRSS6表达的抑制。此外,表型改变指示对TMPRSS6表 达的抑制。例如,铁调素表达水平的提高可指示TMPRSS6表达的抑 制。在另一个实例中,组织中铁积聚的减少可指示TMPRSS6表达的 抑制。在另一个实例中,转铁蛋白的饱和度百分比的增加可指示 TMPRSS6表达的抑制。

[0331] 杂交

[0332] 在一些实施方案中,在本文公开的反义化合物与TMPRSS6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)。

[0333] 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。

[0334] 确定序列是否特异性杂交至靶核酸的方法是本领域中熟知的 (Sambrook和Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, 2001)。在某些实施方案中, 本文提供的反义化合物可与TMPRSS6 核酸特异性杂交。

[0335] 互补性

[0336] 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TMPRSS6核酸) 的反义抑制) 时, 反义化合物与靶核酸彼此互补。

[0337] 可容忍反义化合物与TMPRSS6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TMPRSS6核酸特异性杂交。此外, 反义化合物可在TMPRSS6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)。

[0338] 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 TMPRSS6核酸、靶区、靶区段或其指定部分为或为至少70%、至少 80%、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。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。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。

[0339] 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, 403-410; 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 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.) 使用默认设置来测定。

[0340] 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 TMPRSS6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。

[0341] 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。

[0342] 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TMPRSS6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。

[0343] 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TMPRSS6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。

[0344] 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15个核碱基的部分互补。还涵盖与靶区段中具有至少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、至少20个或多个(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。

[0345] 同一性

[0346] 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。

[0347] 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%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0348] 修饰

[0349] 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。

[0350] 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。

[0351] 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。

[0352] 修饰的核苷间键联

[0353] 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。

[0354] 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。

[0355] 在某些实施方案中，靶向TMPRSS6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，修饰的核苷间键联中的至少一个为硫代磷酸酯键联。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。

[0356] 修饰的糖部分

[0357] 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WO 2008/101157）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WO 2007/134181，其中LNA被例如5'-甲基或5'-乙烯基取代）。

[0358] 具有修饰的糖部分的核苷的实例包括不限于包含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_{III})(R_{II})、O-CH₂-C(=O)-N(R_{III})(R_{II})和O-CH₂-C(=O)-N(R_I)-(CH₂)₂-N(R_{III})(R_{II})，其中R_I、R_{II}和R_{III}各自独立地为H或取代的或未取代的C₁-C₁₀烷基。

[0359] 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'(cEt)和4'-C(H)(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WO 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WO/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Zhou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WO 2008/154401公布的PCT/US2008/066154)。

[0360] 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. Opin. Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch等人, Chem.Biol., 2001, 8, 1-7; Orum等人, Curr. Opin. 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WO 2007/134181; WO 2005/021570; WO 2004/106356; WO 99/14226; 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WO 99/14226的PCT国际申请PCT/DK98/00393)。

[0361] 本文所用的“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。

[0362] 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。

[0363] 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、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、C₅-C₇脂环基、取代的C₅-C₇脂环基、卤素、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)₂-J₁)或亚磺酰基(S(=O)-J₁); 以及

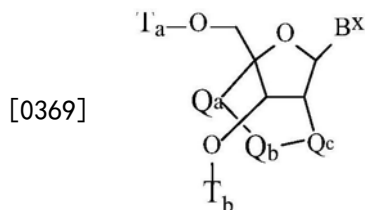
[0364] 各J₁和J₂独立地为H、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、杂环基、取代的杂环基、C₁-C₁₂氨基烷基、取代的C₁-C₁₂氨基烷基或保护基团。

[0365] 在某些实施方案中, 双环糖部分的桥为 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ 或 $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ 。在某些实施方案中, 桥为4'-CH₂-2'、4'-(CH₂)₂-2'、4'-(CH₂)₃-2'、4'-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'、4'-CH₂-O-N(R)-2'和4'-CH₂-N(R)-O-2'-, 其中每个R独立地为H、保护基团或C₁-C₁₂烷基。

[0366] 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) -0-2'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 -0-2')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)。

[0367] 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) -0-2'、 β -D-4'- CH_2 -0-2'、4'- $(\text{CH}_2)_2$ -0-2'、4'- CH_2 -0-N(R)-2'、4'- CH_2 -N(R)-0-2'、4'-CH(CH₃)-0-2'、4'- CH_2 -S-2'、4'- CH_2 -N(R)-2'、4'- CH_2 -CH(CH₃)-2'以及4'- $(\text{CH}_2)_3$ -2',其中R为H、保护基团或C₁-C₁₂烷基。

[0368] 在某些实施方案中,双环核苷具有式:



[0370] 其中:

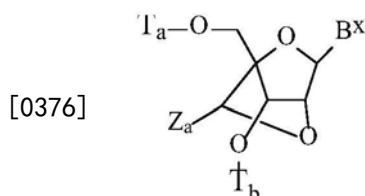
[0371] Bx为杂环碱基部分;

[0372] -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;

[0373] R_c为C₁-C₁₂烷基或氨基保护基团;以及

[0374] 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。

[0375] 在某些实施方案中,双环核苷具有式:



[0377] 其中:

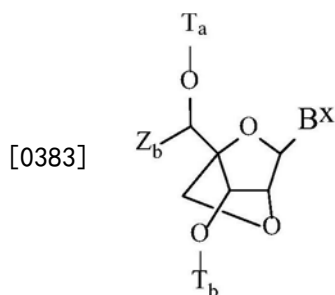
[0378] Bx为杂环碱基部分;

[0379] 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;

[0380] 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。

[0381] 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。

[0382] 在某些实施方案中,双环核苷具有式:



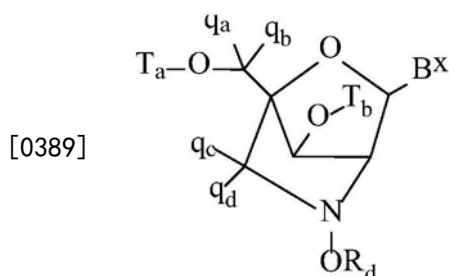
[0384] 其中：

[0385] Bx为杂环碱基部分；

[0386] Ta和Tb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；

[0387] Zb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)-)。

[0388] 在某些实施方案中，双环核苷具有式：



[0390] 其中：

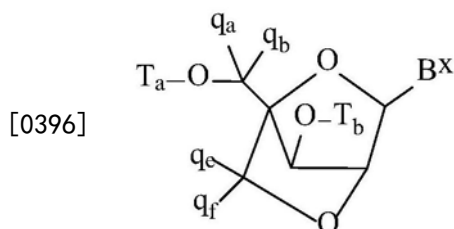
[0391] Bx为杂环碱基部分；

[0392] Ta和Tb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；

[0393] Rd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；

[0394] 各qa、qb、qc和qd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；

[0395] 在某些实施方案中，双环核苷具有式：



[0397] 其中：

[0398] Bx为杂环碱基部分；

[0399] Ta和Tb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；

[0400] 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 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ ；

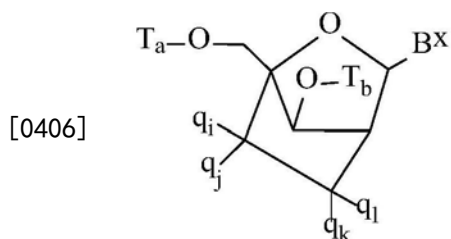
[0401] 或 q_e 和 q_f 一起为 $=C(q_g)(q_h)$ ；

[0402] 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；

[0403] 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。

[0404] 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。

[0405] 在某些实施方案中, 双环核苷具有式:



[0407] 其中:

[0408] Bx为杂环碱基部分;

[0409] 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;

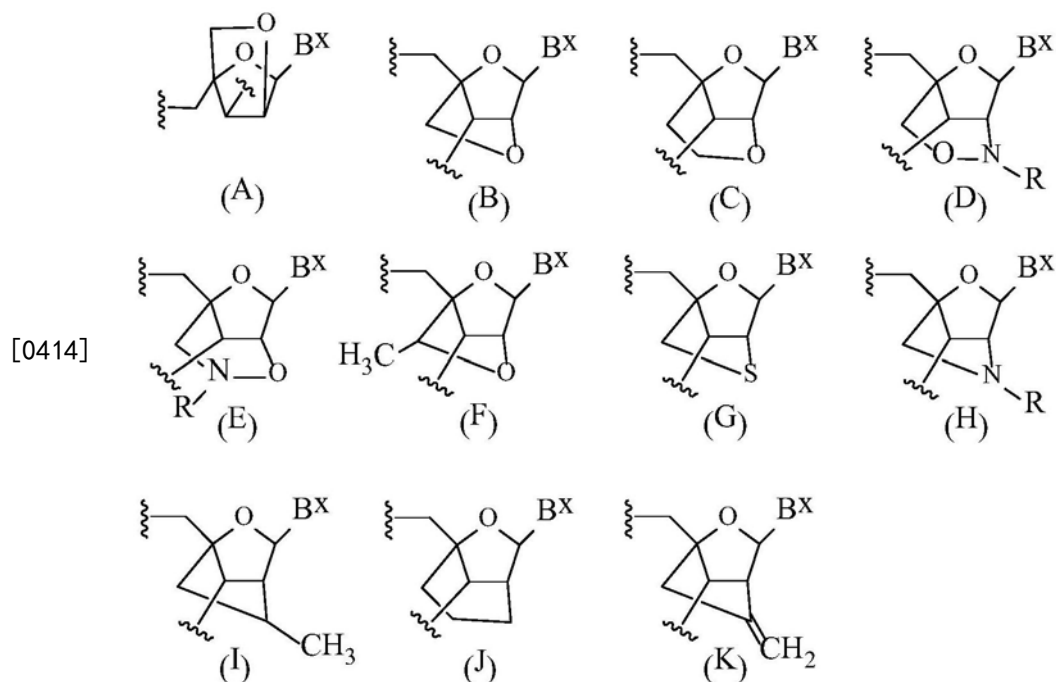
[0410] 各 q_i 、 q_j 、 q_k 和 q_l 独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、取代的 C_1 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$; 以及

[0411] q_i 和 q_j 或 q_l 和 q_k 一起为 $=C(q_g)(q_h)$, 其中 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。

[0412] 一种具有4'-(CH_2)₃-2'桥和烯基类似物桥4'- $CH=CH$ - CH_2 -2'的碳环双环核苷已有所描述(Freier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)。

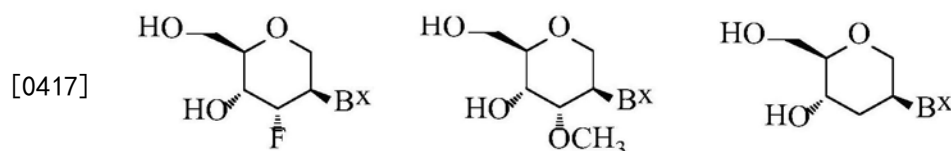
[0413] 在某些实施例中, 双环核苷包括但不限于如下所描绘的(A) α -L-亚甲基氧基(4'- CH_2 -0-2') BNA; (B) β -D-亚甲基氧基(4'- CH_2 -0-2') BNA; (C) 亚乙基氧基(4'-(CH_2)₂-0-2')

BNA; (D) 氨基氧基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{N}(\text{R}) - 2'$) BNA; (E) 氧基氨基 ($4' - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}) - \text{O} - 2'$) 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 ($4' - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}) - 2'$) BNA; (I) 甲基碳环 ($4' - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{CH}_3) - 2'$) BNA; (J) 亚 丙基碳环 ($4' - (\text{CH}_2)_3 - 2'$) BNA以及 (K) 乙烯基BNA。

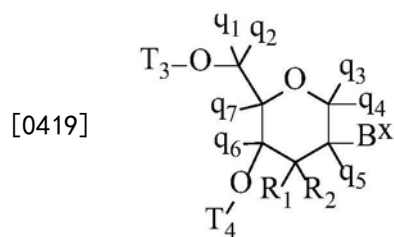


[0415] 其中Bx为碱基部分且R独立地为H、保护基团、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ 烷基或 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ 烷氧基。

[0416] 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)。



[0418] 在某些实施方案中,选择具有下式的糖替代物:



[0420] 其中:

[0421] Bx为杂环碱基部分;

[0422] 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

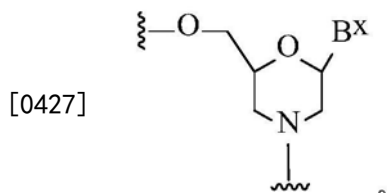
连接基团,且 T_3 和 T_4 中的另一个为H、羟基保护基团、连接的缀合物基团或5'或3'-端基;

[0423] 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

[0424] 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。

[0425] 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。

[0426] 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:

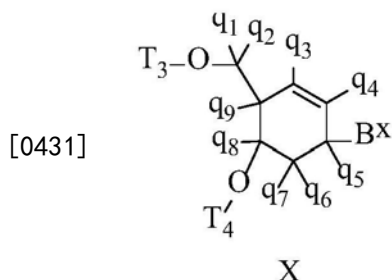


[0428] 在某些实施方案中,可例如通过添加或改变来自以上吗啉代结构的各种取代基来修饰吗啉代。所述糖替代物在本文中称为“修饰的吗啉代”。

[0429] 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W0 2008/101157)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'- CH_2 -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)。

[0430] 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W0 2010/036696; 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。



[0432] 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：

[0433] Bx为杂环碱基部分；

[0434] 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

[0435] 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。

[0436] 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。

[0437] 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:0[(CH₂)_nO]_mCH₃、0(CH₂)_nNH₂、0(CH₂)_nCH₃、0(CH₂)_nF、0(CH₂)_nONH₂、0CH₂C(=O)N(H)CH₃、以及0(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、0-烷芳基或0-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'-0-甲基、0-丙基及0-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)。

[0438] 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具有诸如以下的非桥连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)₂-0-CH₃、

$2'-O(CH_2)_2SCH_3$ 、 $0-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ 或 $0-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ ，其中 R_m 和 R_n 各自独立地为 H 或取代或未取代的 C_1-C_{10} 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。

[0439] 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。

[0440] 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。

[0441] 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。

[0442] 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WO 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。

[0443] 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)。

[0444] 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目标杂交。

[0445] 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。

[0446] 修饰的核碱基

[0447] 核碱基(或碱基)修饰或取代与天然存在的或合成的未修饰核碱基在结构上不同,但在功能上是可以互换的。天然和修饰的核碱基能够参与氢键合。这样的核碱基修饰可赋予反义化合物以核酸酶稳定性、结合亲和力或某种其他有益的生物学特性。修饰的核碱基包括合成的和天然的核碱基,诸如,例如,5-甲基胞嘧啶(5-me-C)。某些核碱基取代,包括5-甲基胞嘧啶取代,对于增加反义化合物的靶核酸结合亲和力是特别有用的。例如,5-甲基胞嘧啶取代已显示出增加核酸双链体稳定性0.6°C-1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 编, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, 第 276-278页)。

[0448] 额外未修饰的核碱基包括但不限于5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基及其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基及其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-位取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤基尤其是5-溴基、5-三氟甲基和其他5-位

取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮鸟嘌呤和8-氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0449] 杂环碱基部分还可包括嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环类取代的碱基部分，例如7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。尤其可用于提高反义化合物的结合亲和性的核碱基包括5-位上被取代的嘧啶、6-氮嘧啶和N-2、N-6和O-6位上被取代的嘌呤，包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。

[0450] 在某些实施方案中，靶向TMPRSS6核酸的反义化合物包含一个或多个修饰的核碱基。在某些实施方案中，靶向TMPRSS6核酸的缺口加宽的反义寡核苷酸包含一个或多个修饰的核碱基。在某些实施方案中，修饰的核碱基中的至少一个是5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中，每个胞嘧啶为5-甲基胞嘧啶。

[0451] 用于配制药组组合物的组合物和方法

[0452] 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组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。

[0453] 靶向TMPRSS6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水，例如注射用水(WFI)。药学上可接受的稀释剂包括盐水，例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)。水或盐水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TMPRSS6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是水或盐水。在某些实施方案中，反义化合物为反义寡核苷酸。

[0454] 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，本文的公开内容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。

[0455] 本文所述的化合物的“药学上可接受的盐”可通过本领域中熟知的方法制备。关于药学上可接受的盐的综述，参见Stahl和Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)。反义寡核苷酸的钠盐是有用的并且对于人类的治疗性施用是广泛接受的。因此，在一个实施方案中，本文所述的化合物是呈钠盐的形式。

[0456] 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。

[0457] 给药

[0458] 在某些实施方案中，药物组合物根据给药方案(例如，剂量、施用频率和持续时间)来施用，其中所述给药方案可选择以实现期望的效果。所需作用可以是例如如降低TMPRSS6或预防、减少、改善与TMPRSS6相关的疾病或、病症或病状或减缓其进展。

[0459] 在某些实施方案中，将给药方案的变量调整以产生受试者中的药物组合物的所需浓度。关于剂量方案所用的“药物组合物的浓度”可以涉及药物组合物的化合物、寡核苷

酸或活性成分。例如,在某些实施方案中,剂量和剂量频率被调整以提供足以达到所期望效果的量的药物组合物的组织浓度或血浆浓度。

[0460] 剂量取决于所欲治疗的疾病病况的严重性和反应性,其中治疗过程持续若干天至若干个月,或者直至实现治愈或达成疾病病况的减少。剂量也依赖于药物效力和代谢。在某些实施方案中,剂量是每 kg 体重 0.01 μ g 至 100mg,或在 0.001mg 至 1000mg 的剂量范围内,并且可以每日、每周、每两周、每月、每季度、每半年或每年给予一次或多次,或甚至每 2 至 20 年给予一次。成功治疗后,可能需要对患者进行维持疗法以预防疾病病况复发,其中寡核苷酸以维持剂量施用,所述维持剂量在每千克体重 0.01 μ g 至 100mg 范围内,每天一次或多次至每 20 年一次或在 0.001mg 至 1000mg 给药的范围。

[0461] 施用

[0462] 取决于希望局部或全身性治疗并且取决于有待治疗的区域,可以将本发明的化合物或药物组合物按许多方式施用。施用可以是吸入(即,肺部)、肠内(即肠道)、胃肠外或局部。

[0463] 在某些实施方案中,如本文所述的化合物和组合物以胃肠外方式施用。胃肠外施用包括但不限于静脉内、动脉内、皮下、腹膜内、眼内、肌内、颅内、鞘内、髓内、心室内或肿瘤内注射或输注。胃肠外施用还包括鼻内施用。

[0464] 在某些实施方案中,胃肠外施用是通过输注。输注可以是长期的或连续的或短期的或间歇的。在某些实施方案中,输注的药物试剂是用泵递送的。

[0465] 在某些实施方案中,胃肠外施用是通过注射。注射可用注射器或泵递送。在某些实施方案中,注射是快速浓注。在某些实施方案中,注射被直接施用至组织或器官。

[0466] 在某些实施方案中,用于胃肠外施用的制剂可包括无菌水溶液,所述无菌水溶液还可含有缓冲剂、稀释剂和其他合适添加剂,如但不限于渗透促进剂、载体化合物和其他药理学上可接受的载体或赋形剂。

[0467] 在某些实施方案中,肠内施用如本文所述的化合物和组合物。肠道施用包括但不限于口服、经粘膜、肠或直肠(例如,栓剂、灌肠剂)。在某些实施方案中,用于肠内施用所述化合物或组合物的制剂可包括但不限于药物载体、赋形剂、粉末或颗粒、微粒、纳米颗粒、水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或小片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可为需要的。在某些实施方案中,肠内制剂是本文提供的化合物与一种或多种渗透促进剂、表面活性剂和螯合剂结合施用的那些。

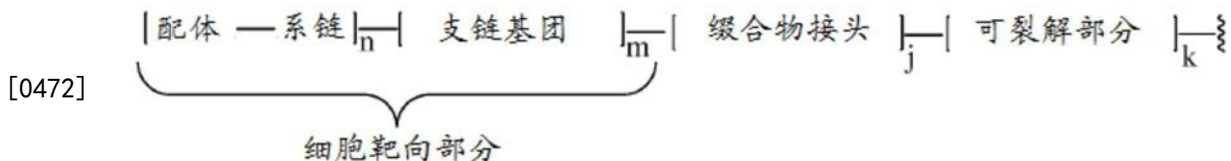
[0468] 在某些实施方案中,施用包括肺部施用。在某些实施方案中,肺部施用包括通过吸入将雾化寡核苷酸递送至受试者的肺部。在受试者吸入雾化寡核苷酸之后,寡核苷酸分布至正常和发炎肺组织的细胞,包括肺泡巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、上皮细胞、血管内皮细胞和细支气管上皮细胞。用于递送包含修饰的寡核苷酸的药物组合物的合适装置包括但不限于标准雾化器装置。另外合适的装置包括干粉吸入器或计量剂量吸入器。

[0469] 在某些实施方案中,施用药物组合物以实现局部暴露而非全身暴露。例如,肺部施用将药物组合物以最小的全身暴露递送至肺部。

[0470] 缀合的反义化合物

[0471] 在某些实施方案中,通过共价连接一个或多个缀合物基团来修饰如本文提供的寡核苷酸或低聚化合物。通常,缀合物基团改变所连接的寡核苷酸或低聚化合物的一种或

多种性质,包括但不限于药效学、药代动力学、稳定性、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、电荷和清除率。如本文所使用,“缀合物基团”是指包含连接至寡核苷酸或低聚化合物的原子基团的基团。通常,缀合物基团改变它们所连接的化合物的一种或多种性质,包括但不限于药效学、药代动力学、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、电荷和/或清除性质。缀合物基团通常用于化学领域,并且可包括将缀合物基团共价连接至寡核苷酸或低聚化合物的缀合物接头。在某些实施方案中,缀合物基团包括将缀合物基团共价连接至寡核苷酸或低聚化合物的可裂解部分。在某些实施方案中,缀合物基团包括缀合物接头和可裂解部分,以将缀合物基团共价连接至寡核苷酸或低聚化合物。在某些实施方案中,缀合物基团具有以下通式:



[0473] 其中n是1至约3,当n是1时m是0,或当n是2或3时m是1, j是1或0, k是1或0,并且j和k的总和是至少1。

[0474] 在某些实施方案中, n是1, j是1且k是0。在某些实施方案中, n是1, j是0且k是1。在某些实施方案中, n是1, j是1且k是1。在某些实施方案中, n是2, j是1且k是0。在某些实施方案中, n是2, j是0且k是1。在某些实施方案中, n是2, j是1且k是1。在某些实施方案中, n是3, j是1且k是0。在某些实施方案中, n是3, j是0且k是1。在某些实施方案中, n是3, j是1且k是1。

[0475] 缀合物基团在本文中示为基团,提供用于形成至低聚化合物如寡核苷酸的共价连接的键。在某些实施方案中,低聚化合物上的连接点是在3'-末端核苷或修饰的核苷处。在某些实施方案中,低聚化合物上的连接点是3'末端核苷或修饰的核苷的3'-羟基的3'-氧原子。在某些实施方案中,低聚化合物上的连接点是在5'-末端核苷或修饰的核苷处。在某些实施方案中,低聚化合物上的连接点是5'末端核苷或修饰的核苷的5'-羟基的5'-氧原子。在某些实施方案中,低聚化合物上的连接点是在核苷、修饰的核苷或核苷间键联上的任何反应性位点处。

[0476] 如本文所用,“可裂解部分”和“可裂解键”是指能够在某些生理条件下分裂或裂解的可裂解键或原子基团。在某些实施方案中,可裂解部分为可裂解键。在某些实施方案中,可裂解部分包含可裂解键。在某些实施方案中,可裂解部分是原子基团。在某些实施方案中,可裂解部分在细胞或亚细胞区室(如溶酶体)内部选择性地裂解。在某些实施方案中,可裂解部分通过内源性酶如核酸酶选择性地裂解。在某些实施方案中,可裂解部分包含具有一个、两个、三个、四个或多于四个可裂解键的原子基团。

[0477] 在某些实施方案中,缀合物基团包含可裂解部分。在某些此类实施方案中,可裂解部分将低聚化合物共价连接至缀合物接头。在某些此类实施方案中,可裂解部分将低聚化合物共价连接至细胞靶向部分。

[0478] 在某些实施方案中,可裂解键选自以下:酰胺、聚酰胺、酯、醚、磷酸二酯的一个或两个酯、磷酸酯、氨基甲酸酯、二硫化物或肽。在某些实施方案中,可裂解键是磷酸二酯的酯中的一种。在某些实施方案中,可裂解键是磷酸二酯的一种或两种酯。在某些实施方案

中,可裂解部分是低聚化合物与缀合物基团的其余部分之间的磷酸二酯键联。在某些实施方案中,可裂解部分包含位于低聚化合物与缀合物基团的其余部分之间的磷酸二酯键联。在某些实施方案中,可裂解部分包含磷酸酯或磷酸二酯。在某些实施方案中,可裂解部分通过磷酸二酯或硫代磷酸酯键联连接至缀合物接头。在某些实施方案中,可裂解部分通过磷酸二酯键联连接至缀合物接头。在某些实施方案中,缀合物基团不包括可裂解部分。

[0479] 在某些实施方案中,可裂解部分是可裂解核苷或修饰的核苷。在某些实施方案中,核苷或修饰的核苷包含选自以下的任选保护的杂环碱基:嘌呤、取代的嘌呤、嘧啶或取代的嘧啶。在某些实施方案中,可裂解部分是选自以下的核苷:尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、4-N-苯甲酰基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、4-N-苯甲酰基-5-甲基胞嘧啶、腺嘌呤、6-N-苯甲酰基腺嘌呤、鸟嘌呤以及2-N-异丁酰基鸟嘌呤。

[0480] 在某些实施方案中,可裂解部分是2'-脱氧核苷,所述2'-脱氧核苷通过磷酸二酯键联连接至低聚化合物的3'或5'末端核苷并且通过磷酸二酯或硫代磷酸酯键联共价连接至缀合物基团的其余部分。在某些实施方案中,可裂解部分是2'-脱氧腺苷,所述2'-脱氧腺苷通过磷酸二酯键联连接至低聚化合物的3'或5'末端核苷并且通过磷酸二酯或硫代磷酸酯键联共价连接至缀合物基团的其余部分。在某些实施方案中,可裂解部分是2'-脱氧腺苷,所述2'-脱氧腺苷通过磷酸二酯键联连接至3'末端核苷或修饰的核苷的3'-羟基的3'-氧原子。在某些实施方案中,可裂解部分是2'-脱氧腺苷,所述2'-脱氧腺苷通过磷酸二酯键联连接至5'末端核苷或修饰的核苷的5'-羟基的5'-氧原子。在某些实施方案中,可裂解部分连接至低聚化合物的核苷或修饰的核苷的2'位置。

[0481] 如本文所用,在缀合物基团背景下的“缀合物接头”是指包含任何原子或原子基团的缀合物基团的一部分,其将细胞靶向部分直接或通过可裂解部分共价连接至低聚化合物。在某些实施方案中,缀合物接头包含选自以下的基团:烷基、氨基、氧代、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫醚(-S-)和羟基氨基(-O-N(H)-)。在某些实施方案中,缀合物基团包含选自以下的基团:烷基、氨基、氧代、酰胺和醚基团。在某些实施方案中,缀合物接头包含选自烷基和酰胺基团的基团。在某些实施方案中,缀合物接头包含选自烷基和醚基团的基团。在某些实施方案中,缀合物接头包含至少一个磷连接基团。在某些实施方案中,缀合物接头包含至少一个磷酸二酯基团。在某些实施方案中,缀合物接头包含至少一个中性连接基团。

[0482] 在某些实施方案中,缀合物接头共价连接至低聚化合物。在某些实施方案中,缀合物接头共价连接至低聚化合物和支链基团。在某些实施方案中,缀合物接头共价连接至低聚化合物和束缚配体。在某些实施方案中,缀合物接头共价连接至可裂解部分。在某些实施方案中,缀合物接头共价连接至可裂解部分和支链基团。在某些实施方案中,缀合物接头共价连接至可裂解部分和束缚配体。在某些实施方案中,缀合物接头包含一个或多个可裂解键。在某些实施方案中,缀合物基团不包含缀合物接头。

[0483] 如本文所用,“支链基团”是指具有能够形成与两个或多个束缚配体和缀合物基团的其余部分的共价键链的至少3个位置的原子基团。通常,支链基团通过缀合物接头和/或可裂解部分提供多个用于将束缚配体连接至低聚化合物的反应性位点。在某些实施方案中,支链基团包括选自以下的基团:烷基、氨基、氧代、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫

醚和羟基氨基。在某些实施方案中,支链基团包含支链脂肪族基团,所述支链脂肪族基团包含选自以下的基团:烷基、氨基、氧代、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫醚和羟基氨基。在某些此类实施方案中,支链脂肪族基团包含选自以下的基团:烷基、氨基、氧代、酰胺和醚基团。在某些此类实施方案中,支链脂肪族基团包含选自以下的基团:烷基、氨基和醚基团。在某些此类实施方案中,支链脂肪族基团包含选自烷基和醚基团的基团。在某些实施方案中,支链基团包含单环系统或多环系统。

[0484] 在某些实施方案中,支链基团共价连接至缀合物接头。在某些实施方案中,支链基团共价连接至可裂解部分。在某些实施方案中,支链基团共价连接至缀合物接头和每个束缚配体。在某些实施方案中,支链基团包含一个或多个可裂解键。在某些实施方案中,缀合物基团不包括支链基团。

[0485] 在某些实施方案中,如本文提供的缀合物基团包括具有至少一个束缚配体的细胞靶向部分。在某些实施方案中,细胞靶向部分包含共价连接至支链基团的两个束缚配体。在某些实施方案中,细胞靶向部分包含共价连接至支链基团的三个束缚配体。

[0486] 如本文所用,“系链”是指将配体连接至缀合物基团的其余部分的原子基团。在某些实施方案中,每个系链是包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、取代的烷基、醚、硫醚、二硫化物、氨基、氧代、酰胺、磷酸二酯和聚乙二醇基团。在某些实施方案中,每个系链是包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、醚、硫醚、二硫化物、氨基、氧代、酰胺和聚乙二醇基团。在某些实施方案中,每个系链是包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、取代的烷基、磷酸二酯、醚和氨基、氧代、酰胺基团。在某些实施方案中,每个系链是包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、醚和氨基、氧代、酰胺基团。在某些实施方案中,每个系链是包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基、氨基和氧代基团。在某些实施方案中,每个系链是包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基和氧代基团。在某些实施方案中,每个系链是包含选自以下的一个或多个基团的线性脂肪族基团:处于任何组合的烷基和磷酸二酯。在某些实施方案中,每个系链包含至少一个磷连接基团或中性连接基团。

[0487] 在某些实施方案中,系链包含一个或多个可裂解键。在某些实施方案中,每个束缚配体连接至支链基团。在某些实施方案中,每个束缚配体通过酰胺基团连接至支链基团。在某些实施方案中,每个束缚配体通过醚基团连接至支链基团。在某些实施方案中,每个束缚配体通过磷连接基团或中性连接基团连接至支链基团。在某些实施方案中,每个束缚配体通过磷酸二酯基团连接至支链基团。在某些实施方案中,每个系链通过酰胺或醚基团连接至配体。在某些实施方案中,每个系链通过醚基团连接至配体。

[0488] 在某些实施方案中,每个系链在配体与支链基团之间包含约8至约20个原子的链长。在某些实施方案中,每个系链在配体与支链基团之间包含约10至约18个原子的链长。在某些实施方案中,每个系链包含约13个原子的链长。

[0489] 在某些实施方案中,本公开提供配体,其中每个配体通过系链共价连接至缀合物基团的其余部分。在某些实施方案中,每个配体经过选择以对靶细胞上的至少一种类型的受体具有亲合力。在某些实施方案中,选择对哺乳动物肝脏细胞表面上的至少一种类型的

受体具有亲合力的配体。在某些实施方案中,选择对肝去唾液酸糖蛋白受体 (ASGP-R) 具有亲合力的配体。在某些实施方案中,每个配体是碳水化合物。在某些实施方案中,每个配体独立地选自半乳糖、N-乙酰基半乳糖胺、甘露糖、葡萄糖、葡糖胺以及岩藻糖。在某些实施方案中,每个配体为N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)。在某些实施方案中,靶向部分包含1至3个配体。在某些实施方案中,靶向部分包含3个配体。在某些实施方案中,靶向部分包含2个配体。在某些实施方案中,靶向部分包含1个配体。在某些实施方案中,靶向部分包含3个N-乙酰基半乳糖胺配体。在某些实施方案中,靶向部分包含2个N-乙酰基半乳糖胺配体。在某些实施方案中,靶向部分包含1个N-乙酰基半乳糖胺配体。

[0490] 在某些实施方案中,每个配体是碳水化合物、碳水化合物衍生物、改性的碳水化合物、多价碳水化合物聚簇、多糖、修饰的多糖或多糖衍生物。在某些实施方案中,每个配体是氨基糖或硫代糖。例如,氨基糖可选自任何数目的本领域中已知的化合物,例如葡糖胺、唾液酸、 α -D-半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃半乳糖(GalNAc)、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖(β -胞壁酸)、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖和N-磺基-D-葡糖胺以及N-乙醇酰基- α -神经氨酸。例如,硫代糖可选自由以下组成的组:5-硫代- β -D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代- β -D-吡喃半乳糖以及3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代- α -D-吡喃葡庚糖苷乙酯。

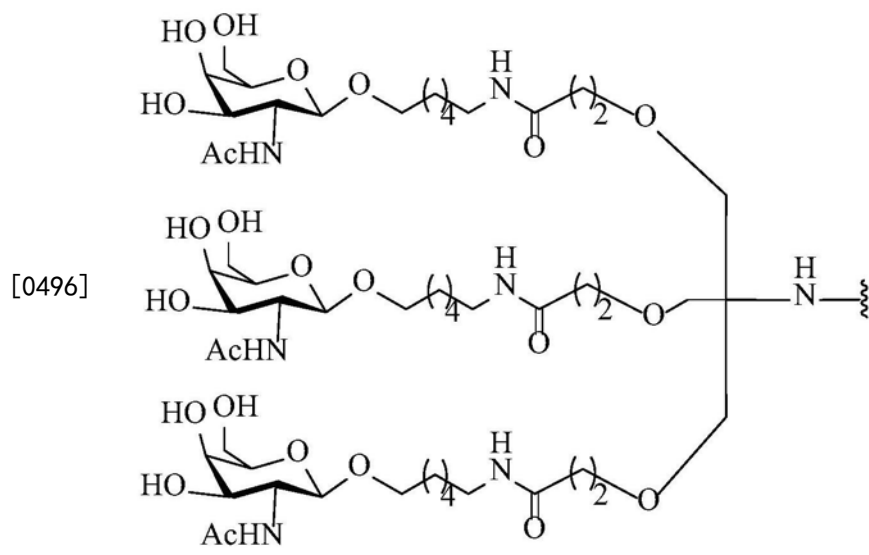
[0491] 在某些实施方案中,如本文提供的缀合物基团包含碳水化合物聚簇。如本文所用,“碳水化合物聚簇”是指其中两个或多个碳水化合物残基通过系链基团连接至支链基团的缀合物基团的一部分。(关于碳水化合物缀合物聚簇的实例,参见例如Maier等人,“Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting,”Bioconjugate Chemistry,2003,(14): 18-29,其以引用的方式整体并入本文;或Rensen等人,“Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor,”J. Med.Chem.2004,(47): 5798-5808)。

[0492] 如本文所使用,“修饰的碳水化合物”是指相对于天然存在的碳水化合物具有一个或多个化学修饰的任何碳水化合物。

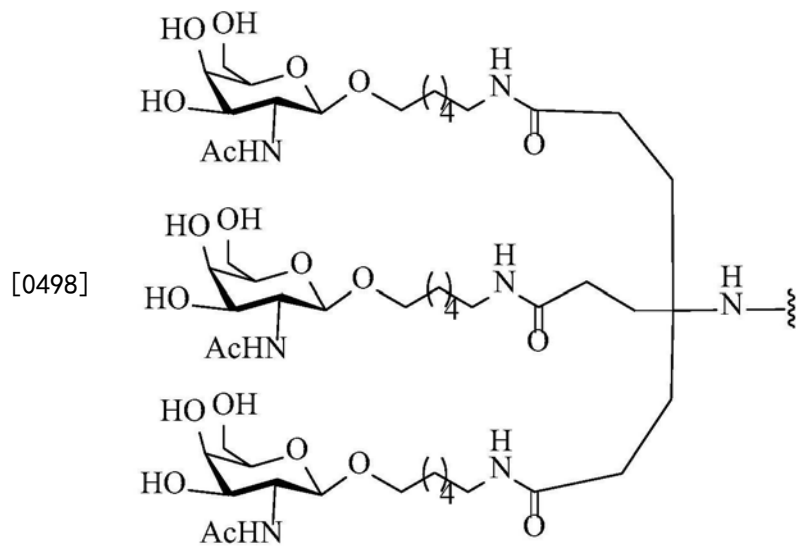
[0493] 如本文所使用,“碳水化合物衍生物”是指可使用碳水化合物作为起始材料或中间体合成的任何化合物。

[0494] 如本文所使用,“碳水化合物”是指天然存在的碳水化合物、修饰的碳水化合物或碳水化合物衍生物。

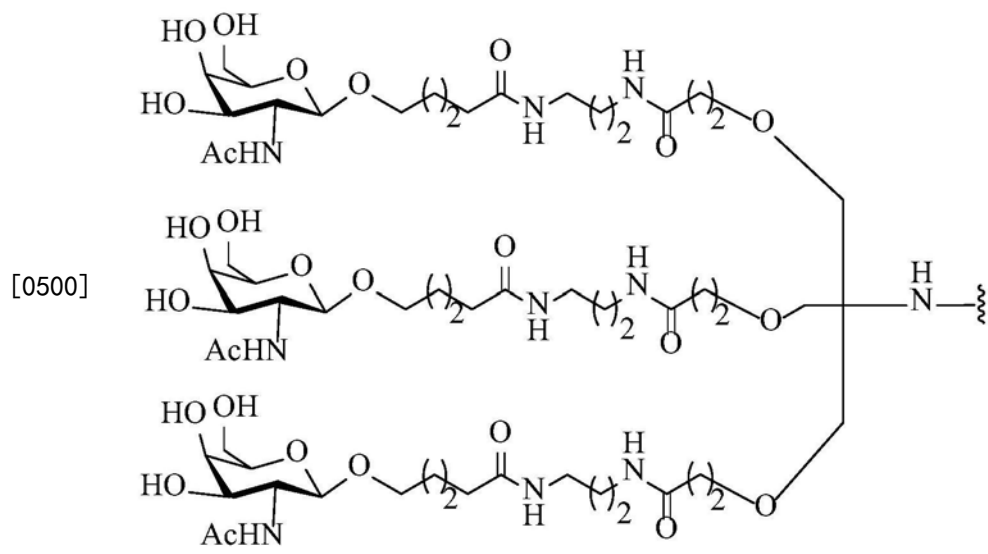
[0495] 在某些实施方案中,提供缀合物基团,其中所述细胞靶向部分具有式:



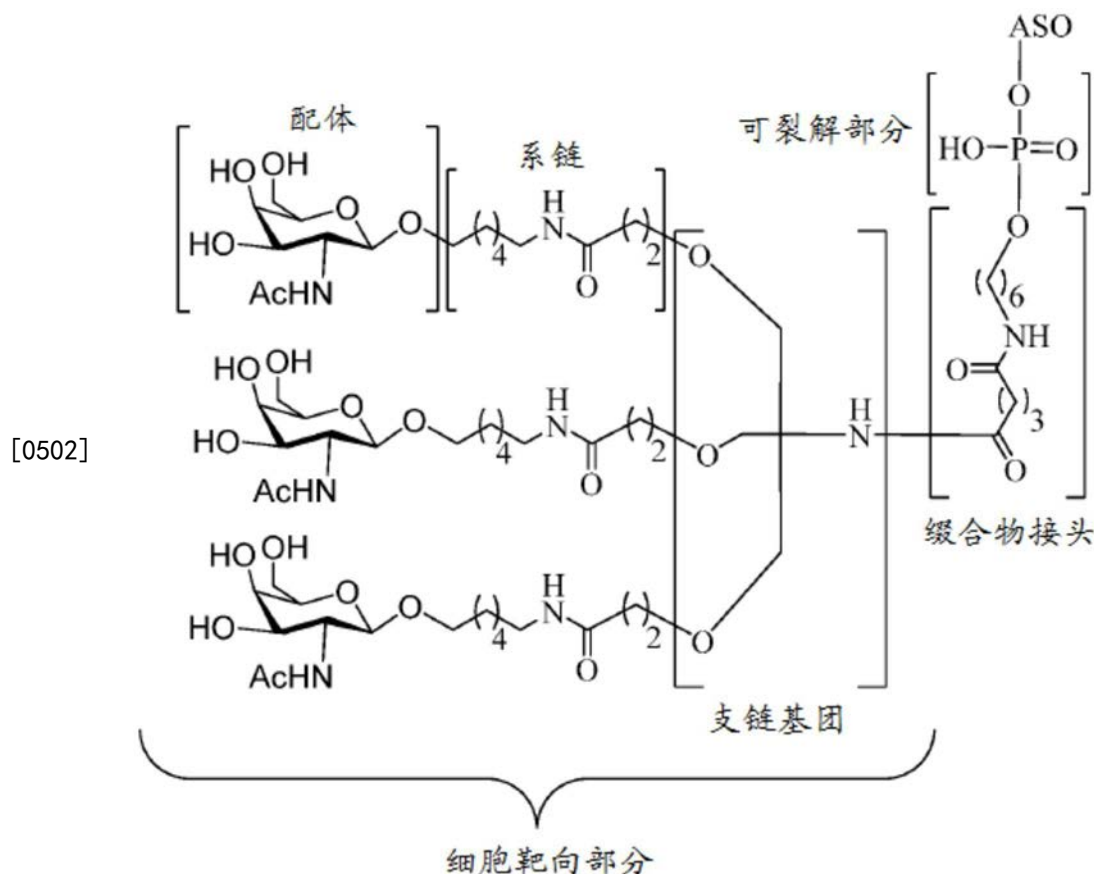
[0497] 在某些实施方案中,提供缀合物基团,其中所述细胞靶向部分具有式:



[0499] 在某些实施方案中,提供缀合物基团,其中所述细胞靶向部分具有式:



[0501] 在某些实施方案中,缀合物基团具有式:



[0503] 教导某些上述缀合物基团、缀合低聚化合物如包含缀合物基团的 反义化合物、系链、缀合物接头、支链基团、配体、可裂解部分以及 其他修饰的制备的代表性美国专利、美国专利申请公布和国际专利申 请公布包括但不限于US 5,994,517、US 6,300,319、US 6,660,720、US 6,906,182、US 7,262,177、US 7,491,805、US 8,106,022、US 7,723,509、US 2006/0148740、US 2011/0123520、WO 2013/033230和WO 2012/037254,其各自均以引用的方式整体并入本文。

[0504] 教导某些上述缀合物基团、缀合低聚化合物如包含缀合物基团的 反义化合物、系链、缀合物接头、支链基团、配体、可裂解部分以及 其他修饰的制备的代表性公布包括但不限于BIESSEN等人, "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852; BIESSEN等人, "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546; LEE 等人, "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500; RENSEN等人, "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276 (40) :37577-37584; RENSEN等人, "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (2004) 47:

5798-5808; SLIEDREGT等人, "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1999) 42:609-618; 以及Valentijn等人, "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" Tetrahedron, 1997, 53 (2), 759-770, 其各自以引用的方式整体并入本文。

[0505] 在某些实施方案中, 缀合物基团包括但不限于嵌入剂、报道分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫代胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、蒽醌、金刚烷、吡啶、荧光素、若丹明、香豆素和染料。某些缀合物基团先前已经得到描述, 例如: 胆固醇部分 (Letsinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、胆酸 (Manoharan等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)、硫醚例如己基-S-三苯甲基硫醇 (Manoharan等人, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、硫代胆固醇 (Oberhauser等人, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪族链例如十二烷二醇或十一烷基残基 (Saison-Behmoaras等人, EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov 等人, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk等人, Biochimie, 1993, 75, 49-54)、磷脂例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯 (Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea等人, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) 或金刚烷乙酸 (Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、棕榈基部分 (Mishra等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), 或十八胺或己基氨基-羰基-氧胆固醇部分 (Crooke等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)。

[0506] 在某些实施方案中, 缀合物基团包含活性药物, 例如阿司匹林、华法林 (warfarin)、苯基丁氮酮、布洛芬、舒洛芬、芬布芬、酮洛芬、(S)-(+)-普拉洛芬、卡洛芬、丹酰基肌氨酸、2,3,5-三碘苯甲酸、氟灭酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮杂草、吡啶美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺药、抗糖尿病剂、抗菌剂或抗生素。

[0507] 缀合物接头的一些非限制性实例包括吡咯烷、8-氨基-3,6-二氧杂辛酸 (ADO)、4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC) 和6-氨基己酸 (AHEx或AHA)。其他缀合物接头包括但不限于取代的C₁-C₁₀烷基、取代或未取代的C₂-C₁₀烯基或取代或未取代的C₂-C₁₀炔基, 其中优选取代基的非限制性列表包括羟基、氨基、烷氧基、羧基、苄基、苯基、硝基、硫醇、硫代烷氧基、卤素、烷基、芳基、烯基和炔基。

[0508] 缀合物基团可连接至寡核苷酸的任一端或两端 (末端缀合物基团) 和/或任何内部位置。

[0509] 在某些实施方案中, 缀合物基团处于低聚化合物的寡核苷酸的3'-末端。在某些实施方案中, 缀合物基团靠近3'-末端。在某些实施方案中, 缀合物连接在低聚化合物的3'末端处, 但位于一个或多个端基核苷之前。在某些实施方案中, 缀合物基团位于端基内。

[0510] 细胞培养和反义化合物处理

[0511] 可在多种细胞类型中体外测试反义化合物对TMPRSS6核酸或蛋白质的水平、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, Manassas, 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。例示性细胞类型 包括但不限于HepG2细胞、Hep3B细胞、Huh7 (肝细胞癌) 细胞、原 代肝细胞、A549细胞、GM04281成纤维细胞和LLC-MK2细胞。

[0512] 体外测试反义寡核苷酸

[0513] 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。

[0514] 通常, 可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。

[0515] 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 浓度及可在每100nM反 义寡核苷酸2至12ug/mL范围内的LIPOFECTIN®浓度。

[0516] 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 2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸 与LIPOFECTAMINE 2000® 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 可在每100nM反义寡核苷酸2至12ug/mL范围内的 LIPOFECTAMINE®浓度。

[0517] 另一种用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的试剂包括 Cytofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA)。将反义寡核苷酸与 Cytofectin® 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可在每 100nM反义寡核苷酸2至 12ug/mL范围内的Cytofectin®浓度。

[0518] 另一种用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的试剂包括 oligofectamine™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)。反义寡 核苷酸与oligofectamine™在 Opti-MEM™-1血清减少型培养基 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 中混合 以达成寡核苷酸的 所需浓度, 其中oligofectamine™与寡核苷酸的比率为每100nM约 0.2 至0.8μL。

[0519] 另一种用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的试剂包括 FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN)。反义低聚化合 物与FuGENE 6在1mL无血清的RPMI 中混合以达成寡核苷酸的所 需浓度, 其中FuGENE 6与低聚化合物的比率是每100nM为1至4 μL的FuGENE 6。

[0520] 用于将反义寡核苷酸引入培养细胞中的另一种技术包括电穿孔 (Sambrook和 Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 第3 版Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。

[0521] 通过常规方法用反义寡核苷酸处理细胞。可在反义寡核苷酸处理 后16-24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 (Sambrook和Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 第3版Cold Spring

Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。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。

[0522] 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 (Sambrook和Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。当用 **LIPOFECTAMINE2000®**、脂质转染剂 (Lipofectin) 或细胞转染剂 (Cytofectin) 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。

[0523] RNA分离

[0524] 可对总细胞RNA或聚(A)+mRNA进行RNA分析。RNA分离的方法是本领域中熟知的 (Sambrook和Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, 2001)。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。

[0525] 分析对目标水平或表达的抑制

[0526] TMPRSS6核酸水平或表达的抑制可以本领域中已知的多种方式来测定 (Sambrook和Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, 2001)。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。

[0527] 对目标RNA水平的定量实时PCR分析

[0528] 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。

[0529] 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。

[0530] 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。

[0531] 探针和引物被设计来与TMPRSS6核酸杂交。用于设计实时PCR探针及引物的方法

在本领域中为熟知的,且可包括使用软件,如 PRIMER EXPRESS® 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

[0532] 分析蛋白质水平

[0533] 对TMPRSS6核酸的反义抑制可通过测量TMPRSS6蛋白质水平来评估。TMPRSS6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)(Sambrook和Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, 2001)。针对目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), 或可经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。

[0534] 体内测试反义化合物

[0535] 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TMPRSS6表达和产生表型改变(如,减少的体内铁积聚)的能力。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(如无菌注射用水或磷酸盐缓冲盐水)中配制反义寡核苷酸。施用包括胃肠外施用途径,诸如腹膜内、静脉内和皮下。反义寡核苷酸剂量和施用频率的计算取决于许多因素,如施用途径和动物体重。在一个实施方案中,在用反义寡核苷酸处理一段时间后,自肝组织分离RNA且测量TMPRSS6核酸表达的变化。还可测量TMPRSS6蛋白质水平的变化。TMPRSS6表达的变化可通过测定动物中存在的铁调素表达水平、铁血浆水平和转铁蛋白的饱和度百分比来测量。

[0536] 某些适应症

[0537] 提供用于治疗个体的组合物、化合物和方法,所述方法包括向所述个体施用本文描述的一种或多种组合物或化合物。在某些实施方案中,提供用于降低个体中的TMPRSS6表达的组合物、化合物和方法。在某些实施方案中,提供用于通过向个体施用治疗有效量的包含靶向TMPRSS6核酸的反义寡核苷酸的组合物或化合物来治疗个体的组合物、化合物和方法。在某些实施方案中,靶向TMPRSS6的反义化合物降低TMPRSS6。在某些实施方案中,需要TMPRSS6降低的个体患有铁积聚疾病、病症或病状,或处于铁积聚疾病、病症或病状的风险中。在某些实施方案中,本文提供本文所述的组合物、化合物和方法,其用于降低个体中的铁水平。

[0538] 在某些实施方案中,铁积聚是用于治疗个体中的疾病、病症或病状的疗法的结果。在某些实施方案中,所述疗法是输血疗法。在某些实施方案中,多次输血可导致红细胞增多症。在其他实施方案中,多次输血与患有贫血的动物相关。需要多次输血的贫血实例是遗传性贫血、骨髓增生异常综合征和严重慢性溶血。遗传性贫血的实例包括但不限于镰状细胞性贫血、地中海贫血、范可尼贫血、戴-布二氏贫血、舒-戴二氏综合征、红细胞膜障碍、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏,或遗传性出血性毛细血管扩张症。在某些实施方案中,地中海贫血是 β -地中海贫血。在某些实施方案中, β -地中海贫血是HbE/ β -地中海贫血、重型 β -地中海贫血、中间型 β -地中海贫血或轻型 β -地中海贫血。

[0539] 在某些实施方案中,铁积聚由于个体中的疾病、病症或病状所致。在某些实施方案中,所述疾病、病症或病状是遗传性色素沉着症或地中海贫血。在某些实施方案中,地中海贫血是非输血依赖性地中海贫血(NTDT)或 β -地中海贫血。在某些实施方案中, β -地中

海贫血是 HbE/ β -地中海贫血、重型 β -地中海贫血、中间型 β -地中海贫血或轻型 β -地中海贫血。

[0540] 在某些实施方案中,所述疾病、病症和/或病状与过量胃肠外铁 补充剂摄入或过量膳食铁摄入相关。

[0541] 本文提供用于提高铁调素水平(如mRNA或蛋白质表达水平)的 组合物、化合物和方法。在某些实施方案中,提供如本文所述的靶向 TMPRSS6的反义化合物,其用于提高铁调素水平,如mRNA或蛋白质表达水平。

[0542] 本文提供用于降低动物中的转铁蛋白饱和度百分比的组合物、化合物和方法。在某些实施方案中,提供如本文所述的靶向TMPRSS6 的反义化合物,其用于降低动物中的转铁蛋白饱和度百分比。在某些 实施方案中,降低转铁蛋白饱和度导致用于红细胞生成的铁供应的降低。在某些实施方案中,红细胞生成的减少可治疗、预防动物中的红细胞增多症或其症状,延迟动物中的红细胞增多症或其症状的发作,改善和/或减轻动物中的红细胞增多症或其症状。在某些实施方案中,提供如本文所述的靶向TMPRSS6的反义化合物,其用于治疗、预防 动物中的红细胞增多症或其症状,延迟红细胞增多症或其症状的发作,改善和/或减轻红细胞增多症或其症状。在某些实施方案中,红细胞增多症是真性红细胞增多症。在某些实施方案中,用靶向 TMPRSS6的反义化合物治疗预防或延迟红细胞增多症进展成红细胞 白血病。

[0543] 在某些实施方案中,在个体中施用治疗有效量的靶向TMPRSS6 核酸的反义化合物伴随监测TMPRSS6水平,以确定个体对所述反义 化合物的反应。在某些实施方案中,在个体中施用治疗有效量的靶向 TMPRSS6核酸的反义化合物伴随监测个体中的铁调素水平。在某些 实施方案中,在个体中施用治疗有效量的靶向TMPRSS6核酸的反义 化合物伴随监测个体中的铁水平。在某些实施方案中,在个体中施用 治疗有效量的靶向TMPRSS6核酸的反义 化合物伴随评估个体中的转 铁蛋白饱和度百分比。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。

[0544] 本文提供包含靶向TMPRSS6的反义化合物的药物组合物,其用于制备用于治疗患有或易患铁积聚疾病、病症或病状的患者药物。

[0545] 在某些实施方案中,本文所述的方法包括施用包含修饰的寡核苷 酸的反义化合物,所述修饰的寡核苷酸具有与TMPRSS6核酸互补的 至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续的核碱基部分。

[0546] 某些组合疗法

[0547] 在某些实施方案中,包含本文提供的组合物或化合物的第一药剂 与一种或多种第二药剂共同施用。在某些实施方案中,此类第二药剂 被设计来治疗与本文所述的第一药剂相同的铁积聚疾病、病症或病 状。在某些实施方案中,此类第二药剂被设计来治疗与本文所述的第一药剂不同的疾病、病症或病状。在某些实施方案中,此类第二药剂 被设计来治疗如本文所述的一种或多种组合物或化合物的不期望的 副作用。在某些实施方案中,此类第一药剂被设计来治疗第二药剂的 不期望的副作用。在某些实施方案中,第二药剂与第一药剂共同施用 以治疗第一药剂的不期望的作用。在某些实施方案中,第二药剂与第一药剂共同施用以产生组合效果。在某些实施方案中,第二药剂与第一药剂共同施用以产生协同效果。在某些实施方案中,与在药剂作为 独立疗法施用时达到治疗或预防效果所需要

的剂量相比,第一药剂和 第二药剂的共同施用允许使用较低剂量。在某些实施方案中,共同施用的第二药剂的剂量与在单独施用第二药剂时将施用的剂量相同。在 某些实施方案中,共同施用的第二药剂的剂量比在单独施用第二药剂 时将施用的剂量低。在某些实施方案中,共同施用的第二药剂的剂量 比在单独施用第二药剂时将施用的剂量高。

[0548] 在某些实施方案中,第一药剂和一种或多种第二药剂在相同时间 施用。在某些实施方案中,第一药剂和一种或多种第二药剂在不同时 间施用。在某些实施方案中,第二药剂在施用第一药剂之前施用。在 某些实施方案中,第二药剂在施用第一药剂之后施用。在某些实施方 案中,第一药剂和一种或多种第二药剂一起制备于单一药物制剂中。在某些实施方案中,第一药剂和一种或多种第二药剂分开制备。

[0549] 在某些实施方案中,第二药剂包括但不限于核酸化合物。此类核 酸化合物可包括 siRNA、核酶或靶向TMPRSS6或另一靶标的反义化 合物。

[0550] 在某些实施方案中,第二药剂包括但不限于非反义化合物,如铁 螯合剂、转铁蛋白、骨形态发生蛋白6 (BMP6)、铁调素激动剂、干 细胞、靶向TMPRSS6的抗体或胎儿血红蛋白 (HbF) 升高剂。在其他 实施方案中,铁螯合剂选自但不限于FBS0701 (FerroKin)、地拉罗司、除铁灵和去铁酮。在某些实施方案中,HbF升高剂包括5-羟基脲、短链脂肪酸 (SCFA) 衍生物 (例如,HQK1001)、DNA甲基转移酶抑制 剂 (例如,地西他滨) 或组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制 剂 (例如Zolina、帕比司他 (Panobinostat))。

[0551] 在某些实施方案中,第二药剂包括但不限于静脉切开术或输血疗 法。在某些实施方案中,第一药剂与静脉切开术或输血疗法同时施用。在某些实施方案中,第一药剂在静脉切开术或输血疗法之前施用。在 某些实施方案中,第一药剂在静脉切开术或输血疗法之后施用。在某 些实施方案中,施用本文提供的组合物或化合物降低个体中静脉切开 术或输血的频率。在某些实施方案中,施用本文提供的组合物或化合 物提高个体中静脉切开术或输血的频率。在某些实施方案中,施用本 文提供的组合物或化合物减少静脉切开术或输血所需的时间长度。

[0552] 某些化合物

[0553] 在本文的实施例1中证明具有增强其作为人的治疗性治疗的有益 性质的优选反义化合物。为了简洁起见,仅描述了有助于选择优选反 义化合物的研究。以下提供所述实施例1的非详尽总结以便于参考。

[0554] 设计了具有MOE缺口聚物基序或含有靶向人TMPRSS6的基序 的cEt的约2200种反义化合物,并且在Hep3B细胞中筛选在向细胞 施用单个剂量之后其对人TMPRSS6 mRNA的影响。实施例1显示被 选择用于进一步研究的超过100种有效反义化合物的代表性单剂量 筛选数据。

[0555] 在体外用单剂量测试的大约2200种反义化合物中,选择约100 种反义化合物用于在剂量依赖性抑制研究中进行测试,以确定其在 Hep3B细胞中的半最大抑制浓度 (IC_{50}) (实施例2)。

[0556] 基于其在剂量反应和/或单剂量研究中的效力进一步选择了约77 种反义化合物,以在CD-1小鼠中研究来确定所述反义化合物在小鼠 中的耐受性 (例如,血浆化学标志物、体重和器官重量) (实施例3-4)。

[0557] 在CD-1小鼠中针对耐受性测试的大约77种反义化合物中,选 择了约48种反义化

合物用于在Sprague-Dawley大鼠中研究来确定大鼠的耐受性(实施例5)。

[0558] 基于大鼠耐受性研究,选择了约32种反义化合物用于人TMPRSS6转基因(huTMPRSS6 tg)小鼠中的体内效力测试(实施例6)。

[0559] 评估在小鼠研究中鉴别为有效和可耐受的反义化合物与恒河猴TMPRSS6基因序列的交叉反应性(实施例7)。虽然本文所述研究中的反义化合物在食蟹猴中进行了测试(实施例11),但食蟹猴TMPRSS6序列不可用于与反义化合物的序列进行比较,因此将反义化合物的序列与密切相关的恒河猴的序列进行比较。发现约七种反义化合物与恒河猴TMPRSS6基因序列没有错配。

[0560] 基于小鼠效力和耐受性研究的结果以及与恒河猴序列的同源性,选择了来自先前研究的七种反义化合物(585774、585683、585775、630718、647477、647449、647420)的序列用于进一步化学修饰以使它们更有效地降低TMPRSS6水平。基于七种原始反义化合物设计了八种具有GalNAc缀合物的新反义化合物(702843、705051、705052、705053、706940、706941、706942、706943)(实施例7)。

[0561] 八种GalNAc缀合的反义化合物在小鼠中进行了测试:对于在CD-1小鼠中的耐受性(例如,测量了体重、器官重量、肝代谢标志物(例如,ALT、AST和胆红素)、肾代谢标志物(例如,BUN和肌酸酐)、组织学、血液学参数(例如,血细胞计数和血细胞比容)等(实施例8);以及对于在人TMPRSS6转基因小鼠中的效力(实施例9)。

[0562] 还评估了八种GalNAc缀合的反义化合物的粘度,并且发现八种中的七种具有有利的粘度水平,而发现一种具有边界可接受的粘度水平(实施例10)。

[0563] 基于在小鼠和体外粘度研究中观察的有利概况,进一步测试了八种GalNAc缀合的反义化合物在降低TMPRSS6中的效力、耐受性及其在食蟹猴中的铁参数(例如,铁调素水平、血清铁和转铁蛋白饱和度)的影响(实施例11)。通常发现八种GalNAc缀合的反义化合物在食蟹猴中是有效的和可耐受的。发现反义化合物705051、702843、706942和706943在降低TMPRSS6、血清铁和转铁蛋白饱和度方面特别有效。

[0564] 因此,本文提供具有任何一种或多种有利于其用作治疗剂的特征的反义化合物。在某些实施方案中,本文提供包含如本文所述的修饰的寡核苷酸的反义化合物,所述修饰的寡核苷酸靶向或与选自SEQ ID NO:1-6中任一项的核苷酸的区域特异性地杂交。

[0565] 在某些实施方案中,如本文所述的某些反义化合物由于其在抑制TMPRSS6表达中的效力而是有效的。在某些实施方案中,所述化合物或组合物将TMPRSS6抑制至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。

[0566] 在某些实施方案中,如本文所述的某些反义化合物由于当在人细胞(例如在Hep3B细胞系)中测试时(如实施例2中所描述)小于20 μ M、小于10 μ M、小于8 μ M、小于5 μ M、小于2 μ M、小于1 μ M、小于0.9 μ M、小于0.8 μ M、小于0.7 μ M、小于0.6 μ M或小于0.5 μ M的体外IC₅₀而是有效的。

[0567] 在某些实施方案中,如本文所述的某些反义化合物由于在体内 $\leq$ 5mpk/wk、 $\leq$ 4mpk/wk、 $\leq$ 3mpk/wk、 $\leq$ 2mpk/wk或 $\leq$ 1mpk/wk的中值有效剂量(ED₅₀)而是有效的。在某些实施方案中,具有ED₅₀ $\leq$ 1 mpk/wk的优选反义化合物包括如实施例8中所述的反义化合物702843、706940、706942和706943。

[0568] 在某些实施方案中,如本文所述的某些反义化合物由于具有小于 40cP、小于 35cP、小于30cP、小于25cP、小于20cP、小于15cP 或小于10cP的粘度而是有效的,如在实施例9中所描述。具有大于 40cP的粘度的寡核苷酸将具有低于最佳粘度。

[0569] 在某些实施方案中,如本文所述的某些反义化合物是高度耐受的,如实施例中所描述的体内耐受性测量值所证明。在某些实施方案中,如本文所述的某些反义化合物是高度耐受的,如通过在盐水处理的动物上ALT和/或AST值不超过3倍、2倍或1.5倍的增加所证明。

[0570] 在某些实施方案中,如本文所述的某些反义化合物由于具有以下 中的一个或多个而是有效的:抑制效力大于50%、ED₅₀≤1mpk/wk、粘度小于40cP以及在转基因小鼠中ALT和/或AST的不超过3倍增加。

[0571] 在某些实施方案中,ISIS 702843 (SEQ ID NO:36) 是优选的。发现这种化合物在TMPRSS6转基因小鼠中是有效的抑制剂,并且在 CD-1小鼠中是非常耐受的的反义化合物。在小鼠中,与盐水处理的动物相比,它具有ALT和/或AST水平的不到3倍增加。在huTMPRSS6转基因小鼠中,它具有约33cP的可接受粘度和ED₅₀≤1mpk/wk。此外,在猴中,它是在抑制TMPRSS6方面最有效的化合物之一。

[0572] 在某些实施方案中,ISIS 705051 (SEQ ID NO:36) 是优选的。发现这种化合物在TMPRSS6转基因小鼠中是有效的抑制剂,并且在 CD-1小鼠中是非常耐受的的反义化合物。在小鼠中,与盐水处理的动物相比,它具有ALT和/或AST水平的不到3倍增加。在huTMPRSS6转基因小鼠中,它具有约23cP的可接受粘度和ED₅₀≤3mpk/wk。此外,在猴中,它是在抑制TMPRSS6方面最有效的化合物之一。

[0573] 在某些实施方案中,ISIS 706942 (SEQ ID NO:77) 是优选的。发现这种化合物在TMPRSS6转基因小鼠中是有效的抑制剂,并且在 CD-1小鼠中是非常耐受的的反义化合物。在小鼠中,与盐水处理的动物相比,它具有ALT和/或AST水平的不到3倍增加。在huTMPRSS6转基因小鼠中,它具有约20cP的可接受粘度和ED₅₀≤1mpk/wk。此外,在猴中,它是在抑制TMPRSS6方面最有效的化合物之一。

[0574] 在某些实施方案中,ISIS 706943 (SEQ ID NO:77) 是优选的。发现这种化合物在TMPRSS6转基因小鼠中是有效的抑制剂,并且在 CD-1小鼠中是非常耐受的的反义化合物。在huTMPRSS6转基因小鼠中,与盐水处理的动物相比,它具有ALT和/或AST水平的不到3倍增加。在huTMPRSS6转基因小鼠中,它具有约19cP的可接受粘度和ED₅₀≤1mpk/wk。此外,在猴中,它是在抑制TMPRSS6方面最有效的化合物之一。

实施例

[0575] 非限制性公开且以引用方式并入

[0576] 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。本申请中所述的各项参考文献以引用的方式整体并入 本文。

[0577] 实施例1:靶向人II型跨膜丝氨酸蛋白酶6 (TMPRSS6) 的反义 寡核苷酸

[0578] 大约2200种新设计的嵌合反义寡核苷酸被设计为5'-10'-5' MOE 缺口聚物或含cET 缺口聚物。

[0579] 5-10-5 MOE缺口聚物被设计为20个核苷长度的寡核苷酸,其中,中心缺口区段包含十个2'-脱氧核苷并且在5'方向和3'方向上各自侧接包含五个核苷的翼区段。5'翼区段中的每个核苷和3'翼区段中的每个核苷具有2'-MOE修饰。每个缺口聚物整个的核苷间键联是硫代磷酸酯(P=S)键联。每个缺口聚物整个的所有胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。

[0580] 含cET缺口聚物被设计为具有变化的脱氧、MOE和(S)-cEt缺口聚物基序。脱氧、MOE和(S)-cEt寡核苷酸的长度是16个核苷,其中核苷具有MOE糖修饰、(S)-cEt糖修饰或脱氧核糖。表3中的'化学'列描述各寡核苷酸的糖修饰。'k'指示(S)-cEt糖修饰;'d'指示脱氧核糖;并且'e'指示MOE修饰。除非另外说明,否则每个缺口聚物整个的核苷间键联是硫代磷酸酯(P=S)键联。每个缺口聚物整个的所有胞嘧啶残基是5-甲基胞嘧啶。

[0581] "起始位点"表示人基因序列中缺口聚物所靶向的最5'核苷。"终止位点"表示人基因序列中缺口聚物所靶向的最3'核苷。将列于以下表中的每个缺口聚物靶向在本文中指定为SEQ ID NO:1 (GENBANK 登录号NM_153609.2)的人TMPRSS6 mRNA或在本文中指定为SEQ ID NO:2 (从核苷酸16850000至16897000截短的GENBANK登录号NT_011520.12补体)的人TMPRSS6基因组序列。在以下表中,'n/a'表示反义寡核苷酸不以100%互补性靶向所述特定基因序列。

[0582] 测试了2200种嵌合反义寡核苷酸在体外对TMPRSS6 mRNA的单剂量影响。在具有类似培养条件的一系列实验中至少一次测试反义寡核苷酸。

[0583] 在所测试的2200种中约110种有效反义寡核苷酸的代表性结果呈现于以下所示的表1-3中。选择这些有效的反义寡核苷酸用于如下所述的进一步研究。

[0584] 表1显示由5-10-5MOE缺口聚物对TMPRSS6 mRNA的抑制百分比。使用电穿孔以4,500nM反义寡核苷酸转染密度为每孔约20,000个细胞的培养的Hep3B细胞。在大约24小时的处理期后,自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量TMPRSS6 mRNA水平。使用人引物探针集RTS3840 (正向序列CAAAGCCCAGAAGATGCTCAA,在本文中指定为SEQ ID NO:92;反向序列GGAATAGACGGAGCTGGAGTTG,在本文中指定为SEQ ID NO:93;探针序列ACCAGCACCCGCCTGGGAAGT,在本文中指定为SEQ ID NO:94)来测量mRNA水平。根据如由RIBOGREEN®所测量的总RNA含量来调整TMPRSS6 mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的TMPRSS6的抑制百分比。

[0585] 表1

[0586] 由靶向SEQ ID NO:1和/或2的5-10-5MOE缺口聚物对TMPRSS6 mRNA的抑制

[0587]

ISIS NO	序列	SEQ ID NO: 1 起始位点	SEQ ID NO: 1 终止位点	SEQ ID NO: 2 起始位点	SEQ ID NO: 2 终止位点	抑制%	SEQ ID NO
585604	CCATCACCTCCGTCCCCCTG	178	197	7011	7030	58	7
585606	TCCGCTTCCTCGCCATCACC	190	209	7023	7042	51	8
585608	TTTTCTCTTGAGTCCTCAC	233	252	7066	7085	52	9
585609	GCTTTTCTCTTGAGTCCTC	235	254	7068	7087	79	10
585611	CCGGGCTTTTCTCTTGAGT	239	258	7072	7091	58	11
585626	GGCTTTGGCGGTTTCACTGC	449	468	11948	11967	79	12
585629	GAGCATCTTCTGGGCTTTGG	461	480	N/A	N/A	80	13
585631	CCTTGAGCATCTTCTGGGCT	465	484	N/A	N/A	84	14
585649	AGTGCCTGCACCACCTCGGG	616	635	14372	14391	79	15
585651	CAGCAGTGCCTGCACCACCT	620	639	14376	14395	70	16
585653	TCCTCCACCAGCAGTGCCTG	628	647	14384	14403	49	17
585654	AGCTCCTCCACCAGCAGTGC	631	650	14387	14406	64	18
585655	CAGCAGCTCCTCCACCAGCA	635	654	14391	14410	66	19
585667	GCTGTGCAGGCCCTTCTTCC	1049	1068	24044	24063	52	20
585668	GTAGTAGCTGTGCAGGCCCT	1055	1074	24050	24069	61	21
585682	ACGGCAAATCATACTTCTGC	1284	1303	26044	26063	60	22
585683	GCACGGCAAATCATACTTCT	1286	1305	26046	26065	58	23
585684	CCCTGGGTGCACGGCAAATC	1294	1313	26054	26073	58	24
585698	CAAACGCAGTTTCTCTCATC	1567	1586	N/A	N/A	52	25
585699	TGCAAACGCAGTTTCTCTCA	1569	1588	N/A	N/A	52	26
585752	GATCACACCTGTGATGCGGG	2504	2523	44266	44285	48	27

[0588]

585757	CTCCTGCCACCACAGGGCCT	2656	2675	44418	44437	70	28
585758	ACCTCCTGCCACCACAGGGC	2658	2677	44420	44439	69	29
585761	TGCCATCACTGGAGCAGACA	2699	2718	44461	44480	60	30
585762	ATCCTCCTGCCATCACTGGA	2706	2725	44468	44487	38	31
585768	TCCATTCCCAGATCCCAAGT	2978	2997	44740	44759	64	32
585769	CTTCCATTCCCAGATCCCAA	2980	2999	44742	44761	62	33
585770	ACCTTCCATTCCCAGATCCC	2982	3001	44744	44763	52	34
585772	CAAAGGGCAGCTGAGCTCAC	3154	3173	44916	44935	47	35
585774	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	3162	3181	44924	44943	67	36
585775	AGCTTTATTCCAAAGGGCAG	3164	3183	44926	44945	68	37
585776	AGGCAGCTTTATTCCAAAGG	3168	3187	44930	44949	59	38
585777	GATCAGGCAGCTTTATTCCA	3172	3191	44934	44953	65	39
585831	AGGAGCGGCCACCGTCCTGT	N/A	N/A	12340	12359	45	40
				12371	12390		
				12562	12581		
585834	GGCAGGAGCGGCCACCGTCC	N/A	N/A	12343	12362	42	41
				12374	12393		
				12565	12584		
585863	TCCCCCTGAGGCTCTCAGGA	N/A	N/A	16233	16252	32	42
				18737	18756		
585864	TAAGTCCCCCTGAGGCTCTC	N/A	N/A	16237	16256	39	43
				18741	18760		
585906	AAGACTGTTCTTCTCCTTT	N/A	N/A	27990	28009	44	44
585912	CAGCTTGTGCCTGCCAGAG	N/A	N/A	29208	29227	45	45
585932	AGTCTATCTGGCCACAGTGA	N/A	N/A	32981	33000	34	46
585937	GGTCCTTCTTTGAGCCTCAC	N/A	N/A	34800	34819	35	47

[0589] 表2显示由另外的5-10-5MOE缺口聚物对TMPRSS6 mRNA的抑制百分比。使用电穿孔以5,000nM反义寡核苷酸转染密度为每孔约20,000个细胞的培养的Hep3B细胞。在大约24小时的处理期后,自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量TMPRSS6 mRNA水平。使用人引物探针集RTS3840来测量mRNA水平。根据如由 RIBOGREEN®所测量的总RNA含量来调整TMPRSS6 mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的TMPRSS6的抑制百分比。

[0590] 表2

[0591] 由靶向SEQ ID NO:1和/或2的5-10-5MOE缺口聚物对TMPRSS6 mRNA的抑制

[0592]

ISIS NO	序列	SEQ ID NO: 1 起始位点	SEQ ID NO: 1 终止位点	SEQ ID NO: 2 起始位点	SEQ ID NO: 2 终止位点	抑制%	SEQ ID NO
591466	CCTCAGGTCACCACTTGCTG	2533	2552	44295	44314	63	48
591491	GCCACCTCCTGCCACCACAG	2661	2680	44423	44442	72	49
591492	ATGCCACCTCCTGCCACCAC	2663	2682	44425	44444	59	50
591514	CTCCATCCTCCTGCCATCAC	2710	2729	44472	44491	59	51
591536	GCAGCTGAGCTCACCTCCCA	3148	3167	44910	44929	68	52
591537	GGCAGCTGAGCTCACCTCCC	3149	3168	44911	44930	75	53
591549	GGCAGCTTTATTCCAAAGGG	3167	3186	44929	44948	69	54
591550	CAGGCAGCTTTATTCCAAAG	3169	3188	44931	44950	76	55
591552	ATCAGGCAGCTTTATTCCAA	3171	3190	44933	44952	66	56
591578	CCACTGGCCCTGGGTGCACG	1301	1320	26061	26080	65	57
591579	TCCACTGGCCCTGGGTGCAC	1302	1321	26062	26081	68	58

[0593] 表3示出来自一系列实验的由含cEt缺口聚物对TMPRSS6 mRNA的抑制百分比。使用电穿孔以2,000nM反义寡核苷酸转染密度为每孔约20,000个细胞的培养的Hep3B细胞。在大约24小时的处 理期后,自细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量TMPRSS6 mRNA 水平。使用人引物探针集RTS3840来测量mRNA水平。根据如由 RIBOGREEN[®]所测量的总RNA含量来调整TMPRSS6 mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的TMPRSS6的抑制百分比。

[0594] 表3

[0595] 由靶向SEQ ID NO:1和/或2的含cEt缺口聚物对TMPRSS6 mRNA 的抑制

[0596]

ISIS NO	序列	SEQ ID NO: 1 起始位点	SEQ ID NO: 1 终止位点	SEQ ID NO: 2 起始位点	SEQ ID NO: 2 终止位点	化学	抑制%	SEQ ID NO
615840	CTTTTGCTTACAGTG	3057	3072	44819	44834	ekk-d10-kke	59	59
615884	GCTGAGCTCACCTCCC	3149	3164	44911	44926	ekk-d10-kke	70	60
615898	TATTCCAAAGGGCAGC	3163	3178	44925	44940	ekk-d10-kke	69	61
615901	CTTTATTCCAAAGGGC	3166	3181	44928	44943	ekk-d10-kke	68	62
615903	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	ekk-d10-kke	70	63
615909	TCAGGCAGCTTTATTC	3174	3189	44936	44951	ekk-d10-kke	69	64
615910	ATCAGGCAGCTTTATT	3175	3190	44937	44952	ekk-d10-kke	69	65
615911	GATCAGGCAGCTTTAT	3176	3191	44938	44953	ekk-d10-kke	69	66

[0597]

630497	ATTCCAAAGGGCAGCT	3162	3177	44924	44939	kkk-d10-kkk	80	67
630689	CTTACAGTGGCAGCAG	3050	3065	44812	44827	kkk-d10-kkk	71	68
630692	TGGCTTACAGTGGCAG	3053	3068	44815	44830	kkk-d10-kkk	75	69
630693	TTGGCTTACAGTGGCA	3054	3069	44816	44831	kkk-d10-kkk	75	70
630696	CTTTTGGCTTACAGTG	3057	3072	44819	44834	kkk-d10-kkk	66	59
630716	CTTTATTCCAAAGGGC	3166	3181	44928	44943	kkk-d10-kkk	63	62
630717	GCTTTATTCCAAAGGG	3167	3182	44929	44944	kkk-d10-kkk	81	71
630718	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	kkk-d10-kkk	84	63
630719	CAGGCAGCTTTATTCC	3173	3188	44935	44950	kkk-d10-kkk	80	72
630722	GATCAGGCAGCTTTAT	3176	3191	44938	44953	kkk-d10-kkk	72	66
630725	TTTGATCAGGCAGCTT	3179	3194	N/A	N/A	kkk-d10-kkk	61	73
630726	TTTTGATCAGGCAGCT	3180	3195	N/A	N/A	kkk-d10-kkk	72	74
630727	TTTTTGATCAGGCAGC	3181	3196	N/A	N/A	kkk-d10-kkk	73	75
630794	ACATCAGGGACGAGAC	2686	2701	44448	44463	kk-d8-kekeke	72	76
647393	TTATTCCAAAGGGCAG	3164	3179	44926	44941	kkk-d10-kkk	78	83
647394	TTTATTCCAAAGGGCA	3165	3180	44927	44942	kkk-d10-kkk	77	84
647395	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kkk-d10-kkk	86	77
647396	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	kkk-d10-kkk	86	78
647397	GGCAGCTTTATTCCAA	3171	3186	44933	44948	kkk-d10-kkk	85	82
647398	AGGCAGCTTTATTCCA	3172	3187	44934	44949	kkk-d10-kkk	82	79
647404	GGCAGCTGAGCTCACC	3153	3168	44915	44930	kek-d9-eekk	76	85
647414	TATTCCAAAGGGCAGC	3163	3178	44925	44940	kek-d9-eekk	86	61
647419	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	kek-d9-eekk	87	63
647420	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kek-d9-eekk	83	77
647421	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	kek-d9-eekk	83	78
647423	AGGCAGCTTTATTCCA	3172	3187	44934	44949	kek-d9-eekk	84	79
647424	CAGGCAGCTTTATTCC	3173	3188	44935	44950	kek-d9-eekk	78	72
647426	ATCAGGCAGCTTTATT	3175	3190	44937	44952	kek-d9-eekk	81	65
647428	TGATCAGGCAGCTTTA	3177	3192	N/A	N/A	kek-d9-eekk	76	80
647429	TTGATCAGGCAGCTTT	3178	3193	N/A	N/A	kek-d9-eekk	78	81
647442	ATTCCAAAGGGCAGCT	3162	3177	44924	44939	kk-d9-eeekk	81	67
647446	CTTTATTCCAAAGGGC	3166	3181	44928	44943	kk-d9-eeekk	79	62
647447	GCTTTATTCCAAAGGG	3167	3182	44929	44944	kk-d9-eeekk	87	71
647448	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	kk-d9-eeekk	86	63
647449	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kk-d9-eeekk	89	77
647450	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	kk-d9-eeekk	88	78
647451	GGCAGCTTTATTCCAA	3171	3186	44933	44948	kk-d9-eeekk	88	82
647453	CAGGCAGCTTTATTCC	3173	3188	44935	44950	kk-d9-eeekk	77	72
647454	TCAGGCAGCTTTATTC	3174	3189	44936	44951	kk-d9-eeekk	82	64
647457	TGATCAGGCAGCTTTA	3177	3192	N/A	N/A	kk-d9-eeekk	78	80
647475	CTTTATTCCAAAGGGC	3166	3181	44928	44943	kk-d8-eeekk	77	62
647476	GCTTTATTCCAAAGGG	3167	3182	44929	44944	kk-d8-eeekk	83	71
647477	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	kk-d8-eeekk	84	63

647478	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kk-d8-eeekk	79	77
647482	CAGGCAGCTTTATTCC	3173	3188	44935	44950	kk-d8-eeekk	76	72
647506	AGCTTTATTCCAAAGG	3168	3183	44930	44945	k-d9-kekeke	89	63
647508	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	k-d9-kekeke	77	78
647514	GATCAGGCAGCTTTAT	3176	3191	44938	44953	k-d9-kekeke	78	66
647531	CAGCTTTATTCCAAAG	3169	3184	44931	44946	kk-d8-kekeke	88	77
647532	GCAGCTTTATTCCAAA	3170	3185	44932	44947	kk-d8-kekeke	77	78

[0598] 实施例2:靶向人TMPRSS6的反义寡核苷酸在Hep3B细胞中的剂量反应

[0599] 在体外抑制人TMPRSS6 mRNA的研究中,还在Hep3B细胞中以不同剂量测试了约100种反义寡核苷酸,其选自在实施例1中描述的单剂量实验中测试的约2200种反义寡核

苷酸。

[0600] 对于以下表4中的实验,将细胞以12,000个细胞/孔的密度涂铺 并且使用电穿孔,以0.15 μ M、0.44 μ M、1.33 μ M、4.00 μ M和12.00 μ M浓度的反义寡核苷酸进行转染。在大约16小时的处理期后,自 细胞分离RNA且通过定量实时PCR测量TMPRSS6 mRNA水平。使 用人引物探针集RTS3840来测量mRNA水平。根据如由 RIBOGREEN[®]所测量的总RNA含量来调整TMPRSS6 mRNA水平。结果呈现为相对于未处理的对照细胞的TMPRSS6的抑制百分比。“0”表示反义寡核苷酸不降低TMPRSS6 mRNA水平。

[0601] 还呈现了各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)。在反义寡核苷酸 处理的细胞中,TMPRSS6 mRNA水平以剂量依赖性方式显著降低。

[0602] 表4

[0603] 使用5-10-5MOE缺口聚物的剂量反应测定

[0604]

ISIS No	0.15 μ M	0.44 μ M	1.33 μ M	4.00 μ M	12.00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
585604	0	0	17	36	63	7
585606	0	0	0	0	35	>12
585608	0	13	6	8	50	>12
585609	0	10	24	44	68	5
585611	0	0	9	33	67	8
585626	3	21	27	55	82	3
585629	37	45	56	71	83	1
585631	29	56	63	70	84	1
585649	0	9	35	46	74	4
585651	0	18	1	39	75	6
585653	10	15	18	42	63	7
585654	0	0	25	33	65	8

[0605]

585655	0	12	15	34	65	8
585667	0	0	2	30	52	>12
585668	11	6	0	43	70	8
585682	0	0	0	30	63	11
585683	1	9	19	39	77	5
585684	6	1	13	21	57	>12
585698	13	11	37	39	78	4
585699	0	8	25	25	65	8
585752	0	12	37	34	69	5
585757	0	7	16	53	79	4
585758	6	0	25	49	71	5
585761	2	12	13	39	66	7
585762	2	15	26	44	75	4
585768	4	0	20	52	76	4
585769	0	0	0	42	70	7
585770	12	12	42	50	68	3
585772	12	12	23	34	56	12
585774	15	28	58	68	84	1
585775	0	7	28	60	82	3
585776	36	24	56	69	86	1
585777	15	39	63	76	88	1
585831	0	8	3	19	31	>12
585834	0	10	3	6	32	>12
585863	7	7	3	0	51	>12
585864	5	9	19	31	34	>12
585906	13	2	16	11	29	>12
585912	20	0	30	33	32	>12
585932	15	11	25	4	37	>12
585937	20	33	30	30	43	>12
591466	0	14	26	39	71	5
591491	0	11	23	45	68	5
591492	0	0	22	27	64	9
591514	0	0	1	41	75	6
591536	13	22	34	64	81	2
591537	17	44	57	81	88	1
591549	21	26	51	72	87	1
591550	19	34	65	76	89	1
591552	23	49	65	86	90	1
591578	0	17	28	45	55	7
591579	3	13	47	40	58	6

[0606] 对于以下表5中的实验,将细胞以5,000个细胞/孔的密度涂铺并 且使用电穿孔,以0.19 μ M、0.56 μ M、1.67 μ M和5.0 μ M浓度的反 义寡核苷酸进行转染。在大约16小时的处理期

后,自细胞分离RNA 且通过定量实时PCR测量TMPRSS6 mRNA水平。再次使用人引物 探针集 RTS3840来测量mRNA水平。根据如由 RIBOGREEN®所测量 的总RNA含量来调整TMPRSS6 mRNA水平。结果呈现为相对于未 处理的对照细胞的TMPRSS6的抑制百分比。

[0607] 还呈现了各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)。在反义寡核苷酸 处理的细胞中, TMPRSS6 mRNA水平以剂量依赖性方式显著降低。

[0608] 表5

[0609] 使用含cEt的寡核苷酸的剂量反应测定

[0610]

ISIS No	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC ₅₀ (μM)
630497	28	49	69	86	0.6
647393	28	42	69	84	0.7
647394	43	59	67	83	0.3
647395	11	41	67	83	0.9
647396	25	47	73	79	0.7
647397	27	42	70	83	0.7
647398	27	49	61	84	0.7
647404	23	47	63	79	0.8
647414	38	52	72	87	0.4
647419	45	60	74	84	0.3
647420	28	52	69	82	0.6
647421	23	47	68	85	0.7
647423	23	50	74	81	0.7
647424	20	48	72	83	0.7
647426	26	37	67	76	0.9
647428	25	33	61	83	0.9
647429	20	32	59	83	1
647442	32	51	66	78	0.6
647446	32	48	73	81	0.6
647447	29	52	70	81	0.6
647448	30	56	72	79	0.5
647449	31	45	71	83	0.6
647450	32	54	70	82	0.5
647451	40	62	74	83	0.3
647453	28	52	68	84	0.6
647454	32	45	62	84	0.7
647457	28	46	69	80	0.7
647475	9	52	63	77	1
647476	43	59	70	79	0.3

[0611]

647477	48	62	77	83	0.2
647478	16	41	68	82	0.9
647482	14	37	73	79	0.9
647506	37	60	75	83	0.4
647508	21	39	52	79	1.1
647514	32	42	63	81	0.7
647531	25	53	73	80	0.6
647532	26	49	61	82	0.7

[0612] 对于以下表6中的实验,将细胞以20,000个细胞/孔的密度涂铺 并且使用电穿孔,以0.22 μ M、0.67 μ M、2.00 μ M和6.0 μ M浓度的 反义寡核苷酸进行转染。在大约16小时的处理期后,自细胞分离RNA 且通过定量实时PCR测量TMPRSS6 mRNA水平。使用人引物探针 集RTS3840来测量mRNA水平。根据如由RIBOGREEN®所测量的总 RNA含量来调整TMPRSS6 mRNA水平。结果呈现为相对于未处理 的对照细胞的TMPRSS6的抑制百分比。

[0613] 还呈现了各寡核苷酸的半最大抑制浓度(IC₅₀)。在反义寡核苷酸 处理的细胞中,TMPRSS6 mRNA水平以剂量依赖性方式显著降低。

[0614] 表6

[0615] 使用含cEt的寡核苷酸的剂量反应测定

[0616]

ISIS No	0.22 μ M	0.67 μ M	2.00 μ M	6.00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
630497	34	54	81	89	0.5
630689	43	61	77	87	0.3
630692	54	64	85	95	0.2
630693	42	66	75	86	0.3
630696	20	37	66	82	1.1
630717	48	73	84	83	0.1
630718	49	81	88	89	0.1
630719	42	69	83	95	0.3
630722	40	56	70	90	0.4
630726	24	45	64	82	0.9
630727	36	57	73	82	0.5
630794	25	46	71	84	0.8

[0617] 实施例3:靶向人TMPRSS6的5-10-5 MOE缺口聚物在CD1 小鼠中的耐受性

[0618] CD1®小鼠(Charles River,MA)是经常被用于安全性和功效测试 的多用途小鼠模型。将小鼠用选自上述表的约26种ISIS 5-10-5 MOE 缺口聚物反义寡核苷酸处理,并且评价各种血浆化学标志物水平的变化。

[0619] 处理

[0620] 每周两次向六周龄雄性CD1小鼠的组皮下注射50mg/kg的ISIS 寡核苷酸(100mg/

kg/周剂量),持续6周。每周两次向一组雄性CD1 小鼠皮下注射PBS,持续6周。最后一次剂量48小时后使小鼠安乐死,并且收获器官和血浆用于进一步分析。

[0621] 血浆化学标志物

[0622] 为了评价ISIS寡核苷酸对肝和肾功能的作用,使用自动临床化学分析仪(Hitachi Olympus AU400e,Melville,NY)测量了转氨酶(ALT 和AST)、总胆红素(Tbil)、白蛋白(Alb)、肌酸酐(Creat)和BUN的血浆水平。结果呈现于表7中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围的肝或肾功能标志物的任一种的水平变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0623] 表7

[0624] 在第六周时CD1小鼠中的血浆化学标志物

ISIS No.	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	24	51	27	0.17	0.17	2.9
585626	167	155	30	0.18	0.15	2.9
585649	263	157	28	0.17	0.15	3.0
585653	147	89	28	0.18	0.39	3.4
585654	778	300	26	0.15	0.17	3.0
585655	1709	1353	29	0.16	0.35	3.0
585683	45	63	31	0.18	0.20	3.0
585698	53	73	34	0.21	0.19	3.0
585752	90	99	29	0.16	0.17	2.9
585757	246	180	30	0.16	0.15	2.8
585758	212	305	28	0.18	0.28	2.9
585761	659	439	28	0.16	0.43	2.7
585762	597	551	27	0.17	0.64	3.0
585768	483	387	26	0.18	0.19	2.7
585774	109	126	31	0.16	0.14	2.6

[0625]

585775	60	70	28	0.17	0.15	2.9
585776	654	388	27	0.17	0.13	2.9
585777	159	200	24	0.16	0.17	2.7
591466	46	53	27	0.15	0.12	3.0
591491	761	729	28	0.18	0.25	3.2
591514	230	215	33	0.15	0.14	2.5
591536	540	416	26	0.16	0.13	3.0
591537	552	346	27	0.17	0.16	3.0
591549	708	488	30	0.14	0.14	2.7
591550	294	225	31	0.17	0.12	2.9
591552	1098	680	24	0.17	0.17	3.0
591579	135	85	25	0.16	0.12	2.8

[0626] 体重及器官重量

[0627] 在实验开始时测量所有组小鼠的体重,并且每周测量直到研究结束。在研究结束时还测量了肝、脾和肾重量,并且相对于在基线的PBS对照组,体重和器官重量的变化呈现于表8中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围之外的器官重量的任何变化的ISIS寡核苷酸

被排除在进一步的研究之外。

[0628] 表8

[0629] 在第六周时CD1小鼠的体重和相对器官重量(克)

[0630]

ISIS No.	BW变化(g)	相对肝重量(g)	相对肾重量(g)	相对脾重量(g)
PBS	1.4	1.0	1.0	1.0
585626	1.4	1.2	0.9	1.1
585649	1.3	1.2	1.0	1.1
585653	1.4	1.1	1.0	0.9
585654	1.2	1.2	1.0	1.1
585655	1.3	1.4	1.0	1.3
585683	1.4	1.0	0.9	1.1
585698	1.5	1.2	1.0	1.4
585752	1.3	1.1	1.0	1.3
585757	1.4	1.5	1.0	1.1
585758	1.4	1.4	0.9	1.0
585761	1.1	1.4	1.0	1.3
585762	1.2	2.1	1.0	0.8
585768	1.5	1.1	1.1	1.3
585774	1.5	1.1	1.0	1.1
585775	1.5	0.9	1.0	1.2
585776	1.4	1.3	1.1	1.5

585777	1.4	1.2	1.1	1.5
591466	1.5	1.0	1.0	1.0
591491	1.3	1.2	1.0	1.1
591514	1.4	1.1	0.9	1.5
591536	1.4	1.3	1.0	1.1
591537	1.3	1.3	0.9	1.3
591549	1.4	1.2	1.0	1.5
591550	1.4	1.1	0.9	1.5
591552	1.4	1.5	1.1	1.5
591579	1.5	1.0	0.9	1.1

[0631] 从这些耐受性研究,观察到大多数5-10-5MOE缺口聚物反义寡核苷酸在给药6周后耐受性良好。

[0632] 实施例4:靶向人TMPRSS6的含cEt寡核苷酸在CD1小鼠中的耐受性

[0633] CD1®小鼠(Charles River,MA)是经常被用于安全性和功效测试的多用途小鼠模型。将小鼠用选自上述表的约51种含cEt反义寡核苷酸处理,并且评价各种血浆化学标志物水平的变化。

[0634] 处理

[0635] 每周两次向5至6周龄雄性CD1小鼠的组(每个治疗组n=4)皮下注射25mg/kg的ISIS寡核苷酸(50mg/kg/周剂量),持续6周。每周两次向一组雄性CD1小鼠皮下注射PBS,持续6周。最后一次剂量48小时后使小鼠安乐死,并且收获器官和血浆用于进一步分析。收集肝、肾和脾用于组织学,并且收集血浆以测量某些血浆化学标志物的水平。

[0636] 将寡核苷酸分成具有相同条件的两个测试组,并且结果呈现于以下表中。

[0637] 血浆化学标志物

[0638] 为了评价ISIS寡核苷酸对肝和肾功能的作用,使用自动临床化学分析仪(Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)测量了转氨酶、胆红素、白蛋白、肌酐和BUN的血浆水平。结果呈现于表9-10中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围的肝或肾功能标志物的任一种的水平变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0639] 表9

[0640] 在第六周时CD1小鼠中的血浆化学标志物

[0641]

ISIS No.	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	55	53	24	0.1	0.2	2.7
615840	752	636	26	0.15	0.23	2.5
615884	1039	664	25	0.17	0.17	2.8
615898	754	420	25	0.17	0.14	2.5
615901	118	120	22	0.11	0.18	2.5
615903	33	46	22	0.12	0.18	2.5
615909	2042	2464	49	0.16	1.19	2.7
615910	978	1058	22	0.15	1.24	2.4
615911	474	366	23	0.14	0.34	2.4
630696	1117	853	26	0.15	0.21	2.3
630716	41	67	25	0.13	0.14	2.4
630717	1005	483	23	0.13	0.19	2.3
630718	57	86	25	0.13	0.13	2.4
630722	207	168	21	0.13	0.16	2.2
630725	1729	897	20	0.12	0.15	2.2
630726	1330	774	22	0.10	0.10	2.1
630727	614	653	23	0.10	0.13	1.6
630794	39	78	24	0.12	0.16	2.6

[0642] 表10

[0643] 在第六周时CD1小鼠中的血浆化学标志物

[0644]

ISIS No.	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	31.3	54.8	32.3	0.14	0.19	3.0
630497	429.0	297.5	31.0	0.18	0.11	2.8
630689	2088.3	1306.0	34.7	0.10	0.22	2.2
630692	1634.8	1402.5	30.9	0.16	0.25	3.4
630693	1247.5	1193.8	33.6	0.19	0.68	2.8
630719	2553.0	2594.7	28.6	0.12	2.55	3.8
647414	718.5	444.0	32.7	0.13	0.12	3.0
647419	39.3	66.5	27.0	0.13	0.15	2.9
647420	90.3	100.8	30.8	0.13	0.19	3.1
647421	613.3	607.3	15.5	0.09	1.61	2.6
647423	1290.3	807.5	29.8	0.28	0.30	3.7
647424	1451.0	1198.3	25.2	0.16	0.37	3.7
647426	548.5	393.0	23.7	0.12	0.16	2.7
647428	2658.8	2232.8	24.8	0.21	0.52	3.0
647429	1306.3	725.3	23.2	0.12	0.21	2.8

[0645]

647442	564.8	371.5	29.7	0.08	0.13	3.0
647446	69.0	91.3	27.6	0.10	0.14	2.9
647447	61.5	76.3	27.2	0.11	0.13	2.8
647448	100.8	110.5	24.4	0.10	0.14	2.9
647449	61.3	88.0	27.7	0.10	0.13	3.1
647450	1850.8	1512.0	18.3	0.09	0.47	2.9
647451	1376.3	588.3	26.0	0.15	0.29	3.7
647453	1774.3	1674.5	28.8	0.16	1.24	3.7
647454	324.3	409.3	27.0	0.11	0.15	2.7
647457	1609.0	1194.8	25.6	0.12	0.21	2.6
647475	40.0	80.5	25.1	0.10	0.12	2.6
647476	62.0	81.0	26.1	0.11	0.14	2.8
647477	74.8	94.0	26.5	0.11	0.15	2.9
647478	62.0	88.0	28.2	0.11	0.13	3.1
647482	959.8	975.8	25.8	0.11	0.19	2.9
647506	36.3	65.3	25.8	0.10	0.14	2.9
647508	49.8	93.3	26.3	0.11	0.14	3.1
647514	276.0	221.8	28.3	0.11	0.17	2.9
647531	248.5	175.0	28.7	0.11	0.16	3.2
647532	156.8	180.0	21.3	0.09	0.10	3.0

[0646] 体重及器官重量

[0647] 在实验开始时测量所有组小鼠的体重,并且每周测量直到研究结束。在研究结束时还测量了肝、脾和肾重量,并且相对于在基线的 PBS对照组,体重和器官重量的变化呈现于表11-12中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围之外的器官重量的任何变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0648] 表11

[0649] 在第六周时CD1小鼠的体重和相对器官重量(克)

[0650]	ISIS No.	BW 变化 (g)	相对肝重 量(g)	相对肾重量 (g)	相对脾重量 (g)
	PBS	1.5	1	1	1
	615840	1.2	1.1	1.0	0.8
	615884	1.4	1.5	1.1	1.2
	615898	1.5	1.3	1.1	1.4
	615901	1.5	1.3	1.1	2.0
	615903	1.4	1.1	1.1	1.2
[0651]	615909	0.8	1.6	1.2	0.7
	615910	1.2	1.9	1.0	2.3
	615911	1.5	1.4	1.1	1.6
	630696	1.1	1.2	0.9	1.2
	630716	1.4	1.2	1.2	1.2
	630717	1.2	1.4	1.0	1.7
	630718	1.4	1.2	1.1	1.4
	630722	1.6	1.2	1.1	1.6
	630725	1.3	1.2	1.1	1.8
	630726	1.4	1.1	1.2	1.9
	630727	1.3	1.2	1.2	3.5
	630794	1.4	1.0	1.1	1.1

[0652] 表12

[0653] 在第六周时CD1小鼠的体重和相对器官重量(克)

[0654]

ISIS No.	BW 变化 (g)	相对肝重 量(g)	相对肾重量 (g)	相对脾重量 (g)
PBS	1.5	1	1	1
630497	1.3	1.2	1.0	1.1
630689	1.6	1.3	1.0	1.4
630692	1.5	1.9	0.9	1.2
630693	1.2	1.3	0.8	0.9
630719	0.8	1.4	1.1	0.4
647414	1.4	1.2	1.1	1.0
647419	1.5	1.0	1.1	1.2
647420	1.4	1.1	1.0	1.4
647421	1.2	1.1	1.1	1.3
647423	1.4	1.7	1.1	1.3
647424	1.1	1.8	1.2	0.6
647426	1.4	1.5	1.1	1.8
647428	1.3	1.4	1.1	1.9
647429	1.4	1.2	1.0	1.6
647442	1.3	1.1	1.1	1.1
647446	1.4	1.2	1.2	1.4
647447	1.5	1.3	1.2	1.4
647448	1.5	1.1	1.1	1.5
647449	1.5	1.1	1.1	1.6
647450	1.4	1.3	1.1	1.9
647451	1.4	1.6	1.0	1.8

[0655]

647453	1.2	1.8	1.4	1.5
647454	1.5	1.6	1.0	2.2
647457	1.4	1.3	1.0	1.8
647475	1.4	1.2	1.1	1.5
647476	1.5	1.1	1.2	1.8
647477	1.5	1.2	1.0	1.5
647478	1.6	1.1	1.0	1.2
647482	1.4	1.7	1.2	1.5
647506	1.5	1.1	1.0	1.2
647508	1.6	1.0	1.0	1.2
647514	1.5	1.0	1.0	1.5
647531	1.4	1.0	1.0	1.4
647532	1.5	1.3	1.1	1.4

[0656] 实施例5:靶向人TMPRSS6的寡核苷酸在Sprague-Dawley大鼠中的耐受性

[0657] Sprague-Dawley大鼠是用于安全性和功效评价的多用途模型。将大鼠用来自以上实施例中描述的研究的被发现在小鼠中体外有效和耐受的约48种反义寡核苷酸处理，

并且评价各种血浆化学标志物水平的变化。

[0658] 处理

[0659] 将雄性Sprague-Dawley大鼠(约8周龄)维持在12小时亮/暗循环中并且随意喂食Purina正常大鼠食物饲料5001。每周一次向各自4只Sprague-Dawley大鼠的组皮下注射100mg/kg的MOE缺口聚物或50mg/kg的含cEt反义寡核苷酸,持续6周。在最终剂量后1至2天,测定尿蛋白/肌酸酐(P/C)比率,并且在最后一次剂量后3天抽取血液用于以下所述的血液学评估。在最后一次剂量三天后,使大鼠安乐死并且收获器官和血浆用于进一步分析。

[0660] 血浆化学标志物

[0661] 为了评价ISIS寡核苷酸对肝和肾功能的作用,使用自动临床化学分析仪(Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)测量了转氨酶(丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(Tbil)、白蛋白(Alb)、肌酸酐(Creat)和BUN的血浆水平。结果呈现于表13中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围的肝或肾功能标志物的任一种的水平变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0662] 表13

[0663] Sprague-Dawley大鼠中的血浆化学标志物

[0664]

ISIS No.	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	60	92	18	0.3	0.1	3.7
585626	66	139	25	0.4	0.1	3.2
585653	92	154	26	0.4	0.1	3.9
585683	73	109	19	0.4	0.1	3.3
585698	66	104	22	0.4	0.1	3.4
585752	64	145	21	0.4	0.1	3.0
585758	113	669	21	0.3	0.2	2.8
585774	125	220	25	0.4	0.2	3.2
585775	66	117	24	0.4	0.1	3.2
585777	302	321	25	0.4	0.2	3.4
591466	368	444	22	0.4	0.2	3.1
591514	91	218	22	0.3	0.2	3.3
591579	484	655	20	0.4	0.2	3.8
614954	146	132	26	0.1	0.2	2.8
615895	291	383	26	0.4	0.2	3.4
615897	1946	1467	26	0.5	0.2	4.0
615899	70	113	25	0.4	0.1	3.4
615900	93	131	26	0.4	0.1	3.1
615903	59	70	22	0.4	0.1	3.5
630716	57	86	26	0.5	0.1	3.1
630718	61	72	23	0.4	0.1	3.4
630722	117	153	24	0.4	0.1	3.2
630794	90	113	29	0.5	0.1	3.4
630800	92	133	25	0.4	0.1	3.6
630948	48	77	21	0.4	0.1	3.3
630950	79	83	25	0.4	0.1	3.3
630952	208	243	31	0.4	0.2	2.9
630953	87	135	22	0.4	0.1	3.0
630957	110	115	26	0.4	0.1	3.6

[0665]

637749	63	102	25	0.1	0.2	3.2
647384	135	158	24	0.4	0.1	3.7
647389	243	272	25	0.2	0.2	3.6
647391	205	520	27	0.0	1.1	2.1
647393	142	172	27	0.2	0.1	3.4
647394	391	340	29	0.1	0.2	2.8
647395	68	95	24	0.1	0.1	3.2
647419	53	66	23	0.4	0.1	3.5
647420	56	80	23	0.1	0.1	3.3
647446	66	110	23	0.2	0.1	3.4
647447	54	67	22	0.1	0.1	3.1
647448	55	73	26	0.4	0.1	3.3
647449	46	81	24	0.4	0.1	3.2
647475	45	78	26	0.4	0.1	3.5
647476	52	85	20	0.4	0.1	3.2
647477	58	89	24	0.5	0.1	3.5
647478	50	82.8	22.8	0.4	0.1	3.2
647506	45	95.3	22.9	0.4	0.1	3.2
647508	73	183.3	33.3	0.3	0.1	2.5
647532	108	179.5	47.8	0.5	0.1	1.8

[0666] 表14

[0667] Sprague-Dawley大鼠的尿中的P/C比率

[0668]

PBS	1.0
585626	6.7
585653	9.4
585683	7.0
585698	6.2
585752	13.4
585758	11.5
585774	7.5
585775	6.7
585777	7.6
591466	8.0
591514	8.0
591579	7.3
614954	5.2
615895	2.9
615897	4.7

[0669]

615899	4.2
615900	4.5
615903	5.7
630716	3.9
630718	4.5
630722	4.3
630794	2.3
630800	5.1
630948	2.4
630950	6.3
630952	6.6
630953	4.4
630957	3.8
637749	3.0
647384	2.2
647389	2.4
647391	3.4
647393	3.7
647394	9.9
647395	5.2
647419	5.0
647420	4.9
647446	3.8
647447	3.9
647448	5.6
647449	5.0
647475	4.1
647476	4.6
647477	5.8
647478	4.6
647506	4.7
647508	9.2
647532	49.4

[0670] 血液学测定

[0671] 从含有K₂-EDTA的管中的每个可用研究动物收集大约1.3mL血液的血液样品,并且送至IDEXX Laboratories, Inc. (Fremont, CA) 用于红血细胞计数 (RBC) 计数和白血细胞计数 (WBC) 计数、个别白血细胞计数 (如单核细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞的白血细胞计数) 以及血小板计数、总血红蛋白含量和血细胞比容 (HCT) 的测量和分析。结果呈现于表15中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围的血液学标志物的任一种的水平变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0672] 表15

[0673] Sprague-Dawley大鼠中的血液学标志物

[0674]

ISIS No.	WBC (x 10 ³ /μL)	RBC (x 10 ⁶ /μL)	HCT (%)	淋巴 细胞 (/mm ³)	单核 细胞 (/mm ³)	血小板 (x 10 ³ /μL)
PBS	4.8	8.5	52.7	3567	93	812
585626	10.1	8.3	46.9	8969	252	1237
585653	13.8	8.2	48.3	11190	359	1305
585683	17.8	7.9	45.7	15773	557	826
585698	16.9	7.9	46.0	15380	344	761
585752	15.3	8.0	46.0	11396	585	1158
585758	18.4	7.9	44.0	6369	61	1548
585774	14.7	8.5	48.6	12818	552	873
585775	7.3	8.4	48.4	6218	219	1161
585777	11.2	8.1	47.1	9548	175	982
591466	14.3	8.1	45.6	12519	226	812
591514	14.9	8.5	48.2	10993	169	1157
591579	12.5	9.1	51.1	8540	222	1080
614954	13.6	5.2	29.9	12186	441	511
615895	15.2	8.0	45.9	11868	603	926
615897	14.5	7.5	43.3	10920	786	902
615899	19.8	7.8	43.7	17319	525	566
615900	14.0	7.1	41.0	12167	267	770
615903	9.4	8.5	51.3	7113	268	687
630716	21.1	7.8	45.3	18994	449	601
630718	8.9	8.9	52.5	7071	269	657
630722	17.0	9.1	51.6	13397	721	693
630794	8.8	8.7	50.5	7098	137	529
630800	16.6	8.0	45.3	13210	478	695
630948	7.2	8.5	50.2	5359	158	670
630950	11.0	8.8	52.4	8833	307	544
630952	24.2	7.7	42.8	17991	798	958
630953	25.0	6.9	42.4	20205	713	662
630957	11.7	8.7	50.5	8913	340	684

[0675]

637749	12.8	7.5	44.7	10837	765	661
647384	14.8	9.0	54.5	11682	354	642
647389	12.8	8.2	51.0	10621	534	1075
647391	16.8	2.3	20.3	13574	807	240
647393	14.5	6.9	40.8	12467	423	1112
647394	24.9	6.5	39.6	21847	1070	990
647395	10.4	7.4	45.2	8685	515	1092
647419	13.8	8.3	48.5	11866	257	939
647420	11.1	8.0	47.3	9350	521	1079
647446	5.9	7.5	44.8	4805	258	1076
647447	10.2	7.8	47.3	8542	260	1019
647448	10.7	7.9	45.3	9050	260	933
647449	21.1	7.7	45.5	18809	479	630
647475	17.4	8.3	49.0	14951	562	776
647476	14.2	8.3	47.7	12336	339	979
647477	16.8	8.3	46.3	14089	726	697
647478	23.7	7.4	42.9	22039	440	762
647506	12.9	7.9	45.4	11679	268	711
647508	12.2	6.8	38.8	9800	431	647
647532	33.1	5.3	31.0	27732	963	844

[0676] 体重及器官重量

[0677] 在实验开始时测量所有组大鼠的体重,并且每周测量直到研究结束。在研究结束时还测量了肝、脾和肾重量,并且相对于在基线的 PBS对照组,体重和器官重量的变化呈现于表16中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围之外的器官重量的任何变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0678] 表16

[0679] 在第六周时Sprague-Dawley大鼠的体重和相对器官重量(克)

[0680]

ISIS No.	肝(g)	肾(g)	脾(g)	体重(g)
PBS	1.0	1.0	1.0	1.8
585626	1.1	0.9	2.3	1.4
585653	1.1	1.0	2.1	1.5
585683	1.1	0.9	3.3	1.4
585698	1.1	0.9	2.8	1.4

[0681]

585752	1.1	0.9	2.5	1.3
585758	1.5	0.9	2.3	1.2
585774	1.1	0.9	2.2	1.4
585775	1.0	0.9	1.7	1.3
585777	1.0	0.9	2.3	1.4
591466	1.0	0.9	2.7	1.3
591514	1.1	1.0	2.4	1.1
591579	1.0	0.8	1.9	1.3
614954	1.4	1.3	4.1	1.4
615895	1.0	1.1	1.7	1.5
615897	1.3	1.1	2.1	1.7
615899	1.1	1.1	2.0	1.6
615900	1.2	1.2	2.1	1.8
615903	1.2	1.0	1.5	1.9
630716	1.1	1.1	2.8	1.6
630718	1.1	1.0	2.1	1.8
630722	1.2	1.2	1.6	1.5
630794	0.9	1.0	1.6	1.8
630800	1.3	1.3	2.4	1.6
630948	1.0	1.1	1.7	1.9
630950	1.2	1.0	2.3	1.8
630952	1.4	1.3	2.6	1.2
630953	1.4	1.2	4.2	1.6
630957	1.2	1.0	1.7	1.6
637749	1.4	1.3	4.4	1.4
647384	1.0	1.0	1.1	1.7
647389	1.0	1.1	1.8	1.7
647391	1.8	1.5	13.1	1.4
647393	1.3	1.1	1.8	1.6
647394	1.2	1.2	2.8	1.6
647395	1.3	1.3	1.8	1.7
647419	1.3	1.1	1.6	1.8
647420	1.2	1.1	2.1	1.6
647446	1.3	1.2	2.3	1.8
647447	1.1	1.1	1.9	1.7
647448	1.2	1.2	1.6	1.7
647449	1.2	1.2	1.7	1.7
647475	1.2	1.1	1.5	1.7
647476	1.1	1.1	1.5	1.5
647477	1.2	1.1	1.7	1.6
647478	1.2	1.3	1.8	1.7
647506	1.2	1.3	2.0	1.6

[0682]

647508	1.7	2.1	2.9	1.3
647532	2.0	1.7	3.7	1.3

[0683] 实施例6:TMPRSS6在转基因小鼠模型中的反义抑制作用

[0684] 进一步评价了在上述大鼠研究中发现可耐受的约32种反义寡核苷酸在具有人TMPRSS6转基因的小鼠(“huTMPRSS6”或“Tg”小鼠)中降低人TMPRSS6 mRNA转录物的能力。

[0685] 处理

[0686] 向8至16周龄的雄性和雌性huTMPRSS6转基因小鼠皮下注射 在两周的时间段内施用的5个剂量的6mg/kg/剂量的靶向TMPRSS6 的ISIS反义寡核苷酸(总计30mg/kg),或皮下注射PBS作为对照。每个处理组由4只动物组成。在施用最后一次剂量四十八小时后,从 每只小鼠中抽血并且将小鼠杀死并收集组织。

[0687] RNA分析

[0688] 在研究结束时,从肝中提取RNA以用于肝TMPRSS6 mRNA表达的实时PCR分析。结果在表17中呈现为相对于PBS处理的动物的抑制百分比。使用人引物探针集RTS4586(正向序列 TGATAACAGCTGCCCACTG,在本文中指定为SEQ ID NO:86;反向序列 TCACCTTGAAGGACACCTCT,在本文中指定为SEQ ID NO:87;探针序列 AGTTCTGCCACACCTTGCCCA,在本文中指定为SEQ ID NO:88)来测量mRNA水平。将mRNA水平用亲环素A(一种管家基因)的水平标准化,所述水平使用引物探针集mCYCLO_24(正向序列 TCGCCGCTTGCTGCA,在本文中指定为SEQ ID NO:89;反向序列ATCGGCCGTGATGTCGA,在本文中指定为SEQ ID NO:90;探针序列CCATGGTCAACCCACCGTGTC,在本文中指定为SEQ ID NO:91)测定。

[0689] 表17

[0690] 标准化至PBS表达的TMPRSS6 mRNA在转基因小鼠肝中的抑制%

ISIS No	抑制%
585626	57
585653	74
585683	81
585698	59
585698	59
585774	69
585775	81
591514	73
615899	88
615900	88
615903	97
630716	82
630718	99
630722	92
630794	71
630800	81
630948	65
630950	81

630957	70
647384	66
647393	95
647395	100
647419	99
647420	96
647446	84
647447	89
647448	96
647449	88
647475	84
647476	84
647477	96
647478	91
647506	91

[0692] 实施例7:缀合至靶向TMPRSS6的GalNAc₃的反义化合物

[0693] 选择在上述实施例中发现有效和可耐受的靶向TMPRSS6的选定 反义寡核苷酸的序列作为亲本序列来设计靶向人TMPRSS6的新的 GalNAc₃缀合的反义化合物。

[0694] 如以下表18中所总结,在此实施例中描述的新设计的反义化合物各自具有5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃端帽。ISIS 702843是具有带有5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃端帽的混合(硫代磷酸酯和 磷酸二酯)主链(“MBB”)的5-10-5MOE缺口聚物。ISIS 705051、705052 和705053是具有带有5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃端帽的硫代 磷酸酯主链的5-10-5MOE缺口聚物。ISIS 706940是具有所有硫代磷酸酯核苷间键联和5'-三己基氨基-(THA)-C6GalNAc₃端帽的3-10-3 cEt缺口聚物;ISIS 706941、706942和706943是具有带有5'-三己基 氨基-(THA)-C6GalNAc₃端帽的硫代磷酸酯主链的脱氧、MOE和含 (S)-cEt缺口聚物。

[0695] 表18

[0696] 靶向TMPRSS6 mRNA的八种未缀合的反义化合物和相应的GalNAc₃缀合物反义化合物

[0697]

亲本 序列 ISIS#	GalNAc 缀合的 ISIS#	主链	长度	序列	化学	SEQ ID NO
585774	702843	MBB	20	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	36
585774	705051	PS	20	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	36
585683	705052	PS	20	GCACGGCAAATCATACTTCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	23
585775	705053	PS	20	AGCTTTATTCCAAAGGGCAG	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	37
630718	706940	PS	16	AGCTTTATTCCAAAGG	5'-THA GalNAc ₃ kkk-d10-kkk	63
647477	706941	PS	16	AGCTTTATTCCAAAGG	5'-THA GalNAc ₃ kk-d8-eeekkk	63
647449	706942	PS	16	CAGCTTTATTCCAAAG	5'-THA GalNAc ₃ kk-d9-eeekkk	77
647420	706943	PS	16	CAGCTTTATTCCAAAG	5'-THA GalNAc ₃ kek-d9-eeekkk	77

[0698] 表18中描述的所有寡核苷酸序列都与人和恒河猴序列互补。在进行本文所述的研究时,针对TMPRSS6的食蟹猴基因组序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库中是不可用的;因此,不能确认靶向人TMPRSS6的反义寡核苷酸与食蟹猴基因组序列的交叉反应性。取而代之,将反义寡核苷酸的序列与恒河猴序列针对同源性进行比较。预期与恒河猴序列具有同源性的ISIS寡核苷酸也与食蟹猴序列完全交叉反应。

[0699] 选择用于GalNAc缀合的反义寡核苷酸与恒河猴基因组序列(从核苷酸380000至422000截短的GENBANK登录号NW_001095180.1 的补体,在本文中指定为SEQ ID NO:95)完全互补。恒河猴序列的每个寡核苷酸的起始位点和终止位点呈现于表19中,而人序列的每个寡核苷酸的起始位点和终止位点呈现于表20中。“起始位点”表示恒河猴或人序列中缺口聚物所靶向的最5'核苷酸。

[0700] 表19

[0701] 与恒河猴TMPRSS6基因组序列(SEQ ID NO:95)互补的ASO

[0702]

ISIS No	恒河猴 起始 位点	恒河猴 终止 位点	化学	序列	SEQ ID NO
585774	40518	40537	5-10-5 MOE	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	36
702843	40518	40537	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	36
705051	40518	40537	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	CTTTATTCCAAAGGGCAGCT	36
705052	22499	22518	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	GCACGGCAAATCATACTTCT	23
705053	40520	40539	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	AGCTTTATTCCAAAGGGCAG	37
630718	40524	40539	kkk-10-kkk	AGCTTTATTCCAAAGG	63
706940	40524	40539	5'-THA GalNAc ₃ kkk-10-kkk	AGCTTTATTCCAAAGG	63
706941	40524	40539	5'-THA GalNAc ₃ kk-8-eeekkk	AGCTTTATTCCAAAGG	63
706942	40525	40540	5'-THA GalNAc ₃ kk-9-eeekkk	CAGCTTTATTCCAAAG	77
706943	40525	40540	5'-THA GalNAc ₃ kk-9-eeekkk	CAGCTTTATTCCAAAG	77

[0703] 表20

[0704] 由GalNAc₃修饰的反义寡核苷酸靶向的TMPRSS6 mRNA (SEQ ID NO:1) 和/或基因组 (SEQ ID NO:2) 序列上的位点

ISIS NO	SEQ ID NO:1 起始位点	SEQ ID NO:1 终止位点	SEQ ID NO:2 起始位点	SEQ ID NO:2 终止位点	SEQ ID NO
702843	3162	3181	44924	44943	36
705051	3162	3181	44924	44943	36
705052	1286	1305	26046	26065	23
705053	3164	3183	44926	44945	37
706940	3168	3183	44930	44945	63
706941	3168	3183	44930	44945	63
706942	3169	3184	44931	44946	77
706943	3169	3184	44931	44946	77

[0706] 实施例8:靶向人TMPRSS6的GalNAc₃修饰的反义寡核苷酸 在CD-1小鼠中的耐受性

[0707] 用以上表18中描述的ISIS GalNAc₃修饰的反义寡核苷酸处理 **CD1®** 小鼠 (Charles River, MA), 并且评价各种血浆化学标志物水平的 变化。

[0708] 处理

[0709] 每周两次向6周龄雄性CD1小鼠的组 (每个治疗组n=4) 皮下注射 40mg/kg的ISIS MOE缺口聚物GalNAc₃修饰的反义寡核苷酸 (80 mg/kg/周剂量) 或20mg/kg的以上表14中所述的ISIS含(S) -cEt缺口 聚物GalNAc₃修饰的反义寡核苷酸 (40mg/kg/周剂量) 持续6周。每周 两次向一组雄性CD1小鼠皮下注射PBS, 持续6周。最后一次剂量 48小时后使小鼠安乐死, 并且收获器官和血浆用于进一步分析。收集肝、肾、脾、心脏和肺用于组织学, 并且收集血浆以测量某些血浆 化学标志物的水平。

[0710] 血浆化学标志物

[0711] 为了评价ISIS GalNAc₃修饰的寡核苷酸对肝和肾功能的作用, 使用自动临床化学分析仪 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) 测量 了转氨酶、胆红素、白蛋白、肌酐和BUN的血浆水平。结果呈现 于表21中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围的肝或肾功能标志物 的任一种的水平变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0712] 表21

[0713] 在第六周时CD1小鼠中的血浆化学标志物

[0714]

ISIS No.	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	32	70	27.3	0.12	0.17	2.8
702843	59	72	28	0.17	0.16	2.9
705051	47	73	26.6	0.16	0.17	2.8
705052	81	94	26.3	0.16	0.17	2.8
705053	139	129	28.2	0.17	0.18	2.9
706940	46	66	28.1	0.18	0.14	3.0
706941	40	57	25.5	0.18	0.16	2.9

706942	195	145	27	0.16	0.14	3.0
706943	178	144	26.1	0.16	0.16	3.9

[0715] 体重及器官重量

[0716] 在实验开始时测量所有组小鼠的体重,并且每周测量直到研究结束。在研究结束时还测量了肝、肾和脾重量,并且相对于在基线的 PBS对照组,体重和器官重量的变化呈现于表22中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围之外的器官重量的任何变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0717] 表22

[0718] 在第六周时CD1小鼠的体重和相对器官重量的变化(克)

[0719]

ISIS No.	BW 变化 (g)	相对肝重量(g)	相对肾重量 (g)	相对脾重量 (g)
----------	--------------	----------	--------------	--------------

[0720]

PBS	1.41	1.00	1.00	1.00
702843	1.39	1.05	1.00	1.08
705051	1.38	0.98	1.00	1.05
705052	1.39	1.02	0.96	1.32
705053	1.37	1.03	0.98	1.22
706940	1.31	0.97	1.01	1.16
706941	1.39	0.90	0.98	1.12
706942	1.39	1.09	1.09	1.40
706943	1.44	1.06	1.02	1.08

[0721] 血液学

[0722] 为了评价CD1小鼠中的ISIS GalNAc₃修饰的反义寡核苷酸对血液学参数的任何影响,从含有K₂-EDTA的管中的每个可用研究动物收集大约1.3mL血液的血液样品。使用ADVIA120血细胞分析仪(Bayer, USA)分析样品的红血细胞(RBC)计数、白血细胞(WBC)计数、个别白血细胞计数(诸如单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞的计数)以及血小板计数、血红蛋白含量和血细胞比容。数据呈现于表23中。

[0723] 所述数据示出寡核苷酸不会引起超出在此剂量下的寡核苷酸的预期范围之外的血液学参数的显著变化。通常,ISIS GalNAc缀合的反义寡核苷酸在小鼠的血液学参数方面是良好耐受的。

[0724] 表23

[0725] CD1小鼠中的血细胞计数

ISIS No.	WBC (x 10 ³ /μL)	RBC (x 10 ⁶ /μL)	HCT (%)	淋巴细胞 (/mm ³)	单核细胞 (/mm ³)	血小板 (x 10 ³ /μL)
PBS	2.9	8.9	49.9	1916.5	38.8	659.0
702843	4.9	8.9	48.5	3630.0	90.3	700.5
705051	4.0	8.5	47.8	2961.0	80.7	781.3
705052	3.2	9.3	50.7	2553.7	146.0	750.7
705053	5.3	9.1	49.8	3856.0	179.5	913.3
706940	3.7	8.5	46.7	2591.3	154.0	935.3
706941	5.5	8.8	49.9	3940.3	177.5	911.8
706942	5.7	9.4	51.8	4126.3	155.3	955.7
706943	3.4	8.9	48.2	3067.0	0.0	1021.3

[0728] 进行来自CD-1小鼠的肝、脾、肾脏、心脏和肺中的GalNAc缀合的TMPRSS6反义化合物的组织学评估。总体而言,尽管在肝中以比未缀合的寡核苷酸具有多大约8倍活性的剂量给予GalNAc₃缀合的反义寡核苷酸,但它们是用于抑制TMPRSS6的良好耐受的和有用的化合物,并且是用于治疗铁积聚疾病、病症或病状的重要候选物。

[0729] 实施例9:靶向TMPRSS6的反义寡核苷酸在huTMPRSS6转基因小鼠中的剂量反应

[0730] 测试了八种靶向TMPRSS6的ISIS GalNAc₃修饰的反义寡核苷酸 (ISIS No. 702843、705051、705052、705053、706940、706941、706942 和706943) 以及两种母体化合物 (ISIS 585774和ISIS 630718), 并且在剂量-反应研究中评价了其在huTMPRSS6转基因小鼠中抑制人 TMPRSS6 mRNA表达的能力。

[0731] 处理

[0732] 将huTMPRSS6Tg小鼠维持在12小时亮/暗循环中,并且随意喂食正常小鼠食物。在开始实验之前,使动物在研究设备中适应至少7天。在缓冲盐水(PBS)中制备反义寡核苷酸(ASO),并通过0.2微米过滤器过滤灭菌。将寡核苷酸溶解于0.9%PBS中用于注射。

[0733] 将大约3.5至4.5个月龄的雄性和雌性huTMPRSS6小鼠分成44组,每组4只小鼠(在每个组中2只雄性和2只雌性)。小鼠接受皮下注射ISIS寡核苷酸,每周两次,持续三周。一组小鼠接受每周两次皮下注射PBS,持续三周。在施用最后一次剂量四十八小时后,从每只小鼠中抽血并且将小鼠杀死并收集组织。

[0734] RNA分析

[0735] 在处理期结束时,从转基因小鼠的肝中提取总RNA以用于人TMPRSS6 mRNA表达的定量实时PCR分析和测量。将TMPRSS6 mRNA水平用亲环素A(一种管家基因)的水平标准化,亲环素A的水平根据标准方案使用mCYCLO₂₄引物探针集测定。以下结果作为标准化至PBS处理的对照的每个处理组的TMPRSS6 mRNA水平的平均百分比呈现在表24中并且表示为“%PBS”。100以上的值被简单地记为“100”。负值被简单地记为“0”。

[0736] 使用人引物探针集RTS4586(正向序列 TGATAACAGCTGCCCACTG,在本文中指定为SEQ ID NO:86;反向序列TCACCTTGAAGGACACCTCT,在本文中指定为SEQ ID NO: 87;探针序

列AGTTCTGCCACACCTTGCCCA,在本文中指定为SEQ ID NO:88)来测量mRNA水平。

[0737] 表24

[0738] 在Tg小鼠中对靶向TMPRSS6的8种ISIS GalNAc₃缀合的化合物和 两种未缀合的化合物的反应

[0739]

处理	剂量 (mpk/wk)	TMPRSS6 % PBS	TMPRSS6 抑制 %
585774	100	4	96
	30	35	65
	10	99	1
	3	100	0
702843	10	0	100
	3	16	84
	1	55	45
	0.3	100	0
705051	10	1	99
	3	68	32
	1	72	28
	0.3	100	0
705052	10	28	72
	3	23	77
	1	100	0
	0.3	100	0
705053	10	7	93
	3	30	70
	1	100	0
	0.3	100	0
630718	30	0	100
	10	37	63
	3	100	0
	1	100	0
706940	3	0	100
	1	4	96
	0.3	52	48
	0.1	100	0

[0740]	706941	3	8	92
		1	71	29
		0.3	100	0
		0.1	100	0
	706942	3	2	98
		1	47	53
		0.3	82	18
		0.1	100	0
	706943	3	2	98
		1	15	85
		0.3	100	0
		0.1	100	0

[0741] 血浆化学标志物

[0742] 为了评价ISIS寡核苷酸对肝和肾功能的作用,使用自动临床化学分析仪(Hitachi Olympus AU400e,Melville,NY)测量了转氨酶、胆红素和BUN的血清水平并且呈现于以下表25中。引起超出反义寡核苷酸的预期范围的肝或肾功能标志物的任一种的水平变化的ISIS寡核苷酸被排除在进一步的研究之外。

[0743] 表25

[0744] 靶向TMPRSS6的八种ISIS GalNAc₃修饰的ASO和两种未缀合的化合物在转基因小鼠中的血清化学

[0745]		剂量 (mg/kg/wk)	ALT	AST	BUN
	PBS	n/a	39.5	64.8	40.4
	5857 74	100	40.8	68.5	42.5
		30	36.5	70.8	37.2
		10	38.5	59.0	38.9
		3	39.8	59.5	41.6
	7028 43	10	38.3	57.3	35.6
		3	41.8	65.5	38.9
		1	41.8	100.	34.7

[0746]

			3	
	0.3	43.3	65.3	38.8
7050 51	10	47.3	79.8	35.4
	3	37.0	58.5	34.9
	1	33.0	57.0	35.7
	0.3	42.0	67.5	34.6
7050 52	10	34.8	61.5	33.9
	3	37.0	62.5	32.8
	1	35.8	57.8	35.1
	0.3	35.0	65.0	34.1
7050 53	10	39.0	55.8	32.4
	3	35.3	62.8	38.6
	1	39.8	73.5	36.6
	0.3	39.5	73.3	37.9
6307 18	30	58.8	160. 8	37.7
	10	38.3	73.0	33.8
	3	39.3	92.3	32.8
	1	38.0	67.8	35.0
7069 40	3	36.3	54.8	33.7
	1	39.8	65.0	35.7
	0.3	38.3	66.8	34.9
	0.1	36.8	52.8	31.8
7069 41	3	37.5	59.0	31.6
	1	34.3	75.8	32.3
	0.3	40.5	72.8	34.9
	0.1	45.3	63.8	31.3
7069 42	3	34.3	90.5	35.8
	1	36.8	58.3	32.8
	0.3	46.8	270. 0	39.8
	0.1	35.5	76.5	31.0
7069 43	3	35.5	81.3	34.6
	1	33.3	71.8	31.0
	0.3	35.0	54.5	32.2
	0.1	42.3	60.0	33.1

[0747] 所有GalNAc缀合的ASO都是良好耐受的,器官和体重以及血清转氨酶水平均无明显变化。

[0748] 计算了每种ASO的半最大有效剂量(ED_{50})并且呈现于以下表26中。

[0749] 表26

[0750] 靶向TMPRSS6的八种ISIS GalNAc₃修饰的ASO和两种未缀合的化合物的效力

[0751]

ISIS #	ED ₅₀ (mpk/wk)
585774	26.0
702843	约 1.0
705051	3.7
705052	约 2.7
705053	约 2.8
630718	约 9.7
706940	约 0.3
706941	1.3
706942	0.9
706943	约 0.9

[0752] ED₅₀ 计算表明, GalNAc缀合的ASO比未缀合的ASO效力高大约10倍。ISIS 702843是最有效的GalNAc缀合的5-10-5MOE缺口 聚物化合物。

[0753] 实施例10: 靶向TMPRSS6的反义寡核苷酸的粘度评估

[0754] 测量了反义寡核苷酸的粘度, 目的是筛选出粘度大于40cP的反义寡核苷酸。粘度大于40cP的寡核苷酸对于施用至受试者将不是最佳的。

[0755] 将ISIS寡核苷酸(32-35mg) 称量到玻璃小瓶中, 添加120μL的水, 并通过在50℃下加热小瓶将反义寡核苷酸溶解于溶液中。将预加热的样品的一部分(75μL) 移液至微量粘度计(Cambridge)。微量粘度计的温度设定为25℃并且测量样品的粘度。将预加热的样品的另一部分(20μL) 移液到10mL的水中, 以在85℃下在260nm下UV读取(Cary UV instrument)。结果呈现于表27中, 并且表明大多数GalNAc反义寡核苷酸溶液在上述标准下其粘度是最佳的。反义寡核苷酸 706941是唯一具有高于40cP的粘度水平的所测试的反义寡核苷酸。

[0756] 表27

[0757] GalNAc-缀合的ASO的粘度数据

[0758]

ISIS #	化学	cP
702843	5'-THAGalNAc ₃ 5-10-5 MOE (MBB)	33
705051	5'-THAGalNAc ₃ 5-10-5 MOE (PS)	23
705052	5'-THAGalNAc ₃ 5-10-5 MOE (PS)	16
705053	5'-THAGalNAc ₃ 5-10-5 MOE (PS)	26
706940	5'-THAGalNAc ₃ kkk-10-kek (PS)	39
706941	5'-THAGalNAc ₃ kk-8-eeeekk (PS)	54
706942	5'-THAGalNAc ₃ kk-9-eeekk (PS)	20
706943	5'-THAGalNAc ₃ kek-9-eeekk (PS)	19

[0759] 实施例11:在食蟹猴中通过包含GalNAc₃缀合物的靶向 TMPRSS6的寡核苷酸进行的体内反义抑制

[0760] 在进行此研究时,针对TMPRSS6的食蟹猴基因组序列在National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库中是不可用的;因此,不能确认靶向人TMPRSS6的反义寡核苷酸与食蟹猴基因序列的交叉反应性。取而代之,如以上实施例6中所描述将反义寡核苷酸的序列与恒河猴序列针对同源性进行比较。预期与恒河猴序列具有同源性的ISIS寡核苷酸也与食蟹猴序列完全交叉反应。

[0761] 选择用于在食蟹猴中测试的十种人TMPRSS6反义寡核苷酸与如在以上实施例6中所述的恒河猴基因组序列(SEQ ID NO:95)具有0个错配。

[0762] 研究设计

[0763] 在雄性食蟹猴中的TMPRSS6 mRNA的反义抑制的13周研究中评价了十种反义寡核苷酸的药效和耐受性,以及其在肝和肾中的药代动力学概况。通过皮下施用靶向TMPRSS6的8种ISIS GalNAc₃修饰的ASO和两种未缀合的母体反义寡核苷酸处理猴,如表28中所示。

[0764] 表28

[0765] 在食蟹猴研究中比较的ASO

[0766]

组	ISIS#	剂量
1	PBS对照	n/a
2	585774	25mpk
3	705051	30mpk
4	705052	30mpk
5	705053	30mpk
6	702843	30mpk
7	705051	5mpk
8	702843	5mpk
9	630718	23mpk

10	706940	30mpk
11	706941	30mpk
12	706942	30mpk
13	706943	30mpk
14	706940	5mpk

[0767] 评估了GalNAc缀合的ASO的高剂量(30mpk)组的毒性。将GalNAc缀合的ASO的低剂量(5mpk)组与相应的未缀合的亲本序列进行比较以评估活性。第2、3、6、7和8组是相同的序列,并且混合主链(MBB)化合物ISIS No.702843在低剂量和高剂量下进行测试,以及与完全硫代磷酸酯化合物ISIS No.705051(也在低剂量和高剂量下测试)进行比较。第9、10、11和14组是相同的序列,并且ISIS No.706940在低剂量和高剂量下进行测试。

[0768] 处理

[0769] 在研究之前,将猴保持隔离,在此期间,每天观察动物的一般健康状况。猴年龄为2至4岁,体重为2至4kg。将56只雄性食蟹猴随机分为14个处理组,每组4只猴。使用不锈钢给药针头和适当尺寸的注射器将猴各自每隔一天皮下注射持续第一周,且然后每周一次持续11周,共计15个剂量的ISIS寡核苷酸或PBS。尾部放血在第一次施用前1周进行,然后在第9、16、30、44、58、72和86天再次进行。

[0770] 在研究期间,每天两次观察猴的生病或不适的迹象。在与实验负责人协商后,由兽医得到批准的止痛剂或缓解疼痛的试剂处理经历因治疗、损伤或生病所引起的超过瞬时或轻微的疼痛或不适的任何动物。鉴定出任何处于不良健康状况或处于可能的濒死状况的动物以供进一步监测以及可能的安乐死。动物的计划安乐死在第86天进行。实施例中所所述的实验方案由Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)批准。

[0771] 在第一剂量之前和之后的不同时间点,针对临床病理学终点(血液学、临床化学、凝血、补体Bb和C3、细胞因子和趋化因子分析)进行抽血,并且还测量了尿化学。在基线和实验期结束时,测量了某些药理学终点,如肝TMPRSS6 mRNA表达、血清铁调素(Intrinsic LifeSciences, San Diego, CA)、血清铁和血清转铁蛋白饱和度。在研究结束时,测量身体和器官重量、组织的组织病理学以及肝和肾的PK分析。没有观察到体重、细胞因子或白蛋白水平的显著变化。

[0772] TMPRSS6 RNA分析

[0773] 在研究结束时,从肝中提取RNA以用于使用各种引物探针集进行TMPRSS6的mRNA表达的测量的实时PCR分析。使用引物探针集RTS3840的代表性数据呈现于以下表中。表29中的结果被呈现为用亲环素(mCYCLO_24引物探针集)标准化的相对于盐水对照的TMPRSS6 mRNA的抑制百分比。

[0774] 表29

[0775] 在12周ASO施用后,猴肝TMPRSS6 mRNA的降低

[0776]

处理	剂量 (mg/kg)	抑制%	组
585774	25	76	2
705051	30	90	3
705052	30	64	4
705053	30	49	5
702843	30	89	6
705051	5	77	7
702843	5	82	8
630718	23	65	9
706940	30	71	10
706941	30	72	11
706942	30	93	12
706943	30	91	13
706940	5	61	14

[0777] ISIS No.705051、702843、706942和706943非常有效,在给药 13周后在30mpk下展示 $\geq 89\%$ 的靶标降低。

[0778] 铁调素分析

[0779] 在以下表30中所示的时间点测量血清铁调素水平。结果被呈现 为盐水对照百分比。“第-7天”表示在施用第一剂量之前一周。

[0780] 表30

[0781] 猴血清铁调素水平

[0782]

	剂量 (mg/kg)	第-7 天	第 9 天	第 16 天	第 44 天	第 86 天
盐水	n/a	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
585774	25	0.9	1.3	1.4	1.1	1.4
705051	30	0.9	1.1	1.5	1.5	1.8
702843	30	0.9	1.2	1.2	1.3	1.9
706942	30	0.7	1.0	1.5	1.3	1.9
706943	30	0.8	0.9	1.5	1.2	1.6

[0783] 该表显示,在研究过程中血清铁调素水平升高。

[0784] 血清铁和转铁蛋白饱和度分析

[0785] 来自14个治疗组中的每一个的四名受试者的平均值呈现于以下 表31中。如表31中所示,与对照相比,血清铁水平和转铁蛋白饱和度(“Tf sat”)在处理组中在第86天降低。

[0786] 表31

[0787] 在第86天的猴血清铁和转铁蛋白饱和度水平

[0788]

组#	处理	剂量 (mg/kg)	铁	Tf sat
1	盐水	n/a	125.7	38.8
2	585774	25	55.2	15.7
3	705051	30	36.6	10.0
4	705052	30	61.9	15.8
5	705053	30	96.0	27.0
6	702843	30	42.3	13.3
7	705051	5	63.7	20.0
8	702843	5	51.7	16.5
9	630718	23	61.4	17.7

[0789]

10	706940	30	71.6	20.5
11	706941	30	55.7	15.8
12	706942	30	25.9	6.9
13	706943	30	30.3	7.4
14	706940	5	82.8	23.7

[0001]	序列表		
[0002]	<110>	IONIS制药公司	
[0003]	<120>	用于调节TMPRSS6表达的化合物和方法	
[0004]	<130>	BIOL0271W0	
[0005]	<150>	62/142,986	
[0006]	<151>	2015-04-03	
[0007]	<160>	95	
[0008]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
[0009]	<210>	1	
[0010]	<211>	3212	
[0011]	<212>	DNA	
[0012]	<213>	智人()	
[0013]	<400>	1	
[0014]	cttgagccag	accagatcca	gctctggtgc
[0015]	cacttccttc	ctctgtgagc	tgtctcgga
[0016]	ttactcttcc	actccaaaag	gatgcccggtg
[0017]	ggggacggag	gtgatggcga	ggaagcggag
[0018]	tccaagagaa	aagcccgggg	ctacctccgc
[0019]	ctcgtgctgg	cttcggcggg	ggtgctactc
[0020]	atggtcagcc	aggtgtactc	aggcagtctg
[0021]	cttaccgcc	gggaatctag	tgccttccgc
[0022]	aaggagctca	tcaccagcac	ccgcctggga
[0023]	tttggggagg	gacccctcac	ctgcttcttc
[0024]	cggctgatgc	tgagccccga	ggtggtgcag
[0025]	gtcaacagct	cggtgccgt	cccctacagg
[0026]	gtgatcctgg	aagccagtgt	gaaagacata
[0027]	cgctacagct	acgtgggcca	gggccaggtc
[0028]	tccagctgcc	tgtggcacct	gcaggggccc
[0029]	tggacgctgg	cagagtgcg	ggaccgactg
[0030]	aagaggtca	tcacctcgt	gtacggctgc
[0031]	gcgtcgggg	ccatcatggc	ggtcgtctgg
[0032]	ttcgtgctct	ccgtgcagcc	ggtggtcttc
[0033]	aacaggtctg	actcccagg	cgctctcagc
[0034]	caaaccact	gctcctggca	cctcacggtg
[0035]	tttgatgcct	atgcactgag	gaggcagaag
[0036]	acgatccaga	acaggaggct	gtgtggcttg
[0037]	cccgtggtgg	ccacggccgg	gatcaccatc
[0038]	cccgtgtgc	gggtgcacta	tggtctgtac
[0039]	ctctgttctg	tgaatggact	ctgtgtccct
[0040]	ggcctggatg	agagaaactg	cgtttgacga
[0041]	tgcatctcac	tgcccaaggt	ctgtgatggg

[0042]	gagcagtgcc aggaaggggt gccatgtggg acattcacct tccagtgtga ggaccggagc	1740
[0043]	tgcgtgaaga agcccaaccc gcagtgtgat gggcgggccg actgcaggga cggctcggat	1800
[0044]	gaggagcact gtgactgtgg cctccagggc cctccagcc gcattgttgg tggagctgtg	1860
[0045]	tcctccgagg gtgagtggcc atggcaggcc agcctccagg ttcggggtcg acacatctgt	1920
[0046]	ggggggggccc tcatcgctga ccgctgggtg ataacagctg cccactgctt ccaggaggac	1980
[0047]	agcatggcct ccacgggtgct gtggaccgtg ttcctgggca aggtgtggca gaactcgcg	2040
[0048]	tggcctggag aggtgtcctt caaggtgagc cgctgtctcc tgcacccgta ccacgaagag	2100
[0049]	gacagccatg actacgacgt ggcgtgctg cagctcgacc acccggtggt gcgctcggcc	2160
[0050]	gccgtgcgcc ccgtctgcct gcccgcgcgc tcccattctt tcgagcccgg cctgcactgc	2220
[0051]	tggattacgg gctggggcgc cttgcgcgag ggcgggccca tcagcaacgc tctgcagaaa	2280
[0052]	gtggatgtgc agttgatccc acaggacctg tgcagcgagg tctatcgcta ccaggtgacg	2340
[0053]	ccacgcatgc tgtgtgccgg ctaccgcaag ggcaagaagg atgcctgtca gggtgactca	2400
[0054]	ggtggtccgc tgggtgtcaa ggcactcagt ggccgctggt tcctggcggg gctggtcagc	2460
[0055]	tggggcctgg gctgtggccg gcctaactac ttcggcgtct acacccgcat cacagggtgtg	2520
[0056]	atcagctgga tccagcaagt ggtgacctga ggaactgccc ccctgcaaag caggggccac	2580
[0057]	ctcctggact cagagagccc agggcaactg ccaagcaggg ggacaagtat tctggcgggg	2640
[0058]	ggtgggggag agagcaggcc ctgtggtggc aggaggtggc atcttgtctc gtccctgatg	2700
[0059]	tctgtccag tgatggcagg aggatggaga agtgccagca gctgggggtc aagacgtccc	2760
[0060]	ctgaggaccc aggcccacac ccagccctt tgcctccaa ttctctctcc tccgtccctt	2820
[0061]	tcctccactg ctgcctaata caaggcagt gctcagcagc aagaatgctg gttctacatc	2880
[0062]	ccgaggagtg tctgaggtgc gcccactct gtacagaggc tgtttgggca gccttgccctc	2940
[0063]	cagagagcag attccagctt cggaagcccc tgggtctaact tgggatctgg gaatggaagg	3000
[0064]	tgctcccatc ggaggggacc ctacagagccc tggagactgc cagggtgggc tgctgccact	3060
[0065]	gtaagccaaa aggtggggaa gtctgactc cagggtcctt gcccacccc tgcctgccac	3120
[0066]	ctgggccctc acagcccaga cctcactgg gaggtgagct cagctgccct ttggaataaa	3180
[0067]	gctgcctgat caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	3212
[0068]	<210> 2	
[0069]	<211> 47001	
[0070]	<212> DNA	
[0071]	<213> 智人()	
[0072]	<400> 2	
[0073]	tgggtggaat cacttgaggt caggagtctg agaccagcct ggctaacatg gtgaaacccc	60
[0074]	atctcttcta aaattatgaa aattagccgg gcatggtggt gggcgctgta atcccagcta	120
[0075]	cctgggaggc tgaggcagga gaattgcttg aaccggggag gcggaggttg cagtgagccg	180
[0076]	aaatcacacc actgcactct agcctgggtg acggagttag actccatctt aaaaaaaaaa	240
[0077]	aaaaaaaaaa aaaagaacga ggtaggaatt caaataattc ccagctaaac agaaaatagc	300
[0078]	atcaaacccc accctgcct cccctttctc ctctccagtc cccagagtat atggggccag	360
[0079]	cctccttttc tctctctcag gccagcagct cctttagtct cgctgtcca ggtaagcacc	420
[0080]	tggactcacc cttgtgagcc cctgcactca cctgcaccgg cctctgcaca gtccccagtc	480
[0081]	cttggtgtgc cctacctcat gctctcgggg accaggggct gtaaccaggc aggcattgtca	540
[0082]	ccaggcaacg ggcctcgggg gagagctcag atctcccga cctgcctgcc agcctctggg	600
[0083]	gtgcccacgc gggggtgggg gaagatgggg cggggcaggc actgccttct cctacctcct	660

[0084]	gcctgtttac ctgtacttag tcacagtgt gtccaggacc cagcaggagg agttccatgg	720
[0085]	agcctgaggc cacaggccac aggggacaag ggccagacac cctggtcacg gctctaggcc	780
[0086]	attgatccag cctgggctgg ctgggtgggg gtggggaggc cttggcctgg acaaacagag	840
[0087]	gtcctgagg cctgtgtgca ggcccggcac ctatctgccg ctcccaaagg taagcggggg	900
[0088]	cctccaggac aggggaccgg gatctataaa tgacctagt acagtgtcca ccctaagagc	960
[0089]	tgggcctggc tccctgcagc ctgagccacc taccctgtc cgaggccagg cctgcagggc	1020
[0090]	ctcatcggcc agagggatgat cagtgcagc aggtgaggg gccacagag ctggggaggg	1080
[0091]	gagggaccac gcagggtag accaggtgtg tggacaggca cagcatcagt gctgggtggt	1140
[0092]	tgggtggcctg ggattcaggt ggcagggaca ggaggaagg agaggccacc ctaccctgc	1200
[0093]	ctcgcaggac tggacatgt gccccctcca caccggtag ccacactgg ctttctggtg	1260
[0094]	taggagacag gcccgagcc ccacattgca cctatgtact gacttaagcc caggaccctg	1320
[0095]	ggctcacagg ctacagattg gcatgtatgt gtatgtgtgt tegtgtgtgt gtctgtgtag	1380
[0096]	gaaggcgctg catctatgaa tttttgtgtc atgaatagat gtgcgtatat ccctccgct	1440
[0097]	gtctccatct gtgtacatct gtgggtctgt gagtgtgttt atatgtgtgg aagggacccc	1500
[0098]	caccagctcc ccacactct caggactcta gggcctaata gtttactga aagatgcccc	1560
[0099]	tatggcccta gccagagtc cctgtctctg tctgtctctg cctggctgag ggacctcggg	1620
[0100]	taagtcatgt tacctctctc tacctcagtt tccccagcca ttaaataagag tcagcaaagt	1680
[0101]	aggcacccca ggctgttga ggctgcagtg gaggttgcag cactgcccag cacagggtg	1740
[0102]	gcacatggta ggagttcata cgagtggtt gaatccgat ctgcattgct gggggagtcg	1800
[0103]	cggccccgcc ccaaggagct cagcctccag caggcagacc cgagaccctc caatggccag	1860
[0104]	aagggcagga gggagttagg agcaggtgcc aggggtgggt ccatggtgct cagagctggg	1920
[0105]	ggactgcttc agggccctgt ggcaattgga gcacagtccc cgcttcagg agttcaatgt	1980
[0106]	gaggggcaaa gagagagtgc ccacaggtaa gctgcacatc gcgaggggca gccgcccctt	2040
[0107]	ctagggcact ctgggagagc tgcgaaggagg tgaggtctga actgaggtga caggggctgc	2100
[0108]	ataagagctg gccaggttg gaggtggggg ccagggcaga aggaagagtg tggggacgcc	2160
[0109]	tggccgtgaa caagcactga cagggtcaa ggtccacgag ggctcttggt gccggctggc	2220
[0110]	tgctcttaat ccataaatgt ttgctaccat ccattgtta aaatttctca ccaatggaag	2280
[0111]	tccagtgtcc ttgggtgctg acggggaaaa gagagggtg gaaaaaagga ggcaggagaa	2340
[0112]	gttggccagg ccacatatgc acacagcacc ttggacttct gtagggagga aggagctggg	2400
[0113]	acctgtcat tcattcattt aacaattact gagtgtccgc tgagtaccag actctgtctt	2460
[0114]	catgcagctt acagacaggg aggaggcaga taaatgacat atttgcata caggcaattt	2520
[0115]	aggcctctgt aattgctata aagaaaaatg caggagagac gggagtgtcc aggggaaggcc	2580
[0116]	tctctggaga ggtgacatct gaccctttgg aggaggtaaa ggagggagcc acgaggccag	2640
[0117]	cagaaaggaa aacatcccag gccagcaag gagcaaacct ccattcagc aaagaggaca	2700
[0118]	ggaaaactga gaccctgggt ctttagggac tgtgttctag gtggatgga gccgtgcgag	2760
[0119]	gcttgtgggc agggcacatg gtgacaacac gcagtggcca ttgtgtgaga actcactggg	2820
[0120]	taggggggtg ggtgattggc tattgcagga gtcaggtga cagatgacgg tggcctggat	2880
[0121]	gatggtggga gtcatggggg gccaaagagg ggctggcttt ggggggcatt tggaaggtag	2940
[0122]	ggccacaggc ttttccaaag gtgctggacc ctgggaatgg gggagccgtt gtattataag	3000
[0123]	atagtaaaga caagagtggc accgtcatct tcacaactgt cactgcccc tctctctgt	3060
[0124]	gggcaggaaa cccaagagga tgggaatgag gtctcttaga gtcacatgt gccaccctgt	3120
[0125]	cgccaccaca gagcctggca ccaagcaggt gctagacaaa gatagggtga ctgagcattg	3180

[0126]	aacctgggac cccacaggcc cacaccattg tccatgcccc agtgccaggc ctcacaagtc	3240
[0127]	ctccttcctg gaggcagcaa gatagaaagc cctgtaccag gggcctagag acttggcagt	3300
[0128]	ttcattcaact cattctttct gatccttcac tcatgtgacg ggctgtgcgg cgttccatgg	3360
[0129]	ggaaccccag aggtgagcaa gatgctggcc ctgcctgttc tgtaggggac agaggcaaga	3420
[0130]	cccaaagcca aggcataatc ttgatctgat caagggctgc ccaggggagg gggcagctta	3480
[0131]	actagccagg ggcccagaac ccagtgcctg gcaggtcgcc tggtaagagt tccccacagt	3540
[0132]	ccaggcaggg ggactcagct gcacaaaggc agggctctcg gggcctgggg caccatgtgc	3600
[0133]	atgatggaag ttatagccac gaggagggtg gacagcagcc tggccatgga gggctcttga	3660
[0134]	tgctgcagca aggggtttgg atgataagt gctgggagct gtgaaaggat cctgagcagg	3720
[0135]	tgagcgattg agctggggag ggaggatgcg ctggaagacg caatggaggc agggggaccta	3780
[0136]	gtgaggaggc cgccccagg gtttgggtgg gaagttatga tgagcccggg ggaattaatt	3840
[0137]	tcccactact gccatttga ccatggcttg ggtttttaca gagggtgtcc tgaaaatgag	3900
[0138]	cctctctgtg ctgctcaaag tcctcccaga tggatgcgag gggcatttag agggaggcaa	3960
[0139]	aatctgcata gagaaggacg cctggcttgg aggatgagag gggaggggag gccaccaag	4020
[0140]	cacccacca tgagctgccc ctcttcgggc ttctctaat ggaccacga cctgctccga	4080
[0141]	gcctcagttt ccctctctt acactgatta tctgagaggt agtagggctc agtgatcagg	4140
[0142]	gcgtcactct gaagtcaatc tgcttgactt tgcagcctgg ctgtgctgct gaccagctgt	4200
[0143]	gtgaccttag ccaagctgct caacctctct gtgccttgac tctcccatct gtaaagtagg	4260
[0144]	agtgatcaga gtacctgtcc ccacaggatc tgtgtaaggc ttacatgaga aagtgcacat	4320
[0145]	aaagcaacag agacaattga aataaatgtc acctgttacc acctctatgc ccccgagtcc	4380
[0146]	ccatggctct atgactcatc ccaaaatagc tcctttgtga tccagactca agagtaaaac	4440
[0147]	agggccaggt atggtggctc acatctgtaa tctcaacact tcaggaggcc aaggtgaggg	4500
[0148]	gatcgcttga ggccagggtg ttgagacctg gtctctacaa aaaataaaac tataaaatta	4560
[0149]	gccaggtgtg ctggtgcacc tgtagtccca gctacttggg aggctgaggt gggaggatca	4620
[0150]	ctcgaacca ggagttggag gctgggggtga gctatgatcg tgctaccata ctccagcctg	4680
[0151]	ggtgacagag tgagatcctg tcccttaaac aaaaggggtg cgacgggaat atggtgtcct	4740
[0152]	cctctggcag agggagggga cgagggactg aaagaagggc aaggagccaa cccatcacct	4800
[0153]	gggatcttcc caatccagca aaccttctca gattttgagg acagccacct cagtacaggg	4860
[0154]	tggccagccc aggacagaca ggcagctctg cgctggggac tcaaacctgc catgtggcct	4920
[0155]	catgcaagag tctcagcacc ctgttactgg tctgtttctt gcctgtttct cactagggat	4980
[0156]	gctgtgaaca tttgaggaag tggcgggggc tgtcccaccc gttgccggac gtttaccatt	5040
[0157]	taccattccc tggccttggc ccataaaaag ccagtagggc ccactccaca tgcaggaatg	5100
[0158]	tcctagctta gttgtggagg gggatgtcat gccagtgag ggtccctgc agtccctccc	5160
[0159]	ttccttgat ctgatgggg cgctcaaca gactactgt ggcttgacac caaagacct	5220
[0160]	tagctgggaa cgatgccaag gggagctgga gggagccagg aagctgggag aagggccagg	5280
[0161]	gcccttcaca tccacctggg aggacttga gcattactaa agagccccgt ttttgaaac	5340
[0162]	ccgtgtgtga aaatcccaag atacagccca aaggaagccc cgcctgcac tggggtgcat	5400
[0163]	tttatttatt tttttatgt ttttttttc tcaagcagag tcttgctctg tccccaggc	5460
[0164]	tggagtacaa tggcatgatc tcagctcact gcaacctccc ctgaccaggt tcaagtgatt	5520
[0165]	ctcctgcctc agcctcccga gtagctggga ttacaggtgc ccaccaccac agccggctaa	5580
[0166]	ttttgtatt tttcatagt acagggttcc accatattgg ccaggctgat ctggaactcc	5640
[0167]	tgacctcagg tgatccactc acctcagcct cccaaagtgt tgggattaca ggcgtgagcc	5700

[0168]	acggcaccgc gccctggggg gcatittaaa gctacacggg atttatggat atagtaagag	5760
[0169]	gagatgaact tcgcagtagt ctggagcctt tgctctcccg gtgggtgggt caaaggcttt	5820
[0170]	ctctgtactg tggggaaacc tgcgtcaaag gccaaataca ttgggatgtt tgcttgaaag	5880
[0171]	ggtctcaaaa tagagtggg accctggagc gtggagaggg gcgacattca gttgctattt	5940
[0172]	aatcatgatt tgtaattaa cagctcattt atgggaggca tcttagattc gtggaaaaag	6000
[0173]	cagggagtca gacatctaga ctcaacctcc acttccctgc tgtgtgatct tgggcaagcg	6060
[0174]	gcttagcctc tctgggcttc agggtttttt taatctgtaa aatgcgtctg ggagtgaatg	6120
[0175]	tcaggtattc aaatcacact gggaaaatgg ggctaggaaa agccctagac tgagttagt	6180
[0176]	ctagaacact ctgggtctca gtttccttat ctgttcaatg ggtgcagaac tggaggttta	6240
[0177]	agtgaataa agcaggtgaa gtaccacagt ggtgtgggct ggaggaagaa aacatgggac	6300
[0178]	aatggttcca catccctggg tgacctgaaa attaagtgtg agatgtctca tgagggcacg	6360
[0179]	aaatgaatat tagttttgt tcccttcctc tgccacaaga ctttgagagc agaaaggtga	6420
[0180]	gagagacggg actctgtgaa ggaaggcagg tccccggccc agcgcagtgc cagctcagg	6480
[0181]	gattctgggg cgggggctaa gtgcatggac tgtgtgggcg tgggtgggaag ctccgtgaac	6540
[0182]	cagaaccagg agcaagaaac agcattcctt gcgtggacgg gaaatgagg caagaggtca	6600
[0183]	gatgtctaca gaagtctgca ccccatgtac ttcagttctg tctgtgggtg cagcctctag	6660
[0184]	ggaggtgggt gtttaggtac tgagacctcc gtctgtcctc tgaccatagg gaagccagt	6720
[0185]	ggaagcaaag gtggggttct tgagccagac ccagtccagc tctggtgcct gccctctggt	6780
[0186]	gcgagctgac ctgagatgca cttccctcct ctgtgagctg tctcggcacc cacttgagc	6840
[0187]	cactgccgcc tgatgttgtt actcttccac tccaaaaggc agggaaagtcc tgcttccgtg	6900
[0188]	ccccaccggg gctcagcaga ggctcccttg caaatgcgag gctgtttcca actttggtct	6960
[0189]	gtttccctgg caggatgccc gtggccgagg cccccagggt ggctggcggg cagggggacg	7020
[0190]	gaggtgatgg cgaggaagcg gagccggagg ggatgttcaa ggcctgtgag gactccaaga	7080
[0191]	gaaaagcccg gggctacctc cgctgggtgc ccctgtttgt gctgctggcc ctgctcgtgc	7140
[0192]	tggtctcggc gggggtgcta ctctggtatt tcttaggtaa cgttgtggga ccgctggga	7200
[0193]	gaggcacctg gggaggactt ggggtgactg tagcaggcac agcaggacag gactgggttc	7260
[0194]	caggctcagc cgtgcttagc atattgctgt gtgacctgg gcaagtcact tctgttctct	7320
[0195]	gggtctccct ccctgtcctt ccagctggag atgctgtcag accctggctc caggtcctat	7380
[0196]	ggctcgggtc tgcttctgc ttgggcaaag tgcccaaaag ctccccacca ggtggggaaa	7440
[0197]	gtgggccctc ctagcaccca gttcttgtga gccagccagc ccacagagca taaacatcgc	7500
[0198]	cttcccttgc ctgcagtcct cctgggttgc ccctgaggct tggagccaac ccagccctaa	7560
[0199]	agaaggaggc ccagaggcac caatggtacc tggtagcaat tagtgccctt gctcacttga	7620
[0200]	gcctagccta ggttctcctc taggttggg accacagctc tatccctctt gggctctcag	7680
[0201]	ggtccagcat gaatggggga cggagcaggc agctggagag cagccagcct tggggccctc	7740
[0202]	tgccatgtcc ttaattatgg ctggccccct cctgatgtca cagccctcag tcagtccct	7800
[0203]	ggtgcccggg gagcaattgg cctgtgtctt gggcccatc atccaggcct ccgttcattc	7860
[0204]	attcatggaa taaatgctct tgagcatcta ttatctttct ctaagattga tggagtctct	7920
[0205]	cctcttccct ctgcctttga cagtgggaag taatggagaa accaaatcgg actgtgcctc	7980
[0206]	tacactgtac actgtagaag gccattcat ttgttcattt actcagtgc aagcacctcc	8040
[0207]	tgtgtgccag gttctgggga tagccccctg ccttgtgatt tagccaaggc atcagacctg	8100
[0208]	acatttacgc taaagcatag catgtgatgg gacagaggaa gctgagggtt gggaagccac	8160
[0209]	aggagggaca acccagatgc ctgcgtgatc agaagcatcc cattaaacat cctgcaaagg	8220

[0210]	atagctagtg ctcttactgg ctgaatctcc tgggtggaatt ccaggcctgt tgaaagcaac	8280
[0211]	ctggggacca actttttagc agtggagaga aatccatgta ggcctagatc caaggggtca	8340
[0212]	gggttgggag tgtctggaac cagcatctgg gagtgacact attgggaacc ccaggctctga	8400
[0213]	cacgggcctg cttgcaatga cttatagtgga ttctaccag agttgagcaa cgcaggcagt	8460
[0214]	agacgcatg tgcatctcac caccagcagg aagccagtgc cccagatagc acagggctgt	8520
[0215]	gggggcctcc tcaggtagcg ggctaattag tctacagggt aaaccacggg gcactgggct	8580
[0216]	ggagggccag gaactcacct gccaatattt tctctttgca gaggagttaa attccccctg	8640
[0217]	attatgctcc tggggtaaat cccccccac cccaggagag gtgctccatg gggctgagga	8700
[0218]	cccaaggggt gagtgtctcc aagcctctgc tgggggaagc caactcccc acagagggat	8760
[0219]	taagggttga aggaggcact ttgggagctg tttgaaagac tcctcccgcc ttgaccaggc	8820
[0220]	tgtgtctctg ggactgggcg ctgggcaagg aagtggatca gagacacgcc ctgccctgtc	8880
[0221]	tggaagagga ggtgcacaag tgaccagtga cactggagca ggacaggccc caagcgagga	8940
[0222]	ggacagcctg gcccaggag aggggtgtgc tggcttccta aggatggtag caggaccctt	9000
[0223]	aataccacca accatatttc ctgggtcctt tccctttcct gctctcccag gcaagagttt	9060
[0224]	tatgtgttct caagccccca gcacccgct gccctgtct cctgcttcag tgagaaaaca	9120
[0225]	aaacagctta gaagagaagc cccatatatg ttggcccacc tgccctccca gctgcatcac	9180
[0226]	gtgcaactct cctgggaccc cgatcccgcc cctctgtccc acacaatggc ccagcaccag	9240
[0227]	caaggatgcc ctctctcccc cagtgtccct tggggtgcct ccccatctt tctgtctctt	9300
[0228]	gaaagagctg tcagtccaca caccagctct ctctgtgccc tttccaacct ggctccctct	9360
[0229]	gcccccaac tccaatggcc attgtcaagc tcgccaacat cccaggttgc taaatccaat	9420
[0230]	gtccacttct cagtcatcat tgcacttgac ccgggggtc accccacct ccagaagccc	9480
[0231]	tttctcct agactttggg ccgccaccgg gtctttccg ctcagcaggt tgctttttct	9540
[0232]	gtgtccctgc tgatgggtgg ggcctctcct ttctctctcc acccgcttct ttcgtgatct	9600
[0233]	catctgctac ccttagcttc aagtgcctt tatacctga taacaccac atttgcatth	9660
[0234]	ctagcctggg cctctccctt gagcttgtct ctagagctgc cctgtctct cctcttaatg	9720
[0235]	tctaaggagc atctcggacc ctatgcttcc agaccatgag gtctctgcat aatttcccc	9780
[0236]	agacctgtac ctccaacatc ccagtccaag accacttctt tctggcacct tccccttact	9840
[0237]	cctttcttcc ttttccaccc agccccactt tgccagcaaa cctgggtcatc tctaactcca	9900
[0238]	aaacacatca aaagcagctg acgccaatca ctccccaccc tctctctctgc cacagctggg	9960
[0239]	gccaggtctt gtccccctgg acatctctcc cctggagccc tgcaggcgtg tctctgatgc	10020
[0240]	tctccctgcc tctgccctgc ctcttagag cttttctcaa cagcagaggg accatttgat	10080
[0241]	aaagcaaacg aaatcctcta acttcgctgc ttaaaacctc gcttggggcc aggcgcgtgg	10140
[0242]	ctcacgccc taatcccagc actttgggag gccgaggcag atggatcacc tgaggctcagg	10200
[0243]	agttcgagac cagcctgacc aatatgcaga aaccctgtct ctactaaaaa taaaaatta	10260
[0244]	accgggcgtg gtggtgcatg cctgtaatcc cagctacttg cgaggctgag gcaggagaat	10320
[0245]	cgcttgaacc cgggaggcag aggttgtggt gagcggagat tgagccattg cactccaagc	10380
[0246]	taggcaacaa gagcgaaact ctgtctcaaa aacaaaaaca aacaaaaaca aaaagaaaac	10440
[0247]	aaaaaaacca cctcccatc ctcccatctt acccagggtg aaagcccag tctctccagg	10500
[0248]	cctggaaagc cctaccagc ctctccctt ccccatctca taccctcctg ctgtctgttt	10560
[0249]	gctcactctt tgctgtcct gaaacacacc aggcctttgc acttgccct gcctgggaca	10620
[0250]	ttctttccac agatgtacat cacttcttc cctgacctcc atatcgcagc ccgtcccatg	10680
[0251]	ccctgattcc caccgcactg accacctcta acctgttata cagatgtgt ggttttaccgt	10740

[0252]	ctgattcctt gctagtctac aagctattaa gggcagtttt ttcttgatag ttctgtccgt	10800
[0253]	tgttttgctc ataatagccc aagtactttg gctcagttcc tacacatagc aggcctctcaa	10860
[0254]	gaggtattta ctgagtaaat ggataggggt gtaaacagg gctgtgagtc taccctcttc	10920
[0255]	acttcagcca aaatagcctt tgcaaacag aagtctgatg acatcattcc tgattttaaa	10980
[0256]	cttttcatgg ttacccttgt tcatcgggta aagacccaat gggccctgcc ctgcggaggc	11040
[0257]	cccagctcct tgccgcccct ccccatctct gactgctcca gccaaacagg ctttcagccc	11100
[0258]	gggtcctcac catggtcccc gtgctaccgg ccccggtccc catgctgctc cctctgctgg	11160
[0259]	aaggtacttc cctccctctt ctcttaccaa ttacagttt ccccatccct acatctcagc	11220
[0260]	tggagggtca ctccactctg gccagggctg agtgtcctcg tcacatcccc tcaacagcac	11280
[0261]	catgtggcac tgctccctga tggcactgcc cacagacaga tgccacatgc tgtgtggttg	11340
[0262]	ccagagccac gcctttctta cccaccactg tcagcttcac aaggggaggc acatctgtct	11400
[0263]	tggttaactg gcgtaccca tgtagtaggt ggtagcaca cactgtggga tccctgggtg	11460
[0264]	acctcacgag tggaaggatg cctagtgtg ctgacctatg accttggcct cctgggccta	11520
[0265]	tgtggatttc ctggccttca tgtcattgggt gtcctggact ggctactgtg tcagcctctc	11580
[0266]	cctgggaacc tgtaggacac catccatctg ggagccttc acctccctgg taccttgtag	11640
[0267]	ccagtttgct atccaataaa ctttagatga ccatgatgac aatgggagtg acaaatatga	11700
[0268]	tgatgatgac attgatgggt ccatggagac ccaagacact gaggctgagc tgagggtgtg	11760
[0269]	ggtggcagga gaaggcatgg aagagacagg agactttccc acctgcttcc tccactaacc	11820
[0270]	ctgctgggtc cttcctgggc aggggtacaag gcggagggtga tggtcagcca ggtgtactca	11880
[0271]	ggcagtctgc gtgtactcaa tcgccacttc tcccaggatc ttaccgccc ggaatctagt	11940
[0272]	gccttcgca gtgaaaccgc caaagcccag aagatggtag gaaaggatct gggggatgag	12000
[0273]	agggagggaa tatgggggtg aaaagagagg ggtggggctc gatcacatgg agccagttgg	12060
[0274]	tcaaccatc tggagcatc acagggacca cagccctgct ccaggacca tggaagcaga	12120
[0275]	tgagggtgag ggtcatggga aagttagtgg atgtttgggt caatagcact cggattagat	12180
[0276]	cctgatcatg cctcttacca ggggtggagc atgaccttg gaaaggtccc acagtgcagc	12240
[0277]	tgacactatt gagggcccgc tctgcccct ccgttacagg acggtggccc gctcctcccc	12300
[0278]	ctccgttaca ggacggtggc ccgctcctcc ccctccgtta caggacggtg gccgctcctg	12360
[0279]	ccccctcggt acaggacggt ggccgctcct gccctccgt tacaggacgg tggcccgtc	12420
[0280]	ctccccctcc gttacaggac ggtggccctc tctccccct ccgttacagg acggtggccc	12480
[0281]	tctcctcccc ctccgtaaca ggacggtggc cctctcctcc ccctccgtta caggacggtg	12540
[0282]	gcccgtctt cccctccgt tacaggacgg tggccgctcc tgcccctccg ttacaggacg	12600
[0283]	gtggcccact cctgcccctc cgttacagga cagtggccgc tctgcccct ccgttacagg	12660
[0284]	acggtggccc gctcctgccc ctctgttaca agacggtggc ccgctcctgc ccctccgtta	12720
[0285]	caggacggtg gccactcctg cccctctgtt acaggatggt ggctcactgc acggaggctg	12780
[0286]	gtctactgcc tgccactctc aggctgcagg accactgccc agcaaggcag gccagaagtg	12840
[0287]	ccggggagtt attcccagga gcaacctga accatgagcg ctggagtggtg tggatcaata	12900
[0288]	ccgcagcttc tttggccctg gcagggggaa tagttcacag aatgttccag gctgtctccc	12960
[0289]	agagatgccc tattcggtg agctcagatg ctctcagctc tacactgctc attcatggcc	13020
[0290]	ctgtgttgggt tgcccacttt ccagtctctc cctcccaact actgtttccc agaatacct	13080
[0291]	caaataaac cacttgcccc accttgtcaa tggagggtct gcttctgagg gaccagcct	13140
[0292]	gaggctgccc gtttctcct ccatgaggta ggggtgataa caacaggacc cggctgcaga	13200
[0293]	tttgtgtgg gttgcagtga agttgagata acacgaacac tattcccacg ctgcgcaaat	13260

[0294]	gcttaagagc ctgtaatcct gccagcagcg ctgtagttgg agatgcgcaa aaactacceca	13320
[0295]	tcagagctgc tggcttgtcc caggccatgg gaggaggtgc agaggggacc caggagccga	13380
[0296]	gtggggtttc tcagagttga ggagtgaactt ttggcaaggg gcagaggggt catcagcagt	13440
[0297]	gcaggtggag gtgagagtcg ggtgtagtgg aaacagaaag aaggggatgg ggtgtgagat	13500
[0298]	tcatgcatgc cccggcccgg ccactcagca ctgtgtgacc gtgatcaagc ctgtccacct	13560
[0299]	tggagaatca tgcattggagc ggggctgcc a taggagcaa agggcacctc caggtaggaa	13620
[0300]	gtgggcctgt ctgccctgca gagggtccca ggggctgttg tcttcccttc tcacagctca	13680
[0301]	aggagctcat caccagcacc cgcctgggaa cttactacaa ctccagctcc gtctattcct	13740
[0302]	ttgggtgagt tgccttggc cctgaccagc tcctgcaaga agctgagatt caaagaatgg	13800
[0303]	gaggggcctc tgtaggcttc tgatgcaatg ctttcatgtt tcaaattggg aaactaaggc	13860
[0304]	atagagaggg aacttggctt cctgcatgtc accctccctt cactgggctc atctgtagaa	13920
[0305]	tggaaacatg ggtgtgatag gtttgcacca gacaatgact gtgatggctg atcaagggcc	13980
[0306]	tgacaccatc aggcgaggcg atgttggagg ggcattgggt taaaagcatt ggctccaggg	14040
[0307]	cccactgcc ccgtccacat ctggttctgc tacttgcggc atagtttatg agacacaagt	14100
[0308]	tcacctctca tgcctcagtt ttctcattcg taaaataagg attatgagag cgcctccttc	14160
[0309]	agaggtcgtc agaggcttc tgcgtgaaga cggacagcaa tggctgaggt gcggaaagtg	14220
[0310]	ctcgatgtgc atgagcaggg gtggagctgg ggccagacct cagaatcctt ccctggcctc	14280
[0311]	tctcacttct gcctgcctta gggagggacc cctcacctgc ttcttctggt tcattctcca	14340
[0312]	aatccccgag caccgccggc tgatgctgag ccccgagggt gtgcaggcac tgctgggtgga	14400
[0313]	ggagctgctg tccacagtca acagctcggc tgccgtcccc tacagggccg agtacgaagt	14460
[0314]	ggacccccgag ggcctagtga tcctgggtca gtactgcgag tggaaacgtg gggttggcct	14520
[0315]	catgaggttg ggggaaacaa gctgtggtgt ggcccgggga ggctgcctgc caggcctggg	14580
[0316]	gtgctgtcag ggtgggcccc ccaggagagc cccccagggt aggttagcagt gccattgcat	14640
[0317]	tcaaggagcc aggaagaag ggtgggatgg gggcatttag ggtaaatttc agacaaggct	14700
[0318]	ggctccaagg gtctcctcta attttatattt cattgtattt tcttttcttt tttttttttt	14760
[0319]	ttgttcttgt ttatttgttt gttcatttcc ttttatcaga agccagtgtg aaagacatag	14820
[0320]	ctgcattgaa ttccacgtcg ggtacgtat ttttttttcc cctccccatt ttccttttga	14880
[0321]	gttggcattt gtcttgactt tgttgtgtat caggggggaca catggcttct gttgtgtgtg	14940
[0322]	cagggagccc tggccaagag taccacaggg gatgccatgg tggactcagc gatgtgtccc	15000
[0323]	aagcaagtct tggagcctgt agggggagag gaggtggcga cgtgcatgcg tgtatttgtg	15060
[0324]	tgtgtcttgt agacgggtgt gcatgcgttc ctgtgtgggt gtgaggatga gtcaggttta	15120
[0325]	gtggtccacg aacgtgactc tcctctatca ttacttcaa cctgcccaca agctagtttc	15180
[0326]	cactgatggg agaaaaatcat cttgccaatt caggtttgt cagtcacgtt ggttttaaaa	15240
[0327]	cttggctctt tggaggtagc ggtgccattg cattcaagaa cgtctcttcc ctcttttctc	15300
[0328]	ttccttccca gtcaggctca tcagccctcc ctccctacct ggtgccgtat tgctagagtc	15360
[0329]	accttgcat tctccaagcg gaccacaaat ctttcagctg accagcacag tcaccacgt	15420
[0330]	gcacaaggca ggaggtgctg tccaagtgt agtttgtgtg agttgtgcag tgcaccaact	15480
[0331]	ggctgctgga ctctatggcc cctaaattct cagattcttc ccacactatc tagtgtgttc	15540
[0332]	accagagcc aaggtggggg tgagcgtctc aacccttctc cagggaggga ggcagagttt	15600
[0333]	aaatccttgt tatacctttc cttaccttcc cgtcttccca tcctgctggt caaatgcttg	15660
[0334]	cttcttttgt ggatggaggt gatgaggtca aagtacagtt ttcaaagagg tgaaatcatg	15720
[0335]	attctcatac aaagatagag tgacctgtg tcaaataattt atttggtga ttaatggggg	15780

[0336]	aacgagtaga atggtaaaga atgcaagaaa ctgatctatt tgtctatcta tctatctatc	15840
[0337]	tatctatcat ctctgttgat atctgtctgc ttgtctatct agttatctaa ctagctagct	15900
[0338]	gtctattatc tatctgtctg tctctctgtc tctgtctgtc tagctagcta gctgtctgtt	15960
[0339]	tatatctatc tatctatcta tctatctatc tatctatcta tctatctatc atcaatcatt	16020
[0340]	aatggaaaaa gagaattgct agaataagat taccaagtta gatacaaacc tggttaagggt	16080
[0341]	cctaccaggc aagaaaactc aaacctttgg agttgtcttt tctagtgaat taaaatcatt	16140
[0342]	gacagcttat tacagtcttc tgaaagttaa catctacctc tacagagtct gaggttgata	16200
[0343]	atctacaacc aatagtaagt cagagatatt actcctgaga gcctcagggg gacttaatca	16260
[0344]	gatgatgctt ggagacagag actggctcat tgcagcctgg acaccgaatc tgggtcaattg	16320
[0345]	ctgcctgatt ttgtatagcc catgagccaa gaatgacata tatatatata taacagagtc	16380
[0346]	tcactctgtc atccaggctg gagtgcagtg ccgcgatctt ggctcattgc aacctccacc	16440
[0347]	tcccagggtc aagcaattct cctgcttcag cctcctgagt agctgggact acagggtcct	16500
[0348]	gccaccatgc ctggctaatt tgtatatttt tagaagagat gaggttttgc cgtgtttggcc	16560
[0349]	aggctggctc cgagctcctg acctcagggtg atccacctgc ctccacctcc caaagtgctg	16620
[0350]	ggattacagg tgtgagccac cacgcctggc tccataggcc atttttcaat tattaaaaaa	16680
[0351]	tataaaagtc agccaggcat ggtggctcat gcctgtaacc cagcactttg ggaggcagag	16740
[0352]	gcaggcagat cacctgaggt caggagtttg agaccagcct ggccaagaag gcgaaacccc	16800
[0353]	gtctcttcta aaaatataaa aattagccgg gcatggtggt gcgcacctgt agtcctaacc	16860
[0354]	agtcaggagg ctgaggcagg agaatacatt gaacccggaa gatggagctt gcagtgaact	16920
[0355]	gagattgtga ggttgtgcca ctgtactcca gcctgggcca cagagtgaga ctccatctca	16980
[0356]	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagaa agaaagaaag gaaaggaaaa ggtcctatgg	17040
[0357]	aaagttattt tttctcctgc aatagaagtg ctatgtaata gcctcatgtt gcctcgtgcc	17100
[0358]	tctgtgtccc catgttcctg gcagttgttc tgtaattatc tgtgtcagct ggggtgttcgt	17160
[0359]	ttcatgaatg aatgattgaa caaatgaatg aaagcatgaa tgaggagact ggttcagtgc	17220
[0360]	atgtccagag cacagagtct cagggggcag agataacaac tcaaatcctt gaagtcgact	17280
[0361]	ttatgagcac ttcttcatg ccaggcccca ttctctgcct gaggacacca ggatgaccgt	17340
[0362]	gtcctcacc cctgcctcgg aggagcttta agcccatga gggagacaga cacataaaca	17400
[0363]	gatttccata acaccagggtg ccagtgtgag aatagaggcc ccagaggcag tggagagagg	17460
[0364]	gaattgttcg ttccaaagca gaagaggggg caaatcaaga gcctcacaca gagtcccaga	17520
[0365]	tctacaggag ggaggggttg ctctgactg ggggatcctg gaagacttca tggagggggc	17580
[0366]	atcagatttg ggcattggcc gggcgtggtg gcacaagcct gtaatcccag cactttggga	17640
[0367]	ggccaagtig agcggatcac ctgaggtcag gagtctgagg ccagcctggc caacatggca	17700
[0368]	aaaccccatc tctactgaaa atacaaaatt agctggctcat ggtggcccat gcctgtaatc	17760
[0369]	ccagctactt gggaggtgga ggcaggagaa ttgcttgaac ccaggagggtg gaggttgtag	17820
[0370]	tgagccaaga ttgcaccatt gcaactcagc ctgggcagca agagcaaatt ccattaaaaa	17880
[0371]	aaaaattagc tggacatggt ggtgtgcacc tgtagtccta gctactcggg ggtgggggtg	17940
[0372]	gggggctaag gtgggaggat caccgagct caggaggctg aggctgcaat gagctgttgt	18000
[0373]	gatgcacatc ctgcgtcca gcctgagtga caggctgtct caacaataaa ataaaaataat	18060
[0374]	tttcaaaaga aaaagaaatt caggcatggg ggtaggcagg aatttgtcag ggcgagaaga	18120
[0375]	agaaagggtt ccctgagcag agggaatggc aggggcaaag gctgggggag gggaacaccc	18180
[0376]	aaggcgtgtt cagttaattc ctcccagccc cgagagggtc caggctccct gaaggtgttt	18240
[0377]	ctgattaaca agaggttage acacacctct ccacggaatt cgtctcaaaa aaaaaaaaaa	18300

[0378]	gggtaattat taaagtggca agagcaaaga atctgcttgg agcaagattt aaagaacaca	18360
[0379]	aaaccctagg aagagccagc catctttccc cagctgctgg tggaggccct gtcccttccc	18420
[0380]	taggcagaca ttgttgttct ctctctgggg aggtcagctc cccactgcag tcagcatggc	18480
[0381]	caggggtcag ggagaagggg ctgagccaca ggtggcagca tcagagcaaa gtgtattcac	18540
[0382]	ctccattccc ttcttggtcc tcagcactgc ccagaggagg tcataggaca gggattatta	18600
[0383]	ttacatccat ttgacagaac ttggaatggc taagccactg gccagactc agttaactac	18660
[0384]	ccagaggtag tgaacatcta cctctacaga gtctgaggtt gataatctgc aaccaatagt	18720
[0385]	aagtcagagt tattactcct gagagcctca gggggactta atcagacaat gattggggac	18780
[0386]	agagactggc tctactgcagc ctggacaccg aatctggtcc actgctgcct gattttgtat	18840
[0387]	ggcccatgag ccaagaatga catcatcaca cagctgatga gtgttggtgc taggtgggga	18900
[0388]	gggtagtgcc cctccctcct tctctccagt tccctcccca tataccccct cccctggggg	18960
[0389]	cccagcagat ggcactagcc tggggggcct gccctcaggc tgaccaagct gacaggggga	19020
[0390]	cttttgcttg cctgtggcct tccaaagaag acgatttaaa gcagagaaaa cagactgaaa	19080
[0391]	actcaggttt tataatttca tgtcaccagg ctgcctccca catcccagg tcatcctaa	19140
[0392]	atccccactg gctcctggaa gaacaccagg cttctggcga ggtttaaatg agatactgga	19200
[0393]	tgctccacgg gagagaacat gttcactggc agaccctggt gcctagatcg aacacacagt	19260
[0394]	cgggtcacag tctactgttt gaatgaatga atgaatgaat gaatgatgca ggtggtactg	19320
[0395]	ctttgtaagt tctagcagt catcagagct tacggattag atggaagagc agagactcac	19380
[0396]	tggtgtgtgg ggtagggggg tggggtatga tggtgaaaca gttgtgaagt gaggcagccg	19440
[0397]	tgagatgggc taggtctgag cctcaggcgg ggccagctgc aggatgaaaa gtcacaggcc	19500
[0398]	tttctcccca gccctacctg ctccgtctcc ctacaccca cctgaggaa caggcactgc	19560
[0399]	ctttattgag cccctactgt gcaagggtgt gtgctgggca ttcaaactg tatcatccta	19620
[0400]	cagcctctgc tggcggccct gcaagggtgg tgttatcgtc ccattctata gatgaggaaa	19680
[0401]	gcaaggccca ggaaagatta ggtggtggct gggcaaacc agatgtgtct ggcccaggct	19740
[0402]	tgtgcaatgg acacaatcat tgaaagtatc tcatagct gttgtgggca ttgagcgaga	19800
[0403]	cagtgaggga aggcattcag ttcagtttct ggcctgtagc aaatgcttga taagcacctg	19860
[0404]	ttttattctg atggcttcac catcattagc tcaaagctca tgcctcccc ccagggcagc	19920
[0405]	ctcccagact cctccttagg gactcctct ctctctaccg gaagtgaagc cctcatccct	19980
[0406]	tcttctctc attgctctg gctcgtctgg tctccacagc agccagagga gtgtgtggtc	20040
[0407]	caagccagcc catgtccagc cttgccaac cttctgtggc tccctatggc tgcaggagaa	20100
[0408]	agcagcggc atcctcgga tggcctggc caggcctccc tgccttcagc ttgtcctcta	20160
[0409]	gatacacgtg ccctgtgtgt acttttctca aagctgccc gctcgcccca gcctctttgc	20220
[0410]	tcacgcaggg acccccagga tgccccagc ccacaggccg ggtttgaagc cgtcacctcc	20280
[0411]	tgagctattc ttgcctgttc tgtgtctgtc tgtccccgt gtcattcatg tccccaggca	20340
[0412]	gcgactggat ttttacctgg gactgagaa ggcgtgaagc tcagtgtgtg tccattccat	20400
[0413]	gagtgaatga ctgaaccaat gaacaaatgc atgaatgagg atactgacag ggaaagagaa	20460
[0414]	ggatggggta gagcatgtct ggctatcccc acccggtcc cctgccagc ccatcctgcc	20520
[0415]	tggtggagga ccttgaggga cctggctccc cagggtcccc tcttctggc tcacaggaat	20580
[0416]	caggggctgt gcccctctcc ccgctccagg ttgttaccgc tacagctacg tgggccaggg	20640
[0417]	ccaggctctc cggctgaagg ggcctgacca cctggcctcc agctgcctgt ggcacctgca	20700
[0418]	gggcccgaag gacctcatgc tcaaactccg gctggagtgg acgctggcag agtgccggga	20760
[0419]	ccgactggcc atgtatgacg tggccgggcc cctggagaag aggctcatca cctcgtgagt	20820

[0420]	ccctgggaag gagggcagga gggagggtcg gaaaaggag tggttgatgg gggagttgaa	20880
[0421]	agtcacacac agcattctta gacaaggag gtaggacct tgggcctggg tatctgggag	20940
[0422]	acaggacggc tagcttagag gggatagggg agaggagct ggagatggtt gtgtactggg	21000
[0423]	ggcgcttccc ctccgcgagc ctcaagttcc ccatctgtaa caaagccgtt gttgtagatg	21060
[0424]	actcctgaag tcagctctgg gaggcaccgt ggcttgttgg gatgtttcag agtctggctg	21120
[0425]	cagcctggac tttcaacctc tgggctcggt cctaaatcct gactgcctcc tggtagaaca	21180
[0426]	cccaccctct ctgcttccca ggcttctggt ggggtttaaa tgagatacta gattcccat	21240
[0427]	gggaggggat gtcttctactg ccgggccctc gtgcctagac caaacgcaca gtaggtgtgc	21300
[0428]	agtatctatt ttgagtgaac gaatgaatga tgtaggtggt actgctttgc aagttctagc	21360
[0429]	aatgcatcag agctcacgga ttaaagttaa gagcagagag gcttactggt gtgtggggcg	21420
[0430]	gggggtgtgg gatgtgacgg ggaacccctt gtctcctagc tgcgtgccct aaggcaagtt	21480
[0431]	actttgcctc ttagaacctg cttaccttgc cggatcattg gaggatttaa atcagactat	21540
[0432]	ctgtgccatg atccttacac atagttagtg cctagcactt acacgctagc cattattggt	21600
[0433]	atcattatat atgctctaac tgggactggg ccgcaaaagg cattgagtgc caggagccat	21660
[0434]	ttggactttg atatttggtt agtggggagc tattgaaagt tcttgagcac agaagtaggg	21720
[0435]	ctttagggca taagatatgg agtggagtac agaagtgatc aggatcagag ggcaggtggt	21780
[0436]	tgggggtggg gaggaggagc tggaaatggc cttgacctct gggagcctgg tcttcccaca	21840
[0437]	ggatggggag atgggtgtta gcctacaaag cactgcagga ggtggggaag atgctctggg	21900
[0438]	ctgggcagtt ctacgcgatt gtttatttag cacttacttt gtgctgggcg tcaggctgat	21960
[0439]	gcctcttctg tctcacttgg gctgtggcca gcctccaggc agatggggat gggaccagt	22020
[0440]	tgttcagatc aagcgcagtc tttgaatgtg agctggcaga ggttcttgcc acaccctcc	22080
[0441]	cccagggcct ctccaagctg ctctctcctt gtcaccctc ctgctgtcct gctgggtgtg	22140
[0442]	acctgatctt gcggcatgtg cgtgggctga gtttctggag ggctctggga agtgcagaga	22200
[0443]	agccagacac catctgactt ccagggtcaa aaagggtggg gacacttagg ggtttccct	22260
[0444]	ggggcttctc cagggtcctc tcagcctggg aggggacctg actgccaggc ccagctctgt	22320
[0445]	tctactcac tgtggctcct ggtggctctc tcatcccaga cccttgaga agctctaaaa	22380
[0446]	tgacaggtea gacaacattt ggggttctca agcttgtacc ccagacacct gctaggaat	22440
[0447]	gggggtgagg gggactttgg tggtagtggg aagacagagc aggtggcccc ttgctcagtt	22500
[0448]	tcaaccatgt gctttgatc tgcgttccat atttcattta taagaagggc tctgccgcta	22560
[0449]	ggtaaataaa ataaaacccc ccaacaatga aagctaaagc cccattaaa ggtgacctcc	22620
[0450]	aggtctcttc catcctaata tcgtatctcc cacctcccag ggaagatgag ccggtaaagg	22680
[0451]	caaaaaggac gtggctgtat gggagggtgg ggggcaccgg tgtggttggg gagacttggg	22740
[0452]	tgctgcagca ggaagatcaa gctggaatgg taggaagaag ggacgagggc ctggggggtg	22800
[0453]	aggggggtgg tgctgtctac tggaggccac ctccctcccc tggcaagagg ccaggggaaa	22860
[0454]	tgccccatcc ccggaccctg ggcaccaaga ccctcccagg gagacccttg gggttatgcc	22920
[0455]	caccatgcct ccagctggct gcaggctgct tgggtgccat gtgtagcgat tttgaggctg	22980
[0456]	tgcttggagg agctcaggta ctgccttgcc aaggtgcctg aaatccctcc agcagacccc	23040
[0457]	cttctctctg tcaaggccca ggtgcccacg cacagtctgc aggcaggag gctattgggt	23100
[0458]	tgcccatcca gagggagggt gggccgttag tttcttataa attgacctat cagatgcgt	23160
[0459]	ggactccaga gagtgttgc attgacactg ggaagtttg gggagggttg tgagagggtg	23220
[0460]	aaggggagct ggggaacccc tgtctgagac aggcagacca ggggcaccta catatgtggg	23280
[0461]	agggtaccag ccatcacaga cagtgcctag cgcaggccta tctctgcat ggactgccgg	23340

[0462]	tagggcctca gtttcctat ctggaatca agcagctgac cccaacagtg tcaccagtct	23400
[0463]	tttcagggtt gacattccag atttctaaaa gcccagaagt ctaagatacg gttatttgtt	23460
[0464]	ccgagcctcc caggcgccaa gctctgggca gatttctggg gcacctggg ggctacgaga	23520
[0465]	ccacacctgc cttctccctg cctatccttg agcacagcca ggagtcgcgg tgccagaaac	23580
[0466]	ggtggtccct gcagatgcca gtctagtctt cctgccaggg acgctagggg tcacagatga	23640
[0467]	ttctgtagca ggggtggagg gtctggggag ggagcatggg actcgagcca gccgtcatca	23700
[0468]	tcaaactgta agctccagaa gtctggggaa cctcctggcc tctctcaccg gaggagctag	23760
[0469]	cctggtcctt ggagggcctt cagtctgtcc tctggggctg gggagacaca gaattctccc	23820
[0470]	cacagacaca cagtggcttc tggtaggaga cccggaccca gaaccagat gtccagactc	23880
[0471]	ccgtccaccc tccccagca gccgcctgcc gccctccctg cactccctt cccagacccc	23940
[0472]	agcccagcct tgccacctt ctgttctgcc aggggtgtacg gctgcagccg ccaggagccc	24000
[0473]	gtggtggagg ttctggcgtc gggggccatc atggcggtcg tctggaagaa gggcctgcac	24060
[0474]	agctactacg accccttctg gctctccgtg cagccggtgg tcttccaggg tgagaggtca	24120
[0475]	ggggtccctg gggcagggga ggggtgggtg tagaatcaa gggccctcca ctgggctcac	24180
[0476]	tgctcacctt ttttgcctaa attgaggatg ggatggggag aggggaagatt ctggaagctc	24240
[0477]	ctgtctctct cactcccca ccccgcccc cctcttctt cctctgtttg cacttccacc	24300
[0478]	cccccttcc ccttgaccgt cctaccatc gcagtctctg tcttcttggc atcgtctcct	24360
[0479]	tgcttccctc ctctttctct gtcttctctt ctctctctt tctcttttct tgtgtgacc	24420
[0480]	gcctctctc cctctcact cgcctggacc tgtgtccct cccctctgcc cctcaccccc	24480
[0481]	tccttgccct ctcccttgg caccaccgg tggctgggcc tggaacacgg gtctgtttgc	24540
[0482]	agcaggacta agaactcctt ggattccgcc ctagacagtc cgtttacagc caagaggcg	24600
[0483]	cagggagctt ggggaggtgt gatggcagca cagccaggcc atggccactg gtgtggcagg	24660
[0484]	tctccactg ccttccagc cccacacctc ctctctctt gggacctccc tcttggccc	24720
[0485]	cttccagga agggcacgtc ccaccccgca tgggacagct gtcttgggcc tggaccagcc	24780
[0486]	atacttctgc gcaggaggcc caaacttgc catttctgga gctcaggagg ggaggatggc	24840
[0487]	agagaggagg ccatagagtg ttggcagctg cttctgcctc acctctctcc cactcttct	24900
[0488]	ccctccact cagggtccca gccctctct cggtttatcc ccaaactgtc tggcatagac	24960
[0489]	ctgggtcccc agctggccaa actggagcgc taaatgggta gcagagctgt tcccttggga	25020
[0490]	gtctgacaca ggctcagggc gggagggaac aaagggttt gggggccctg gcccaatgga	25080
[0491]	gagatggcca gggcaggtga gcatgtctt gtctgacct ctggaccct cagcctctca	25140
[0492]	cgggttagcc tcaaccaagc cactccttt ctccgaacct catcttggaa aagggaaca	25200
[0493]	gctctctctc cccagccac caccgtgagg cctgtgcagg tgtgaatgca ttttgtaaac	25260
[0494]	tggcgagtgc tgtccgcaa atatcaataa ctaacacgga tcgagcactt actacatgcc	25320
[0495]	aggctgtttg aatgtttatg tctttttaat cactctact acctatgag gtgtgtgcta	25380
[0496]	ttactgtcct cattttacag atgaggaaac tgagaccag attcacacaa tcacattcaa	25440
[0497]	ccacagcaat ttgctggcag aggtggtagg ggtggtggg ttacaagctg cgccagcctg	25500
[0498]	ctgggaggtg cagccagggg acccctgtgt aacagctgct ctcttggctc agcctgtgaa	25560
[0499]	gtgaacctga cgctggacaa caggtctgac tcccaggcg tctcagcac cccgtacttc	25620
[0500]	cccagctact actcgcacca aaccactgc tcttggcacc tcacggtgag accccacct	25680
[0501]	gcctgcccac ctgccctctg ccgcaagcac actacaggtc cctggtgacc cgggatgaga	25740
[0502]	gggggcagtg tccgcctct gctgaagcgc ccacaggtg agccctgggt acacatcctg	25800
[0503]	ccagggtgga gagggtgtg ggcgaggtct cctctgttg gtcacagcaa tgctgtttg	25860

[0504]	ttgagtgact gacagacttt agccccacct gggattctgt gtttccttct ctttgttgtt	25920
[0505]	agggaggtgg gttcaccaac ctggccacac cccatgggcc acctgatggc ccgctcctcc	25980
[0506]	ctcccagggtg ccctctctgg actacggctt ggccctctgg ttgatgcct atgcaactgag	26040
[0507]	gaggcagaag tatgatttgc cgtgcaccca gggccagtgg acgatccaga acaggaggta	26100
[0508]	ccacttcctc tcctccctct ggcttccttt cctccctccc cctccctctc ttccctcctc	26160
[0509]	aatagtgacc ccctcattgg aagcccaagt cccaatctc agagggggcag caagggggagc	26220
[0510]	gagcagaggc tggggctggt gtcaggcctg ttgcccttga ccttgtcctc gtcccagcct	26280
[0511]	ccgccctggc cccggcttcc cctctggcta cccagaggt ctgagacacg tttgggtcatc	26340
[0512]	agacaccttg gatgtttatt ctaattacag caaaattgtc tcattcttct gggtgctgta	26400
[0513]	acccctctg gcacctcaa tccttcaata aaatgtttcc agagccaaag gactcatggg	26460
[0514]	cactttgtg ccttcctct aaacccaagg cgtaccatca gaggtgcctc tcccttatca	26520
[0515]	cgaacccctg ctgcacagcc aggcccaatc ccattgcaca gggtaacatg gaaatcatgg	26580
[0516]	gtgccctgga tccccgaat cccaacggg gcacttgccc tcttcctgc tcttgccctt	26640
[0517]	gctccctctg gtaactaagt ttccgacaaa gaagtgagtc cttacagaga tgtgagcaag	26700
[0518]	agacagtggg gttaggctaa gcgactaccg ttgccagggt cactatggca tgaggccagt	26760
[0519]	aggtgccac tgggcctggc caccaggaag ccatgggtgg tgccgacagc ttcagaggcc	26820
[0520]	tgggctgggc aaggaggcag ggaaacagag acagggtgta tggacaggtt ttcatttgtc	26880
[0521]	tgggaagaaa agagaactag gaaattcaag gaaggggaca tttaagacgg gagaggttcc	26940
[0522]	atatctcaaa tgtgtggatc atcccagcat cccagaggg agagaaggag gctcaggtgc	27000
[0523]	aggtaatat gtttagagt gggagggtgg gcaaggggag agggaggccc tcccatggct	27060
[0524]	ccattgttgg ggagcagagg tttggggaga gagaagagga atattgaagc agcgatggca	27120
[0525]	gagccaggga gacccttcc ctgggaatcc ggggtgaaaa cggtcacgt gtcagcgtca	27180
[0526]	ggaaagagga gactctatcc ttcacgcag gttgggcctc tgccctccct tccaacctcg	27240
[0527]	gaattctggg ggcctaattg gttcagagtc tagtatgaaa gatttgtcat ttcttgattt	27300
[0528]	cacagagttt gaatatctaa gatgccagtc ttggaagatg ccaaaattgg aaggctctgg	27360
[0529]	ggctctagaa ttcttgatt tctgggtgt gtgttcccaa tcaccaacac ttgtaatttg	27420
[0530]	cttgttggt gatcctattc aaaaggatca tccagacaaa aggtgacgaa gaatgacaag	27480
[0531]	gtttgcttga ctctttttg caatttatct gggactagga ttaaaagaaa ggagaagaaa	27540
[0532]	tactcatggc atgatctagg gctatgctgt tgggggtaac atggggagt actttgggc	27600
[0533]	tgtgctgttg ggggtgatat ggcgaagcag tgccttcagg gctttgcatt tgggtggtgat	27660
[0534]	atgctgatgg agtgtgacat caggcctgtg ctgctgggtg gacatgctgg ttcagtgatg	27720
[0535]	tcaggcctgt gctgtctgga gagcagaagg cttctgtagc atgatggggg cacctctggg	27780
[0536]	aacggctgcc ctgacccctc atggagctca cttgaagcct ccttgctact cacctaggct	27840
[0537]	ggggatggct ggcttcaccc ccgctcacag gaaccgcag ggtgaccctg agatggatcc	27900
[0538]	atgattcaca gttctgcgaa tgatgagaac atgttttctt gcctccctcc ctaccgcaga	27960
[0539]	gctgaacttt atgtctcagg gaggccaca aaggagaagg aacagtcttg ggtctgacac	28020
[0540]	tcctgtctc atccctcacc cccttggcga ctccatttgc cagaggcggg gccccagcat	28080
[0541]	tcaggggttg tggggggttc ggtggcctgg agttaggtgc taagacaggc gttcagtgca	28140
[0542]	ttggcccaac aacttgtgtg gtcattggcg ccgttctgt ttcccagaga aggaaatcaa	28200
[0543]	ggctcagcag gattaggtgg cacgcagatg ggtccacaga tggggtctct ccatacccc	28260
[0544]	caacagccac aaacagcagg ccaaaggatg ctccaccca tgcttctgt gggaaggccc	28320
[0545]	tcctccctcc ctgatgcagt tgggcaaggg tctgggtact ggggagacag ggacttctgt	28380

[0546]	agctaccctt gggtaatgac agagagagtg tggaacacgg atgggagagt cttttcccta	28440
[0547]	atccaaagga atgatgcctt gatggtgaat ttgaggcact aggacagctt ccaacagggt	28500
[0548]	ggagggatct cgccagagtc tgagcaccac tgagctatag aatgtgtggg ctgaactggt	28560
[0549]	cctagcacc c aacctatggt acaggtgggg aaactgggac cagcgagggc taaggacttg	28620
[0550]	gcctcttgtc cctgtctttt ctgcctttca gtggtggaga tgggcttcag ggtgtagcca	28680
[0551]	agcgggtggct ggggtggtgag gatgaggcct gacagctccc tgtgccccca tagctcccc	28740
[0552]	tctctctgtt cagtctcccc tcgccacacg ggggtggaag tgctcagcag gggctggcat	28800
[0553]	cagggtttgc atggatccct agatgcacc ccttccttgt ctgtgaaacg aggggttcag	28860
[0554]	gccagcccag ggccccaatc tttgattgct taccatcag gaagctattg tctccatac	28920
[0555]	aagtgtgtt tattaattcc tggccaaacg ccattccaag tcaggctggt gaggtgga	28980
[0556]	gcgcttaagt gtcgaagcca gacaggccag ggctcagcac ctgtctctc tgcttctac	29040
[0557]	ctgggcgagg acttacatct cccaacctca ggtaactcat ctgaaaaag ggcgtgaa	29100
[0558]	agacccccac cctgggaaga ctaagtgaga caacgcgtg agaacattgc acacgcgggc	29160
[0559]	ttaggtcaag tgcaacaaac ctgcgttcat caccggctct cactctgctc tgggcaggca	29220
[0560]	caagctgagg ggtttatggt gctggctctt tcagcctcaa caaccagcg aggaagcagg	29280
[0561]	tgctgtact gccttcacag accagtgaga cacccaagac acagagagat gaagtaattt	29340
[0562]	gcacaaagtc acccagctct ttgagccaga gttaaggcca ggcagcctga tctggagtgc	29400
[0563]	acgtgggtgc acagatgcat gtctgtgtgc gtgcgtacat ccatgcatgt ctgtgcacgt	29460
[0564]	gtacgtgcat gtgtgtgtgg tccacgtgtg cgattcttcc ctctgagcct ctagcggccc	29520
[0565]	atgccagctg gtgactccct cagccaaggc atccccagcc aaccactgg catctgggtg	29580
[0566]	gggggatcga cagtttctgt ggctgtccca ccagttccag agcggcctgg gaagtccag	29640
[0567]	ccctttcttc tcagactttc attaagggtc cagggtcccc aggggcagac tcttgtcccc	29700
[0568]	tccccgcaga ctctcctgt gtgaatgaat gtggaaggga aggcagaggt ggcgcctgca	29760
[0569]	aaccatccgc actgggccac tgtgccctct agttatgatc atgggcgata gtgatcatcc	29820
[0570]	catgtagatg ctgagaaatt cttagaatga gcatttgtt gaaatctgct tgtgtgggtg	29880
[0571]	gcaaagacat gagaggctc gggaagagca gattttcaga caaggcactt tagggagggg	29940
[0572]	gaggtacagc cttttggccc agaattgcca ttgatggaga gggcggttca ggggagaggg	30000
[0573]	tatcttaacc ctcaagtgcc agcgtagtga tgaggaaagg ctggcctggt gggccccca	30060
[0574]	tggactaagc atccttaggc acttcacctg actcctctga gactgtggtg cctccttcac	30120
[0575]	ccctgacctg cctgctttct acctagcttc tcccggtgcc cacttgagcc cagctgaggc	30180
[0576]	ctcaggccct tgagtggcct ggggtggtga gagggacttg gccctgaga tctggccatg	30240
[0577]	gctgtcccat ttgcagaag ccactctcac gggctgccac cgaagcacgg gcttccccct	30300
[0578]	ttccgggaac ctgcctcctg ccagcttccct ctctgtgac atcacttctc ttgtgattcg	30360
[0579]	ccccaccatt tccactcact ccagccaggt ggggacaggc agaaccatgg gtccctagg	30420
[0580]	ccagctggag ccacccccga cccggcctgg cctggctatg ggggtggcct tgtgttctcc	30480
[0581]	ggagcgtag tggccagcac aggcggcagc cacagacact tagtaggaac ttcagtgtgg	30540
[0582]	ctgacctgag ctgggtggc cgtgcaggag agtgcaagct gcttctcca tgagctcaca	30600
[0583]	gcctgacgtc agcaagtgt tcaaagaagt catttctat gcatgcctta aaccatgcca	30660
[0584]	caaggagat acgatcacc ctgttttaca aatgtgaaaa ctaaagcttg ctgagggtga	30720
[0585]	ccaaggtca cacagcttgt tcttggggca aagccaggct gccaatcag ctctgcagcc	30780
[0586]	ccaggtctag agctctggca atgccagggt ctgctctcct cccctcttca gcattgcct	30840
[0587]	tctgtgacct tcttccccct ttaatctgtc tgtaggtaag ggcacggggg tgtgcattca	30900

[0588]	tccacccacg cacccttctt tccttcttcc ttcttgtgtt ctccccaccc ttccatccat	30960
[0589]	ccatccatcc atccatgcat ctatccctcc aggagtaga tcctgacagg gtccctgtct	31020
[0590]	acctcctgga tgaggcaaga aggaaatatt ccccatatcc agagaggtga ggaagcaagg	31080
[0591]	caggccacac ggtgcaaaaa tgtgccttca gacactcagt actttgtagc caagatgaac	31140
[0592]	tggcaggcat cgcagcagtc aggcttctgg tgcttcttgg agagggctag aggggagcac	31200
[0593]	ttgttggacg ggaggcactg gagagccaga gaatgtgcac cctccccag agagtctgc	31260
[0594]	agcagaaaca gaaaactcag atgggccaag gggccaggcc agggctagag tctatgatgg	31320
[0595]	gggtaggggt agtccagtgg tgttttcggg gcttttcttt ctttctctct ttctctttct	31380
[0596]	ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt ctttcttttt ctttctttct ttctcttttt	31440
[0597]	ctccttctcc ttctccttct tccttctctt tctctttctt ctttcttctt ctttattctc	31500
[0598]	cttttccctt cttctccctt cctcttctcc ttcttctcct tctcttctt ctcctctcc	31560
[0599]	tctttcttct tcttctcctt ctcctcttcc tctctctcct tcttcttct ctcctcttc	31620
[0600]	tcctcattct ctttctcctt tcttctctt catcttttct tcttcttct ctcgcctcc	31680
[0601]	tccttctctt tccttctcct cttcctcttc tccttctaaa ggagcaggaa tctggattat	31740
[0602]	tatgtgaaat tagctcgcga ctcaatgaag caatttctac atgggtgcata aacagattgt	31800
[0603]	ctttacgtg agtgactccg cttgggccac tagatttcag ccgtgcctt gaattctct	31860
[0604]	ctggcgcttt ctaagcagac gcttgttcca gggattccac cacctctacc cgtgctccag	31920
[0605]	gcctccagag tgagaaccaa acactgccca gacagacagg ttcccgggta cacggtgagg	31980
[0606]	ccctggggaa aggttgctgc cagctacaga ctggttctag gactctccct ggaggttgag	32040
[0607]	agaacttctt gtagcaggca caggtgtctt tgccttacag cccctgccca aggttgagg	32100
[0608]	gacactacag gtctcaacg cagttgcttc tagggtgaaa cgttccactc cctccaacc	32160
[0609]	ccggcttggg ttcttctct gtctccccc aatctccctg tgactgtggg aaggacacc	32220
[0610]	ccaaggccca tgggatgcgc ttgactctc attccccga ctagtcttc ccaaccctg	32280
[0611]	gtccccctgt ctacttctg aggtcttct gtgaggaaaa caatccatga taactttata	32340
[0612]	gacaaacaga caccaaaacc tgcgttctt gggttttaca agagcaagag ggccaggctt	32400
[0613]	gtcaggggc gccccctggc ggtgcctct cccccaccg cctgctggg ctgggggaac	32460
[0614]	catggctggg ggtggcggt cccaacctgt tctgcctcag gaccagtc ctctccgcaa	32520
[0615]	aatgactgag taccctaaag agtttttct tatacaggt atagatctat acttgacga	32580
[0616]	ttagaaattg aaacaaaatt ttaaatgtt tattaattct tttaataata ttataagccc	32640
[0617]	attacacatt tgaatataaa taacattcta tgaaaattag ttgcatctc caaaagtaaa	32700
[0618]	aacatttagt gacaagagt ctgtcatttt acatttttgt acatttctt aacaactggc	32760
[0619]	ttcacagact acaggcggga ctttcgaatc tgcctccgag ttcaatcagt ccgatgtca	32820
[0620]	cacatcagtc tctggaaaac tcgctgtca ctttatgaga gaatgaggc aaaaaaggca	32880
[0621]	aatgatatct gagtgttact ataaacatga cttttggacc ccaggggtc cctgactgt	32940
[0622]	gctttgagaa ctgctggttg gtgtaagggt aagatcgtgg tctactgtgc cagatagact	33000
[0623]	taggggggtg ccagagtcta ggccaggcgt gtggaggaca tggggcatgt agggggctca	33060
[0624]	gacctcagag ctctgttgc agtgggaatt cggagccctc ccctcaagca agctaggtga	33120
[0625]	gtcttcttgg gtctgagge aagattctgg ctccacctg gtctctgcac tcttgacct	33180
[0626]	catctgtaaa atgggatgag agcaattcct cctccctgg gtggaggtgc tgcttgaaac	33240
[0627]	tcagaatccc cgtgcaatga ggccttgtga tgccatagcc aatgaggctc agccccagcc	33300
[0628]	acacacctgg agatgttaaa acagcctcaa agctcatctt cagctgttcg gtggctaagg	33360
[0629]	aattgattaa cttattgaac ggttaagtgc ttaccacatt ctagaagttc tggggaagt	33420

[0630]	cctggccctt gggaatcatg gccggctccg cagggtgttg gatttgctgt gggatgtccc	33480
[0631]	cactggcctt caggggcatt cctgatgctc tctggatttc catctgcttt ctctgccagg	33540
[0632]	ggcattttca gctctccctg cagattttca acctgcaccc tgagtgtgtt tccccatct	33600
[0633]	gcaaagcact ctgatttgct ctgtggaggg catttctatg agctgatgaa gctgtcccca	33660
[0634]	tctgttctgc aagggtgtcc cacctgggat gaaaaggaaac ccccggtgc tgtggagggga	33720
[0635]	gggtcccact gtccctgggg agtggctgca ccactctgt gaagtcatgc cgctgcccac	33780
[0636]	ttgtctctgt ggggtgagtg caccggactc tctgcaggag gaacccttg gcccatgccc	33840
[0637]	tggagatggg agggctccta cctgttctct ggtaggagag aaagactcag cctctctgga	33900
[0638]	gattcccca cctgctctgt ttgaacaacg gtatcttctt ggtggtgta tggcaggggt	33960
[0639]	gcagggcgcg tgtgtccag cagggatgtg aggggtgctc cacagctggg ggtggtccca	34020
[0640]	ccccgtgtgg ccatgcacag agaagggtct gcccatcagc actaagctac tggatcatggg	34080
[0641]	agaaggactg gtccctccct caagcccaca gtgtcacagg gaggcaggag ggttggtgcc	34140
[0642]	taaatgggga gactgctgc cccctcgctc cacaccaagc tcaaggcaga tgaccgtgca	34200
[0643]	catctgtgga cagtggggca gtcaagggt tttgcctcaa ctgacacatt gaagcctttt	34260
[0644]	gtcagattca agatcaacag aaataatttt tcctttcttt ctttctcttt ctttcttttc	34320
[0645]	ttttcttttt tctttccctc cctctctccc tttctttctt tctctttctc tttcttttt	34380
[0646]	ctttctttct tcctttcttt ctctttcttt ctttcttttt cctccctcc cttccttct	34440
[0647]	tctttccctc cctccttctt tcctacctc tgtctcttct tttctttttt tgacgtactt	34500
[0648]	tcgttcttat tgcccaggct ggagtgaat ggcacgatct cggctcaccg caacctctgc	34560
[0649]	ttcttgggtt caagcattc tcctgcttca gcctcccag tagctgggat tacaagcatg	34620
[0650]	tgccaccatg cctggctaatt tttgtatttt tagtagcaac ggggtttctc catgttggtc	34680
[0651]	agtctggtct cgaactcccg acttcagggt atccaccac ctcagcctcc caaagtgtg	34740
[0652]	ggattatagg tgtgagccac tgcgccagc caatttttct tgttttataa gggaggaagg	34800
[0653]	tgaggctcaa agaaggaccc tgacttgcta gaacctcaca gttcacaggt gactgtgact	34860
[0654]	agaattgagt tttttatctg gcaggcaatg gggagccatt gaagattttt gagcagggca	34920
[0655]	gtggcatagc caggctagtt tctagaagat gactctgggg gtgcactcat ctaagggaga	34980
[0656]	aatcagggca gaggaggcac agcgggcgtg cagctcccc tgcccctctg gctgcctgtc	35040
[0657]	cttgctctgt ctgtgcacgg gaccaggag accagccagt gcagccctga gctgtctctg	35100
[0658]	actccccca ggctgtgtgg cttgcgcac ctgcagccct acgccgagag gatecccggtg	35160
[0659]	gtggccacgg ccgggatcac catcaactc acctcccaga tctccctcac cgggcccgtt	35220
[0660]	gtgcgggtgc actatggctt gtacaaccag tcggaccgtg agtatgggca gccgggggaa	35280
[0661]	ccccctgcag tgactcgtg cctcttgcc atccctggaa ccaccaagg ggctgtgggc	35340
[0662]	agctgcttat gaggtgaac aaaaggagag agagagtgtg tgtgtgtgtg tatgtgcttg	35400
[0663]	cacaaattta tgcagctttg tgtgccacg tgtgcaaggc agccacaagg gtttgcagga	35460
[0664]	atacacactc atacatatcc acgtgtgtgt tgtgtattct gtgtgtgtgt ctggatatgt	35520
[0665]	atgtctgctt ggactgtgta cacagggtcc caggaccagc tctgtgggtg cctgtccatg	35580
[0666]	cgcgtgtgag tgaacagggt catgcgtgtc tttgtgcgcc ttcgggcta cgcattgcct	35640
[0667]	aatggcgccc tgctgcctc cacgggtccc tgtggttttg cagcctgccc tggagagttc	35700
[0668]	ctctgttctg tgaatggact ctgtgtccct gcctgtgatg ggggtcaagga ctgccccaac	35760
[0669]	ggcctggatg agagaaactg cggtagtaa cccgccgcg catccctcct ctccctgccc	35820
[0670]	atcccttctc cttcctcacc tttcctgctc tgagctgagt ggagacccca cttctacatg	35880
[0671]	cagcttccat tatgagcacc caggaaagg ggttctctca ctgtgccggg gtggcaaaat	35940

[0672]	gagacagacc agcaatgcag cctccccgag accacctcgt gggacagtgg cagggagaag	36000
[0673]	tggggagcca ggtctcctga cttccagctc agggccatca cccccagccc ctgtcccagc	36060
[0674]	cagccttcca ggaaggaaca gaatgggtga gggagatgtc cccctcctct gccctgtcaa	36120
[0675]	aggtttaaat atgtgggaag agggaagcga gatgttcatg gtgggggat gatcctgcca	36180
[0676]	cgggtgctggg ggaggtacct catattcaga aactgaacat ctggcttcaa gttctggctc	36240
[0677]	agccaagtga ccttggaaca gtcacctcat ctgtttccac cagtgaatg gggatatctca	36300
[0678]	cagggttget gtgaaacttt ggggtgtaaaa tagcagagaa agaggccggg cgcagtggct	36360
[0679]	catgcctgta atcctagcac tttgggaggc ggagtcgagc ggatcacctg aggtcaggag	36420
[0680]	ttcaagatca gcctggccaa catggtgaaa ccccgctctc actaaaaata caataattag	36480
[0681]	ctgggcgtgg tagcaggagc ctgtaattaa tctcagctac tcgggagtct gaggcaggag	36540
[0682]	aatgccttgg acctgggagg ttgcagttag atcatgcat cgcactccag ccttcgtgac	36600
[0683]	aagagcgaga cataaaaata aagtagcaga gaaagagatt tgtgattggt aacgtgcaat	36660
[0684]	acagcacacc ttctacaggc atcgccaagc cccggtggc tcctctggct tcctcccacc	36720
[0685]	tgtccctct ctgtgtcccc acacagttg cagagccaca ttccagtga aagaggacag	36780
[0686]	cacatgcata tcaactgcca aggtctgtga tgggcagcct gattgtctca acggcagcga	36840
[0687]	cgaagagcag tgccaggaag gtagggcagg cctagccgag tgtctggagg gacaccaaag	36900
[0688]	gcagtctagg cctgctacat gcttcagcaa aagtttctag cttctcctct caacacccac	36960
[0689]	caaccctct gtatttacct ctgtatgtct gtccattcat ccatccatcc atccatccat	37020
[0690]	ccatccatcc atccatccat ccatctctg gtctccaatc accgtctgtc cattgattca	37080
[0691]	tacagctacc catttatcta tgcatctact gacctgtgca accatcaatc tccctatcat	37140
[0692]	caaactgtca atctacccat ttattggttt ggctgactac tgggtctatat ggccactgtt	37200
[0693]	ccatccatcc atccatccat ccatccatcc accacccat ctaccaccc acccatccac	37260
[0694]	ccatccatca tccatccgtc catcatccat ccatccatca tccgtctatc catccatcca	37320
[0695]	tccatccatc atccatccat ccacccatcg tccatccgtc catcatccat ccatccatcc	37380
[0696]	atcatccatc catcatccat ctatccatcc atcatcctc caaccatccg tcatccaccc	37440
[0697]	atcgatcatc catctgtcca tcatccatcc atacatcatc catctatcca tccatccatt	37500
[0698]	catccatcca tcatccatgc atcatccatc catcatccat ccatccatcc atcatccgtc	37560
[0699]	tatccatcca tccatccatc atccatccat ccatcatcca tccgtccatc atccatccat	37620
[0700]	ccatcatcca tctatccatc catccatccg tccatccatc atccatccat catccatcca	37680
[0701]	tcatccatcc gtccatcacc catccatcca tcatccatcc atccatcatc catccatcca	37740
[0702]	tcatccatcc gtccatcatc catccatcca tccgtccatca tccatccatc catccatcat	37800
[0703]	ccatccatcc atcatccatc catccatcca tcatccatcc attcatccat catccatcca	37860
[0704]	ttcatccatc atccatctgt ccatcgtcta tccatccatc atccatcatc catccatcca	37920
[0705]	tccatccatc catccatcat ccatccatcc atcatccatc aatccatcaa tccatcatcc	37980
[0706]	atccatccat catccatcga tccatccatc atccatccat gcacccatcc atcatccatc	38040
[0707]	catccatcca tcatccatcc attcatccat catccatcca tccatccatc atccatccat	38100
[0708]	catccatcca tccatgcaac catccatcat ccatccatcc atcatccatc catccatcat	38160
[0709]	ccatccatcc atccatcatc catccatcca ttcatccatc atccatccat ccatcatccg	38220
[0710]	ttcatccatc atccatccat tccacccatca tccatccatc catcatccat ccatcatccg	38280
[0711]	tccatccatc atctgtccat catccatcca tccatccatc atccaacct ccatcatcca	38340
[0712]	tccatccacc atccatccat tcatccgta gccatccatc catccatgca ccatccatc	38400
[0713]	atccatccat ccatccatcc atcatccatc catcatccat ccatcatcca ccatccatc	38460

[0714]	atccatccat ccatctaccc atccatccac ccatccatcc acccatccac tgatctccct	38520
[0715]	agccccctgt ctgtccactg gtctttatat ccacacgttt atccaacctt ctagctgtct	38580
[0716]	gtcagtctcc ctaatggacc accactccac ccattggctt gtctgtctcag tcttctgtct	38640
[0717]	gggtctatth atccatccat ccatctaccc atccaactga ccaactgacc aacacttgca	38700
[0718]	ggctacccag cgataggcaa ggtgcagtaa ggaagtgaga ataaaacagc agagatgcag	38760
[0719]	gccctgcctt ccaaggctca tctgttagta ggaggatatg atgggtgact ctcctgcctt	38820
[0720]	gtaggaagat tggagggcag ggaggaggtc agacatgaaa agcttcctgg aggaggtagg	38880
[0721]	tgthttggccc ttggtgagag ctaaaactta aataggcagg aggaaaggag agaggcaaag	38940
[0722]	accaagtggg ggagtggaaa gttctttaca gtgaagagca gggaggaaaa tgtggacaac	39000
[0723]	cgggcagggc cagagcctgg gagattgcca ggctagggtc ggaccctggg ctaaaagtgg	39060
[0724]	aggcacagtt ctgccttcaa gttccacact ggagggggag gcatgatctt gtggtcagga	39120
[0725]	tctccagtct gagaatggag acaccacttt gtgtcaata ggccagtctg agtggagggg	39180
[0726]	ctgtgggggg cggggggaca tggcctgctt ttaggagacc ctaaaggaga ctcaggaaaa	39240
[0727]	gactctctag tcacctctg gctcttctgg ctccatcgtt cctgcacccc actttggaag	39300
[0728]	gtttccttgg ggctcagaga cccaccttct gtgccctgcc cccatcccct ctgtcccagg	39360
[0729]	ggtgccatgt gggacattca cttccagtgt tgaggaccgg agctgcgtga agaagcccaa	39420
[0730]	cccgcagtgt gatgggcggc ccgactgcag ggacggctcg gatgaggagc actgtgtgta	39480
[0731]	gccctgcctg gctgccgggg ccctggagct tgggagggag ggggtgccca cagcaggaag	39540
[0732]	ctggagggaa atctcactgt tgtcccctgg tctctctcta tctcatctc tgccccctg	39600
[0733]	cctgggtcct gatggtctct cccctccat cattctcctg ttctctgtct ctccatctct	39660
[0734]	ttcttttggc ctctctctct gtctgtctct ccccttcccc tctctctctg tccacccac	39720
[0735]	cacctgcccc catccccaga ctgtggcctc cagggccctt ccagccgcat tgthtgggtga	39780
[0736]	gctgtgtcct ccgaggggtga gtggccatgg caggccagcc tccaggttcg gggctgcacac	39840
[0737]	atctgtgggg gggccctcat cgtgaccgc tgggtgataa cagctgccca ctgcttccag	39900
[0738]	gaggacaggt gagcgggagg gtgtgggggc ctaggcagta agagacaagg gcagggaagg	39960
[0739]	cccggtggga ggtgcactgt gtctgagctc tttgcagata gagggaaggg tggtggaccc	40020
[0740]	cccagacagg ctactgtgat gtgagttcta gtcctggctc caccaggacc ttctgggtcc	40080
[0741]	ccggacacat tgthccacct ctctgccatc tactthtggg atcttgctth aagthtgggc	40140
[0742]	agtaattcat tcattcatct cattcaactca ttcagcaaca cttgtgtctc tactatgtgc	40200
[0743]	cagggtctgt ctagatgtg gggattcagt aaaggacaga actgcccac ctggtcataa	40260
[0744]	gctatgacac tccccagggt gtgacacgag gtagcaggtg gggctgggga gccccaggg	40320
[0745]	gacatctcat caggcctcat ggccatctth cccatctgct tggtgggctg aaacctcccc	40380
[0746]	caatccaccc ccagacagat ctgggtcca gatcccgccc ccaggccctg cacagggatc	40440
[0747]	ccctthtga tctctctgg gacgcagggc gctctgacca cctagctctc thtaacccca	40500
[0748]	tctcaggctc cccactgccc tcaggtagag ggtagagacc cgaaggctgc ccatctgcca	40560
[0749]	cccaggcagc tgactgccgc agtccaattc ctccacgctc aactcccacc cgctccccac	40620
[0750]	taggacccac cagcctcagg gaattcagag cagcctgggt ctgtaaagca cacaggaaaa	40680
[0751]	aagaaatctg tgtcgggggc ctggcactgt gctacatth ttagatacac ggtctthattg	40740
[0752]	gattctctca agaacttcg agtagaaaat gccattccca thtgacagat aggtggcaga	40800
[0753]	ggcttagaga ggcacaccca tgtctaggga gggatgaagc tggggcgtgg aaccaggca	40860
[0754]	ggccgagtgg gtgaaggctg aacgctgtac caccagctag gcgacctca gggagggaag	40920
[0755]	ggagggtctg gtgtggaggg cactgtcccg ggcggggatc tggctatctt gaggttcct	40980

[0756]	ggatggggag aggcagcttc ctccacctc acctcacccc accccacccc accccacccc	41040
[0757]	accccagcat ggcctccacg gtgctgtgga ccgtgttcct gggcaagggtg tggcagaact	41100
[0758]	cgcgctggcc tggagagggtg tccttcaagg tgagccgcct gctcctgcac ccgtaccacg	41160
[0759]	aagaggacag ccatgactac gacgtggcgc tgctgcagct cgaccacccg gtggtgcgct	41220
[0760]	cggccgccgt gcgccccgtc tgcctgcccg cgcgctccca cttcttcgag cccggcctgc	41280
[0761]	actgctggat tacgggctgg ggcgccctgc gcgagggcgg ttagcagcgg ggaacttgcgg	41340
[0762]	cgggaggcgg agggagaccg tgcggatctg cgcgtaaca cctggcctgg agaagggcgg	41400
[0763]	ggctgggggt cccggggctc caccatag gccctctagt gctgggattc aaattgggct	41460
[0764]	gaattttacg gtagaaaacc accatttaat gcggcctgta ggcccctgcc cctcccctcc	41520
[0765]	tagctcttcc cttccttctg gaagggcggt atgtgtgggg caaaggggca ggtctgggac	41580
[0766]	gccactgccc acgtgcaagc tccacctgct gttccttggg ctgcaagggt ggaaggctct	41640
[0767]	taattactag cactttccac atccaggctg gattttaggg gaacttgact tcatataatc	41700
[0768]	caccaacag ccctacgggc ggatgctgtg gccctatitt atggatggag aaaccaaggc	41760
[0769]	tcagagacat gttgctgtaa gtcacacagc cagagaggac tggagcaaag attagaacct	41820
[0770]	agggtggct gcctccagag cccctgctct tcctgctact gctctcagaa acagggtctc	41880
[0771]	tcccctttct acgttcactg accagagtc ctggcggcca ccgcacagtt ttggggacac	41940
[0772]	agaccagct ggcaaacctc cagacatgcc ctgcagcgtt agtgttgggt gcttcaaaaa	42000
[0773]	tgtgtacagt gacttacaat ctggaagcag gcggggccgc agagatattt taaggatggg	42060
[0774]	gaaactgagg ctgagaggaa cagtgactta cccaagggga tggcagtggt catggcaaag	42120
[0775]	caaaggctgg ttcatcact attccttcac tcattcagtc actcaatgac actttctgag	42180
[0776]	caccaagtac gtaccaggcg tgggttagg ggaagggtac ataaggatga agagagaaca	42240
[0777]	ttctcggggg agacagacag tggtaaagac tgacatggat ggggagatgc aggaacagt	42300
[0778]	gagacacaga ggaggctcct gccagctag ggtcagggga ggcttcagg ggagggtgt	42360
[0779]	ttaagctgag gcctggaaga tgagttggca acattcagac aaaggggaaa gacattcagg	42420
[0780]	tgaagacaca ggtgccaaga caggaagatg tgagaacatc cgcagcctgc cagaggggt	42480
[0781]	gagtgggggg gcaggcgtgc ctgggcgagg agcaaccaga atggcagaca gggccttggg	42540
[0782]	cgaggagcaa ccagaatggc agacagggcc ttgccggcca gcataaggat cttaggccag	42600
[0783]	gagtctccc tcctacctgc acctagaac catacgggga gtttcaagaa aaactgcgta	42660
[0784]	tcaagctcc ccgggggact gtgatatgca gccctcgtgg agaagcgta gggcagactg	42720
[0785]	cagagttggg gcaactgcaga gttctaagga aaccatgaag ggatcagatg tgggcttcgg	42780
[0786]	agacatctgc aggtgctgta acagagcagc gaggagccag ccagagccca gaggtgcctc	42840
[0787]	agcagacaga ggtgggggac aagaagctgg aggaagacac tcatccacac gggctttttt	42900
[0788]	cttttttctt ttttttgttt ttttgagaca gagtttcgct cttgtttgcc aggctggagt	42960
[0789]	gcaatggcgc gatctcggt cggatcccc tcctcccggt ttcaagcgt tctcctgcct	43020
[0790]	cagcctcctg agtaactggg attacaggca tgtgccacca caccagcta attttgtatt	43080
[0791]	tttagtacag acagggtttc tccatgttg tcaagctggt ctcaaactct tgacctcagg	43140
[0792]	tgttccgtcc gcctcagcct cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagcc accgtgccc	43200
[0793]	gccctccaca tgggctttgg tcgggggctg tccatgaa cccacagag aaagagctag	43260
[0794]	aataaagtga caggaggca gaggggcagg tgcgacccta gcaggggtaa ggggtgggcag	43320
[0795]	agcaggagag aagtagctc ctgagatgca aagggaataa tgtagggag aatagagaac	43380
[0796]	aggggctcca ggctcctgag atctcacttc tgcccttgac cacggacagg ccccatcagc	43440
[0797]	aacgctctgc agaaagtgga tgtgcagttg atcccacagg acctgtgcag cgaggcttat	43500

[0798]	cgctaccagg tgacgccacg catgctgtgt gccggctacc gcaagggcaa gaaggatgcc	43560
[0799]	tgtcaggtga gtccccggg catgggaggg agagaggagg gagaaaggat gctgcccaca	43620
[0800]	tcaccagggt ctggcccttt gctcacatca gcctgtgaa gcctcccatc ctcccagcaa	43680
[0801]	ggtggtgatg gccaccctta ctttacagaa gaggagactg gggcttagaa aggttgagga	43740
[0802]	gcttgcccaa ggttgagag ccacagatca gaagagatgc tgtgatgggc aggtgttagg	43800
[0803]	ctcaaaccga gttctgctcc ttgccacca caaggcacta ggcccagggt cccacagtga	43860
[0804]	ggtggatgca tggaagaaga aaggggtgtc agccacagaa gggaggcgga ggcagagtgg	43920
[0805]	ggcggtgggg acacagccac agttccagga ggtcccaggc tggctggagg ccggggaggg	43980
[0806]	ctggcttggg ctctctccat ttagcaggcg aggggaaagc agagctttaa gactgaacgt	44040
[0807]	gactctggca cccagtcaat tcccaacagt caggacttaa tccctatggc tcttcacctg	44100
[0808]	gaaaaggggg tgcccttacc ctgcttcagt cttttctcct tcccccttt cagggtgact	44160
[0809]	caggtggtec gctggtgtgc aaggcactca gtggccgctg gttcctggcg gggctggtca	44220
[0810]	gctggggcct gggctgtggc cggcctaact acttcggcgt ctacaccgc atcacaggtg	44280
[0811]	tgatcagctg gatccagcaa gtggtgacct gaggaactgc cccctgcaa agcaggggcc	44340
[0812]	acctctgga ctacagagc ccagggaac tgccaagcag ggggacaagt attctggcgg	44400
[0813]	gggggtgggg agagagcagg ccctgtgtgt gcaggaggtg gcattctgtc tcgtccctga	44460
[0814]	tgtctgctcc agtgatggca ggaggatgga gaagtccag cagctggggg tcaagacgtc	44520
[0815]	ccctgaggac ccaggccac acccagccct tctgcctccc aattctctct cctccgtccc	44580
[0816]	cttctccac tgctgcctaa tgcaaggcag tggctcagca gcaagaatgc tggttctaca	44640
[0817]	tcccaggag tgctgaggt gcgcccact ctgtacagag gctgtttggg cagccttgcc	44700
[0818]	tccagagagc agattccagc ttcggaagcc cctggtctaa cttgggatct gggaatggaa	44760
[0819]	ggtgctccca tcggagggga ccctcagagc cctggagact gccagggtgg cctgctgcca	44820
[0820]	ctgtaagcca aaaggtgggg aagtctgac tccagggtcc ttgccccacc cctgcctgcc	44880
[0821]	acctgggccc tcacagccca gacctcact gggaggtgag ctacagctgc ctttggata	44940
[0822]	aagtgcctg atccaagccc cgctgctgga gtttgaatgg gaccaggca ccagcctcat	45000
[0823]	gcccttgact ggagcagccc ctgcttctg ctacagcctgt ttgacaagt tccagaaggc	45060
[0824]	caaggtgggc tcagtggcag tggcggtggc cactgagggc tggggcctgc agggcagctg	45120
[0825]	cccaggtccc agaagaaatg ccaggaaggc aatcatttgg ggacctcag gtcagaggga	45180
[0826]	tgtgaggagc aatcgtctcc ttttggaaac ttaggaggaa actgaggtc agagaggcgg	45240
[0827]	ttaagacatc ctcatagtgg cactgggggt taggagtgga ggtggcatag actcctgtct	45300
[0828]	ccagctccc tgtctgcaa ggccccgtcc agtgcgacac tcccttcct tgcattcttt	45360
[0829]	gagccactga ataaagcctt gggctccaac catgtgccag cactatgctg gggccacagg	45420
[0830]	ggtgaaggac ctggctcctg accccaggag cagtggggat gatccagtgg gaaggggccg	45480
[0831]	gaggggagcg tggactgggc aagtcaaggc aagctgcctg gaggtgtga gacttgagct	45540
[0832]	ggggttcaga ggtggtccag gtgggaatat ccgggaagga tattccaggc aggggaagagc	45600
[0833]	acgtgcaaag gcacagtccc ggaagaatga ggcacgctag gaccagcaa gccagtgag	45660
[0834]	tgttagaaca gagctcgaga ggatgactca agaattcaga gggcggaact gaggcgggat	45720
[0835]	agcagagcct ggggttgagc caaggattg atcttgaaag ctctggggag ccacgggtggg	45780
[0836]	ctctatagca taggagtgc atgagaggat tcacattttg gaaccagcct tggcaccagt	45840
[0837]	gtgcaggag cggcaggcag ggaggctggt taggaggcca ccgcaggatt ccaggatgga	45900
[0838]	gaggatgggc cgggactgag cagcgccatg ggatggactg gaggatgatt ttagaccct	45960
[0839]	gggggcagtt gtgatggagg cagggggctc gctggaggtg aggggtggacg gtcaagtgtg	46020

[0840]	gacaactctt tctagacgcc taactgggag cggaaggag agaggagct tcagaggggc	46080
[0841]	cccagactga agaggggttt ttccaacatg ggcgctgtg ccaggtctgt gggatgaatga	46140
[0842]	ggcagaagg gaaccagga cggggagcac ccacctgggt cctgccagga cgagccggag	46200
[0843]	cagctgggtg ggcagggagc gtctccagag caggtgggca gaacacatgc agaatacctt	46260
[0844]	gggtgatctg gaatcacctt gggccctacc tcagtcttca tcggaatcct ggagggcggg	46320
[0845]	ggacgtgtca tctgttctcc taacaagcct cctggtgact cttttgcaag gatagttgga	46380
[0846]	ccctaaaaat gagtccagct ttggagtga gtgtcctcag gggaagtggc gaggcctcc	46440
[0847]	aggcttgagc tggcaagggt gtgccccgc ccagcctgt ggaaggcctg cgccttaggg	46500
[0848]	gctcactgcc cggcaggatt tcctcagca gcggggagga ctgaggagt gaaggaactg	46560
[0849]	gccagggtgg gtggagggtc tggggtctgg gctgggtcca gcagggtcag agaagggaga	46620
[0850]	gggcgggtg tttatatctt ctaggatttt gggcagagg gtggcagca tagggaggga	46680
[0851]	tggcggtggc ccaggtgtca gagtagaagt ggagggggcg cgtgagagg tttaggtgt	46740
[0852]	ggcagaggca gccagggtc ctccctagag ttctgtttc tggctcccgg ccaggtaggg	46800
[0853]	caggtgctct ggtatccggc ccaggggca aggatatagc cagttcccca agccctccct	46860
[0854]	gcaacacaca caggaatatg acaacaggc agcgtccctg ggcttttggg acaagccgc	46920
[0855]	gttcctttgg accagactac cacacctta gtttagcccc gtccccaaa gtggcccaga	46980
[0856]	gaaagagggc aacagccagg c	47001
[0857]	<210> 3	
[0858]	<211> 2691	
[0859]	<212> DNA	
[0860]	<213> 智人()	
[0861]	<400> 3	
[0862]	ggacaaacag aggctcctga ggcctgtgtg caggcccggc acctatctgc cactcccaaa	60
[0863]	ggatgcccgt ggccgaggcc cccaggtgg ctggcgggca gggggacgga ggtgatggcg	120
[0864]	aggaagcgga gccagagggg atgttcaagg cctgtgagga ctccaagaga aaagcccggg	180
[0865]	gctacctccg cctggtgccc ctgtttgtgc tgctggccct gctcgtgctg gcttcggcgg	240
[0866]	gggtgctact ctggtatttc ctaggttaca aggcggaggt gatggtcagc caggtgtact	300
[0867]	caggcagtct gcgtgtactc aatcgccact tctcccagga tcttaccgc cgggaatcta	360
[0868]	gtgccttccg cagtgaacc gccaaagccc agaagatgct caaggagtc atcaccagca	420
[0869]	ccgcctggg aacttactac aactccagct ccgtctattc ctttggggag ggaccctca	480
[0870]	cctgcttctt ctggttcatt ctccaaatcc ccgagcaccg ccggtgatg ctgagccccg	540
[0871]	agggtgtgca ggcactgctg gtggaggagc tgctgtccac agtcaacagc tcggctgccg	600
[0872]	tccctacag ggccgagtac gaagtggacc ccgagggcct agtgatcctg gaagccagt	660
[0873]	tgaagacat agctgcatg aattccacgc tgggttgta ccgctacagc tacgtgggcc	720
[0874]	agggccaggc cctccggtg aaggggcctg accacctggc ctccagctgc ctgtggcacc	780
[0875]	tgcaggcccc caaggacctc atgctcaaac tccggtgga gtggacgctg gcagagtgc	840
[0876]	gggaccgact ggccatgtat gacgtggccg ggcccctgga gaagaggctc atcacctcg	900
[0877]	tgtacggctg cagccgccag gagccgtgg tggaggttct ggcgtcgggg gccatcatgg	960
[0878]	cggtcgtctg gaagaaggc ctgcacagct actacagcc cttcgtgctc tccgtgcagc	1020
[0879]	cggtggtctt ccaggcctgt gaagtgaacc tgacgtgga caacaggctc gactcccagg	1080
[0880]	gcgtcctcag caccctgtac ttcccagct actactgcc ccaaacccac tgctcctggc	1140
[0881]	acctcacggt gccctctctg gactacggct tggccctctg gtttgatgcc tatgactga	1200

[0882]	ggaggcagaa gtatgatttg ccgtgcaccc agggccagtg gacgatccag aacaggaggc	1260
[0883]	tgtgtggctt gcgcctcctg cagccctacg ccgagaggat ccccggtgtg gccacggccg	1320
[0884]	ggatcaccat caacttcacc tcccagatct cctcaccgg gcccggtgtg cgggtgcact	1380
[0885]	atggcttgta caaccagtcg gacccctgcc ctggagagtt cctctgttct gtgaatggac	1440
[0886]	tctgtgtccc tgcctgtgat ggggtcaagg actgccccaa cggcctggat gagagaaact	1500
[0887]	gcgtttgcag agccacattc cagtgc aaag aggacagcac atgcatctca ctgccaagg	1560
[0888]	tctgtgatgg gcagcctgat tgtctcaacg gcagcgacga agagcagtc caggaagggg	1620
[0889]	tgccatgtgg gacattcacc ttccagtgtg aggaccggag ctgcgtgaag aagcccaacc	1680
[0890]	cgcagtgatga tggcgggccc gactgcaggg acggctcgga tgaggagcac tgtgactgtg	1740
[0891]	gcctccaggg cccctccagc cgcatgttg gtggagctgt gtcctccag ggtgagtggc	1800
[0892]	catggcaggc cagcctccag gttcggggtc gacacatctg tgggggggccc ctcatcgctg	1860
[0893]	accgctgggt gataacagct gccactgct tccaggagga cagcatggcc tccacgtgc	1920
[0894]	tgtggaccgt gttcctgggc aaggtgtggc agaactcgcg ctggcctgga gaggtgtcct	1980
[0895]	tcaaggtgag ccgcctgctc ctgcaccctg accacgaaga ggacagccat gactacgacg	2040
[0896]	tggcgtgct gcagctcgac caccgggtgg tgcgctcggc cgccgtgccc cccgtctgcc	2100
[0897]	tgcccgcgcg ctcccacttc ttcgagcccg gctgcactg ctggattacg ggctggggcg	2160
[0898]	ccttgccga gggcgcccta cggcgggatg ctgtggccct attttatgga tggagaaacc	2220
[0899]	aaggctcaga gacatgttgc tgcccatca gcaacgctct gcagaaagt gatgtgcagt	2280
[0900]	tgatcccaca ggacctgtgc agcgaggtct atcgctacca ggtgacgcca cgcatgctgt	2340
[0901]	gtgccggcta ccgcaagggc aagaaggatg cctgtcaggg tgactcaggt ggtccgctgg	2400
[0902]	tgtgcaaggc actcagtggc cgctgggttc tggcggggct ggtcagctgg ggctgggct	2460
[0903]	gtggccggcc taactacttc ggcgtctaca cccgcatcac aggtgtgatc agctggatcc	2520
[0904]	agcaagtggg gacctgagga actgcccccc tgcaaagcag ggcccacctc ctggactcag	2580
[0905]	agagcccagg gcaactgcca agcaggggga caagtattct ggcggggggt gggggagaga	2640
[0906]	gcaggccctg tgggtggcagg aggtggcatc ttgtctcgtc cctgatgtct g	2691
[0907]	<210> 4	
[0908]	<211> 1732	
[0909]	<212> DNA	
[0910]	<213> 智人()	
[0911]	<400> 4	
[0912]	gttcttgagc cagaccaggt ccagctctgg tgcctgccct ctggtgcgag ctgacctgag	60
[0913]	atgcacttcc ctctctgtg agctgtctcg gcaccactt gcagtcactg ccgcctgatg	120
[0914]	ttgttactct tccactccaa aaggatgccc gtggccgagg cccccaggt ggctggcggg	180
[0915]	cagggggacg gaggtgatgg cgaggaagcg gagccagagg ggatgttcaa ggctgtgag	240
[0916]	gactccaaga gaaaagcccg gggctacctc cgcctggtgc ccctgtttgt gctgctggcc	300
[0917]	ctgctcgtgc tggcttcggc gggggtgcta ctctgggtatt tcctagggtg caaggcggag	360
[0918]	gtgatgggtca gccaggtgta ctcaggcaggt ctgcgtgtac tcaatcgcca cttctccag	420
[0919]	gatcttaccg gccgggaatc tagtgccctc cgagtgaaa ccgccaaagc ccagaagatg	480
[0920]	ctcaaggagc tcatcaccag caccgcctg ggaacttact acaactccag ctccgtctat	540
[0921]	tcctttgggg agggaccctc cacctgcttc ttctgggtca ttctccaaat ccccgagcac	600
[0922]	cgccggctga tgctgagccc cgaggtggtg caggcactgc tgggtggagga gctgctgtcc	660
[0923]	acagtcaaca gctcggctgc cgtccctac agggccgagt acgaagtgga ccccgagggc	720

[0924]	ctagtgatcc tggagccag tgtgaaagac atagctgcat tgaattccac gctgggttgt	780
[0925]	taccgtaca gctacgtggg ccaggccag gtcctccgc tgaagggcc tgaccacctg	840
[0926]	gcctccagct gcctgtggca cctgcaggc cccaaggacc tcatgtcaa actccgctg	900
[0927]	gagtggacgc tggcagagt cgggaccga ctggccatgt atgacgtggc cgggcccctg	960
[0928]	gagaagaggc tcatcacctc ggtgtacggc tgcagccgc aggagcccgt ggtggaggtt	1020
[0929]	ctggcgtcgg gggccatcat ggcggtcgtc tggaagaagg gcctgcacag ctactacgac	1080
[0930]	cccttcgtgc tctccgtgca gccggtggc ttccaggcct gtgaagtga cctgacgtg	1140
[0931]	gacaacaggc tcgactcca ggcgctcctc agcaccctgt acttccccag ctactactcg	1200
[0932]	ccccaaacc actgctcctg gcacctcac gtgccctctc tggactacgg cttggccctc	1260
[0933]	tggtttgatg cctatgcact gaggaggcag aagtatgatt tgccgtgcac ccaggccag	1320
[0934]	tggacgatcc agaacaggag gtaccactc ctctctccc tctggcttcc ttctctcct	1380
[0935]	ccccctcct ctcttccctc ctcaacagt acccctcat tggaagcca agtccccaat	1440
[0936]	ctcagagggg cagcaagggg agcgagcaga ggctggggc ggtgtcaggc ctgctgccct	1500
[0937]	tgacctgtc ctctcccaa cctccgccct ggccccggc tcccctctgg ctaccccaga	1560
[0938]	ggtctcagac acgtttgtc atcagacacc ttgatgttt attctaatta cagcaaat	1620
[0939]	gtctcatctt cttgggtgt gtaacccct ctggcaccct caatccttca ataaaatgtt	1680
[0940]	tccagagcca aaggaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa	1732
[0941]	<210> 5	
[0942]	<211> 3143	
[0943]	<212> DNA	
[0944]	<213> 智人()	
[0945]	<400> 5	
[0946]	gagccacctt ccctgctccg aggccaggcc tgcaggccct catcgccag aggggtgatca	60
[0947]	gtgagcagaa ggatgcccgt ggccgaggcc cccaggtgg ctggcgggca gggggacgga	120
[0948]	ggtgatggcg aggaagcga gccagagggg atgttcaagg cctgtgagga ctccaagaga	180
[0949]	aaagccggg gctacctccg cctggtgcc ctgtttgtgc tgctggccct gctcgtgctg	240
[0950]	gcttcggcgg ggggtgctact ctggtatttc ctagggtaca aggcggaggt gatggtcagc	300
[0951]	cagggtgact caggcagtct gcgtgtactc aatcgccact tctcccagga tcttaccgc	360
[0952]	cgggaatcta gtgccttccg cagtgaacc gccaaagccc agaagatgct caaggagctc	420
[0953]	atcaccagca ccgcctggg aacttactac aactccagct ccgtctattc ctttggggag	480
[0954]	ggaccctca cctgcttctt ctggttcatt ctcaaattc ccgagcacg ccggtgatg	540
[0955]	ctgagccccg aggtggtgca ggcactgctg gtggaggagc tgctgtccac agtcaacagc	600
[0956]	tcggctgccg tcccctacag ggccgagtac gaagtggacc ccgaggccct agtgatcctg	660
[0957]	gaagccagtg tgaagacat agctgcatg aattccacgc tgggttgta ccgtacagc	720
[0958]	tacgtgggcc agggccaggc cctccggctg aaggggcctg accacctggc ctccagctgc	780
[0959]	ctgtggcacc tgcaggcccc caaggacctc atgctcaaac tccggtgga gtggacgtg	840
[0960]	gcagagtgcc gggaccgact ggccatgtat gacgtggccg ggcccctgga gaagaggctc	900
[0961]	atcacctcgg tgtacgctg cagccgccag gagccctgg tggaggttct ggcgtcggg	960
[0962]	gccatcatgg cggctcgtc gaagaaggc ctgcacagct actacgacc ctctgtgctc	1020
[0963]	tccgtgcagc cgggtgtctt ccaggcctgt gaagtgaacc tgacgtgga caacaggctc	1080
[0964]	gactcccagg gcgtcctcag caccctgtac ttcccagct actactcgc ccaaacccac	1140
[0965]	tgtcctggc acctcacgt gccctctctg gactacggct tgcccctctg gtttgatgcc	1200

[0966]	tatgcactga ggaggcagaa gtatgatttg ccgtgcaccc agggccagtg gacgatccag	1260
[0967]	aacaggaggc tgtgtggctt gcgcattcctg cagccctacg ccgagaggat ccccggtgtg	1320
[0968]	gccacggcgg g gatcaccat caacttcacc tcccagatct cctcaccgg gcccggtgtg	1380
[0969]	cgggtgcact atggcttgta caaccagtgc gacccctgcc ctggagagtt cctctgttct	1440
[0970]	gtgaatggac tctgtgtccc tgcctgtgat ggggtcaagg actgccccaa cggcctggat	1500
[0971]	gagagaaact gcgtttgcag agccacattc cagtgc aaag aggacagcac atgcatctca	1560
[0972]	ctgccaagg tctgtgatgg gcagcctgat tgtctcaacg gcagcgatga agagcagtgc	1620
[0973]	caggaagggg tgccatgtgg gacattcacc ttccagtgtg aggaccggag ctgcgtgaag	1680
[0974]	aagcccaacc cgagtgatga tgggcggccc gactgcaggg acggctcgga tgaggagcac	1740
[0975]	tgtgactgtg gcctccaggg cccctccagc cgcattgttg gtggagctgt gtcctccgag	1800
[0976]	ggtgagtggc catggcaggc cagcctccag gtccggggtc gacacatctg tgggggggcc	1860
[0977]	ctcatcgtg accgctgggt gataacagct gccactgct tccaggagga cagcatggcc	1920
[0978]	tccacggtgc tgtggaccgt gtccctgggc aaggtgtggc agaactcgcg ctggcctgga	1980
[0979]	gaggtgtcct tcaaggtag cgcctgctc ctgcacccgt accacgaaga ggacagccat	2040
[0980]	gactacgacg tggcgtgct gcagctcgac caccgggtgg tgcgctcgcc cgccgtgcgc	2100
[0981]	cccgtctgcc tgcccgcgg ctcccacttc ttgagcccc gctgcactg ctggattacg	2160
[0982]	ggctggggcg ccttgcgca gggcggcccc atcagcaacg ctctgcagaa agtggatgtg	2220
[0983]	cagttgatcc cacaggacct gtgcagcgag gcctatcgt accaggtgac gccacgatg	2280
[0984]	ctgtgtgccc gctaccgcaa gggcaagaag gatgcctgtc aggggtgactc aggtggtccg	2340
[0985]	ctggtgtgca aggcactcag tggccgctgg ttcttgccgg ggctggtcag ctggggcctg	2400
[0986]	ggctgtggcc ggcctaacta ctccggcgtc tacaccgca tcacaggtgt gatcagctgg	2460
[0987]	atccagcaag tggtagctg aggaactgcc cccctgcaaa gcagggccca cctcctggac	2520
[0988]	tcagagagcc cagggaact gccaaagcagg gggacaagta ttctggcggg ggggtggggga	2580
[0989]	gagagcaggc cctgtggtgg caggaggtgg catcttgtct cgtccctgat gtctgtctca	2640
[0990]	gtgatggcag gaggatggag aagtgccagc agctgggggt caagacgtcc cctgaggacc	2700
[0991]	caggcccaca ccagccctt ctgcctccca attctctctc ctccgtcccc ttctccact	2760
[0992]	gctgcctaat gcaaggcagt ggctcagcag caagaatgct ggttctacat cccgaggagt	2820
[0993]	gtctgaggtg cgccccactc tgtacagagg ctgtttgggc agccttgctt ccagagagca	2880
[0994]	gattccagct tcggaagccc ctggtctaac ttgggatctg ggaatggaag gtgctcccat	2940
[0995]	cggaggggac cctcagagcc ctggagactg ccaggtgggc ctgctgccac tgtaagccaa	3000
[0996]	aagtggggga agtcctgact ccagggtcct tgccccaccc ctgcctgcc cctgggcctt	3060
[0997]	cacagcccag accctcactg ggaggtgagc tcagctgccc ttggaataa agctgcctga	3120
[0998]	tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa	3143
[0999]	<210> 6	
[1000]	<211> 528	
[1001]	<212> DNA	
[1002]	<213> 智人()	
[1003]	<220>	
[1004]	<221> misc_feature	
[1005]	<222> (168) .. (168)	
[1006]	<223> n是a、c、g或t	
[1007]	<220>	

[1008]	<221>	misc_feature	
[1009]	<222>	(433) .. (433)	
[1010]	<223>	n是a、c、g或t	
[1011]	<400>	6	
[1012]		aaaaaggcag ggaagtcctg cttccgtgcc ccaccggtgc tcagcagagg ctcccttgca	60
[1013]		aatgcgaggc tgtttccaac tttggtctgt ttccctggca ggatgcccgt ggccgaggcc	120
[1014]		ccccagggtg ctggcgggca gggggacgga ggtgatggcg aggaagcngg agccggaggg	180
[1015]		gatgttcaag gcctgtgagg actccaagag aaaagcccgg ggctacctcc gcctgggtgcc	240
[1016]		cctgtttgtg ctgctggccc tgctcgtgct ggcttcggcg ggggtgctac tctggtattt	300
[1017]		cctagggtac aaggcggagg tgatggtcag ccagggtgtac tcaggcagtc tgcgtgtact	360
[1018]		caatcgccac ttctcccagg atcttaccg cggggaatct agtgccttcc gcagtgaac	420
[1019]		cgccaaagcc canaagatgc tcaaggagct catcaccagc acccgcttg gaacttacta	480
[1020]		caactccagc tccgtctatt cctttgggga gggaccctc acctgctt	528
[1021]	<210>	7	
[1022]	<211>	20	
[1023]	<212>	DNA	
[1024]	<213>	人工序列()	
[1025]	<220>		
[1026]	<223>	合成寡核苷酸	
[1027]	<400>	7	
[1028]		ccatcacctc cgtccccctg	20
[1029]	<210>	8	
[1030]	<211>	20	
[1031]	<212>	DNA	
[1032]	<213>	人工序列()	
[1033]	<220>		
[1034]	<223>	合成寡核苷酸	
[1035]	<400>	8	
[1036]		tccgettcct cgccatcacc	20
[1037]	<210>	9	
[1038]	<211>	20	
[1039]	<212>	DNA	
[1040]	<213>	人工序列()	
[1041]	<220>		
[1042]	<223>	合成寡核苷酸	
[1043]	<400>	9	
[1044]		ttttctcttg gagtcctcac	20
[1045]	<210>	10	
[1046]	<211>	20	
[1047]	<212>	DNA	
[1048]	<213>	人工序列()	
[1049]	<220>		

[1050]	<223>	合成寡核苷酸	
[1051]	<400>	10	
[1052]		gctttttctct tggagtcctc	20
[1053]	<210>	11	
[1054]	<211>	20	
[1055]	<212>	DNA	
[1056]	<213>	人工序列()	
[1057]	<220>		
[1058]	<223>	合成寡核苷酸	
[1059]	<400>	11	
[1060]		ccgggctttt ctcttggagt	20
[1061]	<210>	12	
[1062]	<211>	20	
[1063]	<212>	DNA	
[1064]	<213>	人工序列()	
[1065]	<220>		
[1066]	<223>	合成寡核苷酸	
[1067]	<400>	12	
[1068]		ggctttggcg gtttcactgc	20
[1069]	<210>	13	
[1070]	<211>	20	
[1071]	<212>	DNA	
[1072]	<213>	人工序列()	
[1073]	<220>		
[1074]	<223>	合成寡核苷酸	
[1075]	<400>	13	
[1076]		gagcatcttc tgggctttgg	20
[1077]	<210>	14	
[1078]	<211>	20	
[1079]	<212>	DNA	
[1080]	<213>	人工序列()	
[1081]	<220>		
[1082]	<223>	合成寡核苷酸	
[1083]	<400>	14	
[1084]		ccttgagcat cttctgggct	20
[1085]	<210>	15	
[1086]	<211>	20	
[1087]	<212>	DNA	
[1088]	<213>	人工序列()	
[1089]	<220>		
[1090]	<223>	合成寡核苷酸	
[1091]	<400>	15	

[1092]	agtgcctgca ccacctcggg	20
[1093]	<210> 16	
[1094]	<211> 20	
[1095]	<212> DNA	
[1096]	<213> 人工序列()	
[1097]	<220>	
[1098]	<223> 合成寡核苷酸	
[1099]	<400> 16	
[1100]	cagcagtgcc tgcaccacct	20
[1101]	<210> 17	
[1102]	<211> 20	
[1103]	<212> DNA	
[1104]	<213> 人工序列()	
[1105]	<220>	
[1106]	<223> 合成寡核苷酸	
[1107]	<400> 17	
[1108]	tcctccacca gcagtgcctg	20
[1109]	<210> 18	
[1110]	<211> 20	
[1111]	<212> DNA	
[1112]	<213> 人工序列()	
[1113]	<220>	
[1114]	<223> 合成寡核苷酸	
[1115]	<400> 18	
[1116]	agctcctcca ccagcagtgc	20
[1117]	<210> 19	
[1118]	<211> 20	
[1119]	<212> DNA	
[1120]	<213> 人工序列()	
[1121]	<220>	
[1122]	<223> 合成寡核苷酸	
[1123]	<400> 19	
[1124]	cagcagctcc tccaccagca	20
[1125]	<210> 20	
[1126]	<211> 20	
[1127]	<212> DNA	
[1128]	<213> 人工序列()	
[1129]	<220>	
[1130]	<223> 合成寡核苷酸	
[1131]	<400> 20	
[1132]	gctgtgcagg cccttcttcc	20
[1133]	<210> 21	

[1134]	<211>	20	
[1135]	<212>	DNA	
[1136]	<213>	人工序列()	
[1137]	<220>		
[1138]	<223>	合成寡核苷酸	
[1139]	<400>	21	
[1140]		gtagtagctg tgcaggccct	20
[1141]	<210>	22	
[1142]	<211>	20	
[1143]	<212>	DNA	
[1144]	<213>	人工序列()	
[1145]	<220>		
[1146]	<223>	合成寡核苷酸	
[1147]	<400>	22	
[1148]		acggcaaatac atactttctgc	20
[1149]	<210>	23	
[1150]	<211>	20	
[1151]	<212>	DNA	
[1152]	<213>	人工序列()	
[1153]	<220>		
[1154]	<223>	合成寡核苷酸	
[1155]	<400>	23	
[1156]		gcacggcaaa tcatactttct	20
[1157]	<210>	24	
[1158]	<211>	20	
[1159]	<212>	DNA	
[1160]	<213>	人工序列()	
[1161]	<220>		
[1162]	<223>	合成寡核苷酸	
[1163]	<400>	24	
[1164]		ccctgggtgc acggcaaatac	20
[1165]	<210>	25	
[1166]	<211>	20	
[1167]	<212>	DNA	
[1168]	<213>	人工序列()	
[1169]	<220>		
[1170]	<223>	合成寡核苷酸	
[1171]	<400>	25	
[1172]		caaacgcagt ttctctcatc	20
[1173]	<210>	26	
[1174]	<211>	20	
[1175]	<212>	DNA	

[1176]	<213>	人工序列()	
[1177]	<220>		
[1178]	<223>	合成寡核苷酸	
[1179]	<400>	26	
[1180]		tgcaaacgca gtttctctca	20
[1181]	<210>	27	
[1182]	<211>	20	
[1183]	<212>	DNA	
[1184]	<213>	人工序列()	
[1185]	<220>		
[1186]	<223>	合成寡核苷酸	
[1187]	<400>	27	
[1188]		gatcacacct gtgatgcggg	20
[1189]	<210>	28	
[1190]	<211>	20	
[1191]	<212>	DNA	
[1192]	<213>	人工序列()	
[1193]	<220>		
[1194]	<223>	合成寡核苷酸	
[1195]	<400>	28	
[1196]		ctcctgccac cacaggcct	20
[1197]	<210>	29	
[1198]	<211>	20	
[1199]	<212>	DNA	
[1200]	<213>	人工序列()	
[1201]	<220>		
[1202]	<223>	合成寡核苷酸	
[1203]	<400>	29	
[1204]		acctcctgcc accacagggc	20
[1205]	<210>	30	
[1206]	<211>	20	
[1207]	<212>	DNA	
[1208]	<213>	人工序列()	
[1209]	<220>		
[1210]	<223>	合成寡核苷酸	
[1211]	<400>	30	
[1212]		tgccatcact ggagcagaca	20
[1213]	<210>	31	
[1214]	<211>	20	
[1215]	<212>	DNA	
[1216]	<213>	人工序列()	
[1217]	<220>		

[1218]	<223>	合成寡核苷酸	
[1219]	<400>	31	
[1220]		atcctcctgc catcactgga	20
[1221]	<210>	32	
[1222]	<211>	20	
[1223]	<212>	DNA	
[1224]	<213>	人工序列()	
[1225]	<220>		
[1226]	<223>	合成寡核苷酸	
[1227]	<400>	32	
[1228]		tccattccca gatcccaagt	20
[1229]	<210>	33	
[1230]	<211>	20	
[1231]	<212>	DNA	
[1232]	<213>	人工序列()	
[1233]	<220>		
[1234]	<223>	合成寡核苷酸	
[1235]	<400>	33	
[1236]		cttccattcc cagatcccaa	20
[1237]	<210>	34	
[1238]	<211>	20	
[1239]	<212>	DNA	
[1240]	<213>	人工序列()	
[1241]	<220>		
[1242]	<223>	合成寡核苷酸	
[1243]	<400>	34	
[1244]		accttcatt cccagatccc	20
[1245]	<210>	35	
[1246]	<211>	20	
[1247]	<212>	DNA	
[1248]	<213>	人工序列()	
[1249]	<220>		
[1250]	<223>	合成寡核苷酸	
[1251]	<400>	35	
[1252]		caaaggcag ctgagctcac	20
[1253]	<210>	36	
[1254]	<211>	20	
[1255]	<212>	DNA	
[1256]	<213>	人工序列()	
[1257]	<220>		
[1258]	<223>	合成寡核苷酸	
[1259]	<400>	36	

[1260]	ctttattcca aagggcagct	20
[1261]	<210> 37	
[1262]	<211> 20	
[1263]	<212> DNA	
[1264]	<213> 人工序列()	
[1265]	<220>	
[1266]	<223> 合成寡核苷酸	
[1267]	<400> 37	
[1268]	agctttattc caaaggcag	20
[1269]	<210> 38	
[1270]	<211> 20	
[1271]	<212> DNA	
[1272]	<213> 人工序列()	
[1273]	<220>	
[1274]	<223> 合成寡核苷酸	
[1275]	<400> 38	
[1276]	aggcagcttt attccaaagg	20
[1277]	<210> 39	
[1278]	<211> 20	
[1279]	<212> DNA	
[1280]	<213> 人工序列()	
[1281]	<220>	
[1282]	<223> 合成寡核苷酸	
[1283]	<400> 39	
[1284]	gatcaggcag ctttattcca	20
[1285]	<210> 40	
[1286]	<211> 20	
[1287]	<212> DNA	
[1288]	<213> 人工序列()	
[1289]	<220>	
[1290]	<223> 合成寡核苷酸	
[1291]	<400> 40	
[1292]	aggagcggcc accgtcctgt	20
[1293]	<210> 41	
[1294]	<211> 20	
[1295]	<212> DNA	
[1296]	<213> 人工序列()	
[1297]	<220>	
[1298]	<223> 合成寡核苷酸	
[1299]	<400> 41	
[1300]	ggcaggagcg gccaccgtcc	20
[1301]	<210> 42	

[1302]	<211>	20	
[1303]	<212>	DNA	
[1304]	<213>	人工序列()	
[1305]	<220>		
[1306]	<223>	合成寡核苷酸	
[1307]	<400>	42	
[1308]		tccccctgag gctctcagga	20
[1309]	<210>	43	
[1310]	<211>	20	
[1311]	<212>	DNA	
[1312]	<213>	人工序列()	
[1313]	<220>		
[1314]	<223>	合成寡核苷酸	
[1315]	<400>	43	
[1316]		taagtcccc tgaggctctc	20
[1317]	<210>	44	
[1318]	<211>	20	
[1319]	<212>	DNA	
[1320]	<213>	人工序列()	
[1321]	<220>		
[1322]	<223>	合成寡核苷酸	
[1323]	<400>	44	
[1324]		aagactgttc cttctccttt	20
[1325]	<210>	45	
[1326]	<211>	20	
[1327]	<212>	DNA	
[1328]	<213>	人工序列()	
[1329]	<220>		
[1330]	<223>	合成寡核苷酸	
[1331]	<400>	45	
[1332]		cagcttgatgc ctgcccagag	20
[1333]	<210>	46	
[1334]	<211>	20	
[1335]	<212>	DNA	
[1336]	<213>	人工序列()	
[1337]	<220>		
[1338]	<223>	合成寡核苷酸	
[1339]	<400>	46	
[1340]		agtctatctg gccacagtga	20
[1341]	<210>	47	
[1342]	<211>	20	
[1343]	<212>	DNA	

[1344]	<213>	人工序列()	
[1345]	<220>		
[1346]	<223>	合成寡核苷酸	
[1347]	<400>	47	
[1348]		ggtccttctt tgagcctcac	20
[1349]	<210>	48	
[1350]	<211>	20	
[1351]	<212>	DNA	
[1352]	<213>	人工序列()	
[1353]	<220>		
[1354]	<223>	合成寡核苷酸	
[1355]	<400>	48	
[1356]		cctcaggtca ccacttgctg	20
[1357]	<210>	49	
[1358]	<211>	20	
[1359]	<212>	DNA	
[1360]	<213>	人工序列()	
[1361]	<220>		
[1362]	<223>	合成寡核苷酸	
[1363]	<400>	49	
[1364]		gccacctcct gccaccacag	20
[1365]	<210>	50	
[1366]	<211>	20	
[1367]	<212>	DNA	
[1368]	<213>	人工序列()	
[1369]	<220>		
[1370]	<223>	合成寡核苷酸	
[1371]	<400>	50	
[1372]		atgccacctc ctgccaccac	20
[1373]	<210>	51	
[1374]	<211>	20	
[1375]	<212>	DNA	
[1376]	<213>	人工序列()	
[1377]	<220>		
[1378]	<223>	合成寡核苷酸	
[1379]	<400>	51	
[1380]		ctccatcctc ctgccatcac	20
[1381]	<210>	52	
[1382]	<211>	20	
[1383]	<212>	DNA	
[1384]	<213>	人工序列()	
[1385]	<220>		

[1386]	<223>	合成寡核苷酸	
[1387]	<400>	52	
[1388]		gcagctgagc tcacctccca	20
[1389]	<210>	53	
[1390]	<211>	20	
[1391]	<212>	DNA	
[1392]	<213>	人工序列()	
[1393]	<220>		
[1394]	<223>	合成寡核苷酸	
[1395]	<400>	53	
[1396]		ggcagctgag ctcacctccc	20
[1397]	<210>	54	
[1398]	<211>	20	
[1399]	<212>	DNA	
[1400]	<213>	人工序列()	
[1401]	<220>		
[1402]	<223>	合成寡核苷酸	
[1403]	<400>	54	
[1404]		ggcagcttta ttccaaaggg	20
[1405]	<210>	55	
[1406]	<211>	20	
[1407]	<212>	DNA	
[1408]	<213>	人工序列()	
[1409]	<220>		
[1410]	<223>	合成寡核苷酸	
[1411]	<400>	55	
[1412]		caggcagctt tattccaaag	20
[1413]	<210>	56	
[1414]	<211>	20	
[1415]	<212>	DNA	
[1416]	<213>	人工序列()	
[1417]	<220>		
[1418]	<223>	合成寡核苷酸	
[1419]	<400>	56	
[1420]		atcaggcagc tttattccaa	20
[1421]	<210>	57	
[1422]	<211>	20	
[1423]	<212>	DNA	
[1424]	<213>	人工序列()	
[1425]	<220>		
[1426]	<223>	合成寡核苷酸	
[1427]	<400>	57	

[1428]	ccactggccc tgggtgcacg	20
[1429]	<210> 58	
[1430]	<211> 20	
[1431]	<212> DNA	
[1432]	<213> 人工序列()	
[1433]	<220>	
[1434]	<223> 合成寡核苷酸	
[1435]	<400> 58	
[1436]	tccactggcc ctgggtgcac	20
[1437]	<210> 59	
[1438]	<211> 16	
[1439]	<212> DNA	
[1440]	<213> 人工序列()	
[1441]	<220>	
[1442]	<223> 合成寡核苷酸	
[1443]	<400> 59	
[1444]	cttttggtt acagtg	16
[1445]	<210> 60	
[1446]	<211> 16	
[1447]	<212> DNA	
[1448]	<213> 人工序列()	
[1449]	<220>	
[1450]	<223> 合成寡核苷酸	
[1451]	<400> 60	
[1452]	gctgagctca cctccc	16
[1453]	<210> 61	
[1454]	<211> 16	
[1455]	<212> DNA	
[1456]	<213> 人工序列()	
[1457]	<220>	
[1458]	<223> 合成寡核苷酸	
[1459]	<400> 61	
[1460]	tattccaaag ggcagc	16
[1461]	<210> 62	
[1462]	<211> 16	
[1463]	<212> DNA	
[1464]	<213> 人工序列()	
[1465]	<220>	
[1466]	<223> 合成寡核苷酸	
[1467]	<400> 62	
[1468]	ctttattcca aagggc	16
[1469]	<210> 63	

[1470]	<211>	16	
[1471]	<212>	DNA	
[1472]	<213>	人工序列()	
[1473]	<220>		
[1474]	<223>	合成寡核苷酸	
[1475]	<400>	63	
[1476]		agctttattc caaagg	16
[1477]	<210>	64	
[1478]	<211>	16	
[1479]	<212>	DNA	
[1480]	<213>	人工序列()	
[1481]	<220>		
[1482]	<223>	合成寡核苷酸	
[1483]	<400>	64	
[1484]		tcaggcagct ttattc	16
[1485]	<210>	65	
[1486]	<211>	16	
[1487]	<212>	DNA	
[1488]	<213>	人工序列()	
[1489]	<220>		
[1490]	<223>	合成寡核苷酸	
[1491]	<400>	65	
[1492]		atcaggcagc tttatt	16
[1493]	<210>	66	
[1494]	<211>	16	
[1495]	<212>	DNA	
[1496]	<213>	人工序列()	
[1497]	<220>		
[1498]	<223>	合成寡核苷酸	
[1499]	<400>	66	
[1500]		gatcaggcag ctttat	16
[1501]	<210>	67	
[1502]	<211>	16	
[1503]	<212>	DNA	
[1504]	<213>	人工序列()	
[1505]	<220>		
[1506]	<223>	合成寡核苷酸	
[1507]	<400>	67	
[1508]		attccaaagg gcagct	16
[1509]	<210>	68	
[1510]	<211>	16	
[1511]	<212>	DNA	

[1512]	<213>	人工序列()	
[1513]	<220>		
[1514]	<223>	合成寡核苷酸	
[1515]	<400>	68	
[1516]	cttacagtgg	cagcag	16
[1517]	<210>	69	
[1518]	<211>	16	
[1519]	<212>	DNA	
[1520]	<213>	人工序列()	
[1521]	<220>		
[1522]	<223>	合成寡核苷酸	
[1523]	<400>	69	
[1524]	tggcttacag	tggcag	16
[1525]	<210>	70	
[1526]	<211>	16	
[1527]	<212>	DNA	
[1528]	<213>	人工序列()	
[1529]	<220>		
[1530]	<223>	合成寡核苷酸	
[1531]	<400>	70	
[1532]	ttggcttaca	gtggca	16
[1533]	<210>	71	
[1534]	<211>	16	
[1535]	<212>	DNA	
[1536]	<213>	人工序列()	
[1537]	<220>		
[1538]	<223>	合成寡核苷酸	
[1539]	<400>	71	
[1540]	gctttattcc	aaaggg	16
[1541]	<210>	72	
[1542]	<211>	16	
[1543]	<212>	DNA	
[1544]	<213>	人工序列()	
[1545]	<220>		
[1546]	<223>	合成寡核苷酸	
[1547]	<400>	72	
[1548]	caggcagctt	tattcc	16
[1549]	<210>	73	
[1550]	<211>	16	
[1551]	<212>	DNA	
[1552]	<213>	人工序列()	
[1553]	<220>		

[1554]	<223>	合成寡核苷酸	
[1555]	<400>	73	
[1556]	tttgatcagg	cagctt	16
[1557]	<210>	74	
[1558]	<211>	16	
[1559]	<212>	DNA	
[1560]	<213>	人工序列()	
[1561]	<220>		
[1562]	<223>	合成寡核苷酸	
[1563]	<400>	74	
[1564]	ttttgatcag	gcagct	16
[1565]	<210>	75	
[1566]	<211>	16	
[1567]	<212>	DNA	
[1568]	<213>	人工序列()	
[1569]	<220>		
[1570]	<223>	合成寡核苷酸	
[1571]	<400>	75	
[1572]	tttttgatca	ggcagc	16
[1573]	<210>	76	
[1574]	<211>	16	
[1575]	<212>	DNA	
[1576]	<213>	人工序列()	
[1577]	<220>		
[1578]	<223>	合成寡核苷酸	
[1579]	<400>	76	
[1580]	acatcaggga	cgagac	16
[1581]	<210>	77	
[1582]	<211>	16	
[1583]	<212>	DNA	
[1584]	<213>	人工序列()	
[1585]	<220>		
[1586]	<223>	合成寡核苷酸	
[1587]	<400>	77	
[1588]	cagctttatt	ccaaag	16
[1589]	<210>	78	
[1590]	<211>	16	
[1591]	<212>	DNA	
[1592]	<213>	人工序列()	
[1593]	<220>		
[1594]	<223>	合成寡核苷酸	
[1595]	<400>	78	

[1596]	gcagctttat tccaaa	16
[1597]	<210> 79	
[1598]	<211> 16	
[1599]	<212> DNA	
[1600]	<213> 人工序列()	
[1601]	<220>	
[1602]	<223> 合成寡核苷酸	
[1603]	<400> 79	
[1604]	aggcagcttt attcca	16
[1605]	<210> 80	
[1606]	<211> 16	
[1607]	<212> DNA	
[1608]	<213> 人工序列()	
[1609]	<220>	
[1610]	<223> 合成寡核苷酸	
[1611]	<400> 80	
[1612]	tgatcaggca gcttta	16
[1613]	<210> 81	
[1614]	<211> 16	
[1615]	<212> DNA	
[1616]	<213> 人工序列()	
[1617]	<220>	
[1618]	<223> 合成寡核苷酸	
[1619]	<400> 81	
[1620]	ttgatcaggc agcttt	16
[1621]	<210> 82	
[1622]	<211> 16	
[1623]	<212> DNA	
[1624]	<213> 人工序列()	
[1625]	<220>	
[1626]	<223> 合成寡核苷酸	
[1627]	<400> 82	
[1628]	ggcagcttta ttccaa	16
[1629]	<210> 83	
[1630]	<211> 16	
[1631]	<212> DNA	
[1632]	<213> 人工序列()	
[1633]	<220>	
[1634]	<223> 合成寡核苷酸	
[1635]	<400> 83	
[1636]	ttattccaaa gggcag	16
[1637]	<210> 84	

[1638]	<211>	16	
[1639]	<212>	DNA	
[1640]	<213>	人工序列()	
[1641]	<220>		
[1642]	<223>	合成寡核苷酸	
[1643]	<400>	84	
[1644]	tttattccaa agggca		16
[1645]	<210>	85	
[1646]	<211>	16	
[1647]	<212>	DNA	
[1648]	<213>	人工序列()	
[1649]	<220>		
[1650]	<223>	合成寡核苷酸	
[1651]	<400>	85	
[1652]	ggcagctgag ctcacc		16
[1653]	<210>	86	
[1654]	<211>	19	
[1655]	<212>	DNA	
[1656]	<213>	人工序列()	
[1657]	<220>		
[1658]	<223>	引物	
[1659]	<400>	86	
[1660]	tgataacagc tgcccactg		19
[1661]	<210>	87	
[1662]	<211>	20	
[1663]	<212>	DNA	
[1664]	<213>	人工序列()	
[1665]	<220>		
[1666]	<223>	引物	
[1667]	<400>	87	
[1668]	tcaccttgaa ggacacctct		20
[1669]	<210>	88	
[1670]	<211>	21	
[1671]	<212>	DNA	
[1672]	<213>	人工序列()	
[1673]	<220>		
[1674]	<223>	探针	
[1675]	<400>	88	
[1676]	agttctgccca caccttgccc a		21
[1677]	<210>	89	
[1678]	<211>	15	
[1679]	<212>	DNA	

[1680]	<213> 人工序列()	
[1681]	<220>	
[1682]	<223> 引物	
[1683]	<400> 89	
[1684]	tcgccgcttg ctgca	15
[1685]	<210> 90	
[1686]	<211> 17	
[1687]	<212> DNA	
[1688]	<213> 人工序列()	
[1689]	<220>	
[1690]	<223> 引物	
[1691]	<400> 90	
[1692]	atcgcccgatg atgtcga	17
[1693]	<210> 91	
[1694]	<211> 23	
[1695]	<212> DNA	
[1696]	<213> 人工序列()	
[1697]	<220>	
[1698]	<223> 探针	
[1699]	<400> 91	
[1700]	ccatggtcaa cccaccgtg ttc	23
[1701]	<210> 92	
[1702]	<211> 21	
[1703]	<212> DNA	
[1704]	<213> 人工序列()	
[1705]	<220>	
[1706]	<223> 引物	
[1707]	<400> 92	
[1708]	caaagcccag aagatgctca a	21
[1709]	<210> 93	
[1710]	<211> 22	
[1711]	<212> DNA	
[1712]	<213> 人工序列()	
[1713]	<220>	
[1714]	<223> 引物	
[1715]	<400> 93	
[1716]	ggaatagacg gagctggagt tg	22
[1717]	<210> 94	
[1718]	<211> 22	
[1719]	<212> DNA	
[1720]	<213> 人工序列()	
[1721]	<220>	

[1722]	<223>	探针	
[1723]	<400>	94	
[1724]		accagcaccc gcctgggaac tt	22
[1725]	<210>	95	
[1726]	<211>	42001	
[1727]	<212>	DNA	
[1728]	<213>	猕猴()	
[1729]	<220>		
[1730]	<221>	misc_feature	
[1731]	<222>	(26913) .. (27448)	
[1732]	<223>	n是a、c、g或t	
[1733]	<220>		
[1734]	<221>	misc_feature	
[1735]	<222>	(31066) .. (31221)	
[1736]	<223>	n是a、c、g或t	
[1737]	<400>	95	
[1738]		acttggcctt ggaaacctct tgtgcgtctt ccctatgcag cttttctcag ttcagactgg	60
[1739]		ctcaggagct gcgggtgacc agcggctacc gtcattggaca gcacagggt acggaaccag	120
[1740]		gtaggaattc atgctgcgta tgggtgtaat catgcctgta atcctagcat tttggaaggc	180
[1741]		cgaggtgggt gggatcacct gaggtcatga gttcgagacc aggctggcca acatggtgaa	240
[1742]		accccgctct tactaaaaat ataaaattta gccaggcatg gtgggtggga cctgtaatcc	300
[1743]		cagttactca ggagactgag gcaagagaat tgcttgaacc tggggaagt gaggttgag	360
[1744]		tgagctgaaa tcgtaccact gcactctagc ctggttaaca gactgagact ctatccccc	420
[1745]		ccccgcgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaag aaaaaaagga acaaggtagg aattcaaata	480
[1746]		aacagaaaat agcatcaaac cccaccctg cctctcctt ctcctctcca gtccccagag	540
[1747]		tacatgggcc cagcctcctt tactctctct caggcctgta gctccttag tttctcccg	600
[1748]		ccaggtaacg acctggcctt acctgtgtga gccctgcac tcacctgcac tgggctctgc	660
[1749]		atagtcccca gtccctgacc cccccccacc tcatgctctt ggggaccagg ggctgtaacc	720
[1750]		aggcaggcat gtcaccagc aacaggcctt gggggagagc tcagatctcc cgcacctgcc	780
[1751]		tgccagcctc tggggtgccc atgggcgggg ggatgggaca ggccggccct gccttctcct	840
[1752]		gcctcctgcc tgtttacctg tactcagtc cagtgtgtc ctggggccag caggaggagc	900
[1753]		cccatggagc ctggggccac aggccacagg ggacaagggc cagacaccct ggccatggct	960
[1754]		ctagccatt gatccaggcc gggctggcac ggtgggggta gggaggcctt ggcctggaca	1020
[1755]		aacaaaggct tctgaggcct gcgtgcaggc ccagcaccta tccgccact ccaaaggtaa	1080
[1756]		gcgggggcct ccagaacagg ggaccaggat ctataaatga cttagtgaca gtgtccacc	1140
[1757]		taagagctgg gcctggctcc ctggggcctg agtcacctac cctgctcaa ggccaggcct	1200
[1758]		gcagggcctc atcgccaga gggatgacag tgagcagaag gtgaggggcc cacagagctg	1260
[1759]		gggaggggag ggacctgca gggtagacac aggtgtgtgg acaggcacag catcagtgt	1320
[1760]		gggtggttgg tggcctggga ttcaggcggc agggacagga ggaaggcaga ggccacccta	1380
[1761]		cgcctgcctc gcaggactgg acgtgtgtcc ccctccatac ccggtacccc acctgggcct	1440
[1762]		tctggtgtag gagacaggcc cagagcccca cattgcacct gtgtactgac ttaagcacgg	1500
[1763]		gaccctgggc tcgaaggctc agagttggcg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt cgtgtgtgtg	1560

[1764]	ttcgtgtgtg tgggggaagg gcatgcatct gtgaattttt gtgtcatgaa tatccctcgc	1620
[1765]	gtgtctccac ctgtgtacat ctgtgggtct gtgaatgtgt ttatatgtgt ggaagggagc	1680
[1766]	ccccccagc ctcccacact cgcaggtctc tagggcctaa tgacttcact gaaagatgca	1740
[1767]	cctacaaccc tagcccagag tccccgctct gctctgctct gccctggcta agggacctcg	1800
[1768]	ggtaagtcac gttactgctc tctacctcag tttccccagc cattaacag agttagcaaa	1860
[1769]	gcacacaccc caggctgttg gaggtgcag tggagtctgc agcgccgcc agcgccaggc	1920
[1770]	tggcacatgg taggagttca cacgcagtgg ttgaatacag atctgcattg ccggggagtg	1980
[1771]	gcggccccgc cccaaggagc tcagcctcca gcgggcagac tccagaccgc ccaatggcca	2040
[1772]	gaagggcagg agggagtgaa gagcaggtgc cagggtgggg tccaggtgct cagagctgcg	2100
[1773]	ggactgcttc agggccctgt ggcaattgca gcacagtcct cgcttcagg agctcaatgt	2160
[1774]	gaggggcaga gaggtgccc ataggtgaac cgcacatcgc gaggcacagc tgctccttct	2220
[1775]	agggcactct gggagagctg caaagaggtg aggtctgagt ggaggtgaca gaggtgcac	2280
[1776]	aagagctggc caggctggga ggtgggggtc caggcagaag gaagagtgtg gggatgcctg	2340
[1777]	gccgtgaaca agcactgaca gggctcaagg tccaggaggc ctcttggtgc tggctggctg	2400
[1778]	ctcttaatcc gtaaatgttt gccaccatcc cattgttaaa atttcttacc aagggaagga	2460
[1779]	agtccagtgt ccccggggtg tgacggggag aagagagggt gagaaaaaag gaggcaggag	2520
[1780]	aagtgggcca ggccacatat gcacacagca ccttgagatt ccgtggggag gaaggagctg	2580
[1781]	ggacctgtgc attcatttgt tcaacaatta ctgagtgtcc gctgagtacc agactctgct	2640
[1782]	ctcacgcagc ttagacaggg aggagacaga taaacaacgt atttgcatat caggcaattt	2700
[1783]	aggcctcagt cattgtctata aagaaaaaag caggagagac aggggagtgcc ccagggaagg	2760
[1784]	cctctctgga aagtgacat gtgacacctt ggaggaggtg aaggaggagc ctatgaggca	2820
[1785]	agcagaaagg aaagcatccc aggtcagca aggagcaaac tcccattcag cgaagaggac	2880
[1786]	agaaaacctg gccctgggc cttgtgggac tgagttctag ttgatggaa gccgtgggag	2940
[1787]	gctcgtggac agggcacata gtgacaacac gcagtgtttt ttttgtattt ttagtagaga	3000
[1788]	cggggtttca ccttgtagc caggatggc tctatctcct gacctggtga tccgccgcc	3060
[1789]	tcggcctccc aaagtctgg gattacagc ttgagccacc gcgccccggc ctgggtggga	3120
[1790]	agttatgatg agcctggggg agttaatttc ctactaccac catttgact atggcttggg	3180
[1791]	tttttacaga gggtttctg aaaacgaacc cctctgtgct gctcaagtcc tcccagatgg	3240
[1792]	atgcgagggg tattgagagg gaggcaaat ctgcatagag aaggaggcct ggcttggagg	3300
[1793]	atgagagggg aggggaggcc cacgaagcac ttcacctga gctgccctc ttcggggctc	3360
[1794]	ctctaattga ccatgacct tctctgagcc tcagtttccc tctctttaca ctgattatct	3420
[1795]	gagaggtagt agggcaccag ggatactgtg aacatttgag gaagtgggca gggctctccc	3480
[1796]	accattgcc cattgccgga catttatcat ttaccattcc ctggccttgg ccccataaaa	3540
[1797]	gccagtaggg ccatccac atgtgggaat atcctagctt aggggtgtgga ggggggtgcc	3600
[1798]	atgcctaatt aggttcccct gcagtcctc ctttcttgt atctgatggg gaccgctcaa	3660
[1799]	cagagtcact gtggctggac accaaagacc cttagctggg aaggatgcca aggggagctg	3720
[1800]	gagggagccg ggaagctggg agaagggcca ggaccttca tatccacctg ggaggatttt	3780
[1801]	gagcgtcact aaagagccgc attttttgaa acccatttg taaaatccta agacacagcc	3840
[1802]	caaagggagc ccccgctgc atctgggtg cattttattt tttttaacgg tttgtttgtt	3900
[1803]	tgttttttat cagagtcttg ctctgtcacc caggctggag tataatggca tgatcttggc	3960
[1804]	tactgcaac ctcccttgc caggttcaag tgattctcct gcctcagcct ccgagtagc	4020
[1805]	tgggattaca ggcgccacc accatgcccg gctaattttt gtatttttca tagtgacagg	4080

[1806]	gtttcaccaat attggccagg ctgatctcga actcctgacc tcaggtgatc caccacactg	4140
[1807]	aggtgttggg attacaggcg tgagccaccg cgccccggccc tggggtgcat tttaaagcta	4200
[1808]	ctcagtattt gtggatacag taagagaaga tgagcttccc agtagtgtgg agcccttget	4260
[1809]	ctcctggtgg gcgggtcaaa ggctttctct gtactgtcgg gaaacctgcc tgaaaggcca	4320
[1810]	catacattgg gatatttgct tcaaagcctc tcaaaataga gttggaacct tggaacatgg	4380
[1811]	agaggggtga cattcagttg ctatttaatc atgatttgtt aatcaacagc tcagttatgg	4440
[1812]	gaggcatctt agattagtgg aaaaagcagg gagtcagaca tccagactca acctccgctt	4500
[1813]	tcctgctgtg tgaccttggg caagtggctt agcctctctg ggcttcatgg tttttttttt	4560
[1814]	tttaatctgt aaaatgcacg tgagagtga tgccaggtat tcaactcaca atggaaaaat	4620
[1815]	gcagctagga aaagccctag actgcgttat tgctagaaca ctctgggtct cagtttcctc	4680
[1816]	atctgttcaa tgggtacaga actggaggtt taagttagat aatgcgggtg aagtacccat	4740
[1817]	gtggtgtggg cttgaggaag aaaacatggg acaatggttc cacatccctg ggtgacctga	4800
[1818]	agattaagtg tgaaatgtct catgagggca cgaaatgaat attagttttt gttcccttcc	4860
[1819]	tctgctgtga gagtttgaga gtagaaagggt gagagagacg gtactctgtg aaggaaggca	4920
[1820]	ggtccctggc ccagcacagt gccagctcag gggattcttg ggcaggggct aagtgcattg	4980
[1821]	gctgtgtggg cgtggtggga agctctgcga accagaacca ggagcaagaa acagcattcc	5040
[1822]	ttgcgtggaa gggaaatgag ggcaaaagggt ccgatgccta cagaagtcta caccctatgt	5100
[1823]	acttcagttc tgtctgtggg tgcagcctct agggaggttg gtgttcaggc actgagacct	5160
[1824]	ccatctgtcc tctgaccaca gggaagccag cgggaagcaa aggtgggggtt cttgagccac	5220
[1825]	accagtgcca gctctggtgc ctgcccctcg gggtagctg ccttgagatg cacttcgctc	5280
[1826]	ctctgtgaac tgtctcgga cccacttccg gtcactgcc cctgatgttg ttactcttcc	5340
[1827]	actctgaaag gcagggaagt cctgcttctg taccacacca gtgctcagca gaggtccct	5400
[1828]	tgcaaatgcg aggctgattc caacttcggt ctgtttctct ggcaggatgc ctgtggccaa	5460
[1829]	ggccccccag gtggctggtg ggcaggggga cggaggtgat ggcgaggaag cggagccaga	5520
[1830]	ggggatgttc gaggccctg aggactccaa gagaaaagcc cggggctacc tccgctggc	5580
[1831]	gcccctgtgg ctgaccctgg ttgtgctgac ttcagtgggg gtgctactct ggtatttctt	5640
[1832]	aggtaatgtc gtgggactgc ctgggagagg cacctgggga ggacttagta gcaggcacag	5700
[1833]	caggacagaa cgggggtcca ggctcagcca tgcttagcat gttgctgtgt gatcttgggc	5760
[1834]	aagtcacttc tcctctctgg gtctccctcc ctgtctgcc agctggagac gctgtcagag	5820
[1835]	cctggtccca ggtcctatgg ctcaggcctg cttcccgtt gggcaaagtg cccaaggct	5880
[1836]	ccctaccagg tggggaaaat gggctctcct agcagtcagt tcttgtgaac cagcattccc	5940
[1837]	cagagcataa acattgcctt cccttgcccta cagtcctcct gggttgcccc tgaggcttgg	6000
[1838]	agccaacca ggctgaaga aggaggcca gaggcactca tgggtgcctgg taccaattag	6060
[1839]	tgctctgct cacttgagcc cagcctgcat tctctctag ggtggggacc acagctctat	6120
[1840]	cccttctggg tctccagggt ccagcatgaa tgggggatgg agcgggcagc tggagagcag	6180
[1841]	ctagccttag ggcctctcc catgtcctta attatggctg gcacacaacc ctcagtcagt	6240
[1842]	gtcctggtgc ttggggagca actggcctgt gctctgggtc catccatcca ggcttccatt	6300
[1843]	cattcattea ttgaataaat gctcttgagc atctattatc tttctctaag attgatggag	6360
[1844]	tctatcttct tccttctgcc tttgacagtg ggaagtaac gagaaaccaa actagactgt	6420
[1845]	gcctatacac tgtacactgt agaagcccca ttcattcgtt catttattca gtgccaagca	6480
[1846]	cctcctgtgt gccagtgact ggggtcagcc cctgtccttg tgattagcca aggcgtcaga	6540
[1847]	cctgacactt acgctaaagc acggcatgtg ctgggacaga gaaagctgag ggctgggagg	6600

[1848]	ccacggcagg gacaatccag ctgcctgcgt gatcagaggc atcccattaa acatcctgca	6660
[1849]	aaggttagct agtgctttta ctggccgaat ctcctggttg aattccaggc ctgttgaaag	6720
[1850]	caacctgggg accaaccttg cagcagtggg gcgaaatcca cgtaggccta gatccaaggg	6780
[1851]	ggtcagggtt ggtggtgtct ggaaccagcc tctgggagtg acgctgttg gaaccccagg	6840
[1852]	tctgacatgg gcctgcttgc aatgacttac agtgattcta cccagagttg agcaacgcag	6900
[1853]	gcagtagacg ctgtgtgcat ttcaccaccg gcaagaagcc agtgccccag atagcacagg	6960
[1854]	gctgtggggg ctcctcagg tttcgggcta atgagtctta agggtaaacc atggggcact	7020
[1855]	gggctggagg ggcaggaact cacctgcca ttatttctct ttgcagagga gtttaattcc	7080
[1856]	ccctgattat gctcctgggg taaatcatcc ccaccccagg agaggtgctc catggggctg	7140
[1857]	aggaccaag ggtgagtgct tcccaagcca actccccac agagggatta agggttggag	7200
[1858]	gaggcacttc gggagctgtt tgaaagactc ctcccgctg gaccaggctg tgctcctgag	7260
[1859]	actgggtgct gggcaaggag gtggatcaga gacatgcccc gccctgtctc gaagaggagg	7320
[1860]	tacacaagtg gccgtgaca ctggtgcaca ggccccaaagc gaggagggca gcctggcccc	7380
[1861]	aggagagggt ggggccgact tctcaaggag gatggtagca gagcccttaa taccaccaac	7440
[1862]	cgtatttctt gggctctttt ctttctctgc tctcccaggc aggagtttg tatgttctca	7500
[1863]	agccccagc acccgctgc cctgtgtct tgcttcagt agaaaacaga atggcttaga	7560
[1864]	agagaagccc cacacatgtc ggcccacctg cctcccagc tgcatacgt gcactcctcc	7620
[1865]	ggagcccccg atcccgcctc ctctgcgcac acaatggccc ggcaccagca aggggtgcct	7680
[1866]	ctttccccca gcagcagcgt ctatcagtgt cccttggggg gcctccccca tttctctgct	7740
[1867]	ccttgaagga gctgtcagtc cacacacctt gtctctctgt gccctttcca acctggttcc	7800
[1868]	ccctgcccc caactccaac ggccattgtc aagctcacca ggttgctaaa tccaatgtcc	7860
[1869]	agttctcagt cttcattgca cttgaccggg gggtcactc ccacctccag aagcccttg	7920
[1870]	ctctcttgac tttggccgc cactgggtcc ttttctctca gcgggttttg ctttttctgt	7980
[1871]	gtccctgctg atgggggggg gggcctctcc tttctctctc caccattct tctgtatct	8040
[1872]	catctgtac ccttagcttc gagtgcctt tataacctga tgacaccac atttgcat	8100
[1873]	ctagcctggg cctctccctt gagcttgact ctagagctgc cctgtctct cctctcatat	8160
[1874]	gtctaaggag catctcaaac cccaggagtt cagaccgtga ggtctctgca taatttcccc	8220
[1875]	cagacctgca cctcccacat ccaggtccaa gaccattct tcttggcacc tccccctac	8280
[1876]	tcctctcttt cttttccacc ccagcccaa tttgccagca aacctggtca tctctgactc	8340
[1877]	caaaatacat caaaaacggc tgaagccaat cacttccac cctctctct gccgcagccg	8400
[1878]	gggccaggct ctgtccctt ggacatctct gccctggagc cctgcaggtg tgctctcgat	8460
[1879]	gctctgcctg cctctgtcca gcgttcttag agcctttctc aacgtaacag cagagggacc	8520
[1880]	atttgatgaa gcaaaccaaa tcctctaatt tcctgtctta aaatctcacg tggggccagg	8580
[1881]	cacgtgctc acgcccgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggtggatg gatcacctga	8640
[1882]	ggtcgggagt tcgagaccag cctgaccaac agggagaaac cctgtctcta ctaaaatgc	8700
[1883]	aaaattaaca gggcgtggtg gcacatgcct gtaatccag ctactcgaga ggctgaggca	8760
[1884]	ggagaatcac ttgaaccgg gaggcagagg ttgtggtgag ccaacgtcgc accattgcac	8820
[1885]	tccagcctgg gcaacaagag cgaaactccg tctcaaaacc aaaccaaaca aaaccaaacc	8880
[1886]	aaaacaaaat acctccgtt cctcccctt taccagggt gaaagcccag gtctctccag	8940
[1887]	gcctgacaag ccctaccgg cctctcccct tcccaatctc ataccctcct gctgtcccct	9000
[1888]	tcccaatctc ataccctcct gctgtcccct tcccaatctc ataccctcct gctgtcccct	9060
[1889]	tcccaatctc ataccctcct gctgtcccct tcccaatctc ataccctcct gctgtcccct	9120

[1890]	tcccaatctc ataccctcct gctgtcctgt tgctcactct ttgctgctcc tgaaccacac	9180
[1891]	caggcctttg cacttgcccc tgcctgtgat actctttcca cagatgtaca tcaccttctt	9240
[1892]	ccctgacctc catactgcag cccgccccac gccctggttt ccaccgcact gatcacctct	9300
[1893]	aacctgttat acgctatgtg tggtttactg tctgattcct tgctagtctg caagctatta	9360
[1894]	agggcagttt tttcttgatt gttctgttcg ttgttttgct catatagtcc caagtgcctt	9420
[1895]	ggctcagttc ctacacatag caggctctca ggaagtattt gttgagtgga taaatagggg	9480
[1896]	tgtaaaccag ggctatgagt ctacctctt cacttcagcc aaaatagtct ttgcaaaaca	9540
[1897]	gaagtatgat ggcacacctc ctgattttaa acctttcacg gtttctcttg ttcttcgggt	9600
[1898]	aaagaccagc tgggccctgc cctgcggagg cccagctcc ttgccacccc tccccatccc	9660
[1899]	tgattgctcc agtcaaacag gctttcagcc cgggtcctca ccatggctcc cgtgccacca	9720
[1900]	gtcctgtgcc ccatgtgctt ccctctgttt gaaggtactt ctcttctctt tctcttacca	9780
[1901]	atttacggtt tccccatccc tacataccag ctggagggtc actccactct ggcccagcct	9840
[1902]	gagtgtctc gtcacgtccc ctcaacagca ccgagtggca ctgctccctg atggcactgc	9900
[1903]	ttacagatgg gtgccgcgtg ctgtgtgttt gccagcgcca cgcctttctt atccaccgtc	9960
[1904]	agcttcatga ggggagacac atctgtcttg gttaactagc gtaccccatg tagttggtgc	10020
[1905]	ttagcacaca cctgtgggat ccctggatga gctcacgaat ggaaggatgc ctagtggtgc	10080
[1906]	tgaccacag ccttgccctc ctgggcctat gtggatttcc tggccttctt gtcgttggtg	10140
[1907]	tcctggactg ctgctgtgtg cagcctctcc ctgggaacct gtaggacacc atccatctgg	10200
[1908]	gagcctctca cctccctggc accgtgcaac cagtttgtca tccaataaac tttggatgac	10260
[1909]	catgatgaca atggcagtaa caaagatgat gatgatgagg atgatggtgc tgtggagacc	10320
[1910]	caagacactg aggctgagcg gagggtgtgg gtggcaggag aaggcatgga agagacaggg	10380
[1911]	gcctttccca tccgcttctt ccattaaccc tgctggttcc ttcttgggca gggatcaagg	10440
[1912]	cggaggtgac ggtcagccag gtgtactcag gcagcctgcg cgtgctcaat cgccacttct	10500
[1913]	cccaggatct taccgcccgg gaatccagtg ccttccgcag tgaaaccgcc aaagcccaga	10560
[1914]	agatggtagg aaaggatttg ggggatgaga gggagggaat gtgagggtga aaagagagca	10620
[1915]	gtggggtctg atcacatgga gccagttggt caacccatct ggagcactca cggggaccac	10680
[1916]	agccctgctc caggcaccat ggaagcagat gaggttgagg gtgatgggaa agttagcgga	10740
[1917]	cgcttgagtc aatcgacctc ggattagatc ctgatcctgc ctcttaccag ggggtggagca	10800
[1918]	tgacctggg aaagctcccg cagtgcagct gacactgtca agggcccgat cctgccttc	10860
[1919]	cattacagga cgtggcctgc tctgcctctt ccgttacagg acggtggttc actgcacaga	10920
[1920]	ggctggtcta ctgcctgcca ctctcaggct gcaggatcag tgcccagcaa ggcaggccag	10980
[1921]	aagtgccagg gagttattcc caggaacacc cctgagccat gagcgctgga gtgggtggat	11040
[1922]	caataccaca gcttcttttg ccctggcttg gggaacggtt cagagagtgt tccaggctgt	11100
[1923]	ctcccagaga tgccctgctg ggctaagctc agaagctctc agctttacac tgcacattca	11160
[1924]	tggccccgtg ttggttacct actttccagt ctctccctcc caactactgt ttcccgaat	11220
[1925]	cacctccaaa taaaccactt gccccacctt gtcaatggag ggtctgcttc tgggggacct	11280
[1926]	agcctgaggc tgctgtttc ctctccatg aagtgggagt gataacaaca ggaccggct	11340
[1927]	gcagatttgt tgcgggttgc agtgaagtg agataacacg aacactattc ccacgccgcg	11400
[1928]	caaatgcttg agagcctgta atcctgccag cagcgtgtga gttggagatg tgcaaaaaat	11460
[1929]	ccagccagct gtgctaccca tcagagctgc tggcttctcc caggccacgg gaggaggtgc	11520
[1930]	ggaggggacc caggagctga gtgggggttt tcagagttga ggagtgactt ttggcaaggc	11580
[1931]	gcagaggggt catcggcagt gcgggtggag gtgagagtca ggtatagggg aaagggaag	11640

[1932]	atggggaggt tcatgcatgc cccggcctgg ccactcagca ctgtgtgact gtgatcaagc	11700
[1933]	ctgtccacct tggaggctcc tgcattggagc ggggctgccg ggaggagcaa agggcaccct	11760
[1934]	gaagtaggaa gtggccctcc ttgcagaggg tcccaggagc tctgtcttc cttctttaca	11820
[1935]	gctcaaggag ctcatcgcca gacccgcct gggaacttat tacaactcca gctccgtcta	11880
[1936]	ttcctttggg tgagttgtcc ttgcccctga caagctcctg caagaagctg agacacaaag	11940
[1937]	agtgggaggg gactctatag gcttctgatg caatgccttc atgtttcaaa tgggaaaact	12000
[1938]	aaggcacgga gagggaactt ggcttctgc atgtcacctt ccttctactg ggctcatctg	12060
[1939]	tagaatggaa acatgggtgt gataggtttg caccaggcaa tgactgtgat gggtagtcaa	12120
[1940]	gggcttgaca ccatcaggcg aggccatgtt ggaggcgat ggggttacga gcattggctc	12180
[1941]	cagggcctgg ctgcccgttt cgcattcgtt tctgtcgtt gccttgaagc atagtctatg	12240
[1942]	aggcacaagt tcaactctcg tgcctcagtt ttctcattca taaaataagg atgatgagag	12300
[1943]	cgcctccttc agaggttgc agaggcctt tgtgtgaaga cggacagcaa tggctggggt	12360
[1944]	gtggaagtgt ctcaatgtgc atgagcaggc gcggggcagg ggccagacct cagaatcctt	12420
[1945]	ccctggcccc tctcatttct gcctgcctta gggagggacc gctcacctgc ttcttctggt	12480
[1946]	tcattctcca aatccccgag caccgccggc tgatgctgag ccccgagggt gtgcaggcac	12540
[1947]	tgctggtgga ggagctctg tccacagtca acagctcggc ggctgtcccc tacagggccg	12600
[1948]	agtacgaagt ggaccccgag ggcctagtga tcttaggtcg gtactgggag tggaaacgtg	12660
[1949]	gggttggcct cgtgaggttg ggagaaacaa gctgtggtgt ggcctgggga ggctgcctgc	12720
[1950]	cagggctggg gtgccctcag ggtgggcccc ccaggagggc cccaggtga ggtagcagag	12780
[1951]	ccattgcatt caaggagcca ggaaggaaag gtggggtagg ggtgcttagg gtcaatctca	12840
[1952]	gacaaggtg gctccaagag tctcctctaa ttttatttct attgtatttt cttttattta	12900
[1953]	ttttgtcctt gtttatttgt ttattcattt ctttttatca gaagccagtg tgaaagacat	12960
[1954]	agctgcactg aattccacgc tgggtacgct acttttttcc cctccccact ttccttttga	13020
[1955]	gttggtgttt gtattgactt tgttgtgtgt cagggggaca catggcctct gtcgtgggtg	13080
[1956]	cagagagccc tggcccagag taccacaggc gatgccatgg tggactcagt gatgtgtccc	13140
[1957]	cagcaagtct tggaaactgt agggggagag gaggtggctt tgtgcacgca tgtattttgt	13200
[1958]	gtgtgtcttg tagacaagtg tgcatgtgtt cctgtgtggg tgtgagaatg agtcagattt	13260
[1959]	agtgtgccac aaactgact ctccttctct atcattgact tcaacctgcc cacaagccat	13320
[1960]	ttttccactg atggtagaaa atcacctcgc caattcacgg tgtgtcaggt cttttggagg	13380
[1961]	tagcggtgcc attgcattca aaaacactcc ttccaccttt tcttttcctt cccagtcagg	13440
[1962]	ctcatcagcc ctccctccct acctggtgcc atattgctag agtcaccttg catttctcca	13500
[1963]	agtggacca caatctttca gctgaccagc agagtcaccg cgctgcacaa ggcaggaggt	13560
[1964]	gctgtccaag ttgtagttag tgtgagttgt gcagtgcacc aactgggctg ctggactgta	13620
[1965]	cggcccctaa attctcagat tctctctaca gtatctagca ttgtcaccca gagccaaggt	13680
[1966]	gggggtgagc gtctcaaccc cttctcaggc agggaggcag agtttaaatc cttgtttatac	13740
[1967]	ttttccttaa cttccccctt tcccatcctg ctgggtcaaat gtttgctttg ttggatggag	13800
[1968]	gtgatgagct caaagtacag ttttcaaaga ggtgaaatca tgattctcat acaaagatag	13860
[1969]	agtgaccacg tgtcaaatat gtatttaact gattaacagg ggaaccagcg gaatggtaaa	13920
[1970]	gaatgaaga aactgatctg tctgtctgtc tatctatcta tctatctatc tatctatcta	13980
[1971]	tctatctatc tatctttcta tctgtctatc atccctctct tgatatctgt ctgtctacag	14040
[1972]	ttgttctgta attatctgtg ctcatgggtt gttcgtttca tgagtgaatg atttaacaaa	14100
[1973]	tgaatgaaag catgaatgag gagactggtt cagtgtgcgt ccagggcaga gtctcaggga	14160

[1974]	gcagcggtaa caacttaaac ccttgaagtg gactttctga gcacttcctt tatgccaggc	14220
[1975]	cccattcctg tgctgaggac accaggacga ccgtgtcctc acccctgccc tcgaggagac	14280
[1976]	ttcaagcccc atgagggaga cagagcacat aaacagactc tcataacatc aagtgccagt	14340
[1977]	gtgaaaatag agggcccaga ggcagtggag agagggaatt gtttgttcca aagcagagga	14400
[1978]	gggttaaadc aagagcctca cacagagtcc cagatctaca ggaggaaggg gtgctcctga	14460
[1979]	ctgggggatc ctggaagact tcatggaggg ggcacagat ttgggcatgg gctgggcgtg	14520
[1980]	gtggcacacg cctgtaatcc cggcactttg ggaggccag ttgagcagat cacctgaggt	14580
[1981]	caagagtctg aggccagcct ggccaacatg acaaaatccc gtctctacta aaaatacaaa	14640
[1982]	attagtgggg cgtggtggcc catgcctgta atcccaggta cttgggaggc tgaggcagga	14700
[1983]	gaatttcttg aaccaggaa gtgtaggttg cagtgcctg agattacacc attgcattcc	14760
[1984]	agcctgggag acaagagcaa actccattta aaaaaaaaaa aaaaaattag ccgggcatgg	14820
[1985]	tggtgtgcac ctgcagtcct agctactcgg ggggtggagga ggggaggcta aggtgggagg	14880
[1986]	atcacccgag ctgaggaggt tgaggctgca atgagctgtt gtgatcaca cactgcactc	14940
[1987]	cagcctgggt gacaggctgt ctcaacaata aaataaaata attttttaaa gaaaaagaaa	15000
[1988]	ttcaggcgtg ggggtaggca gggatttgc agggtagaaa ggagaaaggg ttccctgggc	15060
[1989]	agagagaatg gcaggggcaa aggccaaagg agagcaacac ccaaggcatg ttcagttact	15120
[1990]	tcctcccagc cccgagaggt gccaggtccc ctgacgttac ttctgattaa caagaggta	15180
[1991]	gcacacacct ctccactgaa ttcacctaaa aaaaaaaaaa aagagtaatt attaaagtgg	15240
[1992]	caagaacaaa gaatctgctt agagcaagat ttaaagaaca caaaacccta ggaagagcca	15300
[1993]	ggcatctttc cccagctgct ggtggaggct ctgtcccttc cctaggcaga tactgttgggt	15360
[1994]	ctctccctgg ggagctcggc tccccactgc agtcagcaca gccaggggtc agggagaagg	15420
[1995]	agctgagcca caggcggcag catcagagca aagtgtattc accttcattc ccttcctggt	15480
[1996]	cctcagcact gcccggagga ggtcatagga cagggtattat tatcacatcc atttgacaga	15540
[1997]	acttggaaatg gctaagccac tggcccagac tcagttaact acccagaggt agtgaacatc	15600
[1998]	tacctctaca gagtccgagg ttgataatct acaatcaata gtaagtcaga gttattattc	15660
[1999]	ctgagagcct ccgggggact taatcagacg atgcctgggg acagagactg gctcactgca	15720
[2000]	gcctggacac cgaatctggt ccaactgctgc ctgaccaaga atgacatcat cacacagctg	15780
[2001]	atgagtgttg gtgctaggtg gggagggtag tgcccctcct tccttctctc cagttttctc	15840
[2002]	ccctccccc ctccccggg ggcccagcag atggctagcc tagggagctg ccctcagtet	15900
[2003]	gtccaagctg aaagggggac ctttgcttgt cgggtggcctt ccaaataaga cgattttaaag	15960
[2004]	cagagaaaat agactgaaaa ctgaggtttt ataatttcat gtcaccaggc tgcctccac	16020
[2005]	atcccagggt cattcctaaa tccccactgg ctcttggaag aacaccaggc ttctagttag	16080
[2006]	gtttaaatga gatactggat gctccatggg agagaatatg ttactgcca gaccctgggtg	16140
[2007]	cctagatgga acacacagta ggtgcacagt cactgttttg aatgaatgaa tgaatgaatg	16200
[2008]	aatgatgcag gtggtactgc tttgtaagtt ctagcagtgc atcagagctt atggattaga	16260
[2009]	tggaagagca gaggctcact ggtgtgtggg gtaggggtgt aggggtgtaat ggtgaaggag	16320
[2010]	ttgtgaagcg aggcagccgt gagatgggct aggtctgagc ctgaggcggg gccagcggca	16380
[2011]	ggatgacaag tcacaggcct ttcttcccag cctacctgc tccgtttccg tcacaccac	16440
[2012]	ctgaggaaca ggcaatgtct ttactgagcc cctactgtgc aaggcgccgt gctgggcact	16500
[2013]	caaatgtgcg tcatgtcaca acctgctgat gaccctgcaa ggggtggtgtt attgtccat	16560
[2014]	tctacagatg aggaaccaa ggcccaggaa agattaggtg gtggctgggc aaacctagat	16620
[2015]	gtgtccggcc caggtctgtg caatgggcac aatcattgaa cgtatctcat agagctgttg	16680

[2016]	tgggcattca gtgagacact gaggaaggc attcagctcg gtttctggcc tgtagcaaat	16740
[2017]	gcttgataag cacctgtttt attctgacga cttcaccatg attagctcaa agctcacgtc	16800
[2018]	ctccccctaa ggcagcctcc cagactcctc cttggggcag tcccttctct ctaccagaag	16860
[2019]	tgaagccctc atccccttgc ctctcattg cgtgtggaat cgctgttctc cacagtgttg	16920
[2020]	ctcgcagcag ccagaggagt gtgtgggtcca agccagccca tgtctagcct tgctcaacct	16980
[2021]	tctgtggctc cctatggctg caggagaaaag cagcgtcggg cctgggagtg gcctgggtccg	17040
[2022]	ggctccctg ccttcagctt gtctctctaga cacatgtgcc ctgtgtgtac ttttctcaaa	17100
[2023]	gctgcctggc tcgccccagc ctctttgtc acgcggggac cccagggacg cccccagcct	17160
[2024]	ataggctggg tttggaacca tcacctctg agctattctt gcctgttctg tgtctgtttg	17220
[2025]	tctccgctgt catccatgtc cccaggcagt gactgtatct ttacctgggc actgagaaac	17280
[2026]	catgaagctc agtgggtgtc cgttccatga gtgaatgact gaaccaatga acaaatgcgt	17340
[2027]	gaatgaggat actggcaggg aaagagaagg atcgggtaga gcgtgtcttg ctgtccccac	17400
[2028]	ctggctcccc tgccccggcc atcctgcctc gggaaggacc ttgaggaacc tggctcccca	17460
[2029]	gggtccctc cttctgggtc acaggaatca ggggctttgc cctcttccc gctccaggtt	17520
[2030]	gttaccgcta cagctacgtg ggccagggc aggtcctccg gctgaaggga cccgaccacc	17580
[2031]	tggcctccag ctgcctgttg cacctgcagg gccccgaaga cctcatgtg aaactccggc	17640
[2032]	tggagtggac gctggccgag tgccgggacc gactggccat gtatgacgtg gctgggcccc	17700
[2033]	tggagaagag gctcatcacc tcgtgagtc ctgggaagga gggcgggagg gagggctgga	17760
[2034]	aagggaatg gctgattagg gggttaaaag tcacacacaa cattcttaga caagtggggg	17820
[2035]	taggaccttg ggctgggta tctgggagac aggacggcta gtctagagg gataggagag	17880
[2036]	aggagctgg agatggttgt gtagtgcgag cgcttcccct ccccgagcct cggttttccc	17940
[2037]	atttgaaca aagctgttgt tctagatgac ccgtacagac agctctggga ggcactgttg	18000
[2038]	cttgttggga tatttcagag cctggctgca gcctggacgt tcaacctctg ggctcattcc	18060
[2039]	taaatcctga ctgcttctg gcagagcacc caccctccct gcttccaggt tgctgggtggg	18120
[2040]	gtttaaatga gacactagat tcgcaatggg aggggatatc ttcactgccg ggccctggtg	18180
[2041]	cctagatcaa acgcacagtt ggtgtgcagc atctattttg agtgaaccaa tgaatgatgt	18240
[2042]	aggtggtact gctttgcaag ctctagcaat gcatcagagc tcatggatta aatgtaagag	18300
[2043]	cagagagggt tactgtgtg tggggtgggg gtgtgggggt gtgatgggga accccctgcc	18360
[2044]	tcctagctgt gtgccetaag ttactttgcc tctcagaacc ttcttacctt gcactttgcg	18420
[2045]	ggatcattgg aggatttaaa tcagactatc tgtaccatga tccttacaca tagtgagtgc	18480
[2046]	ccagtaaatg ctagccatta ttgttatcat tatatatagt ctaactggga ctgggccaca	18540
[2047]	aaaggcgttg agtaccaggc gccgtttgga atttgataag tggggagcta ttgaaagtgc	18600
[2048]	tgagatctgc ggcatgtgcg tgagctgagt tcctggaggg ctctgggaag cacagagaag	18660
[2049]	ccagacacca tctgacttcc aggtccaaaa aggggtgggga cacttagggg ctccccctgg	18720
[2050]	ggcttctcca ggtgccccctc agcttgggag gggacctgac tgccaggccc aactctgttc	18780
[2051]	ctagtcactg tggctcctgg tggctccctc atcccagacc cttggagaag ctctaaaatg	18840
[2052]	acaggtcaga caacatttgg ggttctcaag ctctgacccc agaaacctgc tagggaatgg	18900
[2053]	gagtgagggg gcctttggtg gtgacaggaa gacagagcag gtggccccctc gtccaggttc	18960
[2054]	aaccatgtgc tttgtttctg cgttccatgt ttcatgaca agggctctgc tgctaggtaa	19020
[2055]	ataaaataac ccccccaac aatgaaagca aaagccccct ttaaagggtga cccccaggtc	19080
[2056]	ttttccatcc tgatatcgta tctcccacct cccagggaag atgagccagt aaggcccaaa	19140
[2057]	aggacatggc tgtgtgggag ggtggggggg ggcgcggtct ggctggggag actagagcac	19200

[2058]	tgcaggaaga ccaagctgga atggtaggaa gaaggacga gggcctgggg ggcgagcggg	19260
[2059]	gtggtgcctg ctactggagg ccacctccct cctctggcga gaggccaggg gaactgcccc	19320
[2060]	atctccggac tctgggcacc aagaccttc caggagacc ccctgggctt atgcacacca	19380
[2061]	cgccttcaac cggctgcagg ctgctcggat gccacgtgtg gtgattttgc ggctgtcctg	19440
[2062]	ggaggagctc aggtactcgc ttgccaaagt gcccacaaatc cctccagcgg cacccttcc	19500
[2063]	tcctgtcaag gcccagggtgc ccacgcacag tcagcaggca gggaggctat tgggttacct	19560
[2064]	actcaggggc aggcagggt gttagtttct tataaattgg cccatcagat gcgctgggcc	19620
[2065]	tccagagggt attgtcattg aacttgggaa gtttgggtga ggttgggtgag aggggtgaagg	19680
[2066]	ggcgtgggg aaccctgtgc tgagacagga agaccagggg catctgtgta tgtgggaggg	19740
[2067]	taccagtcat cacaggcaat gcctagcga ggcctgtctc tgccatggac tgccgggtgag	19800
[2068]	gcctcagttt ccccatctgg gaatcaagaa gctgacttca acagtgtcac tggagtcttt	19860
[2069]	tccgggctga cattccagac ttctaaaagc ccagaagtct aagatacgtt tatttgttcc	19920
[2070]	gagccccca ggcaccaagc tctgggcaga tttctggggc accctggggg tcaccagacc	19980
[2071]	acacctgcct tctccctgtc gcctccttga acacggccag gagttgcagt gcaggcagcc	20040
[2072]	agaagggtg gccctgcag atgccagtct agtcttctc cagggatgc taggggccac	20100
[2073]	aggtgattcc gtagcagggt ggaggagct ggggaggag catgagactt gagccagcca	20160
[2074]	tcattcattga actgtaagct ccagaagtct ggggaacctc caggcctctc tcaccaagg	20220
[2075]	agctggcctg gtccttgag ggccttcagt ctgtcctctg aggccaggga gatacagact	20280
[2076]	cccatggac acacagcggc ctctagtagc agacctgggt ccagaacca gatatccaga	20340
[2077]	ctctcatcca ccatccgga gcagctgcct gccacctcc ctgccaactcc cctcccagac	20400
[2078]	ccggcccag ccttgccgt tttctgttct gccagggtgt atggctgcag ccgccaggag	20460
[2079]	cctgtgggtg aagtcctggc atcggggcc atcatggcg tggtcttgaa gaaggcctg	20520
[2080]	cacagctact acgacctt tatgtctcc gtgcagtcgg tggtcttcca ggtgagggg	20580
[2081]	tgaggggact ctggggcagg ggagggtg tggtagaacc ccagggccct cactgggct	20640
[2082]	cactgtcac cttttgccc aacttgggga cgggatggag aggggaaggt ctggaagtc	20700
[2083]	ctgtctctc cactcccca ccctggcccc actcttctt ccgccatttg cacttccacc	20760
[2084]	ccgctctgcc ccttgacct tctaccgtt cgcagtctct gtcttcccg catcgtccc	20820
[2085]	tcacttctc cctcttccc tctccatcct tcttctcct tttctcttt ctgtgctgac	20880
[2086]	tgcctctcct cctctcac cctctggac ctgtgtcccc tccctctgc cctcctgc	20940
[2087]	cctcttccct cggcaccac cagtggctgg gcctggaaca ccggtctgtt tgcagcagga	21000
[2088]	ctcagaactc cttggattct gccctagaca gtccgcttac ggccaagagg gcacaggag	21060
[2089]	cttggggagg catgatggca gcacagccag gccagggcca ccggtgtgac aggtcccca	21120
[2090]	ctgccctccc agccccacc ctctcctgc ttcaggacct cccccctgc ccccttcta	21180
[2091]	ggaaggcac gtccactct gcaactggaca gctgtcctgg gccggggcca gccatactc	21240
[2092]	tgggcaggaa gctcaaaact tgccatttct ggagcttggg aggggaagat ggcagagagg	21300
[2093]	aagccacaga gtattggcag ctgcttctc cccgacctt gtccccagtc tgctccctc	21360
[2094]	cactcagggt ccctgccctc ttctcagtt atccctaaac tctctggcag ggaccagggt	21420
[2095]	ccccagctgg ccaagctgga gctctaaatg ggtagcagag ctgttctctt gggagtctga	21480
[2096]	cacaggtca aggcaggagg gaacaaacgg ctttgggggc cctggcccca tggagagatg	21540
[2097]	gccagggcag ctgagcgtgc tcctgtcctg acccctggac ccctcagctt ctcactgtgt	21600
[2098]	agcctcaacc aagccactcc ttttctcaa acctatctt ggaaaagggg aacagctctc	21660
[2099]	tctctcccag ccgccaccgt gaggcctgcg cagggtgtgaa tgcattttgt aaactggcgg	21720

[2100]	gtgctgtccc gcaaatgtca ataactaaca cggatcgaac acttactaca tgccaggctg	21780
[2101]	tttgaatgtt ttatgtcttt ttaatcctct ttactaccct atgagggtgtg tgctattatt	21840
[2102]	gtccccatth tacagatgag gaaactgaga cccaagttca cacagttaca ctttaaccaca	21900
[2103]	gcactttgct ggcagagggtg gtaggggttg tggggttaca agctgcgctc gcctgctggg	21960
[2104]	agggtcagcc aggggacccc gtgtaacggc tgctctcctc gtccagcctg cgaggtaaac	22020
[2105]	ctgacgctgg atgacaggct ggactcccag ggcgtcctca gcaccccgta cttccccagc	22080
[2106]	tactactcgc cccgaaccca ctgctcctgg cacctcacgg tgagacccca ccctgcctgc	22140
[2107]	ccacctgtcc tctgccccaa gcacagcacc ggtccctggt aaccgggat gagagcgggc	22200
[2108]	agtgtcctgc ttctgtgaa gcgcccacag gctgagccct gggtaccaat cctgctaggt	22260
[2109]	ggagaggggt atgggcgagg tctccctctg tggatcacag caatgcctgt ttgttgagt	22320
[2110]	actgacagac tttagcccca cctgggattc tatgtctcct tctctttgtt gttagggagg	22380
[2111]	tgggttcacc aatctggcca caccatgg gccacctgat ggcccgtcc tccctcccag	22440
[2112]	gtgcccctc tgactacgg cttggcccctc tggtttgac cctacgcact gcggaggcag	22500
[2113]	aagtatgatt tgccgtgcac ccagggccag tggacgatcc agaacaggag gtactacttc	22560
[2114]	ctctcctccc tccagcttc tttcctccct cccctccct ctcctccctc ccctacaggt	22620
[2115]	gacccctca ttggaagccc aagtccccag cctcagagg acagcaggga gagccagcag	22680
[2116]	aggctggggc tgggtgtggg cctgttgtcc tcgtcccgt ccccgtgt ggccccagct	22740
[2117]	tcctctctag ctacccagc agtctcagac actcttggtc atcagacacc ttgatgttg	22800
[2118]	gttctaatta cagcaaaata gtctcatctc cttgggtgct gtaacccct ctggcacct	22860
[2119]	caattcttca ataaaatgat tccagagcca aaggactcat gggcacttcg gtgccttccc	22920
[2120]	cctaaaccca aggtgtacaa tccaaggac ctctccctta ttatgacccc ctgatgcaca	22980
[2121]	gccaggtcca atccattgc acagggtaac atggaaatca cgggtgccct ggatccccg	23040
[2122]	aatcccaac agggcacttg ccctcttccc tgctcttgcc cttgccccct ctggtaacta	23100
[2123]	agtttctgac aaagaagtga gtcttccag ggatgtgagc aagagacagc agagttaggc	23160
[2124]	tgagcgacca ccgtcaccag ggtcactatg gcatgaggcc aataagtcc ccctgggcct	23220
[2125]	ggccaccagg aggccatggg tgttgccagc agcttcagag gcctgggggtg ggcagggagg	23280
[2126]	cagggaacaa gagacagcgt atatggacag tttttcattt gtctgggaag aaaagagaac	23340
[2127]	taggcaattc aaggaagggg catttaagac aggagaggtt ccgtatctca aatgtgtgga	23400
[2128]	tcctcccagc atccccagag ggagagaagg aggtcaggt acaggtaata ttgttttagag	23460
[2129]	ggtggagggt gggcaagagg agaggaggc cctccacgg ctccattgtt ggggagcaga	23520
[2130]	ggtttgggga gagagaagag gaatattgaa gcagcgatgg cagagccagg gagacccttc	23580
[2131]	ccctgggaat ccagggtgaa aacggtcatc gtgtcagcgt caggaaagag gagactaccc	23640
[2132]	ctcatcacag actgggctct gccctccctt ccaaccccag aattctgggg gcctaattggg	23700
[2133]	ttgagagtct agtacgaag attcatcatt tcttggttcc acagagtttg aatatccaag	23760
[2134]	atgccagtct tggaagatgc caaaattgga aggtctctggg gctctagaat tcttgattt	23820
[2135]	ctggggtctg agttccatt caccaacact tgtaatttgc ttgttggttg atcctattca	23880
[2136]	aaaggatcat ccagacaaaa ggtgacagag aatgacaagg ttgtcttgac tccctttttg	23940
[2137]	caatttatct gggactagga ttaaaggaaa ggagaagaat taccatgggt atgatttagg	24000
[2138]	actatgctgt tgggggtgac atgggaagt actttgggcc tgtgctgctg ggggtgacat	24060
[2139]	ggggtgtgac ttcaggcctg tgctgttggg ggtgacatgg ggtgtgactt caggcctgtg	24120
[2140]	ctgttggggg tgacatgggt aagcagtggc ttcagggtt tgcatttggt gatgatatgc	24180
[2141]	tgatggagtg tgacatcagg cctgtgctgc tggggtgaca tgctgggtccg gtgacatcag	24240

[2142]	gtctgtgctg tctggagaga aggcattctgt agcatgatgg gggcacctct gggaatggct	24300
[2143]	gccccgaccc tcatggagct cccttggggc tgccttgctg ctacttagg ctgaggatgg	24360
[2144]	ctggcctcac ccccgctcac aggaacccgc aggggtgaccc tgagatggat ccatgattca	24420
[2145]	cagttctgcg aatgatgaga acatgttttc ctgcctcccg ccctacccca gagctgaact	24480
[2146]	ttatgtctca gggaggctca gaaaggagaa ggaacagtct tgggtctgac acccccatct	24540
[2147]	catccctcac ccccatggca attccatttg ccagagggtg ggccccagca ttcaggggtt	24600
[2148]	gtggggagtt cagtggcctg gagttagggg ctaagacagg tgttcagtgc attggcccaa	24660
[2149]	caacctgtgt ggtcattggc accgttccca tttccagag aagaaaatca aggctcggca	24720
[2150]	ggattaggta acacgcagat aggtccacag ttggggctct tcccataccc caccagccac	24780
[2151]	aaacggcagg ccaaaggatg ctccacccca tgcttccttg gggagggccc tctccctcc	24840
[2152]	ctgatgcagt cgggcaaggg tctgggtact ggggacacag ggacttcgtg agctaccctt	24900
[2153]	gggtaatgac agagagagtg tggaacacgg atgggagaat cttttcccta atccaaagga	24960
[2154]	atgatgcctc aatggtgaat ttgaggcgt aggcacagctt ccaatgggtt ggagggatct	25020
[2155]	ccccagagtc tctgagcacc attgagctat agaacgtgtg ggctggactg gtcctagcac	25080
[2156]	ccaacctatg gtacagggtg ggaaactggg atcagcagtg gttaaaagga cttggccttt	25140
[2157]	tgtccctgtc ttttctgcct ttcagtgtg gagatggacg tcagggtgta gctaagcgtt	25200
[2158]	ggctgggtgg tgaggatgag gcctggcagt tccccgtgcc cccacagctc cctctctct	25260
[2159]	gtccaggcct cccttgccat atgggggttg aagtgtcag tggaatctgg cgtcagggtt	25320
[2160]	tgcatggatc tctagatgcg ctcccttcct tgtctgtgaa acaaggggtt caggccagcc	25380
[2161]	ccaacctttg attacttacc catcaggag atgctgtctc ccatacaagt tgcgtttatt	25440
[2162]	aattcttggc caagggccat tccaagtcag gctggtgagg cagaaagtgc tttagtgtcg	25500
[2163]	aaaccagaca ggccaaggct cagcacctgt ctctctgct tcctacctgg gcgaggactt	25560
[2164]	agatctccca gcctcaggta actcatctga aaaaaggctg tgaaagagac ccccgccctg	25620
[2165]	ggaagactaa gtgagacagt gcatggagaa cactgcacac gtgggtgtgg gtcaagtga	25680
[2166]	gcgaccctgc gttctcacc ggccgtcact ccgctctggg caggcacaag ctgaggggtt	25740
[2167]	tacggtgctg gctctttcag cctcaacaac ccagcgagga atcacgtgcc tgtacagact	25800
[2168]	tcatagacca gtgagacacc caagacagag acacgaagta atttgcacaa agtcaccag	25860
[2169]	cttgttgagc cagacctaag gccaggcagc ctgatccgga gtgcacgtgg gtgcacagat	25920
[2170]	gcatgtctgt gtgcgtgctg ccatgcatgt ctgtgcacgt gtgtgtgcat gtgtgtgtgg	25980
[2171]	tccacgtgtg cgattcttcc ctctgggcct ctagtggccc atgccagctg gtgactccct	26040
[2172]	cagccatccc cagccaaccc accggcatcc ggatgggggg atggatggtt tctgtggctg	26100
[2173]	tcccaccagc tgcagagtgg cctgggaagt cccagccctt tcttctcaga ctttcattaa	26160
[2174]	gggtccagga tccccagggg cagactcttg tccccctccc gcagactcct cctgtgcgaa	26220
[2175]	tgactgtgga agggaaggca gaggtggtac ctgcgaacca tctgcactgg gacaccgtgc	26280
[2176]	cctctagtta tgatcatggg cgatagtgat catcccatgt agatgctgag aaattcttag	26340
[2177]	aatgagcgat gttggaatc tgcttgtgtg ggtggcaaag acatgagagg tctagggaag	26400
[2178]	agcagatttt cagacaaggc acttttaggga gggggagggt cagtccttg gcccagaatg	26460
[2179]	cccatgtatg gagagggtgt gtcaggggag agggatatct aacctcaag tgccagcgta	26520
[2180]	gtgatgagga aaggctggcc tgggcctccc acgggctgag catccttagg cacctcacct	26580
[2181]	gactcctctg agcccgtggt gcctcctca ccccgaccta cctgctgtct acctagcttc	26640
[2182]	tcttggtgcc cacttgagcc cagctgaggc ctcatgccct tgagaggcct gaggggtgta	26700
[2183]	gaaggacttg gcctgtgaga tctgacctcg gctgctccgt ttgcgagaag ccactctcac	26760

[2184]	gggctgccac caaagcacag gcttccccct ttctgggaac ctgcctcctg ccagcttcct	26820
[2185]	ctcctgtgac atcacttctc ttgtgagagg cccaccatt tccactcact cccagccagt	26880
[2186]	ggggacaggc agaatcatgg gtccctagg cennnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	26940
[2187]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	27000
[2188]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	27060
[2189]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	27120
[2190]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	27180
[2191]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	27240
[2192]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	27300
[2193]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	27360
[2194]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	27420
[2195]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngg tcacacagct tgttcctggg gcaaagtcag	27480
[2196]	gctgtcagtt cagctctgca gccccagtc cagagctctg gccatgctgg gtgatgctct	27540
[2197]	cctccccctc tcagcacttg cttctgtga ccctccttc ctttaacct gttttagat	27600
[2198]	aaggcatgg tgggtgcac tcatccacc atgcaccctt ctttccttat tcttcttgt	27660
[2199]	gttctccca ccttccatc catccacca tcatgcatt tatecctca ggcagtactt	27720
[2200]	cctgacaggt ccttcctga cagggtacct cctggatgag gcaagaagga aatattcccc	27780
[2201]	atattcaacg aggtgaggaa gcaaggcagg ccacacggtg caaaaatgtg cttcagaca	27840
[2202]	ctcagtactt ttagccgag atgaattggc aggcacgca gcagtcaggc ttctggtgct	27900
[2203]	tcttgagag ggctagagag gacacttga tggacaggag gccctggaga gccagagaat	27960
[2204]	gtgcaccctc tccagaaag ctctgcagca gaaacagaaa actcagatgc gccaggggc	28020
[2205]	caggccagg ctagagccta tgacgggggt agttttccag gctcttttct ttctttcctt	28080
[2206]	ccttccttct ttcttcctt cttctttct ttttcttct tttctttct tttctttctt	28140
[2207]	tccttttct ttttcttct cttcttctt ttttcttct tttcttctt tttcttctt	28200
[2208]	ccttctctc ctccaccatc acctctctt tctcttctt ctccttttcc cttcttctc	28260
[2209]	tttctcttct tcttctctc ttcttctgt tctctctct cttcttctt ttcttcttt	28320
[2210]	tcttctctt cttcttctc ttctctctt cttctctt tcttctctt catcttctt	28380
[2211]	cctctctct cctcttctt cctcttctt tcttctctt cttctctt tcttcttaga	28440
[2212]	ggagcaagaa tctggattat tatgtgaaat tagctcgaga ctcaatgaag caatttctac	28500
[2213]	acgtgcata aacacattgt ctttatgtg agtgactccc cctgggccac tagatttcag	28560
[2214]	ccccgcctt gaattcctc ctggtgctt ctaagcagaa gcttgctcta ggggtccacc	28620
[2215]	accactacc ctgctccagg cctccagagt gagaacaaa tgccaccag gcagacagtt	28680
[2216]	tcccggtac gcggtgaagc cttggggaaa ggttgtgcc agctacaggc tggttctagg	28740
[2217]	actctcccg gaggttaata gagagaact cctgtagcag gcacaggtgc ctttgcctta	28800
[2218]	cagccccctg ccaaggctg ggtgacactg cagccctcca cgcagttgct tctagggtga	28860
[2219]	aacgttcac tccccctca ccccggttg ggttcttct ctgtctctc acaatctccc	28920
[2220]	tgtgactgtg ggaggacac cccaaggccc atgggatgtg cttgactcct cattccccgg	28980
[2221]	accagtctt tgcaaccctt ggtctccctg tctacttctt gaggtcttct tgtgaggaaa	29040
[2222]	acaatccatg ataactttat aaacagacat caaaaccagg gtttctctgg ttttacgagg	29100
[2223]	gcaagagggc cgggtttgct caggggcgcc ccctggcggt gcctcatccc ccaccggccc	29160
[2224]	tgctgggctg ggggaaccac ggtgggagc agcgactccc aacctgctct gtctcaggac	29220
[2225]	ccagttactc tctgcaaaat gagcacctta aagagttgtt gcttatacag gttatagatc	29280

[2226]	tataacctgta gcattagaaa ttggaacaaa attttaaaat gtttattaat tcctttaatg	29340
[2227]	taattatcag cccattacac atttgaatat aaataatatt ctatgcaaat tagttgcatt	29400
[2228]	ctccaaaagt aaaaacattt agtggcaaga gtactgtcct tttaacattt tgtacatttc	29460
[2229]	tttaacaact ggcttcacag accacaggcg ggaccttcga atctgcctcc gagttccatc	29520
[2230]	agtcccgatg tcacacatca cgtagtctct ggaaaactcg tctgtcacct tatgagagaa	29580
[2231]	tgagggcaaa aaaggcaaat gacatctgaa tgttactaaa aaaaaatgac ttttgaccc	29640
[2232]	cagggggtcc cctgactgtg ctctgagaac tgctgggttg tgtaagggtg agatcgtgat	29700
[2233]	cactgtggcc agatagactt atgggggtgc cagagtctag gccagtctg tggaagacat	29760
[2234]	gggggatgta gggggctcag acctcagagc tactgggtgca gtgggaatca ggatccctcc	29820
[2235]	cgccaagcaa gctaggtgag ctcttctggg ccctgaggcc agattctgac gacaccttgg	29880
[2236]	ctctgcgct catgagcctc atctgtaaaa tgggatgaga gcaattcctc cctccctggg	29940
[2237]	cggagggtgct gcttgaaact cagaatcccc atgcaacgag gccttgtgat gccatagctg	30000
[2238]	atgaggtcga gcccagcca cacacctga gatgttaaaa cagcctcaaa gctcatcttc	30060
[2239]	agctgttcag tggctggtga attgattaac ttattgaacg gttaagtgtc taccacgttc	30120
[2240]	tagaagttct ggggaagtgc ctggccctg ggaatcatgg ctggctccaa ggggtttgga	30180
[2241]	tttgcgtggt ggtatctcca tcggccctca ggggtattcc tgatgctctc tggatttctc	30240
[2242]	tctgctttct ctgccagggg cattttcagc tctccctgca gattttcagc ctgcgccctg	30300
[2243]	tgtgtgtttt ccccatctgc aaagcgctct gatttgcctc gtggcaggca tttctatgag	30360
[2244]	ctgaggaagc tgtccccgtc tgttctgcaa gcgtgtccca cctgggatga aaaggaaccc	30420
[2245]	ccggcggtg tggaggagg gttccactgt tctcaggag tggttacacc cactctgtga	30480
[2246]	aggcacgcg ctgcccactt actctggggg acgaggtgcg ccgactctc tacaggagga	30540
[2247]	gcccctggac ctatgacctg gagatgggag ggctcctacc tgttctctgg taggagagaa	30600
[2248]	agactcagcc tctctggagg ttccccacc tgctctgttt aaacaagtgt atcttcttgg	30660
[2249]	tggtgttgtg gcaggggagc aggggcggtg ttgtccagca gggatgtgag ggtgctccca	30720
[2250]	cagctggggg tgggtcccacc ccgtgaggcc atgcacggag aaggtgctgc ccatcagcac	30780
[2251]	taagtactg gtcatgggag aaggactggt ctttccctca aaccacagc gtcacaagga	30840
[2252]	ggcaggaagg atggtgccta aacggggagc actgctgccc cctcgtccca caccaacctc	30900
[2253]	aaggcgaata acctgcaca tctgtggaca gtaggccagt caagggttt tgcctcgact	30960
[2254]	gacacattga agccttttgt cagattcaag gtcaacagaa ataatttttc ctccctccc	31020
[2255]	tcctccctc cctccctccc ttcttctc tctctctc tcccgnnnnn nnnnnnnnnn	31080
[2256]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	31140
[2257]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	31200
[2258]	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ntctgcctc agcctccaga gtagctagga ttacaggcat	31260
[2259]	gcgccaccac accccgcta attttgtatt tttagtagcg acgggtttc tccatgttgg	31320
[2260]	tcaggctggt ctcaaactcc tgacctcagg tgatccaccc acctcggcct ctcaaatgc	31380
[2261]	tgggattaca ggtgtgagcc actgctcctg gccaatttt cttgttttat gagggaggaa	31440
[2262]	agtgaggctc aaagaaggac cctgacttgc tagaacctca cagttcacag gtcactgtga	31500
[2263]	ctagaattga gttttatctg gcaggcaatg ggaagccatt gaagaatttt gagcagggga	31560
[2264]	gtgatatagc caggctactt tctagaagat aactctgggg gtgaacagtc acccaaggga	31620
[2265]	gaaatcaggg cagaggaggc gcagtggggg tgcagctccc cctgcccctc tggctgcct	31680
[2266]	gtccttgctc tgtgcacggg acccaggaga ccagccagtg cagccctgag ttgtgtctga	31740
[2267]	tttccccag gctgtgtggt ctgcgcatcc tgcagcctta cgccgagagg atccccgtgg	31800

[2268]	tggccacggc cggcatcacc atcaatttca cctcccagat ctccctcaca gggcctggtg	31860
[2269]	tgcgggtgca ctatggcttg tacaaccagt cggaccgtga gtatgggcag ccgggggaac	31920
[2270]	ccccgcagt gactctctgc ctcttggcca tccctggaac caccaagggg gctgtaggca	31980
[2271]	gctgcttatg aggccgaaca aaaggagaga gagagagaga gagagagaga gagagagtgt	32040
[2272]	ttgtgcttgc acaaatttat gcagctttgt gtgtgcccac gtgtgcaagg cagccacacg	32100
[2273]	ggtttgcaag aatacacact catacatagc ctgtgcgtgt gtctggatat gtatgtgtgt	32160
[2274]	tctgtgcgtg tgtctggata tgtatgtctg cttggaatgt gtacacgggt gcccaggaac	32220
[2275]	acatggcgcc tgtccatgtg tgtgtgagtg aacaggtgca ttcatgtctt tgtgcgcctt	32280
[2276]	tggggctatg catggcctaa cggcgccctc cctgcctcca cggtcacctg tggtttcgca	32340
[2277]	gcctgccctg gagagttcct ctgctctgtg aacggactct gcgtccctgc ctgtgatggg	32400
[2278]	gtcaaggact gcccacaacgg cctggatgag agaaactgcg gtgagcaacc cgccgcgcga	32460
[2279]	tccctcctct ccccgccaat cctcctccc tctcacctt cctgtctctg agctgagtgg	32520
[2280]	agacccact cctacatgta gcttccatta tcaacaccca ggaagtgggg ttctctcact	32580
[2281]	gtgcgggggt ggcaagatga caccacctcg tgggacagtg gcagggacaa gtggggagcc	32640
[2282]	aggtctcctg acttccagct cagggtatc acccccaccc ctgtcccagc cagccttcca	32700
[2283]	ataaaggaa agaatgggtg agggagatgt cccctcctc tgccctgtca aaggtttaaa	32760
[2284]	tatgtgtttt tccaaaggaa gcaagatgtt catggccggg gggatgatcc tgccacggtg	32820
[2285]	ctgggggagg tgcctgatat tcggaaactg aacatctggc ttcaagttct ggctcagcca	32880
[2286]	agtgaccttg gacaagtcac ctcatctgtt tccaccaatg aaatggggta tctcacaggg	32940
[2287]	ttgtctgtaa actttgggtg taaaatagca gagaaaggg ccgggcgcag tggctcacgc	33000
[2288]	ctgtaatccc agcactttgg gaggcgagt agagcggatc aactgaggtc aggagttcaa	33060
[2289]	gatcagcctg gtcaacatgg tgaaacccta tctctacaaa aagtacaata attagctggg	33120
[2290]	tgtagtggca ggagcctgca atcccagcta cttgggagtc tgaggcagga gaatcgcttg	33180
[2291]	aacctgggag gttgcagtga gattgtgcca ttgactcca gccttcatga caagagttag	33240
[2292]	attctgtctc aaaaaataa taataataaa ataaaaataa ataaaattaa aataaagtag	33300
[2293]	cagttagaga tttgtgatcg gtaatgtgca atacagcaca cttccacag gcacgcgcaa	33360
[2294]	gccccagctg gctcctctgg cttcctccca cctgtccctt ctctgtatct ccacacagtt	33420
[2295]	tgcagagcca cattccagtg ccaagaggac agcacgtgca tctcactgct taaggtctgt	33480
[2296]	gacgggcagc ctgactgtct caacggcagc gatgaagagc ggtgccagga aggtagggca	33540
[2297]	gggcctggct gagtgtctgc agggacacca aaggcagtct aggcctgcta catgcttcag	33600
[2298]	caaaggtttc tagcttcttg tcccaacacc caccaacccc tctgtattta cacctgtata	33660
[2299]	tctatccatc catccatcca tccatccatc catccatcca tccactcatc tatcttctgg	33720
[2300]	tctccaatca ccctgtctgt ccatcgattc atacagctac ccatttatcc atgcatctac	33780
[2301]	tgacctttgc aaccactgat cttcctatca tcaaaactgc aatctaccca cttattagtt	33840
[2302]	tggctgacta cctgcctgta atggccactg ttccatccat ctgtccatcc atccatccat	33900
[2303]	catccatcca tcatccatcc atcatccatt catccatcca tccacccatc catcatccat	33960
[2304]	ccatccatcc atccatccat catccatcca tcatccatcc atccacccat ccatcatcca	34020
[2305]	tctatccatt catccatcaa tctatccatc atccatccat ccatccatcc atccatccat	34080
[2306]	acatccatcc atcatccatc catccatcat ccatccaccc atccatcatc catccatcca	34140
[2307]	tcatccatcc atccatctac ccatccatcc atccatccat ccatccatcc atccacccat	34200
[2308]	ccacctaccc atccactgat ctccctagca ccctgtctat ccactgggtc ttacatccac	34260
[2309]	acatttatcc aaccttctag ctgtctgtca gtctccctaa tggaccacca ctccacccat	34320

[2310]	tggttttct gctcaatctt ctgtctgggt ctatttatcc atccatccat ctaccaccc	34380
[2311]	aactgaccaa ctgaccatca cttgcagact atccagcaat aggcaagggt cagtgaggaa	34440
[2312]	gtgggaataa aacagcagag atgcggcccc tgctttccaa ggcttatctg ttaggacgat	34500
[2313]	acgatgagt actctcctgc cgtgtaggca gattgtgggg caggaggag gtcagacatg	34560
[2314]	aaaagcttcc tggaggaggt aggcgtttgg cccttggtga gagctaaaac ttaaatgggc	34620
[2315]	aggaggaaag gagagcggca aagaccaagt ggtggagtgg aaagtcttt acagtgaaga	34680
[2316]	gcaggaggga aaaggtggca accgggcagg gccagagcct gggagactgc caggctaggt	34740
[2317]	ggggactctg gtctgaaagt ggagcatag ttctgctttg aagtccaca ccagaggggg	34800
[2318]	aggcatgatc ttgtggtcag gagctccagt ctgagaatgg agacactgct ttgactcaa	34860
[2319]	cagaccagtc tcagtggagg ggctgggggt gcgggggaca tggcctgctt ttaggaaacc	34920
[2320]	ctaaaggaga ctcaggaaaa gactctccag tcacctctg gatcttctg ctccatcgtt	34980
[2321]	cctgcacct actttggaag tctcctttgg ggctcagaga cccaccttct gtgccctgtc	35040
[2322]	cccatccct ctgtcccagg ggtgccctgc gggacattca cttccagtg tgaggaccag	35100
[2323]	agctgcgtga agaagccca cccacagtgt gatgggcggc ccgactgcag ggacggctca	35160
[2324]	gacgagcagc actgtggtga gccctgccc gctgcctggg gccctggagc ttgggaggga	35220
[2325]	gggggtgcc cacagcagga cgctggagg aaatctcacc cctgttccct ggtctctctc	35280
[2326]	tatcccaccc tctgccccct cacacctggg tctttatgat ctctccccct ccattgttct	35340
[2327]	cctgttctct gtctctccat ctctttcct tgcccttct ctctgtctgt ctgcttctcc	35400
[2328]	ccttccccct ctctctgtc caccacacca cctgcccccc atccccagac tgtggcctcc	35460
[2329]	aggggccctc cagtcgcatt gttggtgggg ccgtgtctc cgagggtgag tggccatggc	35520
[2330]	aggccagcct ccaggttcgg ggtcgacaca tctgtgggg cgccctcctc gctgaccgt	35580
[2331]	gggtgataac agctgcccct tgcttccagg aggacagga agggggaggg tgtgggggcc	35640
[2332]	taggccataa gaggcaaggg cagggaaggc tgggtggcg gtgcactgtg tctgagctct	35700
[2333]	ttgcagatag agggaagggt ggtgaacccc tcagacaggc tactgtgatg tgggttctag	35760
[2334]	ttctggctcc accaggacct actgggtccc tggacacatt gttctacctc tctgcatct	35820
[2335]	actttcggt tcttgcctta agttgggcca gtgattcatt cattcatctc attcactcat	35880
[2336]	tcagcaacac ttgttgtgt cttactatgt gccaggggct atggtagatg ctggggatac	35940
[2337]	agtaaaggac agaactgccc tacctggtca taagctatga cactccccca ggtgtgacat	36000
[2338]	gaagtagcag ggagccccc ggggacatct catcaggcct catggccatc ttcccatct	36060
[2339]	gcttgggtgg ctgaaacct ccccaatcca cccgcagaca gatctgggct ccagatcctg	36120
[2340]	ccccagaac ctgcacaggg atcctcttt gtatctctc tggggcacag gttgctctga	36180
[2341]	ccacctagct ctctttaacc ccatcccagg ctccgcactg ccctcaggta gagagaccg	36240
[2342]	aaggtgccc gcctgccacg caggcagctg actgcggcag tccaattcct ccacgggtcaa	36300
[2343]	cgccccccc ctccccacca ggaccacca acctcgggga actcagagca gcctgggtcc	36360
[2344]	gtaaagtgt aaggaaaaa gaaatttgtg tcgagggcct ggccctgtgc tacatttttt	36420
[2345]	agatatacgg tcttactgga ttctctcaag aacagtcgag tagaaaatgc cgttcccat	36480
[2346]	ttgcagatga ggtggcagag gcttagagag gcacacacat gtctaggag ggataaagct	36540
[2347]	ggggcctgga acccaggcag gccgagggg tgaaggctga aagctgtacc accagctagg	36600
[2348]	cggccttcag ggagggaagg gagggctgg tgtggagggc actgtcccag gcggcagttg	36660
[2349]	gctatcctga ggtccctgg atggggagag gcagcttccc cccacccac cccacccac	36720
[2350]	ccccccac cccagcatgg cctccccggc gctgtggacg gtgttctg gcaaggtgtg	36780
[2351]	gcagaactcg cgctggcctg gagaggtgtc cttcaagggt agccgcctac tctgcatcc	36840

[2352]	gtatcacgaa gaggacagcc acgactacga cgtggcgctg ttgcagctcg accacccggt	36900
[2353]	ggtgcgctcg gccgccgtgc gtccagtctg cctgccccgc cgctcccact tcttcgaacc	36960
[2354]	cggcctgcac tgctggatca ctggctgggg cgccctgcgc gaaggcggta agcggccggc	37020
[2355]	acgtacggcg ggaggcggag ggagaccgtg cggagccaga cctgvcggag ccgcttcgcc	37080
[2356]	acacccggcc tggagaaggg cggggctggg ggggtccggg gctccacccc acaggccctt	37140
[2357]	tactcctggg attcaaattg ggctgaattt tacggtacaa aaccaccctt taatgcggcc	37200
[2358]	cataggcccc cgccccgtcc ctccctagctc ttgccttcat tctggaaggg cattatgtgt	37260
[2359]	ggggcaaagg ggcaggtctg gggggccact gccacgtgc aagctccacc tgctgtcctt	37320
[2360]	tggcctgcaa gggcggaggc tcttaattat tagcacttcc caccatccagg ctgaatttta	37380
[2361]	ggggaacatg acttcacgta atccatccaa tagccctggg gcggaagctg tggccccatt	37440
[2362]	ttatggatgg agaaaccaag gctccacaca cagccagaga ggactggagc agagattaga	37500
[2363]	accaggagct ggctgcctcc agagcccccg ctcttctctg tactgtcttc agaaacaggg	37560
[2364]	tctctccctt ttctaccttc actaaccaga gctggctgtc cctggcggcc accgtacagt	37620
[2365]	tttggggaca cagaccagc tggcaaacct acagacatgc cctgcagcct tagtgttggt	37680
[2366]	ggcttcacaa atgtgtacag tgacttacaa tctggaggca ggcagggtg cagagatatt	37740
[2367]	ttaaggatgg gaaaactgag gctcagagga acagtgactt acccaagggg atggcagaag	37800
[2368]	tcatggcaaa gcaaaggctg gttcattcac tattccttca ctcatcagt cactcaatga	37860
[2369]	cactttctga gcaccagcta tgtaccaggt atgggggttaa gggaagggtg catcaggatg	37920
[2370]	gagagagaac attctcgggg gagacagtga taagagctgg catggatggg gaggtgtagg	37980
[2371]	gacagtggag acacagagge ggctcctgcc taggtagggt caaggaggc ttctaggggg	38040
[2372]	gggtgtttaa agctgaggcc tggaagatga gttggcaaca tccagacaaa gggaaaagac	38100
[2373]	attcaggatga agacacaggt gccaaagacag gaagacctga gaacatccgc agcctgccag	38160
[2374]	aggggccaag gtggggggca ggtgtgcctg ggcaaggagc agccagtgtg aggatcttgg	38220
[2375]	gccaggagtt ctccctccta cctgcacctt agaaccatgc gtggttcaag aaaaaccctt	38280
[2376]	gtatcaagge ttcccagggg actgtgatat gctgccctcc tggagaagca ttgggggtgga	38340
[2377]	ctgcagagtt ggggctctgc agagtgttaa ggaaacggtg aagggggtcag atgtgggctt	38400
[2378]	tggaaacatc cccagggtgt ataacatagc agcgaagagc cagccagagc ccagagggtc	38460
[2379]	ctgaacagac agagggtggg gacaagacgc tggagtaaga cactcatcca cagggtctt	38520
[2380]	tttttttttt gagatggagt ttactcttg ttgccaggc tggagtgtgaa tggatgtatc	38580
[2381]	ttggctcact acaacctctg cctcctgggt tcaagcgatt ctctgcctc aacctctga	38640
[2382]	gtaactggga ttacaggcat gcaccaccac acacagctaa ttttgtattt ttagtagaga	38700
[2383]	cagggtttct ccatgttggg caggctgggt ttgaactctt gacctcaggt gatctgtccg	38760
[2384]	ccttggccac ccaaagtgtg gggattacag gcgtgagcca ctctgcctgg ctctccacat	38820
[2385]	gggctttggg caggggctct gtctccatga accccacaga gaaagagcta gaataaagt	38880
[2386]	acaggagggc agaggggcag gtgcaacccc agcagaggta aggggtgggca gagcaggaga	38940
[2387]	gaagcaggct cctgagatgc aaaggagcgt tagggagaac aggtgtctca ggttccttag	39000
[2388]	atctcacttc tgcccttgac cacggacagg cccaccagc aatgctctgc agaaagtgga	39060
[2389]	cgtgcagttg atcccacagg acctgtgcag cgaggcctat cgtaccagg tgacgccacg	39120
[2390]	catgctgtgt gccggtacc gcaagggcaa gaaggtatgc tgccagggtg gtacccccag	39180
[2391]	tgtgggaggg agaaagaaag gatgctgtct acatcatcag ggtctggccc tatgctcaca	39240
[2392]	tcagcctgct gaagcctccc atcctcccag aaaggtggcg atggccgccc tcactttaca	39300
[2393]	gaagaggaga ctgggggttg gaagggttga ggagcttgcc caaggttgca gagccatgga	39360

[2394]	tcagaagaaa tgctgtgacg ggcagggtgtt aggctcaaac ccagttctgc tccttgccca	39420
[2395]	tcacaaggca ctaggcccag ggtcccacag tgagggtgat gcaaggaaga agaaaggcgt	39480
[2396]	gtcagccaca gaagggcggg ggagacagag tgggggtgtg gggacacagc cacagttcca	39540
[2397]	ggagggccca ggctggctgg aggacaaaga gggttggctt ggactctctc catttagcag	39600
[2398]	gcgaggaaaa agcagagctt taagactgaa cgtgagtctc tggcacccag tcaattccca	39660
[2399]	acagtcagga cttaatcccc atggcccctc gcctggaaag ggggtgccct tacctgctt	39720
[2400]	cagtcctttc tcctttcccc ctttcagggt gactcgggtg gtccgctggt atgcaaggca	39780
[2401]	ctcagtggcc gctggttctt ggcagggtg gtcagctggg gcctgggctg tggccggcct	39840
[2402]	aactacttcg gcgtctacac ccgcatcaca ggtgtgatcg gctggatcca gcaagtgggtg	39900
[2403]	acctgaggaa ctgccccctt gcagagcagg tcccacctct tggactcaga gagcccaggg	39960
[2404]	caattgccaa gcagggggac aagtattctg gggggagggg ggcgcgagca ggccctgtgg	40020
[2405]	tggcaggagg tggcatcttg tcttgtccct gatgtctgct ccagtgatgg caggaggatg	40080
[2406]	gaggagtgcc agcagctggg ggtcaagacg tcccctaggg acccaggccc acaccagcc	40140
[2407]	cttctgcctc ccgattctct ctctctgtc cccttctcc actgctgcct attgcaagga	40200
[2408]	agtggctcag cagcaagaat gctggctcta cgtccccagg agtgtctgag ctgtgccccca	40260
[2409]	ctctgtacag aggtgcttg ggcagcctt cctctagaga gcagatgcca gcttcggaag	40320
[2410]	cccctggtct aacttgggat ctgggaatgg aagggtcccc cataggaggg gaccctcaca	40380
[2411]	gccccgggga ctgccagggt ggccggctgc caccgtaagc caaaaaaggt ggggaagccc	40440
[2412]	tgactccaag gtccttgccc caccctgcc tgccacctgg ccctcacag ccagaccct	40500
[2413]	caccggcagg tgagctcagc tgccctttgg aataaagctg cctgatccaa gccctctgc	40560
[2414]	tggagtttga atggggaccc gggcaccagc cttacgccct tgactgaagc agtccttgc	40620
[2415]	tccagctcag cctgattgac aagtgtccag aaggccaagg tgggctcagt ggcagcaggc	40680
[2416]	gtggccactg agggccactg agggctggga cctctggggc agctgccag gtcctaggag	40740
[2417]	aaatgctggg aaggcaatcg tttggggacc ctacaggtcac agggagggat gtgaggagca	40800
[2418]	atggtctcct tttggaacct taaaggaaac aggtcagag aggcggttaa gacatctca	40860
[2419]	tggtggcact gggggttagg agtggagggt gcatagactc cggctctcca gttccccgc	40920
[2420]	tgccatggcc ccctccagcg cgacactcat tccctttgaa ttctttgaat cattgagtag	40980
[2421]	gcactgtgct ggcgccacag ggggtgaagga cctggctcct gacccagaa gcaatgggga	41040
[2422]	tgatccagtg ggaaggggat ggaggggagc gcagaccggg caagtcaagg caagtgcct	41100
[2423]	ggaggtgtg agacttgagc tggggttcag aggtagtcaa ggtgggaata tccgggaggg	41160
[2424]	atattccagg cagggaaga gcatgtgcaa aggcacagag tcccgaaga atgagacaca	41220
[2425]	ctaggacca gcaagccgag tgagtgttac aacagagctt gagaggggaa ggactgaaga	41280
[2426]	attcagaggg gcaaaccgag gcgggatagc agagcctgga gttgagccaa ggatttgacc	41340
[2427]	ctgcaagttc tgtggagcca tggtaggtc tatagcatag gggtgacatg agtggactca	41400
[2428]	cattttggaa ccagccttgg caccagtgtg cagggagtgg caggcaggga ggctgggtag	41460
[2429]	gccactgcag gattccggga aggagaggat gggccgggac tgagcggcgc cacgggatgt	41520
[2430]	actggaggat gatttcggac ccctgagggc agttgtgacg gagccggggg acccgctgga	41580
[2431]	ggtgagggtg ggtgctcaag tgtggacaac tctttctgga agcctaactg ggagcggaag	41640
[2432]	ggacagaggg cgcttcagag gggccctaga ctgaagaggg gtttttccag catgggcgt	41700
[2433]	gctgccagggt ctgtgggtga atgaggcaga aggggaacca gggacgggaa gcacccacct	41760
[2434]	gggtcctgcc aggaggagcc ggggcagctg ggcgagcagg gggcgtctcc agagcagggtg	41820
[2435]	ggcagaacac atgcagaatc ctttgggtga tctggaatca ccgtgggccc taccctagtc	41880

[2436]	ttcgtcggaa tcctggaggg gtgggggatg tcatctgttc tcctaacaag cctcctggcg	41940
[2437]	actcttttgc aaggatagtt ggaccccaaa agtgaggcca gctttgaagt ggagcgtcct	42000
[2438]	c	42001