



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103930112 B

(45)授权公告日 2018.11.09

(21)申请号 201280051452.1

(22)申请日 2012.10.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103930112 A

(43)申请公布日 2014.07.16

(30)优先权数据
61/549,319 2011.10.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.04.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2012/055692 2012.10.18

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/057687 EN 2013.04.25

(73)专利权人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 D·费尔巴哈 B·戈麦斯-曼西拉
Y·何 D·约翰斯
C·洛佩兹-洛佩兹
K·H·麦卡利斯特 N·佩索斯
L·桑福德 M·韦斯

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.
A61K 31/44(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

(56)对比文件
CN 1678611 A,2005.10.05,说明书第7页倒
数第3行,第8页第17-24行.

CN 1427840 A,2003.07.02,说明书第1页第
2段,说明书第3页第2段、倒数第2段.

CN 1678611 A,2005.10.05,说明书第7页倒
数第3行,第8页第17-24行.

CN 1427840 A,2003.07.02,说明书第1页第
2段,说明书第3页第2段、倒数第2段.

Glenn A. Doyle et al..In Vitro and Ex
Vivo Analysis of CHRNA3 and CHRNA5
Haplotype Expression.《PLoS ONE》.2011,第6
卷(第8期),第e23373页.

审查员 曹寅秋

权利要求书2页 说明书46页
序列表31页

(54)发明名称

预测对 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的响应的生物标志物

(57)摘要

本发明提供了用于预测患有认知损伤或功能障碍、精神病的和/或神经退行性疾病的对象对 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的治疗响应的方法。

1. 能够获得个体在CHRNA5基因的基因座上的基因型的试剂在制备用于预测个体或个体的组对用于增加认知技能和/或治疗认知损伤,精神病的和/或神经退行性疾病的(R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷疗法的治疗响应的方法的试剂盒中的用途,所述方法包括步骤:

在个体的基因组中鉴别CHRNA5 SNP rs55853698-T或与所述SNP形成单体型的SNP,

其中纯合存在CHRNA5 SNP rs55853698-T或与所述SNP形成单体型的SNP是个体将可能应答(R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷疗法的提示,并且

其中通过使用进行序列特异性引物(SSP)分型、序列特异性寡核苷酸(SSO)分型、基于序列的分型(SBT)、DNA扩增、微阵列分析、Northern印迹分析或逆转录PCR的试剂来检测SNP的存在。

2. 能够获得个体在CHRNA3基因的基因座上的基因型的试剂在制备用于预测个体或个体的组对用于增加认知技能和/或治疗认知损伤,精神病的和/或神经退行性疾病的(R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷疗法的治疗响应的方法的试剂盒中的用途,所述方法包括步骤:

在个体的基因组中鉴别携带CHRNA3 SNP rs6495308-C和/或CHRNA3 SNP rs1051730-C,

其中在个体的基因组中纯合存在

CHRNA3 SNP rs6495308-C或与所述SNP形成单体型的SNP,或杂合存在CHRNA3 SNP rs6495308-C/T或与所述SNP形成单体型的SNP,或

纯合存在CHRNA3 SNP rs1051730-C或与所述SNP形成单体型的SNP,

是个体将可能应答(R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷疗法的提示,并且

其中通过序列特异性引物(SSP)分型、序列特异性寡核苷酸(SSO)分型、基于序列的分型(SBT)、DNA扩增、微阵列分析、Northern印迹分析或逆转录PCR来检测SNP的存在。

3. 根据权利要求1至2中任一项的用途,其中鉴别步骤包括额外的步骤:

获得所述个体的生物学样品,其中所述样品选自由血液、血沉棕黄层、血清、血浆、淋巴液、尿液、泪液、唾液、脑脊液、腮拭子、痰、发根、白细胞样品、组织样品、和其任意组合组成的组,和

将生物学样品与试剂接触,其中所述试剂能够检测:

(i) CHRNA5 SNP rs55853698-T,或

(ii) CHRNA3 SNP rs6495308-C,或

(iii) CHRNA3 SNP rs1051730-C,或

(iv) 与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP。

4. 根据权利要求1至2中任一项的用途,还包括选择患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性的疾病的患者作为第一步骤。

5. 根据权利要求4的用途,其中认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病选自由轻度认知损伤、阿兹海默病、帕金森病痴呆、路易体痴呆、精神分裂症、血管性痴呆、AIDS痴呆、老年痴呆、与年龄相关的轻度认知损伤(MCI)、年龄相关的记忆损伤、自闭症、额叶退化痴呆、中风、基底神经节退行性疾病、多发性硬化、创伤、脑肿瘤、脑部感染、脑积水、抑郁症、中毒

或代谢疾病、和药物诱导的痴呆组成的组。

6. 根据权利要求1至2中任一项的用途,其中通过使用至少一种与携带所述一种或多种SNP的核酸分子上的特定区域特异性杂交的寡核苷酸,确定

(i) CHRNA5 SNP rs55853698-T,或

(ii) CHRNA3 SNP rs6495308-C,或

(iii) CHRNA3 SNP rs1051730-C,或

(iv) 与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的存在。

7. 权利要求1至2中任一项的用途,其中施用用于治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的第二种认知增强剂或治疗化合物。

8. 权利要求7的用途,其中用于治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的第二种认知增强剂或治疗性化合物选自非典型的抗精神病药物和常规的抗精神病药物。

9. 根据权利要求1至2中任一项的用途,其中待施用的(R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷剂量是每天从2mg至100mg。

10. 用于检测

(i) CHRNA5 SNP rs55853698-T,或

(ii) CHRNA3 SNP rs6495308-C,或

(iii) CHRNA3 SNP rs1051730-C,或

(iv) 与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的至少一种探针在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于确定个体是否响应

(a) 使用(R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷对认知损伤、精神病的和/或神经退行性的疾病,或 α 7烟碱型乙酰胆碱受体的激动在其中发挥作用或涉及 α 7烟碱型乙酰胆碱受体的激动的病况的治疗,或

(b) 通过(R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷增加认知技能,

其中如果个体具有包括以下一种或多种的基因型,则所述个体将可能应答(R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷疗法,

纯合存在CHRNA5 SNP rs55853698-T,

纯合存在CHRNA3 SNP rs6495308-C,

杂合存在CHRNA3 SNP rs6495308-C或CHRNA3 SNP rs6495308-T,

纯合存在CHRNA3 SNP rs1051730-C,或

与任意前述基因型形成单体型的SNP。

11. 根据权利要求1或2的用途,还包括使用至少一种探针用于检测

(i) CHRNA5 SNP rs55853698-T,或

(ii) CHRNA3 SNP rs6495308-C,或

(iii) CHRNA3 SNP rs1051730-C,或

(iv) 与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP。

12. 根据权利要求11的用途,其中每种探针是寡核苷酸。

13. 根据权利要求1或2的用途,其中所述DNA扩增为聚合酶链式反应(PCR)。

预测对 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的响应的生物标志物

[0001] 发明背景

[0002] 认知缺陷被认为是精神分裂症的重要临床方面,并且是决定成功的功能恢复和重返社会的主要因素(Green,1996;Green,2007)。精神分裂症或其他精神疾病中的认知损伤是记忆功能、问题解决、方向性和/或抽象的一种或多种中的获得性缺陷,影响着个体独立发挥功能的能力,特别是深刻地影响着语言记忆、执行功能、注意力和警惕性、言语流畅性和运动速度,但也包括其他功能。认知损伤不是病症的阳性或阴性症状的结果,或者是因为动机缺乏(Harvey等人,2004)。在大部分情况下,随着疾病进展,认知损伤不发生恶化或改善(Harvey等人,2004;Hoff等人,1999)。对于精神分裂症中的认知缺陷,尚无可接受的治疗。目前可利用的抗精神病治疗不改善实践效果以外的认知(Goldberg等人,2007;Keefe等人,2007)。

[0003] 一些证据线提示 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)可以参与精神分裂症的认知功能障碍。Freedman等人,1997建立了由精神分裂症展示的P50感觉门控缺陷与染色体15q14($\alpha 7$ -nAChR基因位点(Chini等人,1994))缺陷之间的联系。在精神分裂症患者中,减少转录的 $\alpha 7$ -nAChR启动子区内的多态性比对照对象中更流行(Leonard等人,2002)。尸检研究已经证实了在精神分裂症患者的脑部, $\alpha 7$ -nAChR水平减少(Freedman等人,1995)。 $\alpha 7$ -nAChR在对学习和记忆重要的关键性脑部区域(海马、前额皮质和杏仁核)中表达。 $\alpha 7$ -nAChR的激活已经表现出调控谷氨酸能、GABA能和胆碱能神经递质的释放,和改善多种不同的临床前期动物模型中的认知。

[0004] 已研发了新型 $\alpha 7$ -nAChR激活剂,用于治疗与烟碱型乙酰胆碱受体缺陷或故障相关的疾病病况。虽然假设 $\alpha 7$ -nAChR激活剂治疗可能改善认知缺陷,但迄今为止自相矛盾的数据和对 $\alpha 7$ -nAChR激活剂治疗的个体认知应答的变异阻碍了对基于 $\alpha 7$ -nAChR激活剂的认知损伤治疗的发展,例如,不知道为何一些患者不应答这些药物。因此,需要在治疗前预测患有认知损伤或功能障碍的患者是否可能应答 $\alpha 7$ -nAChR激活剂的治疗。因此,本领域急需在患认知损伤或功能障碍的患者中预测对 $\alpha 7$ -nAChR激活剂的响应的方法。

[0005] 发明概述

[0006] 需要预测患者是否可能应答 $\alpha 7$ -nAChR激活剂的治疗。该目标是通过本文公开内容提供的方法和组合物实现的。在本发明中,染色体座位15q24的遗传变体令人惊讶地表现出是患有认知损伤或功能障碍的患者对 $\alpha 7$ -nAChR激活剂治疗的响应的预测标志物。

[0007] 因此,本发明的第一个主题涉及用于在选择的患者群体中治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的包含 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的组合物,其中患者群体是基于具有人乙酰胆碱受体亚基 α -5(CHRNA5)基因(SEQ ID NO.39;15号染色体NC_000015.9,细胞遗传学位置:15q24;基因组坐标(GRCh37):78,857,861-78,887,610)或人乙酰胆碱受体亚基 α -3(CHRNA3)基因(SEQ ID NO.40;15号染色体,NC_000015.9,细胞遗传学位置:15q24;基因组坐标:78885394..78913637,互补体)中的至少一种提示性SNP而选择的。

[0008] 提示性SNP,如本文公开的rs55853698-T(SEQ ID NO.1),在人类个体之间是差异

性呈现的,并且基于所述患者的基因组中SNP rs55853698-T变体的存在可以预测患者应答的可能性。因此,在本申请上下文中,“提示性SNP”指允许在治疗前预测患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的患者是否可能响应 $\alpha 7$ -nAChR激活剂治疗的特定SNP。在本文公开内容的上下文中的提示性SNP指位于CHRNA5或CHRNA3基因中的SNP,以及与所述SNP形成单体型或处于同一连锁不平衡中的SNP。在另一实施方案中,本申请涉及用于鉴别CHRNA5或CHRNA3基因的提示性SNP的方法,包括步骤:

[0009] a) 选择足够大以获得统计学显著性结果的精神分裂症患者的组;和

[0010] b) 获得所述患者在CHRNA5或CHRNA3基因的基因座上的基因型;和

[0011] c) 向所述患者施用治疗有效量的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂;和

[0012] d) 通过使用精神分裂症认知测试组合(例如CogState™精神分裂症测试组合),用步骤c)的患者实施认知评估测试;和

[0013] e) 通过鉴别表现出统计学相关的改善的视觉学习、记忆力、改善的认知功能、改善的推理、解决问题的能力、或注意力和警惕性改善(“响应者”)的患者,将步骤d)的患者细分为响应者和不响应者的亚组,而按下文实施例章节所述测量为效应大小(effect size)的改善,是至少约0.1、或约0.2、或约0.3、或约0.4或大于约0.5;和

[0014] f) 分析步骤e)中鉴别的响应者和不响应者亚群体的基因座的DNA序列,选择那些仅存在于响应者的CHRNA5或CHRNA3基因的基因座中的SNP;

[0015] g) 通过关联步骤f)中选择的SNP的存在与步骤d)的认知测试的结果,鉴别杂合或纯合的提示性SNP变体。

[0016] 用于获得和分析在定义位置或基因中的患者的基因型的方法是本领域普遍已知的,并详细描述在本文中。

[0017] 优选地,所述组合物用于治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病,在所述疾病中 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活发挥了作用或涉及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活。在一个实施方案中,认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病选自轻度认知损伤、阿兹海默病、帕金森病痴呆、路易体痴呆、精神分裂症、血管性痴呆、AIDS痴呆、老年痴呆、与年龄相关的轻度认知损伤(MCI)、年龄相关的记忆损伤、自闭症、额叶退化痴呆、中风、基底神经节退行性疾病、多发性硬化、创伤、脑肿瘤、脑部感染、脑积水、抑郁症、中毒或代谢疾病、和药物诱导的痴呆。

[0018] 在另一个实施方案中,组合物用于这样的患者群体中,所述患者群体是基于携带人CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),或与所述SNP共同形成单体型SNP、或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP选择的。

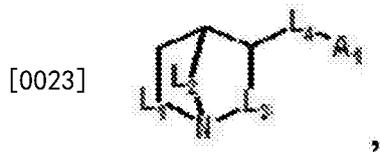
[0019] 在仍然另一个实施方案中,SNP单体型包含下述SNP中的至少两个:rs3841324(SEQ ID NO.5或6)、rs503464(SEQ ID NO.9或10)、rs55853698-T(SEQ ID NO.1)、rs55781567-C(SEQ ID NO.7)、rs56182392(SEQ ID NO.11或12)、rs77293642(SEQ ID NO.13或14)、rs67624739(SEQ ID NO.15或16)、rs142774214(SEQ ID NO.17或18)、rs60182379(SEQ ID NO.19或20)、rs77541452(SEQ ID NO.21或22)、rs72648882(SEQ ID NO.23或24)、rs144334096(SEQ ID NO.25或26)、rs114037126(SEQ ID NO.27或28)、rs140280786(SEQ ID NO.29或30)、rs147565924(SEQ ID NO.31或32)、rs16969968-G(SEQ ID NO.37)、rs6495308(SEQ ID NO.3或4)、rs1051730(SEQ ID NO.35或36)和rs115662711(SEQ ID

NO.33或34)。

[0020] 在某些实施方案中,用于治疗认知损伤,精神病的和/或神经退行性疾病的组合物用于这样的患者群体中,所述患者群体是基于携带包含SNP rs3841324 (SEQ ID NO.5或6)、rs503464 (SEQ ID NO.9或10)、rs55853698-T (SEQ ID NO.1)和rs55781567-C (SEQ ID NO.7)的SNP单体型选择的,且其中所述SNP形成单体型delTTC或insATC。在另一实施方案中,用于治疗认知损伤,精神病的和/或神经退行性疾病的组合物用于这样的患者群体中,所述患者群体是基于其是上述提示性CHRNA5SNP或提示性CHRNA5SNP单体型纯合,特别是SNP rs55853698-T/T (SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G/G (SEQ ID NO.37)纯合而选择的。

[0021] 本文还涉及用于治疗认知损伤,精神病的和/或神经退行性疾病的组合物,其中患者群体是基于携带提示性CHRNA3SNP rs6495308 (SEQ ID NO.3或4)、rs1051730 (SEQ ID NO.35或36)、或与所述SNP形成单体型的SNP、或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP选择的,其中纯合存在SNP rs1051730-C (SEQ ID NO.35)是个体将可能应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示,并且其中纯合存在SNP rs6495308-T/T (SEQ ID NO.4)是个体将可能不应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示,而纯合存在SNP rs6495308-C/C (SEQ ID NO.3)或杂合存在SNP rs6495308-C/T (SEQ ID NO.3/4)基因型是个体将可能应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。

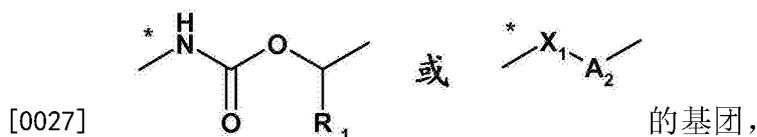
[0022] 此外,本文公开内容涉及本文所述和用于本发明方法的组合物,包含游离碱形式或酸加成盐形式的式(I)的 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂



[0024] 其中L₁是-CH₂-;L₂是-CH₂-或-CH₂-CH₂-;且L₃是-CH₂-或-CH(CH₃)-;或

[0025] L₁是-CH₂-CH₂-;L₂是-CH₂-;且L₃是-CH₂-CH₂-;

[0026] L₄是选自

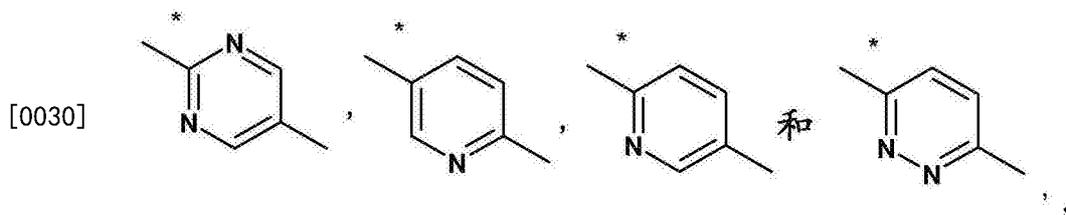


L4a

L4b

[0028] 其中用星号标记的键与氮杂双环烷基部分连接;

[0029] R₁是氢或C₁₋₄烷基;X₁是-O-或-NH-;A₂选自



[0031] 其中用星号标记的键与X₁连接;A₁是五元至十元单环或稠合多环的芳香环体系,可

含有1至4个选自氮、氧和硫的杂原子,其中环体系可含有不多于2个氧原子和不多于2个硫原子,并且其中环体系可以被 R_2 取代1次或多于1次,并且其中杂环体系中的氮上的取代基可以不是卤素;每个 R_2 独立地是 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素、氰基或三至六元的单环体系,其可以是芳香族的,饱和或部分饱和的且可含有1至4个选自氮、氧和硫的杂原子,并且其中每个环体系可含有不多于2个氧原子和不多于2个硫原子,并且其中每个环体系可以转而被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素或氰基取代1次或多于1次,并且其中杂环体系中的氮上的取代基可以不是卤素;或者位于相邻环原子上的2个 R_2 形成 C_{3-4} 亚烷基,其中1-2个碳原子可以被 X_2 替换,并且其中 C_{3-4} 亚烷基可以被 R_3 取代1次或多于1次;每个 X_2 独立地是 $-O-$ 或 $-N(R_4)-$;每个 R_4 独立地是氢原子或 C_{1-6} 烷基;并且每个 R_3 独立地是卤素或 C_{1-6} 烷基。

[0032] 本文的另一主题涉及本文所述的和用于本发明方法的组合物,其中 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂以游离碱或可药用的酸加成盐的形式使用。在另一实施方案中, $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂处于游离碱或可药用的酸加成盐形式,与药学载体或稀释剂关联。

[0033] 在本发明的另一个实施方案中,本文所述的和用于本发明方法的组合物还包含用于治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的第二种认知增强剂或治疗化合物。

[0034] 在仍然另一个实施方案中,本文涉及用于预测个体或个体的组对用于增加认知技能和/或治疗认知损伤,精神病的和/或神经退行性疾病的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的治疗响应的方法,包括步骤:I)获得个体在 $CHRNA5$ 基因的基因座上的基因型;II)鉴别步骤I)中携带 $CHRNA5$ SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37)或与所述SNP形成单体型的SNP的那些个体,其中存在至少一种上述SNP或SNP单体型是个体将可能应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。

[0035] 在仍然另一个实施方案中,本文涉及用于预测个体或个体的组对用于增加认知技能和/或治疗认知损伤,精神病的和/或神经退行性疾病的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的治疗响应的方法,包括步骤:I)获得个体在 $CHRNA3$ 基因的基因座上的基因型;II)鉴别步骤I)中携带 $CHRNA3$ SNP rs6495308(SEQ ID NO.3或4)或SNP rs1051730(SEQ ID NO.35)或与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的个体,其中纯合存在上述SNP rs1051730-C/C(SEQ ID NO.35)或SNP单体型是个体将可能应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示,并且其中纯合存在SNP rs6495308-T/T(SEQ ID NO.4)是个体将可能不应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。纯合存在SNP rs6495308-C/C(SEQ ID NO.3)或杂合存在SNP rs6495308-C/T基因型是个体将可能应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。

[0036] 此外,本文涉及增加个体的认知技能和/或治疗患有认知损伤,精神病的和/或神经退行性疾病的个体的治疗方法,包括步骤:

[0037] III)获得个体在 $CHRNA5$ 基因的基因座上的基因型;

[0038] IV)鉴别步骤III)中携带 $CHRNA5$ SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37)或与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的那些个体,其中存在SNP或SNP单体型中的至少一种是个体将可能应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示;或可选地

[0039] III)获得个体在 $CHRNA3$ 基因的基因座上的基因型;

[0040] IV) 鉴别步骤III)中携带CHRNA3SNP rs6495308 (SEQ ID NO.3或4)或SNP rs1051730 (SEQ ID NO.35)或与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的那些个体,其中纯合存在SNP rs1051730-C/C (SEQ ID NO.35)是个体将可能应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示,并且其中纯合存在SNP rs6495308-T/T (SEQ ID NO.4)是个体将可能不应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。纯合存在SNP rs6495308-C/C (SEQ ID NO.3)或杂合存在SNP rs6495308-C/T基因型是个体将可能应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示,和

[0041] V) 向步骤IV)中鉴别的对象施用治疗有效量的 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂。在额外的实施方案中,上述步骤I)和III)还包括步骤:VI)获得所述个体的生物样品,其中所述样品选自血液、血液来源产品(例如血沉棕黄层、血清和血浆)、淋巴液、尿液、泪液、唾液、脑脊液、腮拭子、痰、发根、白细胞样品或组织样品或其任意组合,和VII)将步骤VI)的生物样品与能够检测(i) CHRNA5SNP rs55853698-T (SEQ ID NO.1),或(ii) SNP rs16969968-G (SEQ ID NO.37),或(iii) CHRNA3SNP rs6495308-C或-T (SEQ ID NO.3或4),或(iv) SNP rs1051730-T或-C (SEQ ID NO.35或36),或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的试剂接触。

[0042] 优选地,上述方法用于治疗 α 7烟碱型乙酰胆碱受体的激活在其中发挥作用或涉及 α 7烟碱型乙酰胆碱受体的激活的认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病。因此,在一个实施方案中,上述方法还包括在个体中诊断对增加认知技能或认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的需要作为第一步骤,而认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病可选自轻度认知损伤、阿兹海默病、帕金森病痴呆、路易体痴呆、精神分裂症、血管性痴呆、AIDS痴呆、老年痴呆、与年龄相关的轻度认知损伤(MCI)、年龄相关的记忆损伤、自闭症、额叶退化痴呆、中风、基底神经节退行性疾病、多发性硬化、创伤、脑肿瘤、脑部感染、脑积水、抑郁症、中毒或代谢疾病、和药物诱导的痴呆。

[0043] 在本文上述方法的另一个实施方案中,通过使用至少一种与携带所述一种或多种SNP的核酸分子的特定区域特异性杂交的寡核苷酸,确定存在(i) CHRNA5SNP rs55853698-T (SEQ ID NO.1),或(ii) SNP rs16969968-G (SEQ ID NO.37),或(iii) CHRNA3SNP rs6495308-C或-T (SEQ ID NO.3或4),或(iv) SNP rs1051730-T或-C (SEQ ID NO.35或36),或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP。特别的是,可以通过序列特异性引物(SSP)分型、序列特异性寡核苷酸(SSO)分型、基于序列的分型(SBT)、DNA扩增如聚合酶链式反应(PCR)、微阵列分析、Northern印迹分析或逆转录PCR来检测所述CHRNA5/CHRNA3SNP的存在。

[0044] 在本文的另一个方面,用式(I)的化合物治疗这样的个体,所述个体根据上述方法被选择为是用于增加认知技能和/或治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的响应者。

[0045] 在仍然另一个实施方案中,可以同时施用用于治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的第二种认知增强剂或治疗化合物,如常规的抗精神病药物或非典型的抗精神病药物。

[0046] 在公开方法的另一个方面,待施用的 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂剂量是从每天约2mg至每天约100mg。

[0047] 本文的另一个实施方案涉及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂用于治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病,或 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活在其中发挥作用或涉及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活的病况的患者的用途,其中已经根据上述方法选择响应使用 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的治疗的患者。

[0048] 此外,本文涉及至少一种探针用于检测(i)CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1),或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C或-T(SEQ ID NO.3或4),或(iv)SNP rs1051730-T或-C(SEQ ID NO.35或36),或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的用途,用于确定个体是否响应对认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病或 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活在其中发挥作用或涉及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活的病况的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂治疗。在另一个方面,本文涉及包含至少一种探针的试剂盒,所述探针用于检测(i)CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1),或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C或-T(SEQ ID NO.3或4),或(iv)SNP rs1051730-T或-C(SEQ ID NO.35或36),或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP。优选地,所述试剂盒包含VIII)用于检测(i)CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1),和/或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),和/或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C或-T(SEQ ID NO.3或4),或(iv)SNP rs1051730-T或-C(SEQ ID NO.35或36),和/或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的工具,和IX)如何使用所述试剂盒的说明。

[0049] 本文的另一主题涉及试剂盒的用途,所述试剂盒优选上文公开的适用于任何上述方法或用途的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少一种探针,所述探针用于检测(i)CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1),或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C或-T(SEQ ID NO.3或4),或(iv)SNP rs1051730-T或-C(SEQ ID NO.35或36),或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP。在相关的实施方案中,上述试剂盒包含寡核苷酸探针。

[0050] 在上述方法或用途的另一个实施方案中,CHRNA5/CHRNA3SNP单体型由至少两种SNP组成,所述SNP选自:rs3841324(SEQ ID NO.5或6)、rs503464(SEQ ID NO.9或10)、rs55853698-T(SEQ ID NO.1)、rs55781567-C(SEQ ID NO.7)、rs56182392(SEQ ID NO.11或12)、rs77293642(SEQ ID NO.13或14)、rs67624739(SEQ ID NO.15或16)、rs142774214(SEQ ID NO.17或18)、rs60182379(SEQ ID NO.19或20)、rs77541452(SEQ ID NO.21或22)、rs72648882(SEQ ID NO.23或24)、rs144334096(SEQ ID NO.25或26)、rs114037126(SEQ ID NO.27或28)、rs140280786(SEQ ID NO.29或30)、rs147565924(SEQ ID NO.31或32)、rs16969968-G(SEQ ID NO.37)、rs6495308(SEQ ID NO.4)、rs1051730(SEQ ID NO.35或36)和rs115662711(SEQ ID NO.33或34)。在上述方法或用途的另一个实施方案中,CHRNA5SNP单体型由提示性SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)和至少一种额外的SNP组成,所述SNP选自rs3841324(SEQ ID NO.5或6)、rs503464(SEQ ID NO.9或10)、rs55781567-C(SEQ ID NO.7)、rs56182392(SEQ ID NO.11或12)、rs77293642(SEQ ID NO.13或14)、rs67624739(SEQ ID NO.15或16)、rs142774214(SEQ ID NO.17或18)、rs60182379(SEQ ID NO.19或20)、rs77541452(SEQ ID NO.21或22)、rs72648882(SEQ ID NO.23或24)、rs144334096(SEQ

ID NO.25或26)、rs114037126 (SEQ ID NO.27或28)、rs140280786 (SEQ ID NO.29或30)、rs147565924 (SEQ ID NO.31或32)、rs16969968-G (SEQ ID NO.37)、rs6495308 (SEQ ID NO.3或4)、rs1051730 (SEQ ID NO.35或36)和rs115662711 (SEQ ID NO.33或34)。在相关的实施方案中,SNP单体型选自SNP rs3841324 (SEQ ID NO.5或6)、rs503464 (SEQ ID NO.9或10)、rs55853698-T (SEQ ID NO.1)和rs55781567-C (SEQ ID NO.7)形成的单体型de1TTC和insATC。

[0051] 一般定义

[0052] 为了更方便的理解本发明,首先定义某些术语。在整个详细说明中提出了额外的定义。

[0053] 术语“包含”意指“包括”,例如“包含”X的组合物可以只由X组成,或者可以包括额外一些物质,例如X+Y。

[0054] 涉及数值x的术语“约”意指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0055] 术语“认知增强剂”在本发明上下文中指据说改善精神功能(如认知、记忆、智力、动机、注意力和专注力)的任何药物、补充物、营养或功能食品。

[0056] 本文使用的认知增强剂包括但不限于胆碱能化合物,如乙酰胆碱酯酶抑制剂和/或butyrylcholinesterase抑制剂(利伐斯的明(rivastigmine)、多奈哌齐(donepezil)、加兰他敏(galantamine)、石杉碱(huperzine))、安帕金类(ampakines)(例如,CX614、CX516)、毒蕈碱调节剂(例如,毒蕈碱受体激动剂)、NMDA-受体的调节剂(例如,正调节剂、拮抗剂、美金刚胺(memantine))、磷酸二酯酶抑制剂(例如,PDE4抑制剂)、益智化合物如海得琴(hydergine)、奥拉西坦(oxiracetam)、茴拉西坦(aniracetam)、乙酰L-肉毒碱、银杏来源的化合物、包含在益康宁类(gerovitals)中的化合物,如对氨基苯甲酸和二乙氨基乙醇及其衍生物,和调节注意力的化合物,如哌醋甲酯(methylphenidate)、托莫西汀(tomoxetine)和莫达非尼(modafinil)。

[0057] 术语“常规的抗精神病药物”表示主要通过多巴胺受体D2的拮抗机制有效治疗精神病的化合物。“常规的抗精神病药物”在本文中包括但不限于氟哌啶醇(haloperidol)、氟哌利多(droperidol)、吗茛酮(molindone)、氟奋乃静(fluphenazine)、thiotixene、氟哌噻吨(flupentixol)、普马嗪(promazine)、哌迷清(pimozide)、氯丙嗪(chlorpromazine)、甲氧异丁嗪(methotrimeprazine)、哌普嗪(pipotiazine)、三氟拉嗪(trifluoperazine)、甲硫哒嗪(thioridazine)、醋奋乃静(acetophenazine)、氯普噻吨(chlorprothixene)和美索哒嗪(mesoridazine)。

[0058] 术语“非典型的抗精神病药物”表示通过额外的和/或与多巴胺受体2的拮抗机制不同的机制有效治疗精神病的化合物。“非典型的抗精神病药物”在本文中包括但不限于氯氮平(clozapine)、利培酮(risperidone)、奥氮平(olanzapine)、喹硫平(quetiapine)、齐拉西酮(ziprasidone)、阿立哌唑(aripiprazole)、舍吲啶(serindole)、羟哌氯丙嗪(perphenazine)、美索哒嗪、丙氯拉嗪(prochlorperazine)、萘普生(naproxene)和洛沙平(loxapine)。

[0059] 如本文中使用的,术语 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂($\alpha 7$ -nAChR激活剂)指 $\alpha 7$ -nAChR激动剂和 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂,特别是本文公开的低分子量(LMW)化合物。

[0060] 术语“SNP”在本申请的上下文中指“单核苷酸多态性”。“SNP”是个体之间的遗传变

化;例如可变的生物体的DNA中的单个碱基位置。SNP定义了给定基因的特定等位基因。如本文中使用的,“SNP”是复数个SNP。SNP出现在被单个核苷酸占据的多态性位点上,所述位点是等位序列之间变异的位点。位点之前和之后通常是等位基因的高度保守的序列(例如,在少于1/100或1/1000的群体成员中变化的序列)。SNP最常见的是双等位的。单核苷酸多态性通常是由于在多态性位点的一个核苷酸被另一个替换所产生的。转换是一种嘌呤被另一种嘌呤替换,或一种嘧啶被另一种嘧啶替换。颠换是一种嘌呤被另一种嘧啶替换,反之亦然。单核苷酸多态性还可以来自相对于参照的核苷酸的缺失或核苷酸的插入。SNP还可以指位于单条染色体上的或单条染色体区域内部的多态性位点,其中SNP可以指若干个碱基对的插入或缺失(例如,本文公开的SNP rs3841325指在人CHRNA5基因的转录起始位点上游-71位插入/缺失22对碱基对)。因此,术语“SNP”还指具有在群体的不同个体的该基因区域中发现的若干种核苷酸序列之一的基因区域。虽然大部分SNP是稀有的,但据估计有530万中常见SNP,每种频率为10-50%,构成了人与人之间DNA序列差异的主体。这类SNP在人基因组中每600对碱基对出现1次(Kruglyak和Nickerson,Nature Genet.27:235(2001))。组成这类SNP构件的处于紧密物理邻近的等位基因(变体)通常是相关的,导致降低的遗传变异性,并定义了有限数量的“SNP单体型”(Fullerton,等人,Am.J.Hum.Genet.67:881(2000))。

[0061] 术语“基因”指与能够以某些方式调控多肽表达的恰当调控序列有效连接的编码区。基因包括位于编码区(开放阅读框,ORF)之前(上游)和之后(下游)的DNA的非翻译调控区(例如,启动子、增强子、抑制子等),以及在适用情况下,包括位于单个编码区(即,外显子)之间的间插序列(即,内含子)。基因还可以包括RNA转录物上存在的位于序列5'-和3'-末端的序列。这些序列被称为“侧翼”序列或区域(这些侧翼序列位于mRNA转录物上存在的非翻译序列的5'或3')。5'-侧翼区可含有调控序列,如启动子和增强子,其控制或影响基因的转录。3'-侧翼区可含有指导转录终止、转录后切割和多聚腺苷酸化的序列。

[0062] 术语“轻度认知损伤”(MCI)在本公开内容上下文中指超过对某年龄和教育程度的个体预期的认知损伤,但不显著干扰所述个体的日常活动(Petersen RC,Smith GE,Waring SC,Ivnik RJ,Tangalos EG,Kokmen E(1999).“Mild cognitive impairment:clinical characterization and outcome”.Arch.Neurol.56(3):303-8)。

[0063] 术语“单体型”在本公开内容上下文中指不表现出独立重组,并可以共同分组在SNP构件中的SNP的组。因此,构成单体型的SNP是处于连锁不平衡中的,因而倾向于一起遗传。在优选的实施方案中,SNP单体型指存在于人CHRNA5基因(SEQ ID NO.39)和/或CHRNA3基因(SEQ ID NO.40)中的SNP的组合,其中形成所述单体型的SNP位于基因组中给定SNP位置的上游和/或下游的约100000、或约50000、或约30000、或约20000、或约10000个碱基对的区域中。“单体型”还指在群体中的单条染色体的多态性位点上或单条染色体区域中观察到的多态性变体(SNP和/或等位基因)的特别组合。本文所述的“单体型”指SNP或多态性位点的任何组合。单体型可以包含两个或更多个SNP/等位基因,并且包含单体型的基因组区域的长度可以在从几百个碱基多至数百个千碱基之间改变。本领域技术人员已认识到可以通过确定定义来自不同核酸链的等位基因的单体型,差异性地描述同一单体型。例如,由本发明的SNP rs3841324=Del(SEQ ID NO.6)、rs503464-T(SEQ ID NO.10)、rs55853698-T(SEQ ID NO.1)和rs55781567-C(SEQ ID NO.7)定义的单体型de1TTC是与GAAdel或de1ATC相同的单体型,所述GAAdel是由其中等位基因是从另一条链确定的相同的SNP定义的,所述de1ATC

是由另一条链确定的第二种SNP定义的。本文描述的SNP差异性地位于人类个体中,并且其特定的序列提示了对 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的响应。因此,这些SNP和包含所述SNP的单体型具有对个体中的风险评估和治疗效力的诊断价值。可以通过本领域已知的用于检测多态性位点处的核苷酸的方法,实现SNP或形成单体型的多态性区域的检测(还参见下文对连锁不平衡的定义)。

[0064] “连锁不平衡”或“LD”指这样的状态,在所述状态下,两个或更多个等位变体是关联的,即,在群体的个体的两个或多个多态性位点上的等位变体之间存在非随机的关联性。通常用大写字母D表示LD。通过除以观察的等位基因频率的理论最大值,将D归一化,得到D'。D'值为0表示检验的基因座实际上彼此独立,而值为1则验证了完全依赖性。关联的两个或多个等位变体/SNP被称为处于连锁不平衡。一般而言,属于单体型或单体型构件的部分的等位变体是处于连锁不平衡的。本领域已知多种方法/度量来评估任何两个多态性变体(等位基因)和SNP处于LD的程度。合适的度量包括D'、 r^2 等(参见例如,Hedrick,P.W., Genetics,117(2):331-41,1987)。如本文中使用的,如果 $D' > 0.8$,则多态性变体或SNP是处于“强LD”的,并形成单体型。

[0065] 术语“对象”在本文中优选指人,尤其是被诊断患有认知损伤、精神分裂症或其他精神疾病的患者,所述精神疾病是在记忆功能、解决问题、方向性和/或抽象的一种或多种中的获得性缺陷,影响个体独立发挥功能的能力。对象、患者或个体可互换的使用。

[0066] 术语“认知病症/损伤”和“精神病的和/或神经退行性疾病”指在记忆功能、解决问题、方向性和/或抽象的一种或多种中的获得性缺陷的精神疾病,影响个体独立发挥功能的能力。所述病症的例子是阿兹海默病、路易体痴呆、肌萎缩侧索硬化症、记忆损伤、记忆丢失、认知缺陷、注意力缺陷、多动症、精神分裂症、帕金森氏病痴呆和血管性痴呆。

[0067] 发明详述

[0068] 已发现在人乙酰胆碱受体亚基 $\alpha-5$ (CHRNA5)基因(SEQ ID NO.39)或人神经元乙酰胆碱受体亚基 $\alpha-3$ (CHRNA3)基因(SEQ ID NO.40)中存在的遗传变体是预测患有认知损伤或功能障碍、精神病的和/或神经退行性疾病的对象对于 $\alpha 7$ -nAChR激活剂疗法的治疗响应的标志物。烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR),如CHRNA5或CHRNA3,是配体门控离子通道超家族的成员,介导突触的快速信号传递。本文公开的教导提供了用 $\alpha 7$ -nAChR激活剂治疗认知损伤或功能障碍、精神病的和/或神经退行性疾病的方法,所述方法基于在人CHRNA5和/或CHRNA3基因中存在某些提示性SNP。

[0069] 因此,本发明的方法、组合物和试剂盒提供了用于选择更可能响应 $\alpha 7$ -nAChR激活剂疗法的患有认知损伤或功能障碍、精神病的和/或神经退行性疾病的患者的工具,从而增强这类治疗的疗效。

[0070] 因此,在一个方面,本发明提供了包含 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的组合物,用于治疗选择的患者群体的认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病,其中患者群体是基于患者在人乙酰胆碱受体亚基 $\alpha-5$ (CHRNA5)基因或人神经元乙酰胆碱受体亚基 $\alpha-3$ (CHRNA3)基因上的基因型选择的,并且其中所述基因型提示了 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的效力。用于预测对 $\alpha 7$ -nAChR激活剂疗法的治疗响应的特定标志物可以是SNP和/或多态性区域。本领域技术人员了解CHRNA5基因(位于人染色体:15(NC_000015.9(78857862..78887611)))和CHRNA3基因(位于人染色体:15(NC_000015.9

(78885394..78913637,互补体))的核酸序列和位置。

[0071] 为了更好的理解本发明,本文公开的SNP定义如下:

[0072]

| SNP名称和SEQ ID | 序列 |
|--|---|
| rs55853698 (SEQ ID NO. 1 或 2) rs55853698-T (SEQ ID NO. 1) rs55853698-G (SEQ ID NO. 2) | CGGGAGCTGTGGCGCGGAGCGGCCCC[G/T]CTGCTGCGTCTGCCCTCGT TTTGTC |
| rs6495308 (SEQ ID NO. 3 或 4) rs6495308-C (SEQ ID NO. 3) rs6495308-T (SEQ ID NO. 4) | GTAAGTGTCTGATGGCAGGTTTGCTG[C/T]GGGAGAGTAGAGAAGAGGT TTGGG |
| rs3841324 (SEQ ID NO. 5 或 6) rs3841324-Ins (SEQ ID NO. 5) rs3841324-Del (SEQ ID NO. 6) | GAAGCTCCCGGCGCCTAGCCCCGCC[- /CTATTTCCCTCTGGCCCCGCC]AATCCTCGCCTTGTCTTTTGCC |
| rs55781567 (SEQ ID NO. 7 或 8) rs55781567-C (SEQ ID NO. 7) rs55781567-G (SEQ ID NO. 8) | TTGTCTCAGACTCACACTCAGTGCT[C/G]CATTCCCCAAGAGTTCGCGTT CCCC |
| rs503464 (SEQ ID NO. 9 或 10) rs503464-A (SEQ ID NO. 9) rs503464-T (SEQ ID NO. 10) | ACAGCTCCCGCCGGGACAGCAGCCTC[A/T]GCCTAGCAGCTTCTGGCGG GCTCGG |
| rs56182392 (SEQ ID NO. 11 或 12) rs56182392-G (SEQ ID NO. 11) rs56182392-A (SEQ ID NO. 12) | GGAGCTTCCACATGCGTCCCAGGCC[A/G]CCAGAAGCTGCTAGGCTGA GGCTGC |
| rs77293642 (SEQ ID NO. 13 或 14) rs77293642-C (SEQ ID NO. 13) rs77293642-T (SEQ ID NO. 14) | CTGCTAGGCTGAGGCTGCTGTCCCG[C/T]GGGAGCTGTGGCGCGGAGC GGCCCC |
| rs67624739 (SEQ ID NO. 15 或 16) rs67624739-Ins (SEQ ID NO. 15) rs67624739-Del (SEQ ID NO. 16) | GGAACAAGGCGAGGATTGGGCGGGGC[- /CAGAGGAAATAGGGGCGGGC]TAGGCGCCGGGAGCTTCCACATGCG |
| rs142774214 (SEQ ID NO. 17 或 18) rs142774214-Ins (SEQ ID NO. 17) rs142774214-Del (SEQ ID NO. 18) | GGGCCAAAAGGAACAAGGCGAGGATT[- /GGCGGGGCCAGAGGGAAATAG]GGGCGGGCTAGGCGCCGGGAGCTT |
| rs60182379 (SEQ ID NO. 19 或 20) rs60182379-G (SEQ ID NO. 19) rs60182379-T (SEQ ID NO. 20) | GGGGATCGGAGGCGGGCTATGAATA[G/T]ACCGGACTGGGCCAAAAGG AACAAG |
| rs77541452 (SEQ ID NO. 21 或 22) rs77541452-A (SEQ ID NO. 21) rs77541452-G (SEQ ID NO. 22) | GACAGGGTTGGACCAGAGGCGGGGCG[A/G]GGTGGGAAAGGGTTGGT GGGGATC |
| rs72648882 (SEQ ID NO. 23 或 24) rs72648882-G (SEQ ID NO. 23) rs72648882-T (SEQ ID NO. 24) | TGTTATCTTAAGGTGTGCAGTGACTA[G/T]GCCAAGGACATCCGGTGGTTA GAGA |
| rs144334096 (SEQ ID NO. 25 或 26) rs144334096-A (SEQ ID NO. 25) rs144334096-T (SEQ ID NO. 26) | AGAGCAGACATCAATGAATAGCTGTT[A/T]TCTTAAGGTGTGCAGTGACTA GGCC |
| rs114037126 (SEQ ID NO. 27 或 28) rs114037126-C (SEQ ID NO. 27) rs114037126-T (SEQ ID NO. 28) | AGCACAGAGCAGACATCAATGAATAG[C/T]TGTTATCTTAAGGTGTGCAGT GACT |
| rs140280786 (SEQ ID NO. 29 或 30) rs140280786-A (SEQ ID NO. 29) rs140280786-G (SEQ ID NO. 30) | CGGCTCCCTCTGCCACTGAAGTTAA[A/G]GATAATTCGCCTGAATCCCTT CAGC |
| rs147565924 (SEQ ID NO. 31 或 32) rs147565924-A (SEQ ID NO. 31) rs147565924-C (SEQ ID NO. 32) | TTCTTTGCAACCAGGTTTAGTTTTTC[A/C]CAGATTTACTAGTCTGGAGGGT GGA |
| rs115662711 (SEQ ID NO. 33 或 34) rs115662711-C (SEQ ID NO. 33) rs115662711-T (SEQ ID NO. 34) | TGGCTCCATTGGATGTAATTTACATT[C/T]TTCCAGCTGTATTTGGACCTAA GAA |
| rs1051730 (SEQ ID NO. 35 或 36) rs1051730-C (SEQ ID NO. 35) rs1051730-T (SEQ ID NO. 36) | TGGGCCATCATCAAAGCCCCAGGCTA[C/T]AACACGACATCAAGTACAAC TGCT |
| rs16969968 (SEQ ID NO. 37 或 38) rs16969968-G (SEQ ID NO. 37) rs16969968-A (SEQ ID NO. 38) | CTAGAAACACATTGGAAGCTGCGCTC[A/G]ATTCTATTGCTACATTACAA GACA |

[0073] 优选地,所述组合物如本文所述用于通过增加个体的认知技能治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病,在所述疾病中 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活发挥了作用或涉及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活。在一个实施方案中,认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病选自轻度认知损伤、阿兹海默病、帕金森病痴呆、路易体痴呆、血管性痴呆、AIDS痴

呆、老年痴呆、与年龄相关的轻度认知损伤(MCI)、年龄相关的记忆损伤、自闭症、额叶退化痴呆、中风、基底神经节退行性疾病、多发性硬化、创伤、脑肿瘤、脑部感染、脑积水、抑郁症、中毒或代谢疾病、和药物诱导的痴呆。在本发明的另一个实施方案中,所述组合物如本文所述用于治疗患精神分裂症的患者。

[0074] 用 $\alpha 7$ -nAChR激活剂治疗基于人CHRNA5和/或CHRNA3基因中某些提示性SNP的存在选择的患者群体导致相比不携带提示性SNP的个体的统计学相关的改善的视觉学习和记忆力、改善的认知功能、改善的推理和解决问题的能力、和注意力和警惕性改善,而按下文实施例章节所述测量为效应大小的改善,是至少约0.1、或约0.2、或约0.3、或约0.4或大于0.5。效应大小的值取决于应用的测试和治疗条件而不同。

[0075] 词组“增加个体的认知技能”指这样的状态,其中(i)本领域技术人员将认为个体的认知技能或能力、生理情况和/或心理情况在健康个体的正常范围之外,和(ii)其中用本发明的组合物或根据本发明的方法治疗导致相比对照组(例如,不携带提示性标志物SNP的个体)或安慰剂组个体的显著的改善。改善可以是完全的(例如,本领域技术人员将认为患者处于正常范围内)或部分的,使得对象中的上述情况的特性显著地比没有接受本发明的组合物或治疗的对象更不明显。部分的治疗结果可导致上述情况或疾病症状的严重性降低、无疾病症状期的频率和持续时间增加,或预防由于病痛造成的损伤或残疾。在上下文中,术语“显著地更不明显”指在用本发明的组合物或根据本发明的方法治疗之后,基于对相关参数的测量,本领域技术人员将不认为个人的情况或状态是完全健康的(参数可能仍然落在正常范围之外),但已经观察到相关参数的显著改善(可以是某参数的增加或降低)。可以通过例如比较个体患者较之对照组(例如,未携带提示性标志物SNP的个体)和安慰剂组个体的治疗结果,来鉴别显著改善或降低。本领域技术人员普遍了解个体的认知技能或能力、生理学情况和/或心理学情况的相关参数,以及如何对其进行确定。所述参数可以由技术人员(例如医生)基于研究的年龄相关的情况进行选择。词组“增加个体的认知技能”还指本领域技术人员将认为(关于认知技能或能力)是落入健康个体的正常范围内的个体想要增加其认知技能或能力的状态。

[0076] 在一个实施方案中,组合物用于这样的患者群体,所述患者群体是基于携带如SEQ ID NO.1中公开的人CHRNA5SNP rs55853698-T而选择的。SNP rs55853698是碱基对长度为1的G/T等位基因(SEQ ID NO.1和2),位于人15号染色体的78,857,939位。在另一实施方案中,组合物用于这样的患者群体,所述患者群体是基于携带如SEQ ID NO.37中公开的人CHRNA5SNP rs16969968-G而选择的。SNP rs16969968是碱基对长度为1的G/A等位基因(SEQ ID NO.37和38),位于人15号染色体的49673482位。

[0077] 本领域技术人员知晓这样的事实,即,在人CHRNA5基因或人15号染色体的基因组区域中存在若干与SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37)形成单体型的SNP或多态性区域。所述SNP或多态性区域可位于SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37)位置的上游和下游约100000、或约50000、或约30000、或约20000、或约10000碱基对的区域中。与SNPrs55853698-T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37)形成单体型的SNP或多态性区域将相等地适合用作预测对 $\alpha 7$ -nAChR激活剂的治疗响应的标志物。本领域技术人员了解鉴别与SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)形成单体型的其他SNP或多态性区域的方法(参见例如,Hedrick,P.W.,Genetics,

117(2):331-41,1987和上文章节的定义)。因此,在另一个方面,本发明提供了用于治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的患者,目标是增加所述患者的认知技能的包含 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的组合物,其中患者群体是基于存在与SNP rs55853698-T (SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G (SEQ ID NO.37)形成单体型的SNP或多态性区域而选择的。在仍然另一个实施方案中,本发明还提供了用于治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的患者,目标是增加所述患者的认知技能的包含 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的组合物,其中患者群体是基于存在至少一种下列SNP而选择的:与SNP rs55853698-T (SEQ ID NO.1)和/或SNP rs16969968-G (SEQ ID NO.37)形成单体型的rs3841324 (SEQ ID NO.5或6)、rs503464 (SEQ ID NO.9或10)、rs55781567-C (SEQ ID NO.7)、rs56182392 (SEQ ID NO.11或12)、rs77293642 (SEQ ID NO.13或14)、rs67624739 (SEQ ID NO.15或16)、rs142774214 (SEQ ID NO.17或18)、rs60182379 (SEQ ID NO.19或20)、rs77541452 (SEQ ID NO.21或22)、rs72648882 (SEQ ID NO.23或24)、rs144334096 (SEQ ID NO.25或26)、rs114037126 (SEQ ID NO.27或28)、rs140280786 (SEQ ID NO.29或30)、rs147565924 (SEQ ID NO.31或32)和/或rs115662711 (SEQ ID NO.33或34)。基于上述内容,用于治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的包含 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的组合物可用于这样的患者群体中,所述患者群体是基于携带SNP rs3841324-del (SEQ ID NO.6)、rs503464-T (SEQ ID NO.10)和/或rs55781567-C (SEQ ID NO.7)而选择的,因为所述SNP与rs55853698-T (SEQ ID NO.1)形成单体型delTTC。可选的,可以基于携带SNP rs3841324-ins (SEQ ID NO.5)、或rs503464-A (SEQ ID NO.9)和rs55781567-C (SEQ ID NO.7)而选择患者群体,因为所述SNP与rs55853698-T (SEQ ID NO.1)形成单体型insATC。

[0078] 在本发明的另一个方面,还可以基于患者在人神经元乙酰胆碱受体亚基 α -3 (CHRNA3)处的基因型来选择患者群体。在一个实施方案中,组合物用于在基于携带如SEQ ID NO.3/4公开的人CHRNA3SNP rs6495308而选择的患者群体中治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的患者,目标是增加所述患者的认知技能。SNP rs6495308是碱基对长度为1的C/T等位基因变体 (SEQ ID NO.3和4),位于人15号染色体的78,907,656位。在仍然另一个实施方案中,本发明还提供了用于治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的患者目标是增加所述患者的认知技能的包含 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的组合物,其中患者群体是基于存在SNP rs1051730 (SEQ ID NO.35)而选择的。SNP rs1051730是碱基对长度为1的C/T等位基因变体,位于人15号染色体的78,894,339位。

[0079] 在人CHRNA3基因中存在若干SNP或多态性区域(例如,SNP rs6495308 (SEQ ID NO.3或4)或SNP rs1051730 (SEQ ID NO.35或36))。所述SNP或多态性区域可位于rs6495308 (SEQ ID NO.3/4)或SNP rs1051730 (SEQ ID NO.35/36)位置的上游和下游的约100000、或约50000、或约30000、或约20000、或约10000碱基对的区域中。与SNPrs6495308 (SEQ ID NO.3/4)或SNP rs1051730-C (SEQ ID NO.35/36)形成单体型的SNP或多态性区域相等地适合用作预测对 $\alpha 7$ -nAChR激活剂的治疗响应的标志物。因此,在另一个方面,本发明提供了用于在选择的患者群体中治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的包含 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的组合物,其中患者群体是基于存在与rs6495308 (SEQ ID NO.3/4)或SNP rs1051730-C (SEQ ID NO.35/36)形成单体型的SNP或多态性区域而选择的。纯合存在SNP rs6495308-T/T (SEQ ID NO.4)是个体将可能不响应 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗

法的提示。纯合存在SNP rs6495308-C/C(SEQ ID NO.3)或杂合存在SNPrs6495308-C/T基因型是个体将可能响应 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。纯合存在SNP rs1051730-C/C(SEQ ID NO.35)是个体将可能响应 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。

[0080] 在本发明的另一个实施方案中,用于治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的患者的组合物被用于基于上述提示性CHRNA5或CHRNA3SNP或提示性CHRNA5或CHRNA3SNP单体型纯合/杂合,特别是SNP rs55853698-T/T(SEQ ID NO.1),或rs16969968-G/G(SEQ ID NO.37)、rs1051730-C/C(SEQ ID NO.35)纯合和/或SNP rs6495308-C/C或C/T(SEQ ID NO.3/4)或与所述SNP形成单型型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP纯合/杂合而选择的患者中。

[0081] LMW $\alpha 7$ -nAChR激活剂:

[0082] LMW $\alpha 7$ -nAChR激动剂:

[0083] 在一个实施方案中,使用的 $\alpha 7$ -nAChR激活剂是 $\alpha 7$ -nAChR激动剂。

[0084] $\alpha 7$ -nAChR激动剂是在体内和体外结合包含 $\alpha 7$ -nAChR亚基的受体,并激活受体的化合物。可以通过W02001/85727公开的方法测量激活,即用稳定表达 $\alpha 7$ -nAChR的大鼠垂体细胞系对同聚的 $\alpha 7$ -nAChR进行功能性亲和力测定。作为读数,使用相比地棘蛙素(epibatidine)的在刺激受体后的钙离子内流。根据本发明的“ $\alpha 7$ -nAChR激动剂”通常诱导由地棘蛙素引起的最大内流的至少50%的钙离子内流,其 EC_{50} 值为至少 $1\mu M$;优选的激动剂诱导由地棘蛙素引起的最大内流的至少75%的钙离子内流,其 EC_{50} 值为至少400nM;更优选的激动剂诱导由地棘蛙素引起的最大内流的至少85%的钙离子内流,其 EC_{50} 值为至少50nM。

[0085] 优选的 $\alpha 7$ -nAChR激动剂应该从胃肠道中良好吸收,应该是足够代谢稳定的且具有有利的药物动力学特性。其他优选的 $\alpha 7$ -nAChR激动剂在体内强有力地结合 $\alpha 7$ -nAChR,同时对其他受体,尤其是对其他nAChR(例如 $\alpha 4\beta 2$ nAChR),对毒蕈碱型乙酰胆碱受体如M1,和/或5-HT₃受体表现出低的亲和力。其他优选的 $\alpha 7$ -nAChR激动剂有效跨越血脑屏障。优选的 $\alpha 7$ -nAChR激动剂应该是无毒的,并表现出少的副作用。此外,优选的 $\alpha 7$ -nAChR激动剂将能够以稳定的、不吸湿的且易于配制的物理形态存在。

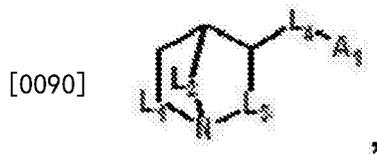
[0086] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂是选择性 $\alpha 7$ -nAChR激动剂,即,对包含 $\alpha 7$ -nAChR亚基的受体是选择性的,因为这类激动剂预期对受治疗的对象导致比非选择性激动剂更少的副作用。对包含 $\alpha 7$ -nAChR亚基的受体选择性的激动剂对这类受体具有高得多的程度的功能亲和力,例如,相比任何其他烟碱型乙酰胆碱受体, EC_{50} 值亲和力差异至少10倍,优选至少20倍,更优选至少50倍。为了评估本发明的 $\alpha 7$ -nAChR激动剂对其他烟碱型乙酰胆碱受体的亲和力,可以使用W02001/85727中公开的方法,即,为了评估对人 $\alpha 4\beta 2$ nAChR的亲和力,使用稳定表达人 $\alpha 4\beta 2$ 亚型的人胎肾细胞系进行相似的功能测定,并且为了评估本发明的化合物对烟碱型受体的“神经节亚型”和“肌肉型”的活性,用稳定表达烟碱型受体的人“神经节亚型”人胎肾细胞系或内源性表达烟碱型受体的人“肌肉型”的细胞系进行相似的功能测定。

[0087] 在最近15年内,许多工作关注于研发选择性 $\alpha 7$ nAChR激动剂,导致发现了展现出所述选择性活性的许多不同化学型。Horenstein等人(Mol Pharmacol, 2008, 74, 1496-1511)的综述概括了这些工作,该综述描述了不少于9种不同的 $\alpha 7$ nAChR激动剂家族,在其中大部分中已经发现了选择性激动剂。实际上,具有 $\alpha 7$ nAChR激动剂作用模式的若干药物候选物已

进入了临床前期,或者甚至临床测试(综述参见:Broad等人,Drugs of the Future,2007,32(2),161-170;Romanelli等人,Expert Opin Ther Patents,2007,17(11),1365-1377)。这类化合物-同样属于多种化学型-的例子是MEM3454、MEM63908、SSR180711、GTS21、EVP6124、ABT107、ABT126、TC-5619、AZD-6319和SAR-130479。其他 $\alpha 7$ nAChR激动剂及其作为药剂的用途可从例如W02001/85727、W02004/022556、W02005/123732、W02006/005608、W02007/045478、W02007/068476和W02007/068475中知晓。

[0088] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂具有1500道尔顿的最大分子量。在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂具有1000道尔顿的最大分子量。在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂具有800道尔顿的最大分子量。在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂具有500道尔顿的最大分子量。

[0089] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂是游离碱形式或酸加成盐形式的式(I)的化合物

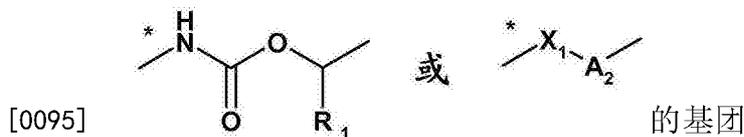


[0091] 其中

[0092] L_1 是 $-\text{CH}_2-$; L_2 是 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$;和 L_3 是 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$;或

[0093] L_1 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; L_2 是 $-\text{CH}_2-$;和 L_3 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$;

[0094] L_4 是选自



L4a

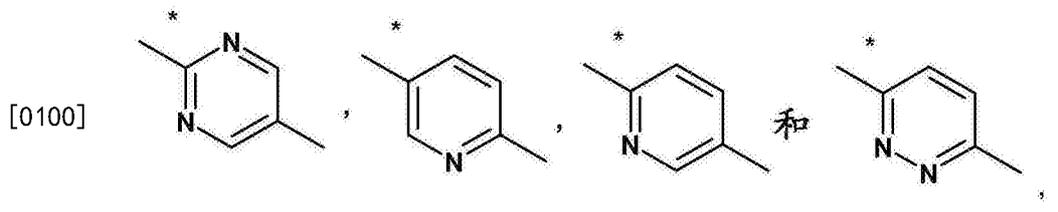
L4b

[0096] 其中用星号标记的键与氮杂双环烷基部分连接;

[0097] R_1 是氢原子或 C_{1-4} 烷基;

[0098] X_1 是 $-\text{O}-$ 或 $-\text{NH}-$;

[0099] A_2 选自



[0101] 其中用星号标记的键与 X_1 连接;

[0102] A_1 是五元至十元单环或稠合多环的芳香环体系,其可含有1至4个选自氮、氧和硫的杂原子,其中环体系可含有不多于2个氧原子和不多于2个硫原子,并且其中环体系可以被 R_2 取代1次或多于1次,并且其中杂环体系中的氮上的取代基可以不是卤素;

[0103] 每个 R_2 独立地是 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素、氰基或

三至六元的单环环体系,其可以是芳香族的,饱和或部分饱和的,并且其可含有1至4个选自氮、氧和硫的杂原子,并且其中每个环体系可含有不多于2个氧原子和不多于2个硫原子,并且其中每个环体系可以转而被C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、卤素或氰基取代1次或多次,并且其中杂环环体系中的氮上的取代基可以不是卤素;

[0104] 或者位于相邻环原子上的2个R₂形成C₃₋₄亚烷基,其中1-2个碳原子可以被X₂替换,并且其中C₃₋₄亚烷基可以被R₃取代1次或多次;

[0105] 每个X₂独立地是-O-或-N(R₄)-;

[0106] 每个R₄独立地是氢或C₁₋₆烷基;和

[0107] 每个R₃独立地是卤素或C₁₋₆烷基。

[0108] 除非另外指出,否则本发明中使用的表述具有下列含义:

[0109] “烷基”代表直链或支链的烷基基团,例如甲基、乙基、正丙基或异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基、正戊基、正己基;C₁₋₆烷基优选代表直链或支链的C₁₋₄烷基,特别优选甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。

[0110] “烷氧基”、“卤代烷基”等的每个烷基部分都应该具有与上述“烷基”定义中所述相同的含义,尤其是涉及线性部分和优选大小。

[0111] 被取代“一次或多次”的取代基,例如关于A₁的定义,优选被1至3个取代基取代。

[0112] 卤素一般是氟、氯、溴或碘;优选氟、氯或溴。卤代烷基优选具有1至4个碳原子的链长度,并且例如是氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、2-氟乙基、2-氯乙基、五氟乙基、1,1-二氟-2,2,2-三氯乙基、2,2,2-三氯乙基、1,1,2,2-四氟乙基、2,2,3,3-四氟丙基、2,2,3,3,3-五氟丙基或2,2,3,4,4,4-六氟丁基;优选-CF₃、-CHF₂、-CH₂F、-CHF-CH₃、-CF₂CH₃或-CH₂CF₃。

[0113] 在本发明的上下文中,“相邻环原子上的2个R₂形成C₃₋₄亚烷基,其中1-2个碳原子可以被X₂取代”或“相邻环原子上的2个R₅形成C₃₋₄亚烷基,其中1-2个碳原子个碳原子可以被X₃取代”涵盖了-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-、-O-CH₂-O-、-O-CH₂-CH₂-O-和-CH₂-CH₂-NH-。被取代的基团的例子是-CH₂-CH₂-N(CH₃)-。

[0114] 在本发明的上下文中,A₁或A₃的“五元至十元单环或稠合多环的芳香环体系”的定义涵盖了C₆-或C₁₀-芳香族碳氢基团,或五元至十元杂环芳香环体系。“稠环”优选意指双环。

[0115] 在本发明的上下文中,R₂的“三至六元的单环环体系”的定义涵盖了C₆-芳香族碳氢基团、五元至六元杂环芳香环体系和三至六元的单环脂肪族或杂环环体系。

[0116] C₆-或C₁₀-芳香族碳氢基团通常是苯基或萘基,特别是苯基。

[0117] 优选地,但也取决于取代基定义,“五元至十元单环或稠合多环的芳香环体系”由5至10个环原子组成,其中1-3个环原子是杂原子。这类杂环芳香环体系可以作为单环体系或双环或三环的环体系存在;优选作为单环体系或作为苯增环的环体系存在。双环或三环的环体系可以通过2个或多个环的增环作用形成,或通过桥接原子(例如氧、硫、氮)形成。杂环环体系的例子是:咪唑并[2,1-b]噻唑、吡咯、吡咯啉、吡咯烷、吡唑、吡唑啉、吡唑烷、咪唑、咪唑啉、咪唑烷、三唑、三唑啉、三唑烷、四唑、呋喃、二氢呋喃、四氢呋喃、呋咱(噁二唑)、二氧戊环、噻吩、二氢噻吩、四氢噻吩、噁唑、噁唑啉、噁唑烷、异噁唑、异噁唑啉、异噁

唑烷、噻唑、噻唑啉、噻唑烷、异噻唑、异噻唑啉、异噻唑烷、噻二唑(thiadiazole)、噻二唑啉(thiadiazoline)、噻二唑烷(thiadiazolidine)、吡啶、哌啶、哒嗪、吡嗪、哌嗪、三嗪、吡喃、四氢吡喃、噻喃、四氢噻喃、噁嗪、噁嗪、二噁烯、吗啉、嘌呤、蝶啶，和相应的苯增环的杂环，例如咪唑、异咪唑、香豆素、异喹啉、喹啉等。优选的杂环是：咪唑并[2,1-b]噻唑、噁唑、异噁唑、噻唑、异噻唑、三唑、吡咯、呋喃、四氢呋喃、吡啶、嘧啶、咪唑或吡唑。

[0118] 在本发明的上下文中，三至六元的单环脂肪族环体系通常是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

[0119] 考虑到可能存在于式(I)的化合物和式(II)的化合物中的一个或多个)不对称碳原子，化合物可能以光学活性形式或以光学异构体的混合物形式，例如，外消旋混合物或非对映异构体混合物的形式存在。所有的光学异构体及其混合物(包括外消旋混合物)都是本发明的一部分。

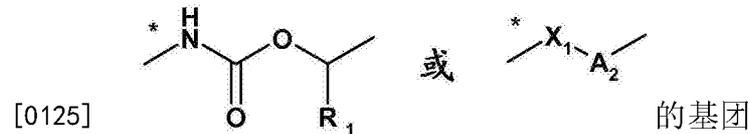
[0120] 在一个实施方案中， $\alpha 7-nAChR$ 激动剂是式(I)的化合物：



[0122] 其中

[0123] L_1 是 $-CH_2-$ ； L_2 是 $-CH_2-CH_2-$ ；和 L_3 是 $-CH_2-$ 或 $-CH(CH_3)-$ ；

[0124] L_4 是选自



L4a

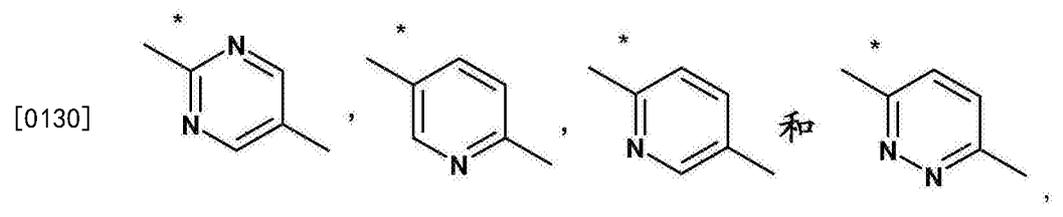
L4b

[0126] 其中用星号标记的键与氮杂双环烷基部分连接；

[0127] R_1 是氢或 C_{1-4} 烷基；

[0128] X_1 是 $-O-$ 或 $-NH-$ ；

[0129] A_2 选自

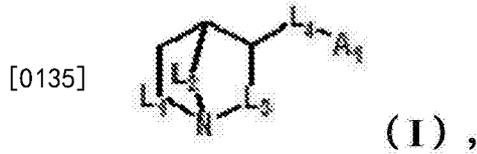


[0131] 其中用星号标记的键与 X_1 连接；

[0132] A_1 是五元至十元单环或稠合多环的芳香环体系，可含有1至4个选自氮、氧和硫的杂原子，其中环体系可含有不多于2个氧原子和不多于2个硫原子，并且其中环体系可以被 R_2 取代1次或多于1次，并且其中杂环环体系中的氮上的取代基可以不是卤素；和

[0133] 每个 R_2 独立地是 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基或卤素。

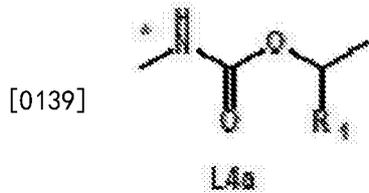
[0134] 在一个实施方案中, $\alpha 7-nAChR$ 激动剂是式 (I) 的化合物



[0136] 其中

[0137] L_1 是 $-CH_2-$; L_2 是 $-CH_2-CH_2-$; 和 L_3 是 $-CH_2-$;

[0138] L_4 是



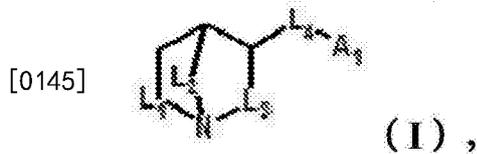
[0140] 其中用星号标记的键与氮杂双环烷基部分连接;

[0141] R_1 是氢或 C_{1-4} 烷基;

[0142] A_1 是五元至十元单环或稠合多环的芳香环体系, 可含有 1 至 4 个选自氮、氧和硫的杂原子, 其中环体系可含有不多于 2 个氧原子和不多于 2 个硫原子, 并且其中环体系可以被 R_2 取代 1 次或多于 1 次, 并且其中杂环体系中的氮上的取代基可以不是卤素; 和

[0143] 每个 R_2 独立地是 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基或卤素。

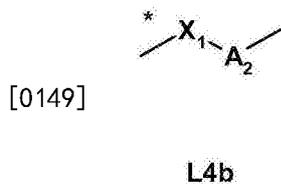
[0144] 在一个实施方案中, $\alpha 7-nAChR$ 激动剂是式 (I) 的化合物



[0146] 其中

[0147] L_1 是 $-CH_2-$; L_2 是 $-CH_2-CH_2-$; 和 L_3 是 $-CH_2-$ 或 $-CH(CH_3)-$;

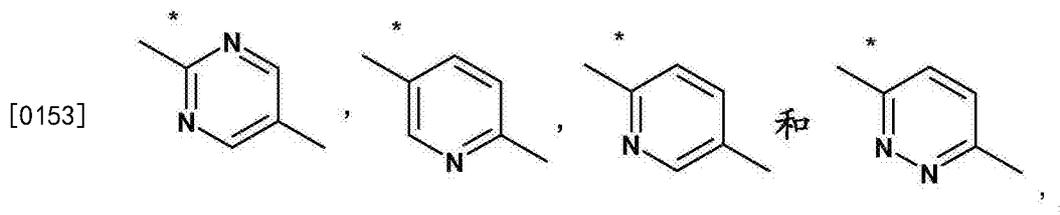
[0148] L_4 是



[0150] 其中用星号标记的键与氮杂双环烷基部分连接;

[0151] X_1 是 $-O-$ 或 $-NH-$;

[0152] A_2 选自

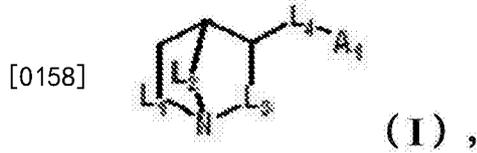


[0154] 其中用星号标记的键与 X_1 连接;

[0155] A₁是五元至十元单环或稠合多环的芳香环体系,可含有1至4个选自氮、氧和硫的杂原子,其中环体系可含有不多于2个氧原子和不多于2个硫原子,并且其中环体系可以被R₂取代1次或多次,并且其中杂环体系中的氮上的取代基可以不是卤素;和

[0156] 每个R₂独立地是C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基或卤素。

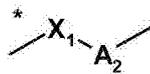
[0157] 在一个实施方案中,α7-nAChR激动剂是式(I)的化合物



[0159] 其中

[0160] L₁是-CH₂-CH₂-; L₂是-CH₂-; 和L₃是-CH₂-CH₂-;

[0161] L₄是

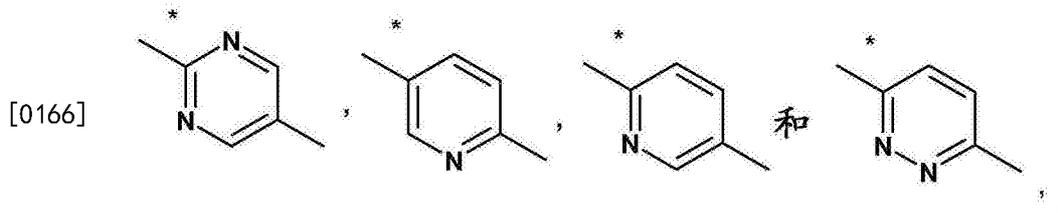


L4b

[0163] 其中用星号标记的键与氮杂双环烷基部分连接;

[0164] X₁是-O-或-NH-;

[0165] A₂选自



[0167] 其中用星号标记的键与X₁连接;

[0168] A₁是五元至十元单环或稠合多环的芳香环体系,可含有1至4个选自氮、氧和硫的杂原子,其中环体系可含有不多于2个氧原子和不多于2个硫原子,并且其中环体系可以被R₂取代1次或多次,并且其中杂环体系中的氮上的取代基可以不是卤素;和

[0169] 每个R₂独立地是C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基或卤素。

[0170] 在一个实施方案中,α7-nAChR激动剂选自P1组的化合物;P1组是由以下组成:

[0171] A-1: (S)-(1-氮杂-双环[2.2.2]辛-3-基)-氨基甲酸(S)-1-(2-氟-苯基)-乙酯;

[0172] A-2: (R)-(1-氮杂-双环[2.2.2]辛-3-基)-氨基甲酸(R)-1-(2-氯-苯基)-乙酯;

[0173] A-3: (S)-(1-氮杂-双环[2.2.2]辛-3-基)-氨基甲酸(S)-1-苯基-乙酯;

[0174] B-1: (R)-3-(5-苯基-嘧啶-2-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;

[0175] B-2: (R)-3-(5-对甲苯基-嘧啶-2-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;

[0176] B-3: (R)-3-(5-(2-氟-4-甲基-苯基)-嘧啶-2-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;

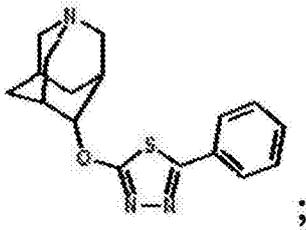
[0177] B-4: (R)-3-(5-(3,4-二甲基-苯基)-嘧啶-2-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;

[0178] B-5: (R)-3-(6-对甲苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;

[0179] B-6: (R)-3-(6-苯基-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;

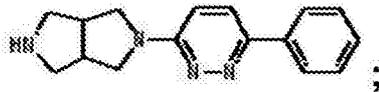
- [0180] B-7: (R)-3-[6-(3,4-二甲基-苯基)-吡啶-3-基氧]-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0181] B-8: (R)-3-[6-(2-氟-4-甲基-苯基)-哒嗪-3-基氧]-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0182] B-9: (R)-3-[6-(4,5-二甲基-2-氟-苯基)-哒嗪-3-基氧]-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0183] B-10: (R)-3-[6-(3,4-二甲基-苯基)-哒嗪-3-基氧]-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0184] B-11: (R)-3-[6-(4-甲基-苯基)-哒嗪-3-基氧]-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0185] B-12: (R)-3-[6-(2,5-二氟-4-甲基-苯基)-哒嗪-3-基氧]-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0186] B-13: (2S,3R)-3-[6-(1H-吡啶-5-基)-哒嗪-3-基氧]-2-甲基-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0187] B-14: (2R,3S)-3-[6-(1H-吡啶-5-基)-哒嗪-3-基氧]-2-甲基-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0188] B-15: (2S,3R)-3-[5-(1H-吡啶-5-基)-噻啶-2-基氧]-2-甲基-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0189] B-16: (2R,3S)-3-[5-(1H-吡啶-5-基)-噻啶-2-基氧]-2-甲基-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0190] B-17: 3-[6-(1H-吡啶-5-基)-吡啶-3-基氧]-2-甲基-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0191] B-18: (2S,3R)-2-甲基-3-[6-(5-甲基-噻吩-2-基)-哒嗪-3-基氧]-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0192] B-19: 3-[6-(2,3-二甲基-1H-吡啶-5-基)-哒嗪-3-基氧]-2-甲基-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷;
- [0193] B-20: 反-2-甲基-1-氮杂-双环[2.2.2]辛-3-基)-(6-苯基-吡啶-3-基)-胺;
- [0194] B-21: 反-[6-(1H-吡啶-5-基)-吡啶-3-基)-(2-甲基-1-氮杂-双环[2.2.2]辛-3-基)-胺];
- [0195] C-1: (4S,5R)-4-[5-(1H-吡啶-5-基)-噻啶-2-基氧]-1-氮杂-双环[3.3.1]壬烷;
- [0196] C-2: 5-{2-[(4S,5R)-(1-氮杂-双环[3.3.1]壬-4基)氧]-噻啶-5-基}-1,3-二氢-吡啶-2-酮;
- [0197] C-3: (4S,5R)-4-[6-(1H-吡啶-5-基)-吡啶-3-基氧]-1-氮杂-双环[3.3.1]壬烷;
- [0198] C-4: (4S,5R)-4-[5-(1H-吡啶-5-基)-吡啶-2-基氧]-1-氮杂-双环[3.3.1]壬烷;
- [0199] C-5: (4S,5R)-4-[6-(1H-吡啶-5-基)-哒嗪-3-基氧]-1-氮杂-双环[3.3.1]壬烷;
- [0200] C-6: 5-{6-[(4S,5R)-(1-氮杂-双环[3.3.1]壬-4-基)氧]-哒嗪-3-基}-1,3-二氢-吡啶-2-酮;
- [0201] C-7: (1-氮杂-双环[3.3.1]壬-4-基)-[5-(1H-吡啶-5-基)-吡啶-2-基]-胺;
- [0202] C-8: (1-氮杂-双环[3.3.1]壬-4-基)-[5-(1H-吡啶-5-基)-噻啶-2-基]-胺;
- [0203] C-9: (1-氮杂-双环[3.3.1]壬-4-基)-[6-(1H-吡啶-5-基)-吡啶-3基]-胺;
- [0204] C-10: (1-氮杂-双环[3.3.1]壬-4-基)-[6-(1H-吡啶-5-基)-吡啶-3基]-胺;
- [0205] C-11: (1-氮杂-双环[3.3.1]壬-4-基)-[5-(1H-4-吡啶基)-噻啶-2-基]-胺;
- [0206] C-12: (1-氮杂-双环[3.3.1]壬-4-基)-[6-(1H-吡啶-5-基)-哒嗪-3-基]-胺;
- [0207] D-1: 4-(5-苯基-1,3,4-噻二唑-2-基氧)-1-氮杂三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷,具有式

[0208]

[0209] D-1a: (4S)-4-(5-苯基-1,3,4-噻二唑-2-基氧)-1-氮杂三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷;[0210] D-1b: 4-(6-(1H-吡啶-5-基)-哒嗪-3-基氧)-1-氮杂三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷;[0211] D-1c: 4-(6-(1H-吡啶-5-基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷;[0212] D-1d: 4-(5-(1H-吡啶-5-基)-噻啶-2-基氧)-1-氮杂三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷;

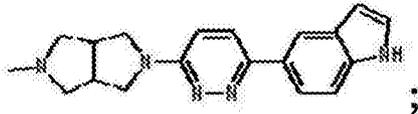
[0213] D-2: 2-(6-苯基哒嗪-3-基)八氢吡咯并[3,4-c]吡咯, 具有式

[0214]



[0215] D-3: 5-[6-(5-甲基-六氢-吡咯并[3,4-c]吡咯-2-基)-哒嗪-3-基]1H-吡啶, 具有式

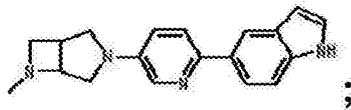
[0216]



[0217] D-3a: 5-[6-(顺-5-甲基-六氢-吡咯并[3,4-c]吡咯-2-基)-哒嗪-3-基]1H-吡啶;

[0218] D-4: 5-[5-{6-甲基-3,6-二氮杂-双环[3.2.0]庚-3-基}-吡啶-2-基]-1H-吡啶, 具有式

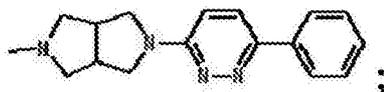
[0219]



[0220] D-4a: 5-[5-{(1R,5R)-6-甲基-3,6-二氮杂-双环[3.2.0]庚-3-基}-吡啶-2-基]-1H-吡啶

[0221] D-5: 2-甲基-5-(6-苯基-哒嗪-3-基)-八氢-吡咯并[3,4-c]吡咯, 具有式

[0222]



[0223] D-6: 5-{6-[1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基氧]哒嗪-3-基}-1H-吡啶;

[0224] D-6a: 5-{6-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基氧]哒嗪-3-基}-1H-吡啶;

[0225] D-7: 5-{6-[1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基氧]哒嗪-3-基}-1,3-二氢-吡啶-2-酮;

[0226] D-7a: 5-{6-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基氧]哒嗪-3-基}-1,3-二氢-吡啶-2-酮;

[0227] D-8: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-1H-吡啶-3-甲酰胺;

[0228] D-8a: N-((3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-1H-吡啶-3-甲酰胺

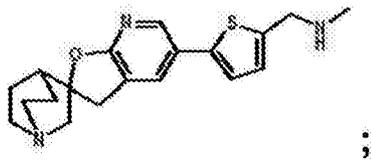
[0229] D-8b: N-((3S)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-1H-吡啶-3-甲酰胺

[0230] D-9: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-5-(三氟甲氧基)-1H-吡啶-3-甲酰胺;

[0231] D-9a: N-((3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-5-(三氟甲氧基)-1H-吡啶-3-甲酰胺;

- [0232] D-9b: N-((3S)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-5-(三氟甲氧基)-1H-吡啶-3-甲酰胺;
- [0233] D-10: N-(2-((3-吡啶基)甲基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)苯并咪唑-2-甲酰胺;
- [0234] D-10a: (2S,3R)-N-(2-((3-吡啶基)甲基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)苯并咪唑-2-甲酰胺;
- [0235] D-11: N-(2-((3-吡啶基)甲基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-3,5-二氟苯甲酰胺;
- [0236] D-11a: (2S,3R)-N-(2-((3-吡啶基)甲基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-3,5-二氟苯甲酰胺;
- [0237] D-11b: N-(2-((3-吡啶基)甲基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-5-甲基噻吩-2-甲酰胺;
- [0238] D-11c: (2S,3R)-N-(2-((3-吡啶基)甲基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-5-甲基噻吩-2-甲酰胺;
- [0239] D-11d: N-(2-((3-吡啶基)甲基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-5-(2-吡啶基)噻吩-2-甲酰胺;
- [0240] D-11e: (2S,3R)-N-(2-((3-吡啶基)甲基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-5-(2-吡啶基)噻吩-2-甲酰胺;
- [0241] D-12: 4-(5-甲基唑并[4,5-b]吡啶-2-基)-1,4-二氮杂双环[3.2.2]壬烷;
- [0242] D-13: [N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-4-氯苯甲酰胺];
- [0243] D-14: 氟[2,3-c]吡啶-5-羧酸(1-氮杂-双环[2.2.2]辛-3-基)酰胺;
- [0244] D-15: 2,3-二氢-苯并[1,4]二烯-6-羧酸(1-氮杂-双环[2.2.2]辛-3-基)酰胺;
- [0245] D-16: 5-吗啉-4-基-戊酸(4-吡啶-3-基-苯基)酰胺;
- [0246] D-17: N-{4-[4-(2,4-二甲氧基-苯基)-哌嗪-1-基]-丁基}-4-吡啶-2-基-苯甲酰胺;
- [0247] D-18: 1-[6-(4-氟苯基)吡啶-3基]-3-(4-哌啶-1-基丁基)-尿素;
- [0248] D-19: 7,8,9,10-四氢-6,10-亚甲基桥(methano)-6H-吡嗪并-(2,3-h)(3)-苯并吡啶庚因(benzazepine);
- [0249] D-20: (2' R)-螺环-[1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3,2'(3' H)-咪唑并[2,3-b]吡啶];
- [0250] D-21: 1,4-二氮杂-双环[3.2.2]壬烷-4-羧酸4-溴-苯酯;
- [0251] D-22: 3-[1-(2,4-二甲氧基-苯基)-甲-(E)-基亚基]-3,4,5,6-四氢-[2,3']二吡啶基;
- [0252] D-23: 7-(2-甲氧基-苯基)-苯并咪唑-2-羧酸(1-氮杂-双环[2.2.2]辛-3-基)酰胺;
- [0253] D-24: N-甲基-1-{5-[3' H-螺环[4-氮杂双环[2.2.2]辛烷-2,2'-咪唑并[2,3-b]吡啶]-5'-基]-2-噻吩基}甲胺,具有式

[0254]



;

[0255] D-24a: N-甲基-1-({5-[(2R)-3'-H-螺环[4-氮杂双环[2.2.2]辛烷-2,2'-咪唑并[2,3-b]吡啶]-5'-基]-2-噻吩基}甲胺);

[0256] D-24b: N-甲基-1-({5-[(2S)-3'-H-螺环[4-氮杂双环[2.2.2]辛烷-2,2'-咪唑并[2,3-b]吡啶]-5'-基]-2-噻吩基}甲胺);

[0257] D-25a: 6-[(苯胺基羰基)氨基]-N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0258] D-25b: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(4-氯苯基)氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0259] D-25c: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(2-甲氧基苯基)氨基]羰基)-氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0260] D-25d: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(4-甲氧基苯基)氨基]羰基)-氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0261] D-25e: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(2-苯基乙基)氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0262] D-25f: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(3-氰基苯基)氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0263] D-25g: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(3-溴苯基)氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0264] D-25h: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(2-乙氧基苯基)氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0265] D-25i: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(4-(二甲基氨基)苯基)氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0266] D-25j: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(2-硝基苯基)氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0267] D-25k: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(2,6-二氟苯基)氨基]羰基)-氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0268] D-25l: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(2,4-二氯苯基)氨基]羰基)-氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0269] D-25m: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[3-(三氟甲基)苯基]氨基]-羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0270] D-25n: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[(3,4,5-三甲氧基苯基)氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0271] D-25o: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[4-甲氧基-3-(三氟甲基)苯基]-氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0272] D-25p: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-({[3-甲氧基苯基]氨基]羰基)氨基)-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

基)-氨基]-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0273] D-25q:N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-([{3-三氟甲氧基苯基}氨基)-羰基)-氨基]-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0274] D-25r:N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-[(叔丁基氨基)羰基]氨基]-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0275] D-25s:N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-[(环己基氨基)羰基]氨基]-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0276] D-25t:N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-([{(1S)-1-苯乙基}氨基)羰基-氨基]-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0277] D-25u:7-[(苯胺基羰基)氨基]-N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-1-苯并噻吩-2-甲酰胺;

[0278] D-25v:N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-([{(4-甲氧基苯基)氨基}羰基)-氨基]-1-苯并咪唑-2-甲酰胺;

[0279] D-26a:N-[4-(2-噻吩基)苯基]-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;

[0280] D-26b:N-[4'-(羟甲基)-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;

[0281] D-26c:N-(4'-氟-1,1'-二苯基-4-基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;

[0282] D-26d:N-(4'-甲基巯基-1,1'-二苯基-4-基)-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;

[0283] D-26e:2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(4'-氟-1,1'-二苯基-4-基)乙酰胺;

[0284] D-26f:2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(4'-甲氧基-1,1'-二苯基-4-基)乙酰胺;

[0285] D-26g:2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(4'-氟-1,1'-二苯基-3-基)乙酰胺;

[0286] D-26h:2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(3'-硝基-1,1'-二苯基-4-基)乙酰胺;

[0287] D-26i:2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-[4'-(羟甲基)-1,1'-二苯基-3-基]乙酰胺;

[0288] D-26j:2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-[4'-(溴甲基)-1,1'-二苯基-4-基]乙酰胺;

[0289] D-26k:2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-[2'-(羟甲基)-1,1'-二苯基-3-基]乙酰胺;

[0290] D-26l:N-[3'-(乙酰基氨基)-1,1'-二苯基-4-基]-2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)乙酰胺;

[0291] D-26m:(3R)-N-[2'-(羟甲基)-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;

[0292] D-26n:(3R)-N-[4'-(羟甲基)-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;

[0293] D-26o:(3S)-N-[4'-(羟甲基)-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;

- [0294] D-26p: (3R)-N-[4'-(4-吗啉基)-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;
- [0295] D-26q: (3R)-N-[4'-(羟甲基)-3'-(甲氧基)-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]-辛烷-3-甲酰胺;
- [0296] D-26r: 甲基4'-{[(3S)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基羰基]氨基}-1,1'-二苯基-4-羧酸酯;
- [0297] D-26s: 4'-{[(3S)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基羰基]氨基}-1,1'-二苯基-4-羧酸;
- [0298] D-26t: (3R)-N-[4'-(羟基-1-甲基乙基)-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]-辛烷-3-甲酰胺;
- [0299] D-26u: (3R)-N-[4'-(氨基羰基)-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;
- [0300] D-26v: (3R)-N-[4'-(羟甲基)-3-氟-1,1'-二苯基-4-基]-1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-甲酰胺;
- [0301] D-26w: (4'-{[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基羰基]氨基}-1,1'-二苯基-4-基)甲基氨基甲酸甲酯;
- [0302] D-26x: (4'-{[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基羰基]氨基}-1,1'-二苯基-4-基)甲基氨基甲酸异丙基酯;
- [0303] D-26y: (4'-{[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基羰基]氨基}-1,1'-二苯基-4-基)甲基氨基甲酸乙酯;
- [0304] D-26z: 选自W02003/078431的实施例26、27、28、29、30、31、32、33、34和35的化合物的游离碱形式;
- [0305] D-27a: 2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(7-溴-1-苯并噻吩-2-基)乙酰胺;
- [0306] D-27b: 2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(6-溴-1-苯并噻吩-2-基)乙酰胺;
- [0307] D-27c: 2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(7-喹啉基)乙酰胺;
- [0308] D-27d: 2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(2-萘基)乙酰胺;
- [0309] D-27e: 2-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-N-(8-硝基-2-萘基)乙酰胺;
- [0310] D-28a: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-6-喹啉甲酰胺;
- [0311] D-28b: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-吩嗪甲酰胺;
- [0312] D-28c: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-7-喹啉甲酰胺;
- [0313] D-28d: N-[(3R)-1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基]-6-喹啉甲酰胺;
- [0314] D-28e: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-乙基-7-喹啉甲酰胺;
- [0315] D-28f: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-乙基-6-喹啉甲酰胺;
- [0316] D-28g: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-甲基-7-喹啉甲酰胺;
- [0317] D-28h: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-甲基-6-喹啉甲酰胺;
- [0318] D-28i: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-4-甲基-6-喹啉甲酰胺;
- [0319] D-28j: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-丙基-6-喹啉甲酰胺;
- [0320] D-28k: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-乙基-4-甲基-6-喹啉甲酰胺;
- [0321] D-28l: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-丙基-7-喹啉甲酰胺;

- [0322] D-28m: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-乙基-4-甲基-7-喹啉甲酰胺;
- [0323] D-28n: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-4-(四氢-2H-吡喃-2-基)-6-喹啉-甲酰胺;
- [0324] D-28o: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-4-(四氢-2H-吡喃-2-基)-7-喹啉-甲酰胺;
- [0325] D-28p: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-苯基-6-喹啉甲酰胺;
- [0326] D-28q: N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)-2-苯基-7-喹啉甲酰胺;
- [0327] D-29: (R)-7-氯-N-(奎宁环-3-基)苯并[b]噻吩-2-甲酰胺;
- [0328] D-30a: 5-{5-[(内)-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基氧]吡啶-2-基}-1H-吡啶;
- [0329] D-30b: 5-{5-[(外)-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基氧]吡啶-2-基}-1H-吡啶;
- [0330] D-30c: 5-{5-[(内)-8-甲基-8-氮杂-双环[3.2.1]辛-3-基氧]吡啶-2-基}-1H-吡啶;
- [0331] D-30d: 5-{5-[(外)-8-甲基-8-氮杂-双环[3.2.1]辛-3-基氧]吡啶-2-基}-1H-吡啶;
- [0332] D-30e: 4-{5-[(外)-8-甲基-8-氮杂-双环[3.2.1]辛-3-基氧]吡啶-2-基}-1H-吡啶; 和
- [0333] D-30f: 5-{6-[(外)-8-甲基-8-氮杂-双环[3.2.1]辛-3-基氧]吡啶-3基}-1H-吡啶;
- [0334] 其中每种所述化合物处于游离碱形式或酸加成盐形式。
- [0335] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂是选自化合物A-1、A-2和A-3的化合物; 其中每种所述化合物处于游离碱形式或酸加成盐形式。
- [0336] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂是选自化合物B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-7、B-8、B-9、B-10、B-11、B-12、B-13、B-14、B-15、B-16、B-17、B-18、B-19、B-20和B-21的化合物; 其中每种所述化合物处于游离碱形式或酸加成盐形式。
- [0337] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂是选自化合物C-1、C-2、C-3、C-4、C-5、C-6、C-7、C-8、C-9、C-10、C-11和C-12的化合物; 其中每种所述化合物处于游离碱形式或酸加成盐形式。
- [0338] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂是选自P2组的化合物; P2组是由化合物A-1、A-2、A-3、B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-7、B-8、B-9、B-10、B-11、B-12、B-13、B-14、B-15、B-16、B-17、B-18、B-19、B-20、B-21、C-1、C-2、C-3、C-4、C-5、C-6、C-7、C-8、C-9、C-10、C-11、C-12、D-1、D-1a、D-1b、D-1c、D-1d、D-2、D-3、D-3a、D-4、D-4a、D-8、D-8a、D-8b、D-9、D-9a、D-9b、D-10、D-10a、D-11、D-11a、D-11b、D-11c、D-11d、D-11e、D-12、D-19、D-22、D-24、D-24a、D-24b、D-25a、D-25b、D-25c、D-25d、D-25e、D-25f、D-25g、D-25h、D-25i、D-25j、D-25k、D-25l、D-25m、D-25n、D-25o、D-25p、D-25q、D-25r、D-25s、D-25t、D-25u、D-25v、D-28a、D-28b、D-28c、D-28d、D-28e、D-28f、D-28g、D-28h、D-28i、D-28j、D-28k、D-28l、D-28m、D-28n、D-28o、D-28p、D-28q、D-29、D-30a、D-30b、D-30c、D-30d、D-30和D-30f组成的组; 其中每种所述化合物处于游离碱形式或酸加成盐形式。
- [0339] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR激动剂是选自P3组的化合物; P3组是由化合物A-1、A-2、A-3、B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-7、B-8、B-9、B-10、B-11、B-12、B-13、B-14、B-15、B-

16、B-17、B-18、B-19、B-20、B-21、C-1、C-2、C-3、C-4、C-5、C-6、C-7、C-8、C-9、C-10、C-11、C-12、D-1、D-1a、D-1b、D-1c、D-1d、D-2、D-3、D-3a、D-4、D-4a、D-8、D-8a、D-8b、D-9、D-9a、D-9b、D-10、D-10a、D-11、D-11a、D-12、D-19、D-22、D-24、D-24a、D-24b、D-29、D-30a、D-30b、D-30c、D-30d、D-30e和D-30f组成的组；其中每种所述化合物处于游离碱形式或酸加成盐形式。

[0340] 在一个实施方案中， $\alpha 7$ -nAChR激动剂是选自P4组的化合物；P4组是由化合物A-1、B-5、B-8、B-12、B-13、C-5、C-6和C-8组成的组；其中每种所述化合物处于游离碱形式或酸加成盐形式。

[0341] 式(I)的化合物(例如，化合物A-1至A-3、B-1至B-21和C-1至C-12)及其生产从W02001/85727、W02004/022556、W02005/123732、W02006/005608、W02007/045478、W02007/068476和W02007/068475已知，或者可以与所述参考文献类似地制备。

[0342] 可以根据W02008/058096制备化合物D-1和D-1a。

[0343] 可以根据W02005/028477制备化合物D-2、D-3、D-3a、D-4、D-4a和D-5(A-582941)。可以根据W02006/065233和/或W02007/018738制备化合物D-6、D-6a、D-7和E7a。可以根据W02004/029050和/或W02010/043515制备化合物D-8、D-8a、D-8b、D-9、D-9a和D-9b。

[0344] 可以根据W02004/076449和/或W02009/018505制备化合物D-10和D-10a。可以根据W02004/076449和/或W02010/085724和/或W02010/056622制备化合物D-11、D-11a至D-11e。O' Donnell等人, *J Med Chem*, 2010, 53, 1222-1237中描述了化合物D-12(CP-810123)和化合物D-19(varenicline)。Horenstein等人, *Mol Pharmacol*, 2008, 74, 1496-1511中描述了化合物D-13(PNU-282987)、D-14(PHA543613)、D-21(SSR-180771)和D-23(ABBF)。Haydar等人, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2010, 10, 144-152中描述了化合物D-15(PHA568487)、D-16(WAY-317538)、D-17(WAY-264620)、D-20(AZD-0328)和D-22(GTS-21)。Ghiron等人, *J Med Chem*, 2010, 53, 4379-4389中描述了化合物D-18(WYE-103914)。W02007/133155和/或W02009/066107中描述了化合物D-24、D-24a和D-24b。W02004/013136中描述了化合物D-25a至D-25v。W02003/078431中描述了化合物D-26a至D-26z。W02003/078430中描述了化合物D-27a至D-27e。W02003/043991中描述了化合物D-28a至D-28q。W02003/055878中描述了化合物D-29。W02007/137030中描述了化合物D-30a至D-30f。

[0345] LMW $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂:

[0346] 在一个实施方案中，使用的 $\alpha 7$ -nAChR激活剂是 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂。

[0347] 如本文中使用的，“ $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂”是在体内和体外与包含 $\alpha 7$ -nAChR亚基的受体结合的化合物，且当与其生理配体(即，乙酰胆碱)结合时强化受体的激活。可以通过W02001/85727公开的方法，即，用稳定表达 $\alpha 7$ -nAChR的大鼠垂体细胞系进行的对同聚的 $\alpha 7$ -nAChR的功能性亲和力测定来测量强化。作为读数，使用相比只结合乙酰胆碱时刺激受体后的钙离子内流。根据本发明的“ $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂”通常诱导由乙酰胆碱引起的最大内流的至少200%的钙离子内流，其 EC_{50} 值为至少5000nM；优选的 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂诱导由乙酰胆碱引起的最大内流的至少300%的钙离子内流，其 EC_{50} 值为至少1000nM；更优选的激动剂诱导由地棘蛙素引起的最大内流的至少400%的钙离子内流，其 EC_{50} 值为至少500nM。

[0348] 特别的是，优选的 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂应该从胃肠道中良好吸收，应该是足够代谢稳定的且具有有利的药物动力学特性。

[0349] 其他优选的 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂在体内有效力地结合 $\alpha 7$ -nAChR，同时对其他受

体,尤其是对其他nAChR,例如 $\alpha 4\beta 2$ nAChR,对毒蕈碱型乙酰胆碱受体如M1,和/或5-HT3受体的表现出低的亲和力。

[0350] 其他优选的 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂有效跨越血脑屏障。

[0351] 优选的 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂应该是无毒的并表现出少的副作用。

[0352] 此外,优选的 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂将能够以稳定的、不吸湿的且易于配制的物理形态存在。

[0353] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂是选择性 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂,即,对包含 $\alpha 7$ -nAChR亚基的受体是选择性的,因为这类正变构调节剂预期对受治疗的对象导致比非选择性正变构调节剂更少的副作用。对包含 $\alpha 7$ -nAChR亚基的受体选择性的正变构调节剂对这类受体具有高得多的程度的功能亲和力,例如,相比任何其他烟碱型乙酰胆碱受体,EC₅₀值差异至少10倍,优选至少20倍,更优选至少50倍的亲和力差异。为了评估本发明的 $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂对其他烟碱型乙酰胆碱受体的亲和力,可以使用W02001/85727中公开的方法,即,为了评估对人神经元 $\alpha 4\beta 2$ nAChR的亲和力,使用稳定表达人 $\alpha 4\beta 2$ 亚型的人胎肾细胞系进行相似的功能测定,并且为了评估本发明的化合物对烟碱型受体的“神经节亚型”和“肌肉型”的活性,用稳定表达烟碱型受体的人“神经节亚型”的人胎肾细胞系或内源性表达烟碱型受体的人“肌肉型”的细胞系进行相似的功能测定。

[0354] 在最近12年内,更多的工作关注于研发选择性 $\alpha 7$ nAChR正变构调节剂,导致发现了展现出所述选择性活性的许多不同化学型。Haydar等人(Current Topics in Medicinal Chemistry, 2010, 10, 144-152)的综述概括了这些工作,其描述了11种作为 $\alpha 7$ nAChR正变构调节剂发挥作用的化合物,属于7个不同的化学家族;即,XY-4083;PNU-120596、PHA-758454和NS-1738;PHA-709829;SB-206553;LY-2087101, LY-1078733和LY-2087133;化合物26;和A-867744(化合物命名来自Haydar等人)。Haydar等人描述的所有所述11种化合物都通过引用整合到本文中。实际上,至少一种具有 $\alpha 7$ nAChR正变构调节剂作用模式的药物候选物获得了美国食品和药品管理局进行临床测试的批准(即,XY-4083)。

[0355] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂具有1500道尔顿的最大分子量。在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂具有1000道尔顿的最大分子量。在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂具有800道尔顿的最大分子量。在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂具有500道尔顿的最大分子量。

[0356] 在一个实施方案中, $\alpha 7$ -nAChR正变构调节剂是选自组P5的化合物;组P5是由以下化合物组成的组:

[0357] E-1: (Z)-N-(4-氯-苯基)-3-(4-氯-苯基氨基)-2-(3-甲基-异噁唑-5-基)-丙烯酰胺(XY-4083);

[0358] E-2: 1-(5-氯-2,4-二甲氧基-苯基)-3-(5-甲基-异噁唑-3-基)-尿素(PNU-120596);

[0359] E-3: 1-(5-氟-2,4-二甲氧基-苯基)-3-(5-三氟甲基-异噁唑-3-基)-尿素(PHA-758454);

[0360] E-4: 1-(5-氯-2-羟基-苯基)-3-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-尿素(NS-1738);

[0361] E-5: 4-(4-氯-苯基)-2-(4-甲氧基-苯基)-5-甲基-2H-吡唑-3-基胺(PHA-

709829) ;

[0362] E-6: 5-甲基-3,5-二氢-2H-吡咯并[2,3-f]吡啶-1-羧酸吡啶-3基酰胺 (SB-206553) ;

[0363] E-7: [2-(4-氟-苯基氨基)-4-甲基-噻唑-5-基]-噻吩-3-基-甲酮 (LY-2087101) ;

[0364] E-8: [2-(4-氟-苯基氨基)-4-甲基-噻唑-5-基]-对甲苯基-甲酮 (LY-1078733) ;

[0365] E-9: 苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-[2-(4-氟-苯基氨基)-4-甲基-噻唑-5-基]-甲酮 (LY-2087133) ;

[0366] E-10: 4-萘-1-基-3a,4,5,9b-四氢-3H-环戊[c]喹啉-8-磺酰胺; 和

[0367] E-11: 4-[5-(4-氯-苯基)-2-甲基-3-丙酰-吡咯-1-基]-苯磺酰胺 (A-867744) ; 其中所述化合物处于游离碱的形式或酸加成盐的形式。

[0368] 在仍然另一个实施方案中,上述公开的用于在根据本文公开的方法选择的患者群中,治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的包含 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的组合物,包含第二种认知增强剂或治疗化合物,如常规的抗精神病药物或非典型的抗精神病药物。

[0369] 在一个实施方案中,本发明提供了用于基于待治疗对象中存在或不存在的特定的遗传标志物预测对象(例如,人类对象)对 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的治疗响应的方法。术语“预测对 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的治疗响应”在本文中意在指评估用 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂治疗对象将会或将不会在对象中临床上有效(例如,向对象提供可测量的益处)的可能性的能力。特别是,评估治疗将会或将不会临床上有效的可能性的该能力通常是在对象中开始用 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂治疗前实施的。然而,也可以在已经开始治疗后但在已经在对象中观察到临床效果的提示物(例如,可测量益处的提示物)之前,实施评估治疗将会或将不会临床上有效的可能性的该能力。

[0370] 方法包括步骤: I) 获得个体在CHRNA5基因和/或CHRNA3基因的基因座上的基因型; II) 鉴别步骤I)中携带CHRNA5SNP rs55853698-T (SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G (SEQ ID NO.37)或与所述SNP形成单体型的SNP的个体,和/或携带CHRNA3SNP rs6495308 (SEQ ID NO.3/4)或SNP rs1051730 (SEQ ID NO.35/36)或与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的个体,其中纯合存在CHRNA5SNP或SNP单体型中的至少一种是个体将可能应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示,并且其中纯合存在SNPrs6495308-T/T (SEQ ID NO.4)是个体将可能不应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。纯合存在SNP rs6495308-C/C (SEQ ID NO.3)或杂合存在SNP rs6495308-C/T基因型是个体将可能应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。纯合存在SNP rs1051730-C/C (SEQ ID NO.35)是个体将可能应答 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。

[0371] 可以使用本领域普遍已知的任何技术,实现CHRNA5和/或CHRNA3SNP的表征,或获得个体在所述基因座的基因型信息。例如,可以对任何基因区域测序。在本发明的方法中可以使用任何普遍已知的用于测序CHRNA5和/或CHRNA3基因的一条或两条链的方法,例如,美国专利号5,075,216,Engelke等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85,544-548和Wong等人(1987)Nature330,384-386;Maxim和Gilbert(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.74:560;或Sanger(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.74:5463中描述的方法。此外,可以利用多种自动化测序方法中的任一种,参见例如Naeve,C.W等人(1995)Biotechniques19:448,

包括质谱测序(参见例如,PCT国际公开号W094/16101;Cohen等人(1996) *Adv.Chromatogr.* 36:127-162;和Griffin等人(1993) *Appl.Biochem.Biotechnol.* 38:147-159)。

[0372] 可以使用任何普遍已知的技术,实现确定生物学样品中CHRNA5和/或CHRNA3SNP的存在或不存在,如聚合酶链式反应(PCR)扩增反应、逆转录酶PCR分析、单链构象多态性分析(SSCP)、错配切割检测、异双链体分析、Southern印迹分析、Western印迹分析、脱氧核糖核酸测序、限制性酶片段长度多态性分析、单体型分析、血清分型,及其组合或亚组合。

[0373] 例如,可以从对象获得mRNA样品,并使用标准的分子生物学技术检测mRNA样品中由CHRNA5和/或CHRNA3等位基因编码的mRNA的表达,如PCR分析。优选的PCR分析方法是逆转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR)。用于mRNA样品分析的其他合适系统包括微阵列分析(例如,使用Affymetrix的微阵列系统或Illumina的BeadArray技术)。

[0374] 在某些情况下,可以使用检测由生物标志物的mRNA编码的蛋白质产物的检测试剂,测定CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因在蛋白质水平的表达。例如,如果可获得这样的抗体试剂,所述抗体试剂特异性结合CHRNA5或CHRNA3标志物蛋白质,而不结合其他蛋白质,则可以利用本领域已知的标准的基于抗体的技术,如FACS分析、ELISA等,使用该抗体检测CHRNA5或CHRNA3标志物蛋白质在来自对象的细胞样品中,或源自细胞样品的制品中的表达。

[0375] 如上所述,确定CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因的存在或不存在可包括例如限制性酶片段长度多态性分析。限制性酶片段长度多态性分析(RFLPS)是基于限制性酶切位点的改变。此外,可以使用序列特异性核酶(参见例如,美国专利号5,498,531)对存在特定核酶切割位点打分。

[0376] 用于确定CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因、或与这类提示性等位基因形成单型型的SNP的存在或不存在的另一种技术涉及使被分析的DNA片段(靶DNA)与互补的经标记的寡核苷酸探针杂交,如在例如Wallace等人(1981) *Nucl.Acids Res.* 9,879-894中所描述的。由于即使仅含单个碱基对错配的DNA双链体表现出高的热不稳定性,因此,可以使用差示溶解温度区分与探针完美互补的靶DNA和仅差单个核苷酸的靶DNA。已经调整了该方法以检测特定的限制性位点的存在或不存在,如在例如美国专利号4,683,194中所描述的。方法涉及使用与靶DNA杂交的跨越限制性位点的末端标记的寡核苷酸探针。然后,将DNA的杂交的双链体与适合所述位点的限制性酶孵育。通过使用限制性核酸内切酶消化探针和靶之间的双链体对,将切割重新形成的限制性位点。如果检测到缩短的探针分子,则靶DNA中存在特定的限制性位点。

[0377] 用于确定CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因或与这类提示性等位基因形成单型型的SNP的存在或不存在的其他方法包括这样的方法,其中使用保护其免受切割剂作用,以检测在RNA/RNA或RNA/DNA异双链体中的错配碱基(描述在例如Myers等人(1985) *Science* 230:1242中)。一般而言,“错配切割”的现有技术始于提供由杂交含有多态性序列的(标记的)RNA或DNA和从样品获得的潜在的多态性RNA或DNA而形成的异双链体。用切割双链体的单链区域的活性剂处理双链双链体,所述单链区域将由于在对照和样品链之间的碱基对错配存在。例如,可以用RNA酶处理RNA/DNA双链体,用S1核酸酶处理DNA/DNA杂交物,酶促消化错配区域。在其他实施方案中,可以用羟胺或四氧化钨和用哌啶处理DNA/

DNA或RNA/DNA双链体,从而消化错配区域。在消化错配区域后,在变性聚丙烯酰胺凝胶上通过大小分开所获得的材料。参见,例如,Cotton等人(1988)Proc.Natl Acad Sci USA85:4397;Saleeba等人(1992)Methods Enzymol.217:286-295。在优选的实施方案中,可以标记对照DNA或RNA用于检测。

[0378] 在另一实施方案中,可以使用电泳迁移率的改变确定CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因、或与这类提示性等位基因形成单体型的SNP的存在或不存在。例如,可以使用单链构象多态性分析(SSCP)检测在CHRNA5或CHRNA3基因的多种提示性标志物等位基因、或与这类提示性等位基因形成单体型的SNP之间的电泳迁移率差异(如在例如Orita等人(1989)Proc Natl.Acad.Sci.USA:86:276;Cotton(1993)Mutat Res285:125-144;和Hayashi(1992)Genet Anal Tech App19:73-79中所描述的)。可以将样品的单链DNA片段和对照核酸变性,并允许复性。单链核酸的二级结构根据序列而变,导致的电泳迁移率改变使得能够检测即使是单个碱基的改变。可以用标记的探针标记或检测DNA片段。可以通过使用RNA(而非DNA)增强测定法的灵敏度,其中二级结构对序列的改变更敏感。在优选的实施方案中,对象方法利用了异双链体分析以在电泳迁移率改变的基础上,分离双链异双链体分子(Keen等人(1991)Trends Genet.7:5)。

[0379] 在仍然另一个实施方案中,使用变性梯度凝胶电泳(DGGE)测定核酸分子在含有变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶中的运动(如在例如,Myers等人(1985)Nature313:495中所描述的)。当使用DGGE作为分析方法时,可以修饰DNA,确保其不完全变性,例如通过PCR添加高熔点的富含GC的DNA的约40bp的GC夹。在另一实施方案中,使用温度梯度替代变性梯度,以鉴别对照和样品DNA的迁移率差异(Rosenbaum和Reissner(1987)Biophys Chem265:12753)。

[0380] 用于确定CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因、或与这类提示性等位基因形成单体型的SNP的存在或不存在的其他技术的例子包括但不限于选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增或选择性引物延伸。例如,可以制备多态性区域放在中间的寡核苷酸引物,然后在允许仅存在完全匹配时杂交的条件下与靶DNA杂交(Saiki等人(1986)Nature324:163;Saiki等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:6230)。当寡核苷酸与杂交膜连接并与标记的靶DNA杂交时,杂交这类等位基因特异性寡核苷酸和PCR扩增的靶DNA或多种不同的多态性。

[0381] 用于确定CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因、或与这类提示性等位基因形成单体型的SNP的存在或不存在的另一种方法是引物延伸法,所述方法由杂交经标记的寡核苷酸引物与模板RNA或DNA,然后使用DNA聚合酶和脱氧核苷三磷酸以延伸引物至模板的5'末端组成。然后,通过基于大小分级,例如通过变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳,解析经标记的引物延伸产物。该方法通常用于比较同源的DNA区段,和检测由于核苷酸插入或缺失造成的差异。不检测由于核苷酸取代造成的差异,因为大小是用于表征引物延伸产物的唯一标准。其他普遍已知的SNP基因分型方法是:

[0382] 动态等位基因特异性杂交(DASH)基因分型(Howell W.,Jobs M.,Gyllensten U.,Brookes A.(1999)Dynamic allele-specific hybridization.A new method for scoring single nucleotide polymorphisms.Nat Biotechnol.17(1):87-8)。

[0383] 通过分子信标的SNP检测(Abravaya K.,Huff J.,Marshall R.,Merchant B.,

Mullen C., Schneider G. 和 Robinson J. (2003) Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin Chem Lab Med.* 41:468-474)。

[0384] 高密度寡核苷酸SNP微阵列 (Rapley R., Harbron S. (编著) (2004) *Molecular Analysis and Genome Discovery*. Chichester. John Wiley & Sons Ltd.)。

[0385] 瓣状内切核酸酶 (The Invader assay for SNP genotyping. *Mutat Res.* 573 (1-2):103-110)。

[0386] 在SNP位于启动子区或对携带所述SNP的基因的表达率有影响的另一非编码区的事件中, mRNA或蛋白质水平可能被影响。在这样的状况下, 基于所述各个基因的mRNA或蛋白质序列就不能确定存在SNP。然而, 可以通过mRNA或蛋白质水平测量, 间接确定存在这类提示性SNP。因此, 在本发明的另一个实施方案中, 本文公开的方法可包括确定某基因或基因产物的mRNA或蛋白质水平的额外的或可选的步骤, 作为CHRNA5或CHRNA3基因中存在提示性SNP的间接确定方法。Falvella及其同事已经鉴别了CHRNA5基因的启动子多态性和转录物水平 (*J. Natl. Cancer Inst* 2010; 102:1366-1370, 第102卷, 第17期, 2010年9月8日)。在所述出版物中, 能够显示出在携带单体型delTTC (由SNP rs3841324-De1 (SEQ ID NO.6)、rs503464-T (SEQ ID NO.10)、rs55853698-T (SEQ ID NO.1) 和rs55781567-C (SEQ ID NO.7) 形成) 的患者中, 表示为mRNA水平的CHRNA5基因的表达率是1.82, 相比携带InsTGG和InsATC单体型的患者则分别为0.88和1.06。因此, 可以使用mRNA水平分析作为间接的测定, 来确定所述患者中存在delTTC单体型。

[0387] 还可以使用在CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因或SNP周围的一个或多个多态性位点的单体型分析, 确定存在或不存在额外的提示性SNP, 并可包括例如使用家族谱、分子技术和/或统计学干扰。

[0388] 此外, 用于这类SNP基因分型的任何普遍已知的方法 (例如, DNA测序、杂交技术、基于PCR的测定法、基于荧光染料和淬灭剂的PCR测定法 (Taqman PCR检测系统)、基于RFLP的技术、单链构象多态性 (SSCP)、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、温度梯度凝胶电泳 (TGGE)、化学错配切割 (CMC)、基于异双链体分析的系统、基于质谱的技术、侵入式切割测定法、多态性比例测序 (PRS)、微阵列、滚环延伸测定法、基于HPLC的技术、基于DHPLC的技术、寡核苷酸延伸测定法 (OLA)、基于延伸的测定法 (ARMS (扩增受阻突变系统)、ALEX (扩增受阻突变线性延伸)、SBCE (单碱基链延伸))、分子信标测定法、invader (第三代技术)、连接酶链式反应测定法、基于5'-核酸酶测定法的技术、杂交毛细管阵列电泳 (CAE)、焦磷酸测序、蛋白质截短测定法 (PTT)、免疫测定法、单体型分析和固相杂交 (点印迹、逆向点印迹、芯片)) 是本领域极普遍已知的, 描述在例如 Siitari, *Nucleic acid diagnostics market, Technology Review* 125/2002, ISDN 1239-758; Caplin (1999) *Biochemical* 1:5-8; Neville, (2002) *BioTechniques* 32:34-43; Underhill (1997) *Genome Res* 7:996-1005; Oefner (2000) *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 739:345-55 和专利公开号 U.S. 20010049586, 并可用于本发明的方法中。

[0389] 可以使用通过活组织检查获得的或来自患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的对象的任何合适的组织样品, 以确定存在或不存在CHRNA5或CHRNA3基因的提示性标志物等位基因或与这类提示性等位基因形成单体型SNP。用于从对象获得活组织检查的技术或方法是本领域普遍已知的。可以使用本领域普遍已知的技术和下文实施例章节描

述的技术,实现组织样品的亚组分(例如,细胞或RNA或DNA)分离。

[0390] 存在,特别是纯合存在CHRNA5SNP rs55853698-T/T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G/G(SEQ ID NO.37)或与所述SNP形成单体型的SNP是个体将可能应答本文所述的 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。纯合存在SNP rs6495308-T/T(SEQ ID NO.4)是个体将可能不应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。纯合存在SNP rs6495308-C/C(SEQ ID NO.3)或杂合存在SNP rs6495308-C/T基因型是个体可能应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。纯合存在SNPrs1051730-C/C(SEQ ID NO.35)是个体可能应答 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的提示。

[0391] 因此,本公开内容涉及增加个体的认知技能和/或治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的个体的治疗方法,包括步骤:III)如上所述,获得个体在CHRNA5基因的基因座上的基因型;IV)鉴别步骤III)中携带CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37)的那些个体,特别是所述SNP变体、或与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP纯合的和/或携带CHRNA3SNP rs6495308-C/C或T/C(SEQ ID NO.3/4)或SNP rs1051730-C/C(SEQ ID NO.35)基因型或与所述SNP形成单体型的SNP的那些个体;和V)向步骤IV)中鉴别的那些对象施用治疗有效量的 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂。

[0392] 在额外的实施方案中,上述步骤I)和III)还包括步骤:VI)获得所述个体的生物样品,其中所述样品选自血液、血液衍生产品(如血沉棕黄层、血清和血浆)、淋巴液、尿液、泪液、唾液、脑脊液、腮拭子、痰、发根、白细胞样品或组织样品或其任意组合,和VII)将步骤VI)的生物样品与能够检测(i)CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1),或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C/C或T/C(SEQ ID NO.3/4),或(iv)SNP rs1051730(SEQ ID NO.35/36)、或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的试剂或活性剂接触(如上文详细描述)。

[0393] 接触生物样品的试剂、活性剂或设备可以是例如适合扩增和/或测序和/或标记样品中存在的CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)或SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37)或与所述SNP形成单体型的SNP、和/或携带CHRNA3SNP rs6495308-C/C或T/C(SEQ ID NO.3/4)或SNP rs1051730(SEQ ID NO.35)或与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的(一种或多种)PCR/测序引物、核苷酸和酶,能够检测样品中的上述SNP或与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP之一的抗体、限制性酶和/或微阵列。

[0394] 术语“治疗有效量”在本文使用的施用治疗有效量的上下文中通常指活性成分(例如, α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂和/或本文所述的第二认知增强剂)的量,当向对象施用所述量足以提供治疗益处,例如足以治疗认知损伤或功能障碍、精神病的和/或神经退行性疾病,特别地增加个体的认知技能。在本发明的另一个方面,认知损伤或功能障碍、精神病的和/或神经退行性疾病是精神病,或记忆功能、问题解决、方向性和/或抽象的一种或多种中的获得性缺陷,特别是深刻地影响着语言记忆、执行功能、注意力和警惕性、言语流畅性和运动速度。在额外的实施方案中,认知损伤或功能障碍、精神病的和/或神经退行性疾病是轻度认知损伤、阿兹海默病、帕金森病痴呆、路易体痴呆、精神分裂症、血管性痴呆、AIDS痴呆、老年痴呆、与年龄相关的轻度认知损伤(MCI)、年龄相关的记忆损伤、自闭症、额

叶退化痴呆、中风、基底神经节退行性疾病、多发性硬化、创伤、脑肿瘤、脑部感染、脑积水、抑郁症、中毒或代谢疾病、和药物诱导的痴呆。

[0395] 施用 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂指施用 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂或正变构调节剂,特别是指选自组P1的低分子量化合物。可选的,增加个体的认知技能和/或治疗患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的个体的治疗方法包括施用如式(I)公开的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂或选自组P1的化合物的步骤。

[0396] “可药用的盐”是本领域普遍已知的(例如,S.M.Berge,等人,“Pharmaceutical Salts”,J.Pharm.Sd.,1977,66:1-19;和“Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection, and Use”,Stahl,RH.,Wermuth,C.G.编著;Wiley-VCH and VHCA: Zurich,2002)。可药用的盐意在表示不是有毒的、生物学不耐受的或生物学不理想的游离形式的盐。优选的可药用的盐是药理学有效的,且适合于患者组织接触而没有不必需的毒性、刺激或变应性应答的盐。

[0397] 在仍然另一个实施方案中,在公开的治疗方法中,可以施用用于治疗认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病的第二种认知增强剂或治疗化合物,如常规的抗精神病药物或非典型的抗精神病药物。优选地,使用药物组合物的组合或组合的药物制品。这类药物组合物可以一起、依次或在一个组合的单位剂量中分别施用。

[0398] 在公开的方法的另一个方面,待施用的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂剂量是从约1mg至约100mg每天。可选的,待施用的剂量是从约2mg至约100mg、或约3mg至约90mg、或约4mg至约80mg、或约5mg至约70mg、或约6mg至约60mg、或约7mg至约50mg、或约8mg至约40mg、或约9mg至约35mg、或约10mg至约30mg每天、或约5mg至约10mg、或约10mg至约15mg、或约15mg至约20mg、或约20mg至约25mg每天。在所述方面的一个实施方案中, $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂是 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂。

[0399] 本文的另一个实施方案涉及如上述的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂用于治疗这样的患者的用途,所述患者患有认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病或 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活在其中发挥作用或涉及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活的病况,其中已经根据上述方法选择易受用 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂治疗的患者。

[0400] 此外,本公开内容涉及至少一种探针用于检测(i)CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1),或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C/C或T/C(SEQ ID NO.3/4),或(iv)SNP rs1051730-C(SEQ ID NO.35)、或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的用途,用于确定个体是否应答(a)对认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病或 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活在其中发挥作用或涉及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活的病况的治疗,或(b)通过 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂增加认知技能。本领域技术人员了解如何设计可用的探针的方法和技术。

[0401] 在另一个方面,本公开内容涉及包含至少一种探针的试剂盒,所述探针用于检测(i)CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1),或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C/C或T/C(SEQ ID NO.3/4),或(iv)SNP rs1051730-C(SEQ ID NO.35)、或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP。优选的,所述试剂盒是用于诊断个体对于使用 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂的认知损伤、精神病的和/或神经退行性疾病或 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体的激活在其中发挥作用或涉及 $\alpha 7$

烟碱型乙酰胆碱受体的激活的病况的治疗的响应的试剂盒,包含VIII)用于检测(i) CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1),和/或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37),和/或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C/C或T/C(SEQ ID NO.3/4),和/或(iv)SNP rs1051730-C(SEQ ID NO.35),和/或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的工具,和IX)如何使用所述试剂盒的说明。

[0402] 本公开内容的额外的主题涉及试剂盒,优选上述公开的试剂盒的用途,所述试剂盒适用于任何上述方法或用途,其中所述试剂盒包含至少一种用于检测(i)CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)、或(ii)SNP rs16969968-G(SEQ ID NO.37)、或(iii)CHRNA3SNP rs6495308-C/C或T/C(SEQ ID NO.3/4)、或(iv)SNP rs1051730-C(SEQ ID NO.35)、或(v)与所述SNP形成单体型的SNP或与所述SNP处于同一连锁不平衡中的SNP的探针。在相关的实施方案中,如上述使用的试剂盒包含寡核苷酸探针。

[0403] 在上述方法或用途的另一个实施方案中,CHRNA5/CHRNA3SNP单体型由至少两种SNP组成,所述SNP选自rs3841324(SEQ ID NO.5或6)、rs503464(SEQ ID NO.9或10)、rs55853698-T(SEQ ID NO.1)、rs55781567-C(SEQ ID NO.7)、rs56182392(SEQ ID NO.11或12)、rs77293642(SEQ ID NO.13或14)、rs67624739(SEQ ID NO.15或16)、rs142774214(SEQ ID NO.17或18)、rs60182379(SEQ ID NO.19或20)、rs77541452(SEQ ID NO.21或22)、rs72648882(SEQ ID NO.23或24)、rs144334096(SEQ ID NO.25或26)、rs114037126(SEQ ID NO.27或28)、rs140280786(SEQ ID NO.29或30)、rs147565924(SEQ ID NO.31或32)、rs16969968-G(SEQ ID NO.37)、rs6495308(SEQ ID NO.3或4)、rs1051730(SEQ ID NO.35或36)和rs115662711(SEQ ID NO.33或34)。在上述方法或用途的另一个实施方案中,CHRNA5SNP单体型由提示性SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)和至少一种额外的SNP组成,所述额外的SNP选自rs3841324(SEQ ID NO.5或6)、rs503464(SEQ ID NO.9或10)、rs55781567-C(SEQ ID NO.7)、rs56182392(SEQ ID NO.11或12)、rs77293642(SEQ ID NO.13或14)、rs67624739(SEQ ID NO.15或16)、rs142774214(SEQ ID NO.17或18)、rs60182379(SEQ ID NO.19或20)、rs77541452(SEQ ID NO.21或22)、rs72648882(SEQ ID NO.23或24)、rs144334096(SEQ ID NO.25或26)、rs114037126(SEQ ID NO.27或28)、rs140280786(SEQ ID NO.29或30)、rs147565924(SEQ ID NO.31或32)、rs16969968-G(SEQ ID NO.37)、rs6495308(SEQ ID NO.3或4)、rs1051730(SEQ ID NO.35或36)和rs115662711(SEQ ID NO.33或34)。在相关的实施方案中,SNP单体型选自由SNP rs3841324(SEQ ID NO.5和6)、rs503464(SEQ ID NO.9或10)、rs55853698-T(SEQ ID NO.1)和rs55781567-C(SEQ ID NO.7)形成的单体型deITTC和insATC。

[0404] 可以改变本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,从而获得活性剂的这样的量,所述量足以实现对特定患者、组合物和施用模式所需的治疗应答,而对患者是无毒的。所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括应用的本发明的特定组合物、或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径、施用时间、所应用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与应用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、受治疗的患者的年龄、性别、体重、情况、总体健康和在先医疗史,以及医学领域普遍已知的因素。

[0405] 施用包含在本发明组合物中的“治疗有效量”的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂可以导致疾病症状严重程度降低、无疾病症状期的频率和持续时间增加、或预防由于疾病

染病造成的损害或残疾,即,改善认知技能。

[0406] 可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种,通过一种或多种施用途径施用本发明的组合物。如本领域技术人员将理解的,施用途径和/或模式将取决于所需的结果。施用途径可包括静脉内、肌肉内、皮肤内、腹膜内、皮下、脊柱或其他不经肠道的施用途径,例如注射或灌注。词组“不经肠道的施用”在本文中意指非肠道和局部施用的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮肤内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和intrastemal注射和灌注。可选的,可以通过非肠胃外的途径施用组合物,如局部的、表皮的或粘膜的施用途径,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。

[0407] 可以与载体制备活性化合物,所述载体将保护化合物免于快速释放,如受控释放配方,包括植入物、经皮贴剂和微囊递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容性聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯类和聚乳酸。多种用于制备这类自己的方法是已专利的或本领域技术人员通常已知的。参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson编著,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0408] 优选的治疗组合物是用于口服或经皮施用的组合物。

[0409] 用于肠道或不经肠道施用的组合物是例如单位剂型,如糖包衣片剂、片剂、胶囊、栓剂或安瓿。

[0410] 单次剂量中的活性成分的单位含量本身不需要构成治疗有效量,因为可以通过施用多个剂量单位达到该剂量。根据本发明的组合物可含有例如从约10%至约100%,优选从约20%至约60%的活性成分。

[0411] 如未另外指出,则根据本身已知的方式制备根据本发明的药物组合物,例如通过常规的混合、造粒、糖包衣、溶解或冻干工艺。在制备用于口服剂型的组合物中,可以应用任何普通的制药介质,例如水、甘油、油、醇、载体如淀粉、糖或微晶纤维素、稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。由于其易于施用,片剂和胶囊代表了最有利的口服剂量单位形式,其中明显地应用固态的药学载体。

[0412] 序列

[0413]

| SEQ ID NO. | SNP名称 | 序列 |
|------------|---------------------------|---|
| 1 | CHRNA5 SNP rs55853698-T | CGGGAGCTGTGGCGCGGAGCGGCCCTCTGCTGCGTCTGCCCTCGT TTTGTC |
| 2 | CHRNA5 SNP rs55853698-G | CGGGAGCTGTGGCGCGGAGCGGCCCGCTGCTGCGTCTGCCCTCG TTTTGTC |
| 3 | CHRNA3 SNP rs6495308-C | GTAAGTGTCTGATGGCAGGTTTCTGCTGCTGGGAGAGTAGAGAAGAGGT TTGGG |
| 4 | CHRNA3 SNP rs6495308-T | GTAAGTGTCTGATGGCAGGTTTCTGCTGTTGGGAGAGTAGAGAAGAGGT TTGGG |
| 5 | CHRNA5 SNP rs3841324-Ins | GAAGCTCCCGGCGCCTAGCCCCGCCCTATTTCCCTCTGGCCCCGC CCAATCCTCGCCTTGTTCCTTTTGCC |
| 6 | CHRNA5 SNP rs3841324-Del | GAAGCTCCCGGCGCCTAGCCCCGCCCAATCCTCGCCTTGTTCCTTT GGCC |
| 7 | CHRNA5 SNP rs55781567-C | TTGTCTCAGACTCACACTCAGTGCTCCATCCCCAAGAGTTCGCGTT CCCC |
| 8 | CHRNA5 SNP rs55781567-G | TTGTCTCAGACTCACACTCAGTGCTGCATTCCCCAAGAGTTCGCGTT CCCC |
| 9 | CHRNA5 SNP rs503464-A | ACAGCTCCCGCCGGGACAGCAGCCTCAGCCTAGCAGCTTCTGGCGG GCTCGG |
| 10 | CHRNA5 SNP rs503464-T | ACAGCTCCCGCCGGGACAGCAGCCTCAGCCTAGCAGCTTCTGGCGG GCTCGG |
| 11 | CHRNA5 SNP rs56182392-G | GGAGCTTCCACATGCGTCCCAGCCCCGCCAGAAGCTGCTAGGCTGA GGCTGC |
| 12 | CHRNA5 SNP rs56182392-A | GGAGCTTCCACATGCGTCCCAGCCCCGCCAGAAGCTGCTAGGCTGA GGCTGC |
| 13 | CHRNA5 SNP rs77293642-C | CTGCTAGGCTGAGGCTGCTGTCCCAGCGGGAGCTGTGGCGCGGAG CGGCCCC |
| 14 | CHRNA5 SNP rs77293642-T | CTGCTAGGCTGAGGCTGCTGTCCCAGTGGGAGCTGTGGCGCGGAGC GGCCCC |
| 15 | CHRNA5 SNP rs67624739-Ins | GGAACAAGGCGAGGATTGGGCGGGGCCAGAGGGAAATAGGGGCGG |

[0414]

| | | |
|----|----------------------------|--|
| | | GGCTAGGCGCCGGGAGCTTCCACATGCG |
| 16 | CHRNA5 SNP rs67624739-Del | GGAACAAGGCGAGGATTGGGCGGGGCTAGGCGCCGGGAGCTTCCACATGCG |
| 17 | CHRNA5 SNP rs142774214-Ins | GGGCCAAAAGGAACAAGGCGAGGATTGGGCGGGGCCAGAGGGAAATAGGGCGGGGCTAGGCGCCGGGAGCTT |
| 18 | CHRNA5 SNP rs142774214-Del | GGGCCAAAAGGAACAAGGCGAGGATTGGGCGGGGCTAGGCGCCGGGAGCTT |
| 19 | CHRNA5 SNP rs60182379-G | GGGGATCGGAGGCGGGGCTATGAATAGACCGGACTGGGCCAAAAGGAACAAG |
| 20 | CHRNA5 SNP rs60182379-T | GGGGATCGGAGGCGGGGCTATGAATATACCGGACTGGGCCAAAAGGAACAAG |
| 21 | CHRNA5 SNP rs77541452-A | GACAGGGTTGGACCAGAGGCGGGGCGAGGTGGGGAAAGGGTTGGTGGGGATC |
| 22 | CHRNA5 SNP rs77541452-G | GACAGGGTTGGACCAGAGGCGGGGCGGGTGGGGAAAGGGTTGGTGGGGATC |
| 23 | CHRNA5 SNP rs72648882-G | TGTTATCTTAAGGTGTGCAGTACTAGGCCAAGGACATCCGGTGGTTAGAGA |
| 24 | CHRNA5 SNP rs72648882-T | TGTTATCTTAAGGTGTGCAGTACTATGCCAAGGACATCCGGTGGTTAGAGA |
| 25 | CHRNA5 SNP rs144334096-A | AGAGCAGACATCAATGAATAGCTGTTATCTTAAGGTGTGCAGTACTAGGCC |
| 26 | CHRNA5 SNP rs144334096-T | AGAGCAGACATCAATGAATAGCTGTTTTCTTAAGGTGTGCAGTACTAGGCC |
| 27 | CHRNA5 SNP rs114037126-C | AGCACAGAGCAGACATCAATGAATAGCTGTTATCTTAAGGTGTGCAGTACTGACT |
| 28 | CHRNA5 SNP rs114037126-T | AGCACAGAGCAGACATCAATGAATAGTTGTTATCTTAAGGTGTGCAGTACTGACT |
| 29 | CHRNA5 SNP rs140280786-A | CGGCTCCCTCTGCCACTGAAGTTTAAAGATAATTCGCCTGAATCCCTTCAGC |
| 30 | CHRNA5 SNP rs140280786-G | CGGCTCCCTCTGCCACTGAAGTTTAAAGATAATTCGCCTGAATCCCTTCAGC |
| 31 | CHRNA5 SNP rs147565924-A | TTCTTTGCAACCAGGTTTAGTTTTTCCAGATTTACTAGTCTGGAGGGTGGAT |
| 32 | CHRNA5 SNP rs147565924-C | TTCTTTGCAACCAGGTTTAGTTTTTCCAGATTTACTAGTCTGGAGGGTGGAT |
| 33 | CHRNA5 SNP rs115662711-C | TGGCTCCATTGGATGTAATTTACATTCTCCAGCTGTATTTGGACCTAAGAA |
| 34 | CHRNA5 SNP rs115662711-T | TGGCTCCATTGGATGTAATTTACATTTTCCAGCTGTATTTGGACCTAAGAA |
| 35 | CHRNA3 SNP rs1051730-C | TGGGCCATCATCAAAGCCCCAGGCTACAAACACGACATCAAGTACAACTGCT |
| 36 | CHRNA3 SNP rs1051730-T | TGGGCCATCATCAAAGCCCCAGGCTATAAACACGACATCAAGTACAACTGCT |
| 37 | CHRNA5 SNP rs16969968-G | CTAGAAACACATTGGAAGCTGCGCTCGATTCTATTGCTACATTACAAAGACA |
| 38 | CHRNA5 SNP rs16969968-A | CTAGAAACACATTGGAAGCTGCGCTCAATTCTATTGCTACATTACAAAGACA |

实施例

[0415] 一般方法

[0416] 为了测量 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法对精神分裂症患者的认知技能的效果,应用短持续时间的合适的认知测试组合(CogState™)(如下文详述),允许在治疗期间进行多个时间点进行测量(Pietrzak等人2009;Maruff等人2009)。

[0417] 连续配对的联想学习(CPAL)测试

[0418] CPAL任务是评估视觉性事件记忆(联想学习)的经验证的测试。该测试之前已用于精神分裂症中。在开始该任务前,测试监督员向患者宣读测试监督员文本中的完整说明书。在CPAL测试中,参与人员必须学习在一组难以用言语表达的图式和位置之间的一系列联想。在任务的演示阶段,图式在位置出现,对象需要通过触摸其出现的位置,来承认其已经

见过该图式。在任务的这一阶段,患者还将看见不出现目标的两个位置(干扰位置)。图式以随机顺序呈现。然而一旦呈现,则在整个任务过程中,图式都位于同一位置上。在任务的学习阶段,患者必须将八个图式的每个放在其正确的位置上。必须进行六轮学习。在第一轮中,图式中的一个呈现在中央位置,并且对象需要记住其曾经出现的位置。通过触摸指出该位置。如果触摸了错误的位置,则出现视觉和听觉的信号(在位置上方出现红叉,并响起蜂鸣音)。然后要求患者选择第二个位置。该过程持续直至患者将所有四个目标都正确的放在其正确位置上。一旦正确的摆放了所有八个图式,则开始第二轮。在第二轮中,图式仍然在相同位置上,但其呈现在屏幕中央的顺序与第一轮不同(随机化的)。将每个目标放在正确位置上的过程与第一轮相同的进行。当完成第二轮时,重复同一过程,随着轮次的进展,将图式放在其正确位置中产生的错误数减少。健康志愿者的执行时间是约5分钟。精神分裂症患者预期在约12分钟内完成任务。

[0419] NAB-迷宫测试

[0420] 神经心理学评估组合(**NAB®**)迷宫测试测量了规划和预见-在具有额叶功能障碍的患者中通常是受损的执行功能的方面。通过迷宫追踪任务,测量快速评估了规划和组织技能,传统上认为所述技能是对额叶损伤敏感的。NAB迷宫测试由七个难度递增的迷宫组成,允许测试监督员基于完成度和完成时间对迷宫打分(NAB Neuropsychological Assessment Battery Mazes Test Kit;2009,Robert A Stern Travis White)。

[0421] Matrices共识认知组合(Consensus Cognitive Battery)(MCCB,Matrices Assessment Inc.)

[0422] 改善精神分裂症中认知的测量和治疗研究(MATRICES)首创地确定了应该研究的认知功能的特定区域或领域,以确定在精神分裂症中存在疗效。基于其在慢性精神分裂症患者中确实受损,鉴别出认知功能的七个领域。这些领域包括处理速度、注意力/警惕性、工作记忆、语言学习、视觉学习、推理和解决问题、以及社会认知。

[0423] CPT-IP(连续性能测试-相同配对)

[0424] 任务前的屏幕说明提问:“卡片是红色的吗?”测试监督员将向患者宣读测试监督员文本中的完整说明书。为了启动任务,测试监督员或对象必须按下“进入(Enter)”键。屏幕中心出现一张播放卡片。卡片将迅速翻转朝上。当卡片翻转时,对象必须确定卡片是否是红色。如果是红色,则应该按下“是”,如果不是,则应该按下“否”。对象将练习直到达到所要求的应答数,或者直到超过实践期。然后,屏幕上出现真实测试的说明。测试监督员或对象必须按下“进入”键开始真实测试。应该鼓励对象尽可能快且尽可能准确地操作。例如,对象应该尝试不在卡片翻转前按下“是”或“否”。如果发生错误,则将听到错误提示音。

[0425] 用于药代动力学分析的统计学方法

[0426] 如下从CPAL的给药后效应曲线下面积(AUEC)4-10的统计学分析获得活性评估:通过根据关于作为固定效应的比例、治疗组、时期、序列和作为随机效应的患者的时期特异性基线值调整的线性混合的效应模型,分别分析变量。从时期特异性的第1天值的平均值和给药前的值获得关于比例的时期特异性基线值。从模型获得在各B-5给药组和安慰剂之间的平均治疗差异(及其95%CI)。通过用平均治疗差异(及其95%CI)除以残留误差的估计方差的2倍的平方根,获得效应大小。从CPAL的效应大小,评估上文定义的活性。

[0427] 实施例1:鉴别应答B-5治疗的患者亚组是否存在的研究设置

[0428] 在鉴别应答B-5治疗的患者亚组的尝试中,进行研究以探讨在CHRNA5基因中的遗传变体rs55853698(SEQ ID NO.1和2)和研究中的B-5疗效之间的关系。在研究中,使用实施例E所述的硬明胶胶囊形式的B-5单延胡索酸盐。

[0429] 临床样品:根据Gentra Systems, Inc. (Minneapolis, MN)的说明书,从全血中提取29个个体的基因组DNA。

[0430] 基因分型测定:对总计29个DNA样品的CHRNA5基因中的rs55853698(SEQ ID NO.1和2)进行基因分型。在ABI7900测序仪上,使用TaqMan Assays-by-Design和Assays-on-Demand (Applied Biosystems, Foster City, CA)实施基因分型。根据生产商的说明,基因分型使用1ng基因组DNA。

[0431] 统计学分析:使用混合效应模型,所述模型包括序列、时期和治疗作为固定效应、基线值作为协变量和对象作为随机效应。通过用B-5-安慰剂治疗的估计平均值的差除以残留误差的估计方差的2倍的平方根,确定效应大小。通过针对年龄、性别、教育年数和吸烟史调整的ANCOVA(协方差分析),分析基线疾病严重程度。

[0432] 结果:相比安慰剂组(2mg:p=0.015,15mg:p=0.003和100mg:p=0.024),CHRNA5SNP rs55853698-T/T(SEQ ID NO.1)的“T”变体纯合的患者在“视觉学习和记忆”(CPAL)中表现出对B-5显著的应答。3个治疗组的效应大小分别是0.63、0.80和0.58。相反,CHRNA5SNPrs55853698的“T”变体不纯合(G/T)或“G”变体纯合(G/G)的患者的认知功能未表现出任何显著改善(表1)。结果显示CHRNA5SNPrs55853698-T(SEQ ID NO.1)的“TT”基因型是精神分裂症患者对B-5的临床应答的预测标志物。

[0433] 表1:CHRNA5基因型的CogState™测试组的主要临床终点CPAL评估

[0434]

| 剂量(mg) B-5 | rs55853689 基因型 TT (n=18) | | rs55853689 基因型 GG+GT (n=8) | |
|---------------|-----------------------------|-------|-------------------------------|-------|
| | 效应大小 | P 值 | 效应大小 | P 值 |
| 2 | 0.626 | 0.015 | - | - |
| 15 | 0.795 | 0.003 | -0.231 | 0.561 |
| 100 | 0.578 | 0.024 | -0.158 | 0.681 |

[0435] 关于由CHRNA5变体(rs55853698)确定的亚群体中的B-5疗效评估关键的次要临床终点Matrics共识认知组合(MCCB)。如表2中概括的,在“推理和解决问题”(NAB迷宫)中,CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)的“T”变体纯合的患者表现出比安慰剂组更大的改善。在2mg、15mg和100mg组中,效应大小分别是0.40、0.50和0.32。此外,在“注意力和警惕性”(CPT-IP)中,CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)的“T”变体纯合的患者也表现出更大的改善。在2mg、15mg和100mg组中,效应大小分别是0.47、0.40和0.39。相反,CHRNA5SNP rs55853698的“T”变体不纯合(G/T)或“G”变体纯合(G/G)的患者没有表现出在认知功能上的任何显著改善。结果显示CHRNA5SNP rs55853698-T(SEQ ID NO.1)的“TT”基因型是精神分裂症患者中对B-5临床应答的预测标志物。

[0436] 表2:CHRNA5基因型的次要临床终点MCCB(Matrics共识认知组合)MATRICS:美国国家心理健康研究所的改善精神分裂症中认知的测量和治疗研究的倡议。

[0437]

| 剂量(mg) B-5 | rs55853689 基因型 TT (n=18) | rs55853689 基因型 GG+GT (n=8) | | |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|--------|-------|
| NAB 迷宫 | | | | |
| | 效应大小 | P 值 | 效应大小 | P 值 |
| 2 | 0.4 | 0.102 | -0.157 | 0.706 |
| 15 | 0.5 | 0.045 | -0.109 | 0.814 |
| 100 | 0.316 | 0.199 | -0.153 | 0.708 |
| CPT-IP | | | | |
| | 效应大小 | P 值 | 效应大小 | P 值 |
| 2 | 0.465 | 0.059 | - | - |
| 15 | 0.404 | 0.105 | 0.019 | 0.971 |
| 100 | 0.389 | 0.116 | -0.387 | 0.494 |

[0438] 表3:CHRNA3(rs1051730)基因型的CogState™测试组的主要临床终点CPAL评估

[0439]

| 剂量(mg) B-5 | rs1051730 基因型 CC (n=19) | rs1051730 基因型 CT+TT (n=7) | | |
|---------------|----------------------------|------------------------------|--------|-------|
| | 效应大小 | P 值 | 效应大小 | P 值 |
| 2 | 0.443 | 0.068 | 0.565 | 0.183 |
| 15 | 0.627 | 0.012 | -0.202 | 0.622 |
| 100 | 0.464 | 0.057 | -0.209 | 0.606 |

[0440] 表4:CHRNA3(rs6495308)基因型的CogState™测试组的主要临床终点CPAL评估

[0441]

| 剂量(mg) B-5 | rs6495308 基因型 CC + CT (n=15) | | rs6495308 基因型 TT (n=11) | |
|---------------|---------------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | 效应大小 | P 值 | 效应大小 | P 值 |
| 2 | 0.553 | 0.048 | 0.001 | 0.998 |
| 15 | 0.593 | 0.034 | -0.112 | 0.749 |
| 100 | 0.342 | 0.208 | 0.154 | 0.639 |

[0442] 下列章节公开了涉及该技术的其他方面：

[0443] 实施例A:制备5-氯-2-(4-甲基苯基)吡啶:

[0444] 在氮气下,将2,5-二氯-吡啶(40g,270mmol)、4-甲基苯基硼酸(39g,289mmol)和双三苯基膦二氯化钯(II)(1.14g;1.6mmol)悬浮在水(258g)/THF(117g)中,35-55°C约30min。在约60-120min期间,在35-55°C加入在水(143g)中的磷酸三钾(143.4g,676mmol)溶液,并在55°C保持约30-45min。在约30min的时间中,加入更多的水(22.9g)中的磷酸三钾(22.9g,108mmol),升高温度至55-60°C以在另外约2h内完成反应。

[0445] 为了移除提取物钯,在60-55°C向反应混合物中加入在水(115g)中的半胱氨酸(约16g)的溶液。在55°C约1h后,通过在cellflock助滤器的垫(2-5g)上过滤,澄清两相反应混合物,并使用THF/水混合物(110g/75g)进行漂洗。在25°C分离组合的滤液的层,并用THF(1x57g)提取含盐的水层。用乙醇94%(195g)稀释组合的THF层,并通过在45°C的夹套温度下降压(300-200mbar)蒸发浓缩,以去除大部分的THF(175-250g)。向剩余的产物溶液中加入另外的乙醇(97g),并在45-55°C在约60min的时间内逐渐加水(565g),以诱导和维持结晶。30min后,在约90-120min的时间内,将温度降低至约20°C,在另外1小时后,在当时的温度下通过过滤收集固体,用1:2的乙醇/水洗涤,并在减压下干燥,以产生5-氯-2-(4-甲基苯基)吡啶(52.5g;理论的95%;纯度>95%;Pd<25ppm)。

[0446] 实施例B:制备处于游离形式和延胡索酸盐形式的(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷

[0447] 实施例B1:形成游离形式:

[0448] 在氮气下,向DMSO(792g)中的3R-喹宁环醇(quinuclidinol)(43.8g,0.34mol)中加入叔丁醇钾(210g,0.375mol)的约20%THF溶液,并在约40-45°C减压蒸发THF溶剂。将反应混合物的温度升高至90°C,并以至少4份逐渐加入固体5-氯-2-(4-甲基苯基)吡啶(61.2g,0.30mol)。将温度进一步升高至约100-105°C,在该温度下至少3小时后,完成成为(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的反应。

[0449] 在60-25°C,向反应混合物中加水(150g),并在约60min内,将温度逐渐降低至约20°C,并加入额外的水(210g)。在该温度下至少另外2小时后,通过过滤收集精制的固体,用DMSO/水(约322g;2:1混合物)、水(500g)和水/乙醇(约500g;9:1混合物)连续洗涤,并在60°C减压干燥,以产生(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷(56.3g,理论的63%)。

[0450] 实施例B2:形成延胡索酸盐形式:

[0451] 在65℃,向在乙醇(330g)/水(21g)中的(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷(39.6g;0.135mol)和延胡索酸(16.4g,0.141mol)的清澈溶液中,加入叔丁基甲基醚(142.5g),在约60min内,将反应混合物冷却至23℃。加入其他的叔丁基甲基醚(170.6g)。在至少另外2小时后,通过过滤收集固体,用乙醇/叔丁基甲基醚(153g;1.1混合物)洗涤,并在55-60℃减压干燥,以产生(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷延胡索酸(43.8g,理论的79%)。

[0452] 实施例C:制备游离形式和延胡索酸盐形式的(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷

[0453] 实施例C1:形成游离形式:

[0454] 在氮气下,向DMSO(320g)中的3R-唑宁环醇(41.4g,0.325mol)中加入在甲苯(201g)中的5-氯-2-(4-甲基苯基)吡啶(51g,0.250mol)的溶液。将温度逐渐升高至约100-105℃,同时通过在脱水器中减压回流约45min,去除任何残留的水。在约90min的时间内,连续加入叔丁醇钾(158.8g,0.283mol)的约20%THF溶液,同时逐渐蒸发THF溶剂。在约100-105℃另外2-5小时后,结束生成(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的反应。

[0455] 在60-25℃向反应混合物中加水(293g)。对层进行分离,并用水(2x42g)洗涤甲苯层。通过在脱水器中减压回流约45-60min在60℃干燥甲苯溶液。

[0456] 实施例C2:形成延胡索酸盐形式:

[0457] 在约50-55℃,向实施例C1的甲苯溶液中,逐渐加入在EtOH94%(22g)和甲苯(97g)中的延胡索酸(26.1g,0.9eq)的浆。加入另外的甲苯(97g)进行漂洗,并且在55℃约30-60min后,在约120-180min内,将温度逐渐降低至约20℃。在至少另外1小时后,通过过滤收集固体,用水饱和的甲苯(2x104g)洗涤,并在60℃减压干燥,以产生(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷延胡索酸(84.8g;理论的82%,基于实施例C1中使用的5-氯-2-(4-甲基苯基)吡啶的量)。

[0458] 实施例D:制备晶体形式的(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐

[0459] 将500mg游离碱形式的(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷悬浮在20ml异丙醇中。加入化学计量的延胡索酸。在室温下搅拌得到的溶液14小时。通过过滤收集沉淀。

[0460] 实施例D1:通过接种结晶制备晶体形式的(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐

[0461] 在约50℃,将7.3g(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐(纯度>98%;按例如实施例C2所述制备)溶解在乙醇(42.9g)/异丙醇(8.5g)/水(7.2g)中,过滤澄清,并在该温度下,在约8小时的时间内,将其逐渐加入到约50℃温度的经过滤的叔丁基甲基醚(118.4g)中。在加入约25%滤液后,加入在异丙醇(0.1ml)中的(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐的种子晶体(6mg;按例如实施例C2所述制备)的经超声处理的悬浮液,以诱导结晶。将产物悬浮液在50℃保持另外1小时,并在8小时内冷却至0℃。在该温度另外1小时后,通过过滤分离

固体,用异丙醇/叔丁基甲基醚(40ml,1:1混合物)洗涤,在约50℃减压干燥,以产生(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐(5.85g;理论的81%;纯度>99.5%)。

[0462] 实施例E:硬胶囊

[0463] 可以如下制备硬明胶胶囊,每个胶囊包含0.5、5或25mg (R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐作为活性成分:

[0464]

| 胶囊填充物的成分 | 0.5 mg 胶囊 的% (w/w) | 5 mg 胶囊 的% (w/w) | 25 mg 胶囊 的% (w/w) |
|--|-----------------------|---------------------|----------------------|
| (R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐 | 0.46 | 4.65 | 23.23 |

[0465]

| | | | |
|-----------|-------|-------|-------|
| 乳糖单水合物 | 65.24 | 61.05 | 42.47 |
| 微晶纤维素 | 25.00 | 25.00 | 25.00 |
| 羟丙基甲基纤维素 | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| 交联羧甲基纤维素钠 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| 胶体二氧化硅 | 0.30 | 0.30 | 0.30 |
| 硬脂酸镁 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| 纯水* | q.s. | q.s. | q.s. |

[0466] *在加工过程中去除

[0467] 制备过程:在高剪切力的搅拌钵中,干混合(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐、乳糖单水合物、微晶纤维素、一部分交联羧甲基纤维素钠和羟丙基甲基纤维素,并加入造粒液(纯水)。一旦完成造粒,在流化床干燥器中干燥湿粒,并碾碎干燥的颗粒。将剩余的交联羧甲基纤维素钠和胶体二氧化硅通过合适的筛子并加入到干燥的粒状材料中并掺入合适的掺合外壳(blending shell)中。这是通过将交联羧甲基纤维素钠和胶体二氧化硅与一部分碾碎的颗粒经过合适的筛子共同筛入掺合外壳中来实现的。类似地,向散装颗粒中加入所需量的经筛过的硬脂酸镁,然后在同一掺合外壳中混合。使用自动化仪器将最终的掺合物封装到胶囊中。胶囊填充物与空胶囊外壳的重量比是2:1。

[0468] 实施例F:片剂

[0469] 实施例F1:薄膜包衣片剂

[0470] 如下制备含有例如0.5mg (R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环

[2.2.2] 辛烷的单延胡索酸盐的薄膜包衣片剂:

[0471] 制备预混合物:

[0472] 称量(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐(例如,约0.7%)和玉米淀粉(例如,约13%),在滚筒式搅拌机中混合(约100-300转),通过约0.25-1.0mm目大小的筛子。在滚筒式搅拌机中混合(约100-300转)。

[0473] 制备最终的掺合物:

[0474] 向上述预混合物中,加入微晶纤维素(例如,约25%)、喷雾的乳糖(例如,约68%)、羧甲基纤维素钠XL(例如,约2%)和Aerosil(例如,约0.5%),并在滚筒式搅拌机中混合(约100-300转)。将该混合物通过约0.5-1.0 mm目大小的筛子,再次混合(约100-300转)。

[0475] 通过约0.5-1.0 mm目大小的手筛,加入硬脂酰-延胡索酸钠(例如,约1.5%),并在滚筒式搅拌机中混合(约30-150转)。

[0476] 压缩:

[0477] 在轮转压片机上,使用剂量特异性工具(例如,约6mm,圆形,弯曲的)将上述最终掺合物压制为约100mg的核心,。

[0478] 包衣:

[0479] 用预先混合黑色、红色、黄色和/或白色的基础包衣制备水悬浮液。在预先打孔的包衣锅中将上述获得的核心包衣,并干燥。

[0480] 实施例F2:双层薄膜包衣片剂

[0481] 如下制备含有例如2.5 mg (R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐的双层薄膜包衣片剂:

[0482] 最终的活性掺合物:

[0483] 称量(R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐粗制物(例如,约15.5%)、微晶纤维素(例如,约25%)、喷雾的乳糖(例如,约53%)、羧甲基纤维素钠XL(例如,约3%)和Aerosil(例如,约0.5%),并在滚筒式搅拌机中混合(约100-300转)。将该混合物通过约0.5-1.0 mm目大小的筛子,并再次混合(约100-300转)。

[0484] 通过约0.5-1.0 mm的手筛,加入硬脂酰-延胡索酸钠(例如,约3%),在滚筒式搅拌机中混合(约30-150转)。

[0485] 最终的安慰剂掺合物:

[0486] 称量微晶纤维素(例如,约26%)、喷雾的乳糖(例如,约69%)、羧甲基纤维素钠XL(例如,约1.9%)和Aerosil(例如,约0.5%),并在滚筒式搅拌机中混合(约100-300转)。将该混合物通过约0.5-1.0mm目大小的筛子,再次混合(约100-300转)。

[0487] 通过约0.5-1.0mm目大小的手筛,加入硬脂酰-延胡索酸钠(例如,约3%),在滚筒式搅拌机中混合(约30-150转)。

[0488] 压制:

[0489] 在轮转压片机上,使用剂量特异性工具(例如,约6mm,圆形,弯曲的),将上述最终掺合物压制为约100mg的双层片剂核心,一层为安慰剂层(约77.5mg),一层为活性层(约22.5mg)。

[0490] 包衣:

[0491] 用预先混合黑色、红色、黄色和/或白色的基础包衣制备水悬浮液。在预先打孔的

包衣锅中将上述获得的核心包衣,并干燥。

[0492] 实施例F3:薄膜包衣片剂

[0493] 可如下制备含有例如50mg (R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐的薄膜包衣片剂:

[0494] 最终的掺合物:

[0495] 称量 (R)-3-(6-(4-甲基苯基)-吡啶-3-基氧)-1-氮杂-双环[2.2.2]辛烷的单延胡索酸盐粗制物(例如,约15.5%)、微晶纤维素(例如,约25%)、喷雾的乳糖(例如,约53%)、羧甲基纤维素钠XL(例如,约3%)和Aerosil(例如,约0.5%),在滚筒式搅拌机中混合(约100-300转)。将该混合物通过约0.5-1.0mm目大小的筛子,并再次混合(约100-300转)。

[0496] 通过约0.5-1.0mm目大小的手筛,加入硬脂酰-延胡索酸钠(例如,约3%),并在滚筒式搅拌机中混合(约30-150转)。

[0497] 压制:

[0498] 在轮转压片机上,使用剂量特异性工具(例如,约15*5.9mm,圆形,弯曲的),将上述最终掺合物压制为核心。

[0499] 包衣:

[0500] 用预先混合黑色、红色、黄色和/或白色的基础包衣制备水悬浮液。在预先打孔的包衣锅中将上述获得的核心包衣,并干燥。

[0501] 参考文献

[0502] 1.Chini B,Raimond E,Elgoyhen AB,Moralli D,Balzaretti M,Heinemann S (1994).-Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha7-nicotinic receptor subunit gene (CHRNA7).Genomics19:379-381.

[0503] 2.Freedman R,Hall M,Adler LE,Leonard S(1995).-Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia.Biological.Psychiatry38:22-33.

[0504] 3.Freedman R,Coon H,Myles-Worsley M,Orr-Urtreger A,Olinicy A,Davis A, Polymeropoulos M,Holik J,Hopkins J,Hoff M,Rosenthal J,Waldo MC,Reimherr F, Wender P,Yaw J,Young DA,Breese CR,Adams C,Patterson D,Adler LE,Kruglyak L, Leonard S,Byerley W(1997).-Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome15locus.-Proceedings of theNationalAcademy of Sciences of theUnitedStates of America.94:587-592.

[0505] 4.Goldberg TE,Goldman RS,Burdick KE,Malhotra AK,Lencz T,Patel RC, Woerner MG,Schooler NR,Kane JM,Robinson DG(2007).-Cognitive improvement after treatment with second-generation antipsychotic medications in first-episode schizophrenia:is it a practice effect?-Archives of General Psychiatry64:1115-1122.

[0506] 5.Green MF(1996).-What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia?.American Journal of Psychiatry153: 321-330.

[0507] 6.Green MF(2007).-Cognition,drug treatment,and functional outcome in

schizophrenia:a tale of two transitions.AmericanJournal of Psychiatry164:992-994.

[0508] 7.Harvey PD,Green MF,Keefe RS,Velligan DI(2004).-Cognitive functioning in schizophrenia:a consensus statement on its role in the definition and evaluation of effective treatments for the illness.Journal of ClinicalPsychiatry65:361-372.

[0509] 8.Keefe RS,Bilder RM,Davis SM,Harvey PD,Palmer BW,Gold JM,Meltzer HY,Green MF,Capuano G,Stroup TS,McEvoy JP,Swartz MS,Rosenheck RA,Perkins DO,Davis CE,Hsiao JK,Lieberman JA,CATIE I,-Neurocognitive Working Group(2007).-Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial.-Archivesof GeneralPsychiatry64:633-647.

[0510] 9.Leonard S,Gault J,Hopkins J,Logel J,Vianzon R,Short M,Drebing C,Berger R,Venn D,Sirota P,Zerbe G,Olinicy A,Ross RG,Adler LE,Freedman R(2002).-Association of promoter variants in the alpha7nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia.Archivesof GeneralPsychiatry59:1085-1096.

序列表

| | | |
|--------|---|----|
| | <110> 诺华股份有限公司 | |
| | <120> 预测对 α 7烟碱型乙酰胆碱受体激活剂疗法的响应的生物标志物 | |
| | <130> PAT054760 | |
| | <140> US 61/549319 | |
| | <141> 2012-10-20 | |
| | <160> 40 | |
| | <170> PatentIn 版本 3.5 | |
| | <210> 1 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 1 | |
| | cgggagctgt ggcgcggagc ggcccctctg ctgcgtctgc cctcgttttg tc | 52 |
| | <210> 2 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 2 | |
| | cgggagctgt ggcgcggagc ggccccctg ctgcgtctgc cctcgttttg tc | 52 |
| | <210> 3 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| [0001] | <400> 3 | |
| | gtaactgtct gatggcaggt ttgctgctgg gagagtagag aagaggtttg gg | 52 |
| | <210> 4 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 4 | |
| | gtaactgtct gatggcaggt ttgctgttgg gagagtagag aagaggtttg gg | 52 |
| | <210> 5 | |
| | <211> 73 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 5 | |
| | gaagctcccg gcgcctagcc ccgcccctat ttcctctgg ccccgcccaa tctctgctt | 60 |
| | gttccttttg gcc | 73 |
| | <210> 6 | |
| | <211> 51 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 6 | |
| | gaagctcccg gcgcctagcc ccgcccate ctctcttgt tctttttggc c | 51 |
| | <210> 7 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |

| | | |
|--------|---|----|
| | <400> 7 ttgtctcag actcacaactc agtgctceat tcccacaagag ttcgegttec cc | 52 |
| | <210> 8 <211> 52 <212> DNA <213> 智人 | |
| | <400> 8 ttgtctcag actcacaactc agtgctceat tcccacaagag ttcgegttec cc | 52 |
| | <210> 9 <211> 52 <212> DNA <213> 智人 | |
| | <400> 9 acagctccc ccgggacagc agcctcagcc tagcagcttc tggcgggctc gg | 52 |
| | <210> 10 <211> 52 <212> DNA <213> 智人 | |
| | <400> 10 acagctccc ccgggacagc agcctctgcc tagcagcttc tggcgggctc gg | 52 |
| | <210> 11 <211> 52 <212> DNA <213> 智人 | |
| [0002] | <400> 11 ggagcttcca catcgtccc gagcccacca gaagctgcta ggctgaggct gc | 52 |
| | <210> 12 <211> 52 <212> DNA <213> 智人 | |
| | <400> 12 ggagcttcca catcgtccc gagcccacca gaagctgcta ggctgaggct gc | 52 |
| | <210> 13 <211> 52 <212> DNA <213> 智人 | |
| | <400> 13 ctgctaggct gaggctgctg tcccggcggg agctgtggcg cggagcggcc cc | 52 |
| | <210> 14 <211> 52 <212> DNA <213> 智人 | |
| | <400> 14 ctgctaggct gaggctgctg tcccgggagg agctgtggcg cggagcggcc cc | 52 |
| | <210> 15 <211> 73 <212> DNA <213> 智人 | |
| | <400> 15 ggaacaaggc gaggattggg cggggccaga gggaaatagg ggccgggcta ggcgccggga | 60 |

| | | |
|--------|---|-----|
| | gcttccacat gcg | 73 |
| | <210> 16 | |
| | <211> 51 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 16 | |
| | ggaacaaggc gaggattggg cggggctagg cgccgggagc ttccacatgc g | 51 |
| | <210> 17 | |
| | <211> 122 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 17 | |
| | gcggggctat gaatagaccg gactgggcca aaaggaacaa ggcgaggatt gggcggggcc | 60 |
| | agagggaaat aggggggggg ctaggcgccg ggagcttcca catgcgtccc gagcccgcca | 120 |
| | ga | 122 |
| | <210> 18 | |
| | <211> 110 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 18 | |
| | gcggggctat gaatagaccg gactgggcca aaaggaacaa ggcgaggatt gggcggggcc | 60 |
| | agagggaaat aggggggggg agcttccaca tgcgtccga gcccgcaga | 110 |
| [0003] | <210> 19 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 19 | |
| | ggggatcggg ggcggggcta tgaatagacc ggactgggcc aaaaggaaca ag | 52 |
| | <210> 20 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 20 | |
| | ggggatcggg ggcggggcta tgaatatacc ggactgggcc aaaaggaaca ag | 52 |
| | <210> 21 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 21 | |
| | gacagggttg gaccagaggc gggcgaggt ggggaaaggg ttggtggga tc | 52 |
| | <210> 22 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 22 | |
| | gacagggttg gaccagaggc gggcgaggt ggggaaaggg ttggtggga tc | 52 |
| | <210> 23 | |
| | <211> 52 | |

| | | |
|---|--|-----|
| <212> DNA | | |
| <213> 智人 | | |
| <400> 23 | | |
| tgttatctta aggtgtgcag tgactaggec aaggacatcc ggtggttaga ga | | 52 |
| <210> 24 | | |
| <211> 52 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 智人 | | |
| <400> 24 | | |
| tgttatctta aggtgtgcag tgactatgcc aaggacatcc ggtggttaga ga | | 52 |
| <210> 25 | | |
| <211> 101 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 智人 | | |
| <400> 25 | | |
| gcttccccctt ttgggtgctga gcacagagca gacatcaatg aatagctgtt atcttaaggt | | 60 |
| gtgcagtgac taggccaagg acatccggtg gttagagaag g | | 101 |
| <210> 26 | | |
| <211> 101 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 智人 | | |
| <400> 26 | | |
| gcttccccctt ttgggtgctga gcacagagca gacatcaatg aatagctgtt ttcttaaggt | | 60 |
| gtgcagtgac taggccaagg acatccggtg gttagagaag g | | 101 |
| [0004] | | |
| <210> 27 | | |
| <211> 52 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 智人 | | |
| <400> 27 | | |
| agcacagagc agacatcaat gaatagctgt tatcttaagg tgtgcagtga ct | | 52 |
| <210> 28 | | |
| <211> 52 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 智人 | | |
| <400> 28 | | |
| agcacagagc agacatcaat gaatagttgt tatcttaagg tgtgcagtga ct | | 52 |
| <210> 29 | | |
| <211> 101 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 智人 | | |
| <400> 29 | | |
| ataaagcgtt ctgtgaagag tcagcggtc cctctgccac tgaagtttaa agataatteg | | 60 |
| ccctgaatccc tteagccaaa tgaagctttc taattaigga c | | 101 |
| <210> 30 | | |
| <211> 101 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 智人 | | |
| <400> 30 | | |
| ataaagcgtt ctgtgaagag tcagcggtc cctctgccac tgaagtttaa ggataatteg | | 60 |

| | | |
|--------|---|-----|
| | cctgaatccc ttcagecaaa tgaagctttc taattatgga c | 101 |
| | <210> 31 | |
| | <211> 101 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 31 | |
| | cttcactgaa ttttgctggt tagattcttt gcaaccaggt ttagtttttc acagatttac | 60 |
| | tagtctggag ggtggagtga aatttttgct cacaatgagt c | 101 |
| | <210> 32 | |
| | <211> 101 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 32 | |
| | cttcactgaa ttttgctggt tagattcttt gcaaccaggt ttagtttttc ccagatttac | 60 |
| | tagtctggag ggtggagtga aatttttgct cacaatgagt c | 101 |
| | <210> 33 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 33 | |
| | tggetccatt ggatgtaatt tacattcttc cagctgtatt tggacctaaag aa | 52 |
| [0005] | <210> 34 | |
| | <211> 52 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 34 | |
| | tggetccatt ggatgtaatt tacatttttc cagctgtatt tggacctaaag aa | 52 |
| | <210> 35 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 35 | |
| | ccccaggcta caaacacgac a | 21 |
| | <210> 36 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 36 | |
| | ccccaggcta taaacacgac a | 21 |
| | <210> 37 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |
| | <400> 37 | |
| | agctgcgctc gattctattc g | 21 |
| | <210> 38 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 智人 | |

| | |
|---|------|
| <400> 38 | |
| agetgcgctc aattctattc g | 21 |
| <210> 39 | |
| <211> 29750 | |
| <212> DNA | |
| <213> 智人 | |
| <400> 39 | |
| acatgcgtcc cgagccccgc agaagctgct aggetgaggc tgcctgtccc gcgggagctg | 60 |
| tggcgcggag cggccccctc gctgcgctc ccctcgtttt gtctcacgac tcacactcag | 120 |
| tgtccattc cccaagagtt cgcgttcccc gcgcggcggt cgagaggcgg ctgcccggg | 180 |
| tccegcggg gcgcggggcg atggcggcgc gggggteagg gccccgcgc ctecgctgc | 240 |
| tgtcttgggt ccagctggtc gcggggcgct gcggtctagc gggcgcggcg ggcgcgcgc | 300 |
| agagaggtaa gccccggctg cagagggcgc gggcgggagc tggcccggac tccacatcgc | 360 |
| ggtgccagg aagccgccag gcgacggcgc ccggaaaacc tggttgcgag gggaggtggg | 420 |
| ttttttctc ctggggcctt ggagtgggt ttcagtttaa atgtccagat ttgctcattt | 480 |
| aaatgcagag aaagggtcac ttgggtgggt tttctttgtt gttccacgac ctgcctcgt | 540 |
| ggagactacg aggettgctt agcgtatact tccacacaae ttttccagta aaagatgcca | 600 |
| ctctgtcca gcaggcttt cctgtctcgg tggcagccaa gcttccatt ttgttgccta | 660 |
| tttacgggat atagagactc tggggttcat tctaggggtt gggacttate tccacctcc | 720 |
| tgcccgccgc ctcttctcc atccctgtcc cctaccacc gcagcatttg aaaaccttc | 780 |
| ctttgcggg agatgaaagg tgtgtgtgt agcaggctag gcggccaact tccctggett | 840 |
| cggggcfaat cgtllgcate cagagllccl caclagctcc tttaggcaca gctlltllca | 900 |
| gcctgcigt tttcaagagg tttggacag gaatggaanc aacaaaagaa atcgcgtagt | 960 |
| cclacatgtt tcaagictt gggaaagttt lagagtcagt tctctcaala ccttgaagaa | 1020 |
| aaacacgttt gtgagcagc tafgggtgta tctaaacgta gaaaagctaa gcattccgita | 1080 |
| agcaagatat gattacagaa gttcacfac tctgtatttc aggttttatg agtgagtttc | 1140 |
| ttaaatagtg gaaatattgc aagaaccttt tcttgcttt cctttgttaa ggtttttaa | 1200 |
| ctatggctcc tgattttagg aagtaataag actagaataa ttcatcagc gatgtatfgc | 1260 |
| ttagtglaga cegaagagaa ataagatgga gggtgattta aacaaatgaa gaaaatcctg | 1320 |
| ggcagagaga gttaaacaga aagaaaggaa igtgattttg gagccaggca aacctgtatt | 1380 |
| caaattatgg ctctgggca tctgactgg acgaacttct cteagctgtt ttctttttt | 1440 |
| aagaaatggc gggccggcgc cgggtggctca cgctgtaat ccagcactt tgggaggccg | 1500 |
| aggcgggcag atcacgaggt caggagatcg agaccatcct ggctaacaca gtgaaacccc | 1560 |
| gtctctacta aaaatacaaa aaaattagcc gggcgtggtg gtgcgcctc gtagtcccag | 1620 |
| ctactcggga ggcigaggca ggagaatgac gtgaaccoga gaggcggagg ttacagtgag | 1680 |
| ccgagatcgc gccactgcac tccagcctgg gcaacacagc gagactccgt ctcaaaaaaa | 1740 |
| aaaaaaaaa aaagaaaaga aatgggggta ataateatgc ttacctctca gattctttt | 1800 |
| gaggattaaa taatgcataa aaaatgccag gcacagtgcc tgacactcga gaaaatgta | 1860 |
| gtctctacc cctttgatg aaactgaact ttaaaaatct gttctatgct ttttaataa | 1920 |
| gaacacigta gccaaagcatt aaatagtgta aatagctatc tcccttcagc catgggttc | 1980 |

[0006]

| | |
|---|------|
| agtgttataa caaagtgaag tcgattagtt cctgcttctt gccccaetta gttaatatct | 2040 |
| ctctcataat aaccatctgg ttctattgca ctctctgttc ctctctcttc cacgtaagct | 2100 |
| ccitaagaac tgtgattctt gtttatcttt gtatcgccaa cacctgcctt aatgtaggag | 2160 |
| cccagtgaag gtttgcgga ggaaggagtg gaacagtatt acctctctgg atattagttt | 2220 |
| ctccatctgg atgtgaggg gccattaaag gatccccctt ccacctgaa aattataaga | 2280 |
| ttctgtgtgc tcttagaagt gatcatcttg aagaacaaag tgatactgaa tggatgatgt | 2340 |
| aattgcacac ttgtctttaa ctgttaatat gcatttgtgt acaactgtcg tccatgtgg | 2400 |
| gtggctgaaa gtactgtctg gaaataggag acctgccact cgtctctctg gtttctctgg | 2460 |
| acgtattact tgaccttctt gattctttgt ttctctctct taaaatgaa agggcgtag | 2520 |
| tagatgtttt taagtcaact ttaagttttt taagttcaaa tafaattacc tttattttta | 2580 |
| caatttattg ttttcatatt cgtcttaggt tcttaatagt aacttttccc tgtgtgtttc | 2640 |
| tgtgagccag tcccaggtt aagagaalat ctagtctagc cgcagctatt atttggctga | 2700 |
| tgaacggta cagagctgtg gaaagtggct caggagacaa ttaaagtata atataataa | 2760 |
| gtataaigaa ctagtacatc aagataatac aagcatttta aactgacctg tgattgggac | 2820 |
| agtgattatg gaagttagat agtcaatac taactaacta gttatatctt ttaactattc | 2880 |
| ttagctatgt gacattttaa agccaatggt tatatttctt agctgtgtga cattttattt | 2940 |
| ttttaatttt ttttttaaaa tattacttta agttctggga tacatgtgca gaacctgcag | 3000 |
| gtttgttaca taggtataca tgtgccatgg tggtttctc cacctatcaa cctgtcatct | 3060 |
| [0007] aggttttaag ccccacatgc attaggattt tgcctaatg ctctctctcc ccttgcctcc | 3120 |
| aacctcccga cagaccctga tgtgtgatgt fccccctct gtgtccatgg attctcatg | 3180 |
| ttcaactccc acctatgaaa gagaacatgc ggtgtttggt gctctgtctt ggttagttt | 3240 |
| gctgagcatg atgttttcca gcttcatcca tgcctctgca aaggacatga actcattctt | 3300 |
| ttttatggct gcacgctatg tgacatttta aatggctgaa ccttaatttt aattactata | 3360 |
| tgtagtggct gaaaatgaaa taggaaaatg aaataattca tagaaaatga gagctatgaa | 3420 |
| agattttttt ctctctcatc ttagtcatct tcattaacat tttcagaagc taacagaaat | 3480 |
| acacacatac tgactgtcag ttttactttt gttatatata tgccttacc taaactttat | 3540 |
| acacaattta atttgaatt taaaattatt ttgatttcca agaaatacta aatatgtgaa | 3600 |
| ctagactgag cagctggagg gtaggatttc attgtctgt gtatttctctg atacactgca | 3660 |
| gatatacctg catttattaa tgtagcctat ggattgaact ctgagctttt tttcaacct | 3720 |
| taatctacaa atgagatcta gcaagtaatt ttttataatt aggatatgaa gttttagttc | 3780 |
| agtaatttca gtacagaact ttttcttcta atagcattat ttttctaaa gcattggaat | 3840 |
| taaattatca gatgatagtt taagttcact attaaataag catgtcgaca attagagttg | 3900 |
| ttaaatattg gaattttttt tttttttttt ttgagacgga gtcttgcact gttgccagg | 3960 |
| ttggagtgea gtgtgcaat ctggctcac tgaagctct gccctccggg ttcacgccgt | 4020 |
| tcctctgect cagctctcca agtagctggg actacaggca cccgccacca cgcctggeta | 4080 |
| attttttgta ttttttagtag agacggggtt tcaccatgtt agccaggatg gtctcgtct | 4140 |
| ctgacctca tgacctccc gcctcgccgt cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc | 4200 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| accgtgccg | gcctggaatt | gttttgaaa | gaagttttaga | atttgtttct | ttaaacaatct | 4260 |
| gttccacaga | acagcatggg | tatagtgttt | tttttgtttt | tgtttttgtt | ttttttcttg | 4320 |
| agacagagtc | tcactctgtc | gcccaggetg | gagtgcaatg | gcatgatett | gtctcactgc | 4380 |
| agcctctgcc | tctgggttca | agtgaattct | ctgcctcagc | ctcccaagta | gctgggatta | 4440 |
| caggcatgtg | ccaccatgcc | tggttaattt | ttgtattttt | agtagagatg | gggtttctcc | 4500 |
| attttggcca | ggctggcttt | gaaaactctt | gaectcaggt | gatccgectg | cctcggcctc | 4560 |
| ccaaagtgtt | gggattacag | gcgtgagcca | ccgcgcctgg | cctgggtata | gttttataat | 4620 |
| gacaatafga | tagaaaggat | tatttaaaat | catecttttc | tgttctafga | tgaaaaatgt | 4680 |
| taatttagat | gttttgttct | cttttaggag | aacatgatat | tgtttgcctt | actgttiatt | 4740 |
| tattttatfat | ttttattgag | gcagagtcct | gctctgtcac | ctaggcttga | gtgcagtggc | 4800 |
| gtgatcttgg | ctcactgaca | cctctggctc | ctgggtccaa | atgattctcg | tgccctcagcc | 4860 |
| tcccaagtag | ctgaaattac | agccatgtgc | caccaatccc | ggctattttt | tttttttttt | 4920 |
| tttttttttt | agtaaagaca | gggtttcacc | atgttggcca | ggctggcttt | gaaetccctgg | 4980 |
| cctcgaatga | tccgccgcc | ttgctctcgc | aaagtgcctg | gattacaggt | gtgagccacc | 5040 |
| acgccccggc | cctcctactg | tgtttaattc | agtgaattca | tgetcttctc | tccaaaagtg | 5100 |
| tgattataaa | atatagcctt | ttaccagtaa | aaataggagt | taaatatgaa | tatttgaatt | 5160 |
| ctgacaaaaa | aggtgatatg | aacttttagg | ttttattttt | atctggtttt | attttcattt | 5220 |
| ttatttttaca | tccaactgta | tgtatggaat | taggcaaaac | tctttcctct | aggctcaggat | 5280 |
| ttctcaacct | ctgaaatttt | gtactgggtt | attctttgtt | gtcagagggg | ggcgtcctgt | 5340 |
| gcctttagag | atgttttagca | gcatactggt | ctctagccat | gagatgccag | tageaccacc | 5400 |
| tgaaaaatgt | ctccagacat | gttcagatgt | gccttggggg | caaaattgtt | cttcacattt | 5460 |
| gctaccocct | gagaaccact | tctctaggtc | ttgttgacca | gggttcttga | aaetttagatg | 5520 |
| tacacagtaa | tccctcaga | acgcagatgc | tgatccagta | ggtcagaagc | agggcctgag | 5580 |
| actctgcatt | tetaacaagc | tcccaggtga | tgtgaatact | gttggctagt | gtatcacaat | 5640 |
| taagtagcaa | ggttgtagaa | aagtcacat | tcataccaac | tgggtgaact | ctcaaggtaa | 5700 |
| gccgatgaaa | gtaattatgg | aaatagttaa | tttacaatga | attgtagccc | aaacaatgta | 5760 |
| aggctaatag | aagctaagaa | aacaagcatt | atctctgtgt | cctaacaag | cagctgtctt | 5820 |
| cacttttcca | tattttcttc | cagtccttag | tattcattca | taactcgaca | tctctaaggg | 5880 |
| ggaaatttgc | aagatctttt | icaaggtcat | acaggcaacc | tcatgcacca | ttaggtgttt | 5940 |
| tattccataa | tattgtaaat | atactagctc | ataatacata | tttatagcct | gttgagagat | 6000 |
| ttatagccce | aaattaaagat | aatgaactct | gcatttactt | gatctgatga | tgetctgcct | 6060 |
| tttttttttt | ttttttttga | agtgtacaag | ttgtctcgtc | tcctcgagaa | ctattgactg | 6120 |
| cacctaaatt | aataccacct | aaggtcattc | attttcttac | tgcgagtgtt | ctgagagtca | 6180 |
| gggtaagata | ttaagtttac | taaggcatag | cagttacagt | gtaactttat | ccfataatc | 6240 |
| tgtgataaaa | atcaatataa | aatataatga | aaatcctgga | gcgaaaaaaa | tccctctata | 6300 |
| ttttatctgt | aaactttaaa | ataatgatgg | gfaagcattc | ttgtttgtca | cattgaaaaa | 6360 |
| gttggatata | atacacattt | tccctcgttt | acaaaaatgt | tacgttccact | gctttatctt | 6420 |
| gctgttgcct | aaaaatagccc | tcttaggact | gctgcaaaaga | ggattttttt | ttcaaaaagag | 6480 |

[0008]

| | |
|--|------|
| tacaagtcac tttttgctaa cttataaaaa gatgcaagga gacttcaggg gtagattaac | 6540 |
| tgctccagga atgccttgat tatgaattgg ggaggtataa tatacatcac tcitcaaatc | 6600 |
| tttttagata tattatccta tttccttctt atggcagcct gtgaagaaga aaaggaagat | 6660 |
| attggcagca cctagcaaga tttaaaatgt gcgccccctt gactcagcag ttttacttct | 6720 |
| gagaatcatt gctatagaaa tctttgcatc agtatggaaa aagagatttg ttaattacag | 6780 |
| cattttttcc cattgtaaca ttattagaaa taaccaaaaa ctgaagacta taaatgccaa | 6840 |
| tcagtgtgta aaacttaaat aaagtcctaat gcactcataa tgatcacttt gcagcttgtg | 6900 |
| aaggaagact ggagatagtt ggacatctac tggatatag tttatatagt tgtgtttttt | 6960 |
| attttttiatt ttattttttt tgagacggag ttttgetctt gttgccagg ctggagtcca | 7020 |
| gtggcgigat ctcgctcac tgcaacctct gcctccggg ttcaagtgat tctctgcct | 7080 |
| cagcctccca agtagctggg attacaggca tgcaccacca cgcctggcta atttgtiatt | 7140 |
| tttagtagag acggagtctc tccatgttgg tcatactggt ctgaaetcc cgacctcaag | 7200 |
| tgatccccc cctcagectc ccaaagtgct gggattacag gcgtgaacca ccacacctgg | 7260 |
| ctggtatata gtattgaatg aaaaaaagt gcagaactta gaggaaaaca tgtttctgtg | 7320 |
| tgtagtgaa catgcatgta atttaaaata tetacagtc aaacttaatg gttaccttg | 7380 |
| gaaggaagge gaaggagagg aggagggaga attcttactc tttatgagct tctggatttg | 7440 |
| aattttgaca gtgaccacac attccttttg caattatage atcattttga gaaaaacaa | 7500 |
| aataaatctg ggtcctagtt ctactctgct tcttattag ctactagtgt cacaacagtg | 7560 |
| [0009] gtttcaaga agggctcagt ttgctcccc tcaccaacat ttggcaatgt ctggagacat | 7620 |
| gattggttgt catgtggggc ggtggtatgt ctagtggta gaagccagg atgccgctaa | 7680 |
| acatacaggc cacaggacag ccccccacaa cagggaattg tccagcccaa aatgtccgta | 7740 |
| gtccaagtt gagaatcct gtgttagact ccagagctgc agtctgttg gaatatgcag | 7800 |
| gtgatgcact gtgcagtggc aggggcgcca tctcactgt ggggtgtact ttgcatagcc | 7860 |
| atagaattat aagtaigata taataaggta aataaatatg caagttttta cccaggaag | 7920 |
| acaggcacca ggtctctgtt tctctctctc cctctggcac ctggcacaga ggttggcaca | 7980 |
| gtaagcagct agttggcatt tgitgaatta acgaattgaa caagatatca cgttaggctc | 8040 |
| tagtgtggcc aagtgttagc agatgctaaa gatttaagaa taatttggg cagaaacttt | 8100 |
| aaattatagt taatgtctgt ttttatctgc aggttggcaa aagactgcta atatcccat | 8160 |
| ttagttgctg aacatgttgg ttgacttttt tccaatcat taccttttga taagaaaatc | 8220 |
| atgattcttc atggaaaaat gccagagcaa agcactatca aatgttecta gaattttttt | 8280 |
| ttttttttg agacggagt ttactctgct acccagtctg gactgcagtg gcacaatctc | 8340 |
| ggctcactgc aacctecacc tcccaggctc aagtgattct tcttctctg cctcagcctc | 8400 |
| ctgagtactg gggactacag gcgtgcacca ccacgctgg ctaatttttt ttttttttt | 8460 |
| tttttttga ttttagtag agacagggtt tcaccaigtg gcccaggatg gtcicaaact | 8520 |
| cctaaccteg tgatccgecc acctcggect cccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc | 8580 |
| accgtgeccc gcctagaatt ggttttttaa atcctcaggg ggaggccaag gcggcggat | 8640 |
| cacctgaggt cgggagtcca aaaccagcct gaccaacatg gagaaacccc gtctctacta | 8700 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|--------------|-------|
| aaaatacaaa | attatccggg | cgtggtggca | catgcctgta | gteccagcta | ctcaggaggc | 8760 |
| tgaggcagga | gaattgcttg | aacctgggag | gtggaggttg | cagtgagecg | agatcgcacc | 8820 |
| aatgcactcc | agcctggcca | acaggagcta | aacgctgtct | caaaaaaaaa | aaaaaaaaat | 8880 |
| cctcaggfat | ctttttgget | acatactata | tttagtgaag | aaggtttttt | taaaaaaaaatc | 8940 |
| ttaaactaacc | tagacactac | ctaacatagt | aagataatgt | actttatttc | atttgattca | 9000 |
| gacgagagtg | aagcagctaa | gcagaggttc | tccittttat | taatgttttt | taatggaaaa | 9060 |
| ataatgttca | caagaatggt | ccaaagtaat | gaatcaaaaa | gtcgttgcca | tacctattta | 9120 |
| acaattattg | acatattgct | aacagatata | cttattttat | ataggctaga | aaattgtggg | 9180 |
| ccagacacgg | tggetgacac | ctgtaatccc | agcactttgg | gaggccgaga | caggtggatt | 9240 |
| tcttgagctc | aggagticaa | gaccagcctg | agcaacatgg | caaaacctg | tctctacaaa | 9300 |
| aaaattagct | gggcatgggt | gcgagtgcct | gttgtcccag | ctactcggga | ggttgaggca | 9360 |
| ggaggattgc | ttgagcacag | gagatcgagg | ctgcagttag | ccaagatcgt | gccactgtac | 9420 |
| ttcagcttgg | gcgaccaagt | gagacctgt | cttaaaaaaa | aaaaaaaaag | gaaaggaaaa | 9480 |
| aaatgtggc | ttatggatgg | aggtaacag | cttatttagt | gtgccaaagta | ttcaaattaa | 9540 |
| ggttttcagc | tttgcagttc | igtgtccttt | cttttcacc | atactaaaac | taaggagcaa | 9600 |
| ggttacattt | ctttgaaaa | aaatgtgggt | tcaccaaatg | atttgactgt | gattttttta | 9660 |
| aatgtcattc | tcccagttcc | tcaaacittta | ggcaatgaat | gatagtaaga | gttaaaattg | 9720 |
| aatttgtaaa | accaaaatgt | aaatatataa | aagtgttagt | gacattactg | tatacacatt | 9780 |
| tatacccttg | ttaggtattc | aacttagttt | ttctcttagc | agctgtactt | ttaactactt | 9840 |
| tagaagaatt | atcccattta | attttttttt | gttcttatcc | tatttttagt | gtgcttctact | 9900 |
| gcttggttcc | ctttgttttt | ctgagatag | tggttatata | gctatttagca | ggttgtaita | 9960 |
| taattattat | tattttggtt | caagaagaga | cttgaggaaa | gctttatagt | gaccctattat | 10020 |
| tgcacigtgt | taagagtgcc | caatgccaca | agcatattct | tccittgtat | ttttgcaaag | 10080 |
| ttccattgce | tggactgtc | tggagacagt | ctttgttgg | ctatcagtta | ccattacttt | 10140 |
| agcaatcatt | tatggaagaa | taagnaacgac | ccgtgtctgg | cacttatata | tacactgita | 10200 |
| gctaatccct | acaatgacct | cataagggag | gtactttttt | aatacctgtg | tcacagatga | 10260 |
| agaaaaatca | tatccaaaagt | tgagtaacct | atctatcttt | ttggttatag | ccaatccctat | 10320 |
| taggtgtgaa | gtgctgtttc | attgtgglat | tgallttgtt | tttctgtatg | gctaaaggltg | 10380 |
| ttgagcatct | tttcafatgc | ttactggcct | ttctttggag | aaatgtctaa | gttaatttag | 10440 |
| atctcttgcc | catllaaaaa | ttggallatt | gaalcitllt | atllatcalt | talaatagtt | 10500 |
| ctttatagat | tttagataca | agtcccctat | cagatacatg | atttgcaaat | atlttctctg | 10560 |
| ggttgtatat | ctttttgatg | taaggatct | tttgaagtca | agttttttgt | tttgtttggt | 10620 |
| tgtttttttt | tttgttgttg | tttttgagtt | agagtctctc | tctgtctccc | tgactggagt | 10680 |
| gcagtgccac | agtcttggct | cactgcaacc | tctgctctcc | aggttcaata | gatcctecta | 10740 |
| cctcagcctc | ctfagtagct | gggaccacag | gcgcgtgcta | cacgcccage | tcattattgt | 10800 |
| gttttttagta | gagacaggg | ttctccatgt | tggccaggct | ggtctcgaac | tcctggcctc | 10860 |
| aagtgatcca | tttgcctcgg | cctcccacaa | igtgtggatt | acaggcgtga | gccaccgcgc | 10920 |
| ctggcccaag | tcaactattt | ttaagacaag | gaagggaaga | aaaattaaaa | tgtaataatg | 10980 |

[0010]

| | |
|---|-------|
| taataagtaa ggccggcgt ggtggatcct gtagcacttt gggagattaa ggtgggagga | 11040 |
| ttgcttgagc ccaagagttc aagaccagcc tgagctacaa aaagagacc cgtctctaca | 11100 |
| aaaaataaat aaattagctg ggtgtggtgg aacgcacctg tagttccagc tctgtgggag | 11160 |
| cttgagatag gagggagct gaggtgggag gattgcttga gtcaggagt tccaggctgc | 11220 |
| agtgagccgt gatggcgcca ttgcactcca gtctgggtga caggcgaga cccagtctca | 11280 |
| aaaaaaaaa aaaacaaaa aagcaattac tgcctcagc ctatatgtag tgctatagag | 11340 |
| atgccaaaa agtgttcatt ttgaatagga tgagcaata ttaactatit aaaacaactt | 11400 |
| ctaaaaagaa ttttccatt tgattcagtt tattttagaat ttacctaca tatagtgca | 11460 |
| gtctttccta ctggatagta aatgtcgatg ttgtctgttt tgtttaccag tgtgttccca | 11520 |
| gtgectgct gataaatgtt tgttaaatga atgaataagt aaacatcaat gttggctaga | 11580 |
| gctatcgggg ggtgtggcatt cattaagtta atctagaag ttgtcacaag atggaagatg | 11640 |
| ttaggglgat gagagcalga agccaaggcg cccctcagag ccttgggtt tatgaacct | 11700 |
| gtagcagcaa cctttcttt catacgtata tctgtattg taaaatgagg ggatgcattg | 11760 |
| gattgtctcc ttttaacat gctgaggttt gtaacagtg gaaactttaa acatttacag | 11820 |
| ccagctaaaa aagcaatgct getaagaaga atttaagtgc actatcaagg ttttatgcta | 11880 |
| agataccitt gacatttga cttgacactg ctgtaaagt tctaagaaa atggtatttc | 11940 |
| tagtatggga tgtattacga agatattcac aaagcagtat cttgaagatt ctcattaggt | 12000 |
| agaatgttgg gattactatt ttatttatac cctgtctact ttctttcaa gaagatttga | 12060 |
| [0011] gatagcgact caagctagt ttccccccac teaggcaaag gttcctttag atgctattga | 12120 |
| cagacatitt aggtctgggtg cagtgaacta cacctgtaat ctcagcactt tgggagcag | 12180 |
| aggtctagcag atcgtctgag ctcaggagtt caagaccagt ctgggcaaca tggtgaaacc | 12240 |
| ccatctctac caaaaataca aaacattagc cagggtgtgt gcaagcctgt ggtcccagtt | 12300 |
| actcaggagg ctgaggtggg aggtctgctt gactcagga ggttgaggct gcagtgagcc | 12360 |
| aagattgcac cattgcactc cagactgagt gacagagacc ctgtctcaa aaaaaaaaa | 12420 |
| aagacatitt atttattaat acttttatct tttaacctt aaattttgg tatttcaggg | 12480 |
| actataggag gattagaaga ggagaaatgg ttcaataatg ctattttaac ttgaagctct | 12540 |
| aaaatfaatg gcttttaaac attaagaatg actctagtgt ataattttct aaattaatct | 12600 |
| aaatctctc aatgctgtgc atttcagcat aaggctgact ttacagcgt caccacacaa | 12660 |
| actecatagt attttagat taaactaagt atcttaact agttactgcc tggcgcagtg | 12720 |
| gctcacgct gtaatcccag cactttggga ggccgaggcg ggtggatcac ctaaggctcag | 12780 |
| gagtcaaga ccagctgac cagtaggtg aaacccatc tctactaaa atacaaaaat | 12840 |
| tagccaggcg tgggtgctg tgcctgtgtt cctgtgtt cgggagctg agacagagaa | 12900 |
| tcacttgaac ctgggaggtg gaggttgagc tgagccgaga tcacaccact gcaactccagc | 12960 |
| ctgggtgaca gactgagact cctgtcaag ataaataaat aaaaaataaa taattttta | 13020 |
| aaataaact agttattcag ggaagcagga cacaaactct tgaggagtag gttattatg | 13080 |
| aaaaagagaa ccagaaata ggttctctc agctagagta cctgatatt cttteatct | 13140 |
| tctgtatgga aaacatggtc tatcatcata aagagaagat ttgtgaaag tgcataattc | 13200 |

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------|
| tctccaacca | tttcttttag | gttggagaag | aacaatcact | tgetactgta | atcettatgt | 13260 | |
| gtataattgc | tgattataaa | gccagtgaca | ttttgttfc | aagtaaaagt | ggttttttcg | 13320 | |
| taatafcatt | agtcftaagt | aaaagtcatg | cttgaatttt | tatacatttc | acatttcttt | 13380 | |
| aagtgatccc | aggccagaca | acagtgaaaa | cicattttct | cagagatgct | tatttgaget | 13440 | |
| cftgtagtag | ataagcataa | cftgfatccc | caaatctaac | cagtctttgg | ccatagatfc | 13500 | |
| caaaacattt | tatattttga | cttttttttt | tttttaaca | acttaggtcc | ttaaatagat | 13560 | |
| ttttttgaag | aaacaagttt | cttttttagta | tatttaattg | cacatgttfc | ctgatttttg | 13620 | |
| aacgggaatt | cctcatcttc | atfttacatt | gggccctgtg | aattatttag | ccaacctagt | 13680 | |
| tcacattctc | acataatacat | acattttatt | atttattatt | tgtttgtttg | tttgtttggt | 13740 | |
| tgtttgtttt | ttgagacaga | gtctcgetct | gttggccacg | ctggagtgca | gtggcacaat | 13800 | |
| ctcggtctac | tgcaacctct | gtctcccggg | ctcaageagt | tctctgctct | cagcctccca | 13860 | |
| agtagctggg | attacaggcg | tgtgccacca | tgccfgacta | atftttgtat | ttttgttaga | 13920 | |
| gacagggttt | cacctagtgt | gccaggttcg | tctcgaactc | cftaacctcag | gtaatctgtc | 13980 | |
| cgctcagct | tcccnaagtg | ctgggattac | agacgtgagc | caccgcctat | ttatfttttt | 14040 | |
| tactgatctt | gaaataaacc | ttctttgatt | ctttatcctc | agtafcccta | tatcagcata | 14100 | |
| acttttgtaa | agagatcatt | ctgtcttttg | cactctgtct | taaacatact | gcagttcate | 14160 | |
| ictctctctc | tcccatagat | ggctttttgt | agattcacca | ttgacctcac | tgttgctaata | 14220 | |
| ccaacactca | gttctcagct | gcctctccat | gtctcatgag | tagcatcagt | agattgggag | 14280 | |
| gctcaacctc | tcttctgctca | ttttcttcat | ttagcttcca | ggacagcatg | ctatctgcta | 14340 | |
| [0012] | tcttcgagtt | cttcttctct | tattccctaa | aaagcagttt | tatacaaatg | tatagtttta | 14400 |
| tacaataata | gtagcaaaagt | atgtcaaaagc | taaatcaatc | attcaatatt | tatatatttt | 14460 | |
| catattaaga | ttatgacagg | ccaggcacag | tggetcacag | ctgtgatecc | agcactatgg | 14520 | |
| gagctgagg | cgggcagatt | gctgaagctc | agaagttcaa | gaccagtctg | gccaacatgg | 14580 | |
| tggaaccccg | tctctactaa | aaatacaaaa | attagccagg | cgttggtggtg | gataacctgta | 14640 | |
| gtctcagctc | ctcgggagcg | tgaggtggag | aattgcttga | atcccagttg | cagaggttgc | 14700 | |
| aatgagccga | gattgcacca | ctgcacttcc | agcctgggag | accaggcagg | actccgtctc | 14760 | |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaagattatg | caaattaagc | caattttaac | atttataatt | 14820 | |
| gataaatgag | ctttgcttta | gtatatctgt | ttcttaggtt | tggaatttca | agataactcc | 14880 | |
| tgcacacctg | gcaattttaa | agctttttatt | atttagattt | gaaactattc | tgtattgagt | 14940 | |
| actgagtggt | tcttaaggag | ctcagcataat | tccaatagtc | agtcftgattt | aaetgagacg | 15000 | |
| tatctgaacc | agagtgtccc | ttattctatc | agaaatactt | acattfaatat | ttcattttta | 15060 | |
| aaagctcatt | aataatagcc | taaatftgtag | tttggttcat | taataatctg | aaetfttttt | 15120 | |
| ttcttttttt | tttttgagac | agagctctct | tccatfgccc | aggttggagt | gcaglggccc | 15180 | |
| gatcttggtc | cactgcaacc | tttgcctctc | gggtttgaac | ttttgtttga | aagtacaggt | 15240 | |
| atctgggtggg | agagaagcga | gtacattaac | ttttaaaaat | ttgttataca | ggattatctg | 15300 | |
| aaactttctc | tattgcaaaa | catgaagata | gtttgctftaa | ggattttattt | caagactacg | 15360 | |
| aaagatgggt | tcttctctgtg | gaacacctga | atgacaaaaat | aaaaataaaa | tttggacttg | 15420 | |
| caatctctca | attgggtggat | gtggtaggtg | tgcatactct | tctatagtca | atttcccaaa | 15480 | |

| | | |
|--------|--|-------|
| | gatttagtga gagcctgggtg tgtgccagg cactgtgcta ggcaccaagg attacaaagg | 15540 |
| | tgattgaagc agtcctttgc ctgaaggaac tcaccaggga aaagtagtga ttgtgtcaca | 15600 |
| | tacatgataa cacactgtgt ttatatafitt tafagttag aaactgttta tctcaatttg | 15660 |
| | gtaattataa gtctatcttt aacaaattea aagatctaaa acattgtgta ttccttaaat | 15720 |
| | gtgttaaaaa tagtttcaaa aagttagcct gaaaggaggg aaaagaaaat aaatttttaa | 15780 |
| | gfttaagaga aaaagtccaa aaatagagtg atagattctt aggaactaaa agtatcacia | 15840 |
| | gagatcatta tcttgggctc acacttaaaa catttcagaa atttttctat atgacgttca | 15900 |
| | ttagtagaat aagtccctt gataaattgt acttatigtc aagagatcct atctatttaa | 15960 |
| | actaaaacat tcatgctaatt ttttaacta gtttcttctt gtctgaaca tghtaatcaa | 16020 |
| | taattatttc cctgtttgtg tcccaaaata accaagtata tgfataatta tataatgta | 16080 |
| | tgtttaaaa taacatttat agatgtgctt tatgttctga ttacagaagc aatgcgtgat | 16140 |
| | ttttgtagag aatttggaaa gtgcaaaaaa tacaatgag aaaataaaaa gtgactgtaa | 16200 |
| | ttctaciace cggagatgac taatgtfaat aattagttgt gtttcttggc agtctgtctt | 16260 |
| | tgtgtatag ttacaaaatt ggaataatat tttagaata attttgatta ctgcittttc | 16320 |
| | tctactatga catgatgaac attttcttat gtcctiacat actctccaaa tataattttt | 16380 |
| | aatagttaca taittcatct ataatttaag cattctccca ttftgaacag aagcttgttt | 16440 |
| | ccaatttttc ttattataat taacaaatgat gaatataatt gtaacaaaat gcttgaacgt | 16500 |
| | ctcctttctc taagaaaggc agtttagtga ccaaaggata taccittttc aaagtctatt | 16560 |
| [0013] | gctatgtcat ctaattgtct ccagaaaggc faatgaataf atgtggactg tgtgtgtcfa | 16620 |
| | gcccttagct agtcaatatg gggagatttt aaatgaaaat aggaaagtgg aaaaglaagg | 16680 |
| | tgttagccag gtgtgtgtgt tcatgctgtt iatcccagca ctttgggagg ccaaggtggg | 16740 |
| | tggateactt gaggtcagga gttccagacc agcctggcca atatagcaaa acctcaittc | 16800 |
| | tatcaaaaaa acaaaaatta gctggggcgt gttccgtgcc tgfaaatcca gctactcagg | 16860 |
| | aggctgagac aggagaatcg ttgtaacctt gggaagcaga gtttcagtg agttgagatt | 16920 |
| | gcaccactgc actccagcct gggcaacaga gcaagactct gtctcaaaaa aaaaaagaaa | 16980 |
| | agaaaagaaa aagtaagggt ggtggggctt gctctcaaag afctttctgg ttgaggtcat | 17040 |
| | tgacacacaa atggtgtaga aaactgtagc actaaatcat gatccagaa agagctggga | 17100 |
| | atgcagatct taatgaatga cttatcaaa gaaggtaggg tagatgaggt ggcacccgag | 17160 |
| | ctggctttgt aggaagtgtg gggtttcaac gtggcagaga ggaaaagtat ttaagtacaa | 17220 |
| | aggaacaata tagttgtagg tatataagtg ataactgagc cttcctgtac agctgtttag | 17280 |
| | ateaaaagat gaatgttggg agccctggca tacaggagtg gtctgactgg acggtggaga | 17340 |
| | aggtgaggag aatccctgca tgccacttgc tctttactcc tgccatgttt acttcttggg | 17400 |
| | agaattttcc tactggcact agccafttat tattcaaggc caaattcact tgcagacct | 17460 |
| | tttgtgaaat ctttcagaa tccataagac agcctctctt gtgttcaaaa ttttttttt | 17520 |
| | ttfgcacttt aatatgggtc ccattacaet cactgttact catgtgtctt ggcatttcat | 17580 |
| | cttcaaaagt ggttgaactt tattcttgtt atctgtccca gaacctagca cggtatctgg | 17640 |
| | tacatagtaa atgtcgaatg agtgagagac ctgataggca acagacacga tcaaagcagt | 17700 |

| | |
|---|-------|
| actttcagaa gatcagtaaa acagtaatgt acatggtttt gaggagttaa agagagacta | 17760 |
| gaaaatgaaa ggcaagttag aagaccacat acaagaagga acaggacttg accactgaat | 17820 |
| atggaggagg gcatcacatt ttgaagccta ggtgattaga gtggaagagt aacacatttg | 17880 |
| aaaaaactg teggccgggc acagtggctc acgcctgtaa tcccagcaet ttgggaggcc | 17940 |
| gaggcaggta gatcacaagg tcaggagatt gagaccatcc tggctaacac ggtgaaaccc | 18000 |
| cgctctact aaaaaafaca aaaaaattag ctgggcattg tggcgggcac ctgtagtccc | 18060 |
| agctactcgg gaggccgagg caggagaatg gtgtgaacct gggaggcggg gcttgcagtg | 18120 |
| agccgagatt gcgccactgc actccagcct ggccgacaga gcgagactct gtctcaaaaa | 18180 |
| aaaaaaaaa gaaaaaactt cticattggt acgggagtag ggcagagaag atgatgagtt | 18240 |
| tgatttggtt ttgaggtggt aattccaaag aaaatgttca ctagcttttg ggaagtcaag | 18300 |
| actggctctg agatgacaga tgagaacaag gatgtccatc tggattgctt ggctggagg | 18360 |
| agactgttga aaactttgat gattttctt tgtttttgtt ttgcccctg cctctcacct | 18420 |
| cccactttga tgagttttta aagttagttg gaagagcagg aacctgatcc ttgaggaaca | 18480 |
| ttttagaaaa gtgtagaag gaaggggtaa ccaagcagag aagtgggga agggttgctt | 18540 |
| cttgagagaa gagcccaaaa aatgaaatgt cagtactac gaaagcagaa gaggactgca | 18600 |
| gtcaggggag atgaagggtg aggctctgg agatggagaa tggcaaattc actgaattgt | 18660 |
| gtctgagatg ttttagttc ctittatcgc taagctcccc ggaatcatat ttggtgatt | 18720 |
| cttgccttat tcccacata ttctgtcttt tttttgttt taaatccat ttttggctg | 18780 |
| tttgtttga ttttaaagat aaaatctttt tataaatcag attacecctg aaactctct | 18840 |
| gtctatatta cacatgiagt taacattttt ccattttgta gtttagttt cctcctggg | 18900 |
| atcatctac atttateigt cctcagttca tttttgttgc atctccattt gfgctgagca | 18960 |
| cattatagat gcttgggagg tatttgaggt cacatfaaat taggcggtat cccttatggt | 19020 |
| aatggctaac caccacatct taggggccat ttgtgaactt atggattatt cttttatctg | 19080 |
| tgttattgtt gaaagtgcta agtattgact gggagcccaa tttatgtgtg tgtgcacatt | 19140 |
| ttctagga aagcccata agtttcatta gattctcaa gatgaectat tgetatatac | 19200 |
| tatcatcatg ggtaatatgt ttaccagaac tticctaatt ataatgcct ctglttagaa | 19260 |
| cttttgecta acaggcatat tcagatacag ggatcagcag ttattctggg tgggtgcca | 19320 |
| ctagggtgga tagcagagtt ggiggcttta gatttaggaa attttagttc taaaatcagt | 19380 |
| gtaccagta atcgggtgctg tgactttaag caagtcacct ctctgggcca gttctgtctg | 19440 |
| ectagcttg agtgcagtga caigatctt gctcactaca accctgcctt tccagattea | 19500 |
| ageggtctc ceaccacagc ctctgagta gctgggacta cagggtgtcc accatgccc | 19560 |
| gctacttttt gtatttttag tagagaccag gtttcatcat attgcccagt ctggtctcga | 19620 |
| actctgacc tegtatcca cccgtcttgg cctcccaggt gctgggatta cagggtgag | 19680 |
| ccaccgtgcc cagccagctc tagtgttta atcaaggaaa attgetcttt ggaactgcag | 19740 |
| tgtaagagag atggccgtgc tgcatttccc agtactcatt ctcccattgc agggacctca | 19800 |
| tggagctgcc tgcatectca ggggtatgct tctttctggt ctcttctttt gtctgggctc | 19860 |
| acttacctgt tgttgggacg ggataaggaa tgggtcacct ccagttacct gaggtattaa | 19920 |
| tatttattta caccctgtc ctatctcccc agtttctca taettctgtg agtctctgtg | 19980 |

[0014]

| | |
|---|-------|
| catagcattg tgcctacac ataatatatt tgcggctggt gattatggat cttttgttga | 20040 |
| tttcctggc tccatgatat ttcactaaaa tttaatggaa gaagtattac ttttaattaca | 20100 |
| ccttgaatat ttggtaaagg actggcatag caaagacatg atagcagaga ggtgtaagtg | 20160 |
| agaagtacca aggacctcca gtctctaca aaagtaggca cgaaaagcct tatgaaattc | 20220 |
| gtattcaagg ctgccaatat tttttctttt tcttttctt tcttttctt tctttttttt | 20280 |
| tttgagatgg agtctcgtg tgttgeccag gctgtagtgc agtggcatga tcttggctca | 20340 |
| ctgcaacetc tgcctcccgg gttcaagcaa ttettgtgce tccgcctect gaatagctgg | 20400 |
| gattacaigc atgtgccacc atgccigget aatttttigt atttttttt ttttaagtga | 20460 |
| gatggggttt cactatgttg gccaggctgg tctcaaacct ctgcctcaa gtgatctgcc | 20520 |
| caccttgccc tccc aaagt ttggtattat aggcataage cactgcgccc agccctcaat | 20580 |
| gtttttctg tctagcagac ctacagggaa atcagatc ttcctcage agaggcaaat | 20640 |
| gactgtaaga gatgtccctc agggatgtac agaaataccg tatctcactg attctaagaa | 20700 |
| gcacactttt cegcatttta atacttctga aatcatgatg tctctataa ttcattggcag | 20760 |
| cttgaattc attgacagcc ctttttctc ctcttagtgc taagcacata aaataaact | 20820 |
| atgcttatat cttagactgc atcttaaata tgaggaaata tagtagtga gatgattaat | 20880 |
| gttaaagtca aaaatgcaa aggtacttt tagttagt ttctgaaat agagagtatg | 20940 |
| ttgaaaggag taatgtgnaa ttaggctgga agaaagatcc tagctttcta ggnaccaga | 21000 |
| ttgatgaatg aaatgtgggt actatgtgaa gaagagtgtt tatatacaa tgtgaaatt | 21060 |
| [0015] attatttaa gaattatgt tctgtaatt gaaatcaat ttatttaa ttttatttt | 21120 |
| taaaggatga gaaaaatcag ttaatgaaa caaacgtctg gttgaaacag gtatgtgtg | 21180 |
| aaaattcaaa cgggcacca attagact gggacaccta ttttattat atgtattgta | 21240 |
| gcagaaatc aagagtatgt atattigtga atacaaatga atactgact atatggcctt | 21300 |
| ggtggattgg caggacacag aaagatgagg gtagatggag ttcttgtatt tattcagcta | 21360 |
| gtattttigg agtgcctatt gtgtgccaga cactgttatg gggaaacagc agtgaacaaa | 21420 |
| acagacaaaa aacctgtag tattagtccg ttctcacact gctataagga catacccaag | 21480 |
| gctgggtaat ttataaaggg aagaggttta atggattcac agttcagcat gactggggag | 21540 |
| gcttcacaat gatggtgaa agtgaaggag aggcaaaggc atgcttaca tggcagcagg | 21600 |
| caagagagca tgttcagggg aactgccctt tataaaacca tcaattcaag atgagatttg | 21660 |
| ggtggggaca cagccaaacc acatcacctg cctcatgga acttcattct agtgggggaa | 21720 |
| aaataaacia gttgtatagt acctagaag ctgataagct tggggaaaaa cacactggaa | 21780 |
| aagaagatag ggagtattgg ggtcgggggt gtacttataa aaatggtggt cagagaaaac | 21840 |
| agcattgaga agataatgtc tgaacaaagt cttggtggag aggaagcaag ccatgtgtat | 21900 |
| atctggggag gagcgttcca ggcagcagga cctacaagtg caaaggtttc tgagctggtg | 21960 |
| tgtgcctagt gtgtttaaag agttgcaagg agccagtgt ggctagcagt gagagaacca | 22020 |
| ttggggagag ggggtgtagg agatggcatc agataagcaa gaagaggctg gtggagtagc | 22080 |
| agctgcttat aggccactgc aaggattctg actctctaag gtgaaatgg gcaagaatga | 22140 |
| aatgaatttt ttttaatat atagteccct ttatataaag gacttttgtt ttttctggg | 22200 |

| | |
|---|-------|
| ccaccataca fatgtccctaa ctgctgttga gcgcttcctt ttgtttttat catccctaata | 22260 |
| ttttataacct actatattgtt ttctaaccce gaactcctga aaggcatata tgettttctc | 22320 |
| aggggtgcage tccfaacttg atcacagaat tgtaactgca tggaggtagg gtaagggtgtt | 22380 |
| gaaatagcga gaatgtgcaa taaatccaac tcccttttgc atggaccaga acagccaaat | 22440 |
| tgggtgacaa tacatctgga aaaaagaatg ttcccttga accitggatat taagtgcctg | 22500 |
| tggcttcaag tectggatat agtcagtcag ttgatgggag aagagttgcc gagecagagcc | 22560 |
| atgaacacat ctagctctgg ttctcaccgt tctctcacag ggaccatggt gagaaccact | 22620 |
| acacaagggg acagggttat ctgggcecca taataagaaa gacagggagg tttctctat | 22680 |
| tgggggiaga gatgatctca tctctaaaat ttctgggtg acaaaaaagt atgttatcca | 22740 |
| ctgtttttga ctattagttt tattgaaatt gaggcagatt tctttgtttt aaaggaatgg | 22800 |
| atagatgtaa aattaagatg gaaccctgat gactatgggt gaataaaagt tatacgtgtt | 22860 |
| ccctcagact ctgctcggac accagacatc gttttgtttg ataagtaagt tatactcfaa | 22920 |
| atatagtttt atattttcaa aagaaaacat ttgtatttct attaggcact aataattttt | 22980 |
| ctcccttttg aaattgttta ggtataaaaa tcaaatgaca tgaccgcatg tgcctgggta | 23040 |
| tgattacatg ttttatagat gaggaacag aggetttagg tggttgttct tttccaagat | 23100 |
| cacagageta geacatgcca gactaggggg gtcacacca ggggactgat acctccattt | 23160 |
| actctttgtt ttactagact acatatttgg cagacttcta gatttttttg tatgtttttt | 23220 |
| acgicglitga ggicatatllt talgllgaal lgtgcatecl tclagllgig lliaaiacl | 23280 |
| gtatcgtcat ttteccacaa tgaggaatgc tgggttaatt atcaattcat ctttagagge | 23340 |
| atcctaceta ggigtgtttt gaggattttt ttttttttaa cttaggggag aggaaaatc | 23400 |
| tgggtaccag ttttttttt ttctaagacc actcctgggc aaatctggga attigtgett | 23460 |
| atcttaaaage actttgtctg attcgaaaga aggccatttg gcatgaggac agagcaactg | 23520 |
| ctatgcaaaa atatctttta tcttttgaca ctttttacct ccattctct taagaagtga | 23580 |
| acaaagcttg taaggacaca tgatgcagct tectggagca tcattttatt ttcagtaatt | 23640 |
| gaaaacattt ttatatttaa catggatata ttacagaata gtgtgcaaaa gccacatgaa | 23700 |
| tttgaagaca gcaacatttt aaagaaatct tatgttgggt gtgtgettcc ctagtatatg | 23760 |
| gattctatac tagacttttc tcatatatga attcacttgg tgggagagct tgagaggcat | 23820 |
| agctgctttt cagggtcatg cccagcttgg tgttcatggt ctttccccat caaagtaaaa | 23880 |
| aacggccagt atttgcgatg aaggaagaag agcactgtgg agggagtcta ggagtgtgga | 23940 |
| ttcaggttct ggcgtgatgc gtgcccattg tgtcaatage ctgagcttat tctgtgtgta | 24000 |
| aggtgaggtc ttttcaatca ttagaatctc aggettctgt gaaaatttgt cagtctctga | 24060 |
| gtagatgcag aagaaggggt tcagttctag tagagttaga tatttaagga agatattcct | 24120 |
| ggagcagggt ccctatgtag cacttatatc ttatctgaag tatagtaatt taaaaattat | 24180 |
| ttcaigcaat caalgalagg ctgclllla taltaggell aialtaatc aallcaigtg | 24240 |
| cattgtttaa tttctgcatt gttattttat atgtgtgtat tttagtgcag atggacgttt | 24300 |
| tgaagggacc agtacgaaaa cagtcacag gtacaatggc actgtcacct ggactecacc | 24360 |
| ggcaaacctac aaaagttcct gtaccataga tgtcacgttt ttcccatttg acctcagaa | 24420 |
| ctgttccatg aaatttgggt cttggactta tgatggatca caggttgata taattctaga | 24480 |

[0016]

| | |
|--|-------|
| ggaccaagat gtagacaaga gagatttttt tgataatgga gaatgggaga ttgtgagtgc | 24540 |
| aacagggagc aaagaaaca gaaccgacag ctgttgctgg tatecgtatg tcacttactc | 24600 |
| atttghtaac aagcgcctgc ctctctttta taccttgttc cttataaac cctgtattgg | 24660 |
| gctetcaitt ttaactgtac ttgtctteta tcttcttca aatgaagggtg aaaagatttg | 24720 |
| tctctgcact tcagtaacttg tgtcttggac tgccttcttt ctggttattg aagagatcat | 24780 |
| accatcatct tcaaaaagca tacctetaat tggagagtat ctggtattta ccatgatttt | 24840 |
| tgtgacactg tcaattatgg taaccgtctt cgetatcaac attcatcacc gttcttctct | 24900 |
| aacacataat gccatggcgc ctltggctcg caagataatt ettcacacgc tteccaaaact | 24960 |
| gctttgcatg agaagtcacg tagacaggta cttcactcag aaagaggaaa ctgagagtgg | 25020 |
| tagtggacca aaatcttcta gaaacacatt ggaagctgcg ctgattctta ttcctfacat | 25080 |
| tacaagacac atcatgaagg aaaatgatgt cctgaggtc tgtgatgtgt atttacaat | 25140 |
| gcagatcttc ttccatttta agttcagaag ttactttcat taattttggc agagttaaca | 25200 |
| gcatgacctt taagtaagac taagcataga ttgagggcca gaattgttga catattttct | 25260 |
| ataaaagatc tttaactaagg ctgtttcag ttaaagcacc tgcaaaatgg ggcaattaca | 25320 |
| caaatctcac ttctccactt ccccatcag catcttggat aactctaaag aaaatttagt | 25380 |
| gttatattct aaggaataat cctgcatat ttcttggctc tgacctgatg aattgtttta | 25440 |
| atttcttggg gtgagggcag tgggtgaact gttttaattt tgccttcagt aactttgttt | 25500 |
| ctaaattgtg ataactctga ggcagaactc cattataaca gttaatggag ttatcaaaag | 25560 |
| [0017] ttcttttagg ctgggcgcag tggcttcacg cctgtaatec caccactttg ggaggccgag | 25620 |
| gtgggtgat catttgaggt caggagtttg agatcagcct ggtcaacatg gtgaaactcc | 25680 |
| atttctacta aaaatacaaa aattagctgg gcatgggtgc acatgctat agtcacaget | 25740 |
| actcgggagg ctggggcagg agaatcactt gaaccagga ggcggagatt gcagtgagcc | 25800 |
| gagatcacgc cattgcactc cagcctgggc gaccgagcaa gactccgtct caaaaaaaaa | 25860 |
| aaaaaaaaaa aagttctttt aaagaatgag cctaattgig aattataag tataaaattc | 25920 |
| agctctgca ctgttatttc ttctattgtg tattatttta aacctatgac tatagtaata | 25980 |
| tttcataat tgaatgtaca ttaaaattat gtgaattata atctgtaaag ctattttaaa | 26040 |
| tggaaaattt ccatcaggta tgaggagaca gaataaatct ggcaaatca cagcctttat | 26100 |
| cccaaaaggg acatttgatg tatatatttt taaaactttt ttcatatgt taatgattta | 26160 |
| atttcaataa gaatttctt ccttatttta ttgtatttca ataggttttt ggggaacatg | 26220 |
| tgtttggtca catgcataag ttctttcatg ctgatttctg agaactttgtt gcaccatca | 26280 |
| taaaaacttc taatgcttgt gggtttgtga agtatctatt tgggtgtagc ataatgaaat | 26340 |
| tagtttataa ggtttggagc tatcattgga gtttttaaaa gtacatagat ttgttaggia | 26400 |
| atggtttaga ctgagatgga atttaataaa tgcctgcaaa gtattgtgca aaagggtcat | 26460 |
| ggetcactact actaggacca aggaggttgg ttttatttc agataaaaac agaggcagag | 26520 |
| gtggccagggt gcggtggctc acgctgtaa tcccagcact ttgggaggct gaggcagggt | 26580 |
| gateacgagg tcaggagtgt gagaccagcc tggccaatat ggtgaaacac tgcctctct | 26640 |
| aaaaatagaa aaattagctg gccatggtg tigtgtgctg tagtcccage caccitggag | 26700 |

| | | |
|--------|--|-------|
| | gctgaggcag aagaatcact taaacttggg aggcagaggt tgcagtgagc egaggtcagc | 26760 |
| | ccactgcaact ccagcctggg ggacggagca aggctctgtc tcaaaataaa ataagcagag | 26820 |
| | aagtaacagg gtttacaatg ccctaaattc taaattatce tacactttgg aggcacagtt | 26880 |
| | ccccatagagg acaccatcct tcatagaggt tcagggccag ggaagcccct ggtcaaggaa | 26940 |
| | atggccittgt agaaaggga gccctgtctg cttagtggct gggtctatce ttcttttcc | 27000 |
| | ttgtgggtgc tccgagetgc tgagccagct ccctactaaa gctggctcca gggaagactg | 27060 |
| | ttctgtgtct atgaaatag actgaagtgg tccctaggaa atccaaaaat aaataaagtg | 27120 |
| | tgtatgtgag gaagatgaac agctttctaa catgtattat tctgaaccaa cttttaattt | 27180 |
| | ggcatgaaat taatctcagg ctagagtctc tcaaaatatt aaaataagta aacactactg | 27240 |
| | ggcaagaata agtatatata gtaagaataa ttttttttag ttattttaa aataccaag | 27300 |
| | tctattttaa tttttaactt atcaaaaata accacttcta atataagttg atgtgtaaat | 27360 |
| | gaacatattt tgiagtgtct tttaaagctt atatctatag tagaccttca ggctagtgtc | 27420 |
| | tgicccctgag ctgaglatag ggicacttac cglllagagg cagcaatggg aggcagaaa | 27480 |
| | cgatttggct tctaactcag tgtgtttgtt atatcttaa atatgtacac aatttacaat | 27540 |
| | tatttaatgc attttattt tttctaac aggttgtga agattggaaa ttcatagccc | 27600 |
| | aggttcttga tccgatgttt ctgtggactt ttcttttctg ttcaattgtt ggatctctg | 27660 |
| | ggetttttgt tctgttatt tataaatggg caaatatatt aataccagtt catattggaa | 27720 |
| | atcaataaa gtaagcctc ccaagggact gaagtataca tttagttaac acacatata | 27780 |
| | ctgatggcac ctataaaatt atgaaaatgt aagttatgtg ttaaatttag tccaagcttt | 27840 |
| [0018] | aacagactaa gttgctaacc tcaatttatg ttaacagatg atceatttga acagttggct | 27900 |
| | gtaigtactga agtaataact gatgagatac atttgaictt gtaaaaatag caaaatatta | 27960 |
| | tctgaactgg actagtgaaa aatctagtat ttgtatcctg gcaataata ctaatttata | 28020 |
| | atccacagta aagttcatcc ttigactgtg ctggagaatt ccagttgtat tgaagactg | 28080 |
| | attttaaaac ttttctgcat ttggtaaagg tatgtaaact ttctgtact cactgagtaa | 28140 |
| | cagctaatct ttaataaat attatactgc tataattaaa aagctgacta ctgtatata | 28200 |
| | ttacttaatg tgatgttga tataataatt acttaatgtg gccgggcagc gtgctcaca | 28260 |
| | ccgttaatcc cagcactttg ggaggtcagc gtggcgtat cacctgaggt tgggagttcg | 28320 |
| | agaccagcct gaccaacgtg gagaacccc gtcttacta aaaataigaa attagccagg | 28380 |
| | gtgggtgtgc acacctgtaa tcccagctac ctgggaggct gcggcaggag aatcgcttga | 28440 |
| | accaggtgg cggaggttgc ggtgagctga gatacagcca ttgcactcca gectgggcaa | 28500 |
| | caagagcaaa actcagctc aaataataat aataacaaca acttaatgtg ctgctgcttt | 28560 |
| | tccataacca acattttaaa aataaaigaa aaacaggaat tgggaactcc ttttaagctt | 28620 |
| | actttattct ttagatgctt aattattgtg ttaactattt ctgtagctta gcttccactg | 28680 |
| | taaagtcata cagtagacaa ctctgtgga cacgcagtag catatectta acatttaatt | 28740 |
| | cagtectctt gtccacattt ccacaatta atagaacct ctctatata aattgtggta | 28800 |
| | gtatctcttt atccctgact ttagaatagt cagtcacta caattacatg aacccattt | 28860 |
| | aaaaacata tttagggccg gggcagttg ctacatctg taatccaagc actttgggag | 28920 |
| | gctgaggcag gttgacacc agaggttagg agllcgagac lagcctgacc aacatgttga | 28980 |

```

agccccctct ctactaagaa tacaaaaaat tagtcgggca tggtagcagg cgcctgtagt 29040
cccagctact caagaggctg aggcaggaga atcgettgaa cctgggaggt ggaggctgca 29100
gtgagccgag actgcgccat tgcactccag cctggcaaca agagcaaac tctgtctcaa 29160
acatattttg gtctaaatca ttctgtgaga aaacaatctt ctaatatgaa acacagtatt 29220
ctaatttggf atatgcaaac tgfatafac ctgtaatatt tcagttttct ctccttcatt 29280
etaacaatta caataataga atcttagagt tgcaagggcc tttagatgta atcaatctta 29340
gctattact agtacacgtt aatgatitaa gtacagtata atgtatcaca gttaaaacag 29400
ttaaattcca tctctaaatg tcaccacttc aggtgtgacc aggtagcaaa cactgacaga 29460
aacctctggt caatttagaa ctcttagctg ttgagatcac aaacacctca tttatttata 29520
ataagtaacc tatctaagtt caagccaatg ctctttggaa ggccgaggag acctatcta 29580
atttgeattt aatcgtagcg aggtgtttaa tgccatttaa tgagtgaang cctggtgtga 29640
tgaatttaga ttgectgcca gctacctacc ttagtctgta tacatccctg atccctctta 29700
tactaccatt actgttactt atgattitaa tatataaatt tttatcgaca 29750

```

```

<210> 40
<211> 28244
<212> DNA
<213> 智人

```

[0019]

```

<400> 40
gtcttcccca ggggtgtgta gcgctctccc tacggcgccc gcctagcccg gtggtcccaa 60
ccccctcggg gagetgcaca cgeccccgaa acctgggaca gaaactgagt ecctctcctt 120
cctggtggtg gtgacagcac ctgctcagat ctggtcggac gccgcggccc ggagcaceca 180
gcccgccgga gaaggagctc gcccgccctt ggggactggg acctggagcc ccttcccta 240
ccgcacgtac gccccgcccc gcgcacgccc gcccccccgc ccgcacctg cgcagcttca 300
ctccggatgg ttctctgctt ccccgggctc cgaggcgctt gaaaaccag cggcggcgaa 360
gcgagagagg gccccgcgcg tctccgcccc cacggctcca ggtctggggt ctgcctgga 420
gccgcgcsgg gagaggcctt ctctcgcacc gccgcgccc ctcccagccg tccgggtccg 480
cgccagccc gccaccagc catgggctct ggcccctct cgtctcccct ggcctgtctg 540
ccgcccggcg tctctctctt gctctctctt tctctcttgc caggtacgcg cacaggcgtt 600
agggctccgg agggacgggc gcccgagaag gggcgcgggg tccggagggg ctgccggcga 660
gaaacaccgc cgggcgagcg gagaggctg gcgccgtcgc cggggactcg gaaccgcgc 720
agactggctc cagcccggcg gcgacttggg tggggtggct ttttccctt cggctcacct 780
cccacccta gccaccacca aacctgggag tcaactgagcg ggcctggta cgcgccgggt 840
gatggggagg tctgagaccg gtctctctt ttggcgcag gacttgggga tctcctccc 900
cgcctgccc gtcgcccctc cccgcgact ggtcccaaa ctggcgccc caagcctcc 960
gtctaccctt ctgcatccc cccacctctt catttgacgg agatggetga agacttggcc 1020
aaggccacct cgggaagagg ggagtctctt cgggactggg gctggagctg gacgcccagc 1080
ctctccccc gtttagcctt cctagcctc ctgctctcgt cgtctaggga cctctcaccg 1140
ggagagccc tctgtcttct ctccctctct ccagaggagc ctgctggggg aagccggccc 1200
tggccccccc ctgggagctt cttgggtgcc tgggaggctt ggtgggtage gagagtccgg 1260

```

| | |
|--|------|
| gaccgggcaa ggcctcaggg aattcctgga gggcccaggc cggcggctctg fegtgcggct | 1320 |
| gtgagctcag agecctttcc gccctcggtg cggaggcctg cactactcag aacgccatac | 1380 |
| gcctcaacc gacctcctgc cggggaccct tctttcatcc tgggaagga gagtggggag | 1440 |
| caggaaaaat cctatttcaa gacctgagga agttggatte aacttcctag aggattctec | 1500 |
| tcccgttcc ccaagctgcc ccagatctg tacgtggaa tcagaagaca gctgaccgg | 1560 |
| taigcctcac ttgtgctggg gtgtggctta ggaacaaaga ggggtgccca agggttgcag | 1620 |
| aggtcagagt ctttcatcag gatatgaaga cagcatcagc aagagctggg ggtcacacga | 1680 |
| gaticagga gtcacacagt gccttggctt ciaagagggc tggtgccac ccctacaggg | 1740 |
| tggaatgcag gagaggecca gacctgggct gtgttctccc ggagctggg aggtagaaga | 1800 |
| cctgggctg ggcaccgtg gttggccctg ccctgggag cggactggcc atctttcat | 1860 |
| cgtagaagca gtgagtggct gtaeccaggc agacagcatt tccccacac ccccaccgg | 1920 |
| cagaacaac ccaggaaaag attgcgaata gttcttgacc tcttaccgca gcaccaagct | 1980 |
| gtgacttcc tcacaacaa cctttgagg tggatacgtt tataatcctt atttgactg | 2040 |
| gtaaagacac aggttcagag aggttaagcc acttgcctaa gtcacacag cttacaagtg | 2100 |
| atgttcagg atttgacca gatctgcca actccagagc ccagcttgc aacctctg | 2160 |
| cttctactg aatgcgtgtg gccaggtaga atcctgccc tcttggcct cagtctcca | 2220 |
| ttttgtaacc cactgggta gactggcctg aaagtctagg gtccacaga atccccccac | 2280 |
| aggtggagg gatgctgtag atgggtgatg ttctctctgg ctgggtggg ggaggttaag | 2340 |
| [0020] taacgattc cccagggact gacagggtg ctccacag tggccagggc ctgagggt | 2400 |
| gagcaaccgc tatltagcg gctgttgaa gattacaatg agatcaacc gctgtagcc | 2460 |
| aactgtctg acccagtc atccattc gaggttcca tctctcagct ggtgaagtg | 2520 |
| gtgagtctg gaagccacga gccgtggcca tggggaccgg ggcctctgga ggagccttc | 2580 |
| ccagaattag tctgttttg taattctct gcaacttta atctcttt ctaggatgaa | 2640 |
| gtaaaccaga tcatggagac caacctgtg ctcaagcaag taagtacca gaccctagc | 2700 |
| actgctgcc cctgggtgtg actgtttat ttgctttagg tgaaccaaga aaggcctaaa | 2760 |
| gaccagctt cattacttc tgtggaacc agattgggt ccactgactg gcagatfat | 2820 |
| ctcttctaa gcttgggtc acatgactg cctacagtc cccctggaag gactgtagg | 2880 |
| cccaaccct caagtccag atggacaggt tgcagcctg agaaagacat tctccatgtt | 2940 |
| cacacaacg aagagtaca acctgagatt gaagccctgc ccccaacc tgggtgtgtg | 3000 |
| ctgagacac ctcttctct cctcttctt aaaaactcag tttttttcc agacgggatc | 3060 |
| tcgctctgt acccagccg gactgtgtg gcgtgatct ggctcactgc aatctccacc | 3120 |
| agcagggttc aagcagttct cctgctcag ctcccaagt agctgggacc acagctgtgc | 3180 |
| accaccagct ctgctaatt ttggatttg ttatagagac aggtttctgc catgttccc | 3240 |
| aggctgtct cgaacgctg atctcaagca aaccacacac ctacgctcc caaagtctg | 3300 |
| gggttacagg cagaagccac tgtgcacagc cctatactc attcttaagt cagaataaga | 3360 |
| tgtgtgtgt gttggtagcg tgggagtaga ttttctgtt cagatcgagg ccaagaaatt | 3420 |
| gcctccaca tgtctctccc agggaggctt gtccagact tgccaggaga cataatggcc | 3480 |

| | |
|--|------|
| catggcctg cgggtgacc ttctgceage ctggccagct gagcactcag cacacacage | 3540 |
| cttcateccc aggagggttg aaagccagat gggcacagtg cccacaccag tacttgatgc | 3600 |
| acaagtccc tetgtggccg cagcctcace cctctctct ctgggtgctc ggaatcagac | 3660 |
| ctccagcct ctggaaccag acaattccig ggecctgcag ggtcatgga ttcttccccc | 3720 |
| ggaatcttcc agagtccagt ctgcttaac ctgggggtga aagagtgtct atgttgaaa | 3780 |
| acacccctgg agagccattc agggctgta aacaggcaca tggacctgga catgatgat | 3840 |
| gaagtcagg agtctccacc tggcactaga agtgaccaga gaaagcacga gtaggccctg | 3900 |
| tttggtgat gagggctgg gettgetcat ggtatgggg gcagtgett cctagtgcc | 3960 |
| aggaggtagc cccagagacc agcctgtgic tctctctgc actacacca caggagaagt | 4020 |
| tggactatgt gatcatggca tggatgtgt tgggtcacat gcagcagggg tggggagtca | 4080 |
| ccaagatggg tgggtgccc ggaagtaaaa ccaggetgat tctttaccg tctcttctc | 4140 |
| cctccctgct tcttcccgc agatctggaa tgaactacaag ctgaaatgga acccctctga | 4200 |
| ctatggtggg gcagagtcca tgcgtgtccc tgcacagaag atctggaagc cagacattgt | 4260 |
| gctgtataac aagtaagggt ctggggggcc caegccctct cagggtgctc agcctgggct | 4320 |
| ctgggttttt ggcccactgt gcttaaaacc tggccttctt tggccttttc caagaaggct | 4380 |
| gcattcattt gttcagtcga taggtatgta atcageaac actacatacc aggtaccaga | 4440 |
| gatgttgagg agccacagag agcagcagtg tctgagatgg ctccaagca ggcattgggtg | 4500 |
| ggggaagat ggcattggga aagtttcaag gaagaattgg catttgaagt gaatccfgaa | 4560 |
| gattgtgtag gatctcagga caggagatg gagcagagga gggcccgggg aggcaggaga | 4620 |
| gtatgtcatg ggcagccaag gtgacctcat tggctggact gtgggacata agcctggaaa | 4680 |
| gatccatggg ccaaggacca accccagtgt gtggaggggg aaggetcaga tgcgggggc | 4740 |
| acctggaatg tagcactctg tagcagetct gtgcaaacag acaggaatgg agtaaacggt | 4800 |
| ccctctcac ctgtctttg aaagagaatg aggggtgtgg agaagatcat agcctgggtg | 4860 |
| gcctaagctg tgtagtccca gggttcccag cctgctgact ggcattggtta ccaaggagct | 4920 |
| ttttttttg ggggtgggg gggggaagac tgaacttac tgtcaccag gctggagtgc | 4980 |
| agtgggtgga tctcggtcca cagcaactc cacctctgg gttcaagaaa tctctctgcc | 5040 |
| tcagctccc aagtagctgg gattacagc acgtgctgcc acacctggt aattttgtat | 5100 |
| tttctagtag agatgggggt ttgccatggt ggcaggctg gttttgaact cctgacctca | 5160 |
| agcaatctgt ctgcttggc ctcccaaagt gcgggatta cagcatgagc caccatcccc | 5220 |
| agccccaatg agctttttta aaatacaggt gtttgccag gcattggggtc tgaatgctgt | 5280 |
| aatcccagca ctttgggagg ccgagccagg aggatcactg gaggccagga gttcagagacc | 5340 |
| agcctggcca atataccaaa accccatctc tactaaaaat acaaaaaatt agccaggeat | 5400 |
| ggtggcgtgt gectgtaac ccagctactc cagagctga ggcaggagaa tgccttgaac | 5460 |
| ctggtaggtg gaggtctcag tgaacctgat cacaccctg tactccagcc tgggtgacag | 5520 |
| tgagactccc tctcaaaaa aaaaaaaaa aaaaaataca ggtgcctgaa tcaaaaatat | 5580 |
| tttattctt gttctcact gtctttteta aagttaatat gtattacgtt atccaaaaa | 5640 |
| tctctatacc tctcccagg tcttgcacca cagaaacact gagtcagtgg gcttgggtag | 5700 |
| gcctaggaat ggggtttttc acaaacctgt cctgggggct gctgaaccag cttgctttgg | 5760 |

[0021]

| | |
|--|------|
| ggatccctga tctgcccctt cctgacatt tcacagatga ggactgaggc ccagagtgga | 5820 |
| tgtgtggcac agccaggctt ggggtggtct cagccatcca ctgtgctttt ggggccactg | 5880 |
| tgggcagtgg atgcaggagg ccgatgctgt gatcaggggg ctgagctggg caccaccagcc | 5940 |
| tgtctctgcc tgtgtcccca aacctcttct ctactctccc aacagcaaac ctgccateag | 6000 |
| acagttacce tgcctacacgg tgtaccctgc aggectctct ccactgggaa aaggctctggg | 6060 |
| ccttggagaa aggattgata gcccaccaag tatgtgaagc aaggttccca tgtacagagt | 6120 |
| aggatgagca ttctgggecc cgtgctccca gccctctctg gtggctgcat ccaggtcgtg | 6180 |
| gttgagaagg gtgagtcacg gactaaaaag acttccctgg ctctctgcat cgagagaagc | 6240 |
| tgtctctcag ccagtccttc acagtgggcc acttccagtc tcttatggat ccggaatgtg | 6300 |
| catcttcccg ccagttttgg gaggcctctc ctctttctct ctigcaagg ttcttctct | 6360 |
| gccagacagg tctctctcat catagcactt ccaaaaaccc tccctttctt ctaagtcac | 6420 |
| acaaaactga tacttcccac atttaagctc tttcattgga ctgacataaa ttttagttga | 6480 |
| tattttgcaa tatgctagtt agttctctgg gtattgaaga atatcatttt tgfacctgca | 6540 |
| ttttagagtt aaaatgtttg aatatitaaa ccttttacct ttacatttaa acattttcag | 6600 |
| caaaacagtt gatgtagaat tagcttattc tgattttaat gctaagaata cttctaggtt | 6660 |
| tttaigccat attagtacaa aataatgitt tcttattagt agtattgatt ttacagttag | 6720 |
| tgtcaggact agagaagcta tgttttatac tgaatcccac tttctggtct ctggcaaaaa | 6780 |
| caaaagtggg tctttactca ctctaaagac agtccatggt ttatttactg ttttcccag | 6840 |
| [0022] gaaacacagc acttataaat gtttcttcta tgaatttgi atttgaaac tggctatcaa | 6900 |
| agaactggga cacaatataa actcaacagg cttgcagatt ttttctctt tgcactgaat | 6960 |
| tgtcgtagga atcacatggt tcaaatgctc ttaaggaac tgggcagggt gtagagaatt | 7020 |
| tttgctaagc tacaattaag aaaatgagca aaaagttaa tcttcatggt ttgcgttita | 7080 |
| tagccatttc cttgctggca atcttgagtg aacagctgga gtactgtagg atttatgatt | 7140 |
| ttagcaataa tgagagcgt agcaaaatgt tgcaaaatgg ctgtggagag gagcaaatat | 7200 |
| cataaggaat ttctttgaaa tctgaagetg aaaataacat ttagagaaaa tcatccaact | 7260 |
| catgttctct ctcttctctt agttagaact tcaattgctc aggattcacc ctctgttaag | 7320 |
| gatttctctt ctttttttcc ccccccccc gagatggagt ctactctgt cgccaggct | 7380 |
| ggagtgcagt ggcatgatct gggctcactg caagctccgc ctccctggtt cagccattc | 7440 |
| icctacctca gcctcccaag tagctgggac tacaggcgcc cgcaccaccg cctggctaat | 7500 |
| ttttttgtgg ttttttttgg tttttttttt gtttgtttgc caetgcttta cagttttttt | 7560 |
| ttaaatttta ttattattat acitaaagtt ttaggttaca tgtgcacaat gtgcaggitt | 7620 |
| gttacataig tatacatgtg ccatgttggg gtgctgcacc caittaactg tcatttagca | 7680 |
| ttaggtatat ctccaatgc tatctctccc cctcctcccc accccacaac agtccctggt | 7740 |
| gtgtgatggt ccccttctct tgcctatgtg ttctcattgt tcaattecca cctatgagtg | 7800 |
| ataacatcgc gtgttttggt ttttgcctt gcgatagttt gtgagaaatg atggtttcca | 7860 |
| gtttcatcca tgcctctaca aaggacatga actcatcatt ttttatggct gcatagtatt | 7920 |
| ccatggigtg tatgtgccac attttcttaa tccagtctat ccttgttggg catttgggtt | 7980 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------|
| ggttgcaagt | ctttgctatt | gtgaataatg | ccgcaataaa | catacgtgtg | catgtgtcct | 8040 |
| tataacagea | tgatttatag | tcctttgggt | ataataccag | taatgggatg | gctgggtcaa | 8100 |
| atggtatttc | tagttctaga | tccttgagga | atcggcacac | tgacttccac | aatggttgaa | 8160 |
| ctagtttaca | ctcccaccaa | cagtgtaaaa | ggtttccfat | ttctccacat | cctcgcceag | 8220 |
| afctgtttgt | tctgacctt | tiaatgatcg | ccattctaac | tggtgtgaga | tggtatctca | 8280 |
| ttgtggtttt | gatttgcatt | tctctgatgg | ccagtacga | tgagcatitt | ttcatgtgtt | 8340 |
| ttttggctgc | ataaatgtct | tcttttgaga | agtgctctgt | catatccttc | accactittt | 8400 |
| tgatgggggt | gtttgttttt | ttcttgtaaa | ttgttttgag | ttcattgtag | attctgaata | 8460 |
| ttagcccttt | gtcagatgag | taggtttgta | aaattttctc | ccattttgta | ggttgceigt | 8520 |
| tcactctgat | ggtagtttct | tttctgtgce | agaagctctt | tagtttaatt | agatcccatt | 8580 |
| tgtcaatttt | ggcttttgtt | gccattgctt | ttggtgtttt | agacatgaag | tccttgecca | 8640 |
| tgccatagtc | ctgaatggta | ttgectaggt | ttctctcgag | ggtttttatg | gttttaggtc | 8700 |
| taacatgtta | agtctttaat | ccatcttgaa | ttattttttg | tataagggtg | aaggaagggg | 8760 |
| tccagtttca | gccttctaca | tatggctagc | cagttttccc | agcaaccattt | attaaatagg | 8820 |
| gaatcctttc | ccccattgct | gtttttgtc | aggtttgca | aagatcagat | agttgtagat | 8880 |
| atgtggcggt | atttctgagg | gctctgttct | gttcttttga | tctatatctc | tgttttggta | 8940 |
| ccagtaacct | gctgttttgg | ttactgtagc | cttgtactat | agtttgaagt | caggtagigt | 9000 |
| gatgccctca | gctttgttct | tttgcttag | gattgacttg | gcgatgctgg | ctctgttttg | 9060 |
| gttccatgat | aaactttaag | tagtttttct | caattctgtg | aagaaagtca | ttggtggcct | 9120 |
| gatgggggat | gcattgaate | tataaattac | cttgggcagt | atggccattt | tcacgatatt | 9180 |
| gattcttctc | accatgagc | atggaatgtt | cttccatttg | tttgtatctt | cttttatctc | 9240 |
| attgagcagt | ggtttgtagt | tctecttgaa | gaggtccttc | acatccctct | taagttggat | 9300 |
| tcttaggtat | tttattctct | tigaagcaat | tgtgaatggt | agttcaetca | tgatttggct | 9360 |
| gtttgtctgt | tattggcgtg | taagaatgct | tgtgattttt | gtacattgat | tttgtatcct | 9420 |
| gagactttgc | tgaagttgct | tatcagctta | aggagatttt | gggctgagac | aatggggttt | 9480 |
| tctagatata | caatcatgtc | atctgcaaac | agggacaatt | tgacttctct | ttttcctaatt | 9540 |
| tgaateccctt | tatttccctc | tectgectaa | ttgccctggc | cagaacttcc | aacactatgt | 9600 |
| tgaataggag | tggtgagaga | gggeatccct | gtcttgtgcc | cgttttcaaa | aggaatgctt | 9660 |
| ccagttttgt | cgcaatcagt | atgatattgg | ctgtgggttt | ctcatagaca | gctcttatta | 9720 |
| ttttgagata | catcccatac | atacctaatt | tattgagagt | ttttagcgtg | aagggttggt | 9780 |
| gaatttttgc | aaaggccttt | tctgcateta | ttgagataat | catgtgggtt | ttgtcttttg | 9840 |
| ttctgtttat | atgctggatt | acatttgttg | atttgcata | gttgaaccag | ccttgcctcc | 9900 |
| cagggatgaa | gcccacttga | tcatggtgga | taagcttttt | galgtgctgc | tggatctggt | 9960 |
| ttgccagtat | tttattgagg | atttttgcat | caatgttcat | caaggatatt | ggtctaaaa | 10020 |
| tctctttttt | ggttgtgtct | ctgccagctt | tggtatcagg | aggatgetgg | cctcataaaa | 10080 |
| tgagttaggg | aggatccctt | ctttttctat | tgattggaat | agtttcagaa | ggaatggta | 10140 |
| cagctcctcc | ttgtacctct | gatagaattc | agctgtgaa | ccatctggtc | ctggactttt | 10200 |
| tttggttggt | aagctattga | ttattgccac | aatctcagct | cctgttattg | gctctattcag | 10260 |

[0023]

| | |
|--|-------|
| agattcaact tcttctcggg ttagtcttgg gagagtgtat gtgtccagga atttatccat | 10320 |
| ttcttctaga ttttctagtt tatttgcgta gagttgtttg tagtattctc tgatggtaat | 10380 |
| ttgtatttct gtgggatcgg tgggatatc ccttttatca atttttatg catctattg | 10440 |
| atttctcttt ctgctttatt agtcttgcia gcagtctatc aattttgttg atcttttcaa | 10500 |
| aaaaccagct cctggattca ttaatttttt gaagggtttt ttgtgtctct atttcttca | 10560 |
| gttetgcict gattttagtt atttcttgc tctgtctagc ttttgaatgt gtttgcctt | 10620 |
| gctttctag ttcttttaat tgtgatgta ggggttcaat tttggatctt tcttgccttc | 10680 |
| tcttggggc attttagtct ataaatttct ctctacacac tgccttgaat gcgtcccaga | 10740 |
| gattctggta tgttgtgtct ttgttctcat tggtttcaaa gaacatcttt atttctgcct | 10800 |
| accttctgtt atgtacceag tagtcatcca ggagcagatt gttcagttc catgtagttg | 10860 |
| agtggttttg agtgagtttc ttaatcciga gtcttagttt gattgcactg tggctctgaga | 10920 |
| gacagtttgt tacaatttgt gttcttttac atttgcctgag gagtgcctta ctccaacta | 10980 |
| tgtggccaat ttgggaatag tgtgtgtgtg gtctgaaaa aaatgtatgt tctgttgatt | 11040 |
| tggggtggag agttctgtag atgtctatta ggctccgttg gtccagagct gatttcaatt | 11100 |
| cctgggtate gttgttaact ttgtcttgtt gatctgtcta atgttgcag tggggtgttg | 11160 |
| aagtctccca ttattattgt gtgggagtct aagtctcttt gtaggtctct aaggacttgc | 11220 |
| tttatgaate tgggtctctc tgtattgggt gcctatata ttaggatagt tagctcttct | 11280 |
| tgttgaattg atccctttac cattatgtaa tggccttctt tctctctttt gatctttgtt | 11340 |
| [0024] ggtttaaagt gttttatcag agactaggat tgaacccctt gccttttttt gttttccatt | 11400 |
| tgccttgtag atcttctctc atccctttat ttgagccta tgtgtgtctc tgcgtgtgaa | 11460 |
| atgggtttcc tgaatacage acactgatgg gcttgaactc tttatccaat ttgctagtct | 11520 |
| gtgtctttta attggagcat ttageccatt tacatttaaa gttaatatig ttatgtgtga | 11580 |
| atttggctct gtcattatta tgttagctgg tgattttgct cgttagttga tgcagtttct | 11640 |
| tcctagcett gatggtcttt acattttggtc atgtttttgc agtggctggt accagttgtt | 11700 |
| cctttccatg tttagcgtt ccttcaggag ctcttttagg gcaggcctgg tggatataaa | 11760 |
| atctctcage atttgcctgt ctgtaaagta ttttatttct cctttactta tgaagcttag | 11820 |
| tttggctgga tatgaaattc tgggttgaaa attcttttct ttaagaatgt tgaatattgg | 11880 |
| ccccactct cttctggcct gtagagtatc tgccgagaga tctgtctgta gtctgatggg | 11940 |
| cttccctttg tgggtaacce gacctttctt tctggctgcc cttaacattt tttccttcat | 12000 |
| ttcaactttg gtgaatctga ctattatgtg tcttggagtt gctcttctcg aggagtatct | 12060 |
| ttgtggcatt ctctgtattt cctgaatctg aatgttggcc tgccttgcta gattggggaa | 12120 |
| gttctcttgg ataatactct gcagagtgtt ttccaacttg gttccattct ccccgctact | 12180 |
| ttcaggtaca ecaatcagat gtagatttgg tcttttcaca tagtcccata tttcttggag | 12240 |
| gctttggica tttctattct tttttctcta aacttccctt ctcaattcat tcaatcatt | 12300 |
| tcaatctcca tcaatgatac cttttcttcc agttgattgc atcggtctct gagcttctg | 12360 |
| caatcttcaac glagttctcc agccttggct ttcagctcca tcaatctctt taaggacttc | 12420 |
| tctgcattgg ttattctagt tatccatttg tctaattttt ttttcaactt ttttaacttc | 12480 |

| | |
|--|-------|
| tttgccattg gtttgaattt cctcctgtag cttggagfat tttggtcgtc tggagccttc | 12540 |
| ttctctcaac ttgtcaaatg cattctccgt ccagctttgt tccattgctg gtgaggaget | 12600 |
| atgttccftt ggaggaggag aggtgctctg atttttagag ttccagttt ttctgctctg | 12660 |
| tttttccccc atctttgttg ttttaactac ttttggcttt tgatgatggt gacgtacaga | 12720 |
| tgggtttttg gtgtggatat gctttctgtt ttttagtttt ccttetaaca gacaggacec | 12780 |
| tcagctgcag gctgtttgga gtttgcctaga ggtccactcc agaccctgtt tgcctgggta | 12840 |
| tcagcagcgg tggctgcaga acagcgggtg ctgtagaaca gtggaicttg gtgaccaca | 12900 |
| gatgctgctg cctgactgtt cctctggaag ttttctatca gaggagtacc cggccgtgtg | 12960 |
| aggtgtcagt ctgccccac ttgggggtg tctcccagtt aggtgctctg ggggtcaggg | 13020 |
| accacttga ggaggcagtc tgcctgttct cagatttcca gctgctgctt gggagaacca | 13080 |
| ttactctctt caaagctgtc agacaggaa gtctgcagag gttactgctg tctttttgtt | 13140 |
| tgctctgccc ctgccccag aggtggagcc tatagaggca ggcaggcttc ctgggctgt | 13200 |
| ggtgggctcc atccagttcg agcttcccgg ctgctttgtt tacctaafca aggtgggca | 13260 |
| atggcaggcg cccctcccc agcatcctg ccgcttga gtttgatec agactgctgt | 13320 |
| gctagccatc agcaagaetc cgtgtgtgta ggaccctccg agcaaggtc aggatgfaat | 13380 |
| ctctgtgtgt gccgtttttt aagcccgtt gaaaagtca gtattaggtt gggagtgacc | 13440 |
| cgattttcca ggtgccatct gtcacccctt tctttgacta gaaaggaa ctccctgacc | 13500 |
| ccttgtcttt cccaagtgag gcaatgcctc gccctgcttt ggctcatgca cagtgcctg | 13560 |
| caccactat cctgcaacca ctgcttgcca ctccctagt agatgaect ggtacctcag | 13620 |
| atggaaatgc agaaatcacc catctctgc attgctcatg ctgggagctg tagaccggag | 13680 |
| ctgttctat ttggccattt tggctccacc cgaattttt tgtattttt tagtagcgac | 13740 |
| gggtttcac cgttttagcc aggatggtct caatctctg acttagccag gatggtctca | 13800 |
| atctctgac tttgtgatcc accctcctg gccctccaaa gtgctgggat tacaggtgtg | 13860 |
| agccatcatt cccagccttt ctctgtgat attttgttt ctaaagttca tttgctgaca | 13920 |
| gaactctcag agtattcatg gacctgtat actctgtgtt ctggcaagtt cataattcat | 13980 |
| tgtaaccttt ttagagaata cttttaggta acttggctgg gtgtaaaatt cttggctctt | 14040 |
| ctttatcttc catgaaaatc ttttttttt ttttttttga gacagagctt cactgtgttg | 14100 |
| gccaggtcgg agtgccttgg ctcactgcaa tctctgctc ctgggttcca gctattctcc | 14160 |
| tgcctcagcc tctgagtag ccggattac aggtgtgtgc caccatgcc agctaattt | 14220 |
| ttgtatttt agtagagatg gggtttca atgttggeca ggtgtgtctt aaactctga | 14280 |
| cttcaaatga tctgcccgcc tcagccttcc aaagtctgg gattacaggt gtgagccatc | 14340 |
| acacceagac tgcctgttct tatgtttctt ctggtttct tttttgtgtg tttttgttt | 14400 |
| tgttttgtt tgttttttg agacagactc tcgtggtgce atgatctcag ctactacaa | 14460 |
| getccgctc ccaggctac accattcccc tgcctcagct tcccagtag ctgggactac | 14520 |
| aggtgccac caccacatcc ggetaatttt tttgtattt ttttagtaga gacgggttt | 14580 |
| cactgtgtta gccaggatg tctcgatctc ctgacctgt catcactca cctcggctc | 14640 |
| ccaaagtgtt gggatfacg cctgagcca ccacccctgg cctcttctgg ttttattct | 14700 |
| aaaatgattt tttcttttt cctaatctt tcttaaatc tgcagttct tttacatc | 14760 |

[0025]

| | |
|---|-------|
| tttcatttaa ccaaattate cettatcttt tctgatttct gttctttcac aattttgaaa | 14820 |
| aatttccttag ttctctttca tttaatttgt aatatcagat tategtcage tteatctgct | 14880 |
| tggtggetct aattttgtag ttgctgttat ctgcgtgigt gttaatcag ttactttggt | 14940 |
| ttgtatTTTT ttttttttt ttgagacate ttctgttttt ttgctcttgt taccaagget | 15000 |
| ggagtgeaat ggcattgatct tggctcactg caacctctgc ctctcagatt caagcaattc | 15060 |
| ttctgcctca gccctccaag tagctgggac tacaggtagc tgccaccacg cctagctaaa | 15120 |
| tttttttttg tatttttggg agagacgggg ttccaccatg ttggccaggt tggctctgaa | 15180 |
| ctctgaactt caggtaatcc acctgtctca gccctccaaa gtgctgggat tacaggcatg | 15240 |
| agctgctgta cccagtttgt gttttcttta caatatgttt tcataaaget tctgtctctt | 15300 |
| tgtttaaata gatagccttg ctcttacttt agggcaagtt ctctggggga ataggagaag | 15360 |
| acggtagtta ccttgaggtg ccacttctct caatgcatgg ccacctcccc agctctccca | 15420 |
| gtcatgacac ctctagtcct acatgaccgc acagtcatgg cctctccacg agctgctgcc | 15480 |
| tctggatgct gacttcagtt tctgaacctt ctctctcttc tcatecccae ttcttacct | 15540 |
| gttgagtttg gattctacca taagcagctt ttctctgag tgggtctctg tcttctgaa | 15600 |
| agggaggttt tgggaggcat ttctgacate ctcaagagcc cacgtcagca ctgactgacc | 15660 |
| tctgcagaca ctgagtgat tcccacggga ttttttggg tcttgccac aaattggaac | 15720 |
| ctgtggagcc ctctctgttc cattgttccc ctgctgagg attcagtgca gagtggggtc | 15780 |
| ctctctttt gagggcagc cacttttgg agattctgt gtctggcact cttaggatct | 15840 |
| [0026] taggacatga gaacctctt ttctttccc ccgctgcct ctaccccca gctaatgca | 15900 |
| tgtgggtccc acaggctctg ctgggtggtg tggctgacc gcacactctc atatctgag | 15960 |
| gtctctgta acctaacctt ttgacaatg tgatcagatt tgttattttg ctgctatct | 16020 |
| agttgcccta tttttctgaa gaaatttaga gagattttaa aaacctatgc catcatgac | 16080 |
| ttctcatag ccctcaccac cccacccca ttctgttctt aaatgcccc tctatgatag | 16140 |
| tctacctca gctgatcatt tgcaccata ctacctttc ttttttaat tgcctccat | 16200 |
| ggtttggcag tacattgctc agaccttcc caccaatgt gtccttctt gccagctatc | 16260 |
| tctgggtgtg atattgattg actgagacag aatctcactc tctcaccag gctggagtgc | 16320 |
| agtggtgcca tctcagctca ctgcagcttc cactctctgg gttcaagcaa ttctctgcc | 16380 |
| tcagccccc gagtagctgg gattacaggt gtgcaccacc acctctgct aatttttgta | 16440 |
| tttttagtag agatggggtt ttgtcatggt gaccaggctg gtctcaaaact gctgacctca | 16500 |
| ggtgatctgc ccgctcagc ctcccaaatg attagtatta cagggtgag ccaccacacc | 16560 |
| cagctttcat ttattttttg gtcattctgt aggtcaacaa atatttactg agtgccttt | 16620 |
| atgaggctgg tctgtgcca gaccccagtc tccagctggg tctgcatggt ctgtctctg | 16680 |
| ctagtagaga tatgactgtt gacactgcc caggcagcac acaggccttc tgatctgggt | 16740 |
| ggacacacce caggggtgct gtgggcagca gccacagtga ccaggatccc cagaaatgag | 16800 |
| ccatcagcca agctcagcta acctctagta tatgttcttt gggccatgct acacattct | 16860 |
| gtgtctctc acttggggac ccaagtctg aatggccaag gttctgcat aaactctgtg | 16920 |
| gagctctgag caagtcatc ctgtctttg acctcagtt ttctctttgg caaaatgaag | 16980 |

| | |
|--|-------|
| gtgttgact agagcaggg ctagcaaaig ttttctciaa agggccagag aataaatatt | 17040 |
| ttaggcgttg tgggtcafac agigacggtc acagctattc atctctgccc ctggagctca | 17100 |
| aaagtagcta tagataatgg acaacaaaag gcagtggcac tatcccccc agafittatt | 17160 |
| tacagaaaga ggaccacage ttgccaacco ctggaccaga ccttgggctc tgaagctccc | 17220 |
| ttgccctct gacattitgt tgatccagga tgetgtatgg aattggttca ggagcctct | 17280 |
| gccttctga gggcttttc gacctttgc ttagcccage cctctccagg gccctcagt | 17340 |
| gctaaacaif ggetgagtc acttggggac tgtgtggatg ttcacctca ccccaccctc | 17400 |
| ctacctctcc ctttttctg gagccaggag caggaatact cgtagggaat taagggcatg | 17460 |
| gtggagatga aattggggct aagaatgtat aaactcagca gggcaccatt ggggcaaac | 17520 |
| tagccaacea gaggaaagat agttagtggc ttggcattg agccttcatg ggtaatgatc | 17580 |
| ctgctcaacc gagaccagg agagactagc aaggaagaag cacatgcacc acaacattc | 17640 |
| ccttctgitt tcacaggttc ccatccaatt acagcagcac aaggatafcc ctfaatgitt | 17700 |
| aggctttgtc attgtttaca aggcaaaagga gtatggcagt tgcicccftt ggaggatga | 17760 |
| aatgccitca caagctaag aaacttaaca gggetgatcc gaggaaatgt taagaacctt | 17820 |
| cctgggcagg gccattgttg tggaaagcaac tggccttget ctcatatggc ctcatctggc | 17880 |
| catcgcggat ggaatgacca atgcaagact caacagggat catcagetga ttttctgtc | 17940 |
| aacaaaecaa caagactatt cctagaaaaa cgtacatgtc taagccagg cagtggctca | 18000 |
| agcctgtaat ctacgacctt tgggaggccg aggtgggcag atcacttgag gtcaggagtt | 18060 |
| cgagaccagc ccagccaaca tggcaaaact ccatccctac taaaaataga aaaagtagct | 18120 |
| [0027] gagcgtttgt ggtacatget tataattcca gctactcagg aggetgagca ggagacttgc | 18180 |
| tlgaaccccg ggagacagag attgtatgta gclactgcat tclagccctgg gcaacagagt | 18240 |
| gagactctgt ctcaaagaaa aagaaaaatg ictatttctg tgtgaaaaa aatgtcagga | 18300 |
| tgcacatagt gaaaaggaag ggagaagaaa catggggaga aaatgggat agggacacag | 18360 |
| aaagtgaaga aacctgttag gctgaattcg aaagacaagg aagcaaaaca tgattatgt | 18420 |
| aaaacagtac tgggaagaat ggggttggg aggttacagg gaatggtcaa atcaggatcc | 18480 |
| agagataggg ttfgnaagta aatccatctg acaaggttcc gtttaaitgg ggtgactcc | 18540 |
| cctgggttgt ctgtgcagcc cttccacat ccatagtctg gtttcaaca cacattagcc | 18600 |
| gcccgttaca gactgaatga ggagagggcc aagcctcagg gacctgggt gcaataat | 18660 |
| cccaaaggct gcttcagcac ctggctccag gaggatgacc ttccctccat ttcttaatt | 18720 |
| aaagggggac caatcctctt cgggcatttg ggagtctatc agtttgggac ctgtattgtg | 18780 |
| ggatgaactg gtggcctgcc ctggggcagg gagtgatcca tctctcagat tgttgttggg | 18840 |
| gaggagcctt gggcctcagt atccctgttg gtaaatgggg ccaggaaaatg ggtgacctt | 18900 |
| tatggcactt tagctctcat ctccagtc cttccaaatc attacttact gtgagaaget | 18960 |
| ggttgagatg accacaatat gaccaagtgt taatgacctg gtgtcacigt gcccccctt | 19020 |
| tgtctttgca gtgtgttgg ggatttcag gtggacgaca agaccaaagc ctactcaag | 19080 |
| tacactggg aggfgaactg gatacctccg gccatcttta agagetctcg taaaatcgac | 19140 |
| gtgacctact tcccgtttga ttaccaaaac tgtaccatga agttcggttc ctggctctac | 19200 |
| gataaggcga aaatcgatct ggtcctgatc ggctcttcca tgaacctcaa ggactattgg | 19260 |

| | | |
|--------|---|-------|
| | gagagcggcg agtgggceat catcaaagcc ccaggctaca aacacgacat caagtacaac | 19320 |
| | tgctgcgagg agatetaecc cgacatcaca tactcgtgt acatccggcg cctgcccttg | 19380 |
| | ttctacacea tcaaccicat catccctgc ctgcicactt ccttctcac tgtgetcgtc | 19440 |
| | ttctacetgc ectecgactg cggtgagaag gtgacctgt gcattttgt cctctctcc | 19500 |
| | ctgacgggtg ttctcctgt gatcaetgag accatccctt ccacctgct ggtcaccce | 19560 |
| | ctgattggag agtacctctt gttcaecatg atttttgtaa ccttctcat cgtcaccce | 19620 |
| | gtctcgtgc tcaactgtca ctacagaacc ccgacgacac acacaatgcc ctcatgggtg | 19680 |
| | aagactgtat tcttgaacct gctccccagg gtcatttca tgaccaggcc aacaagcaac | 19740 |
| | gaggccaacg ctcagaagcc gagggccctc tacggtgceg agctctcaaa tctgaattgc | 19800 |
| | ttcagcccg cagagtccaa aggctgcaag gagggctacc cctgccagga cgggatgtgt | 19860 |
| | ggitactgac accaccgag gataaaatc tccaattca gtgctaacct cacgagaage | 19920 |
| | tctagtctg aatctgttga tgcgtgctg tccctctctg ctttctacc agaaatcaaa | 19980 |
| | gaagccatcc aaagtgtcaa gtatatgct gaaaatatga aagcacaaaa tgaagccaaa | 20040 |
| | gagtaagga tatggctttt attacattgg tcatcttcc attcaacaaa tatttatggg | 20100 |
| | ttctctgtg ggcaaggcat agggtagggg gtttaagaat tgcctctctg agtcagtggc | 20160 |
| | ctgtgttaag accagttata tgcctctggg tatgttacct caectctctg agcctgtttt | 20220 |
| | ctctctgta aatgggatg ataaagcttg gtatgtgta ccttgaagct agccaccagg | 20280 |
| | ctgccagcag gctggcaggc tggaccatga aaacacctga tgccaataga ctagattagg | 20340 |
| [0028] | atgtaggctg gaaaagggca tggggccaga tgatctccag ttagtattgg ttaattgagg | 20400 |
| | ttatattttt atttttattt attttttga gacagggtcc tgcctctctg cccaggtgg | 20460 |
| | agtcagctg cgcaactctg gctcaetgca acttccgctt cccagctcaa gcgattctcc | 20520 |
| | cacctcagtt tcccagtag ctggaactac agatgcccgc ccaccatacc ctaatttttt | 20580 |
| | tgtaccgatg gggttttgcc atgttgccca ggttggctc agactcctcg actcaatctg | 20640 |
| | ctcacctcag tctcccaaaa tgcctggact acaggcatga gccaccgcac ctggccttta | 20700 |
| | tttttacttt ctaattgtat atgtgttctc actgaggaag aatttacgtg gagtaaagtg | 20760 |
| | cacacctctt cagtgtacat ctcaatgagt ttttacctca tgtatacaac catgtaacca | 20820 |
| | agaccagggt aaagatatag aacactccca gggcccctag aaagtcccc aatgcccctg | 20880 |
| | ccagtcagtg tctccctccc tgcctggtag ccaccatctt ggcttagcgc cagtggctca | 20940 |
| | cgctgtaat cctagcactt taggaggctg aggcaggtgg atggcttgag atcaggagtt | 21000 |
| | tgagaccagc ctgggaaaca tagcgaacc ccgtctctaa cagaaataca aaaattagcc | 21060 |
| | aggcgtgggt gcacgtgcct gtagttccag ctactcagga ggctgagggt agaggateac | 21120 |
| | tggagctcag gaagcttagt gagctgtgat caigccactg cactccagcc tgggtaacag | 21180 |
| | agtgaagtcc tttctttaat taattaatta atttttttaa aaaccattat actgaattat | 21240 |
| | tigataatig attagtttta cctatttttt ttttttttg agatggagtc ttgctctgic | 21300 |
| | accagaatg gagtgacgta gtacaatctc tgcctactgc aaacctctgt tcccagggtc | 21360 |
| | aagtgatcca catgectcag cctcccaagt gcttgggact acaggtaccc gcccgetacc | 21420 |
| | atgectaat ttttgtattt ttaatagaga ggggattttg ccatgtttgt caggettggtc | 21480 |

| | | |
|--------|--|-------|
| | ttgaactccc gacetcaggt gatctgcccg ccttggcctc ccaaagtget aggattaaag | 21540 |
| | gtgtgatcca ccacacetgg cctttigagc cctcagaaga acatttatcc ataaacattc | 21600 |
| | ttgagaagge atgccanatan gaagaganaat aatccaggg ggctacaaag gagaggagga | 21660 |
| | aagcctcagg ctccaccagt caatgggcag ctcaattctc tgcacttccc tttagccagg | 21720 |
| | ctctgctggg cttgtgaggg acccctgaa cctgcatctc tgggctggga gtggcaggct | 21780 |
| | aaagagcaca agtggcaggg gaacaaagat ctccctagct ctcccctcca ccaagcccct | 21840 |
| | ccccctgcca gcccagctc ctggccacac ctccccagtt ctctggctct laaagtagtc | 21900 |
| | ttctcatgct tctgggccag ctctcaattt gggetagttc accactttgc ctaacatctg | 21960 |
| | tgaetcatca gaaaatggcc aatafcattg tgccttaaag actttaggag ctgatataa | 22020 |
| | gccaggcaca gtggcttaca cctgtaatcc aacctttgg gagccaagg caggaggatc | 22080 |
| | acttgagccc aggagttcaa aaccatcctg ggccacgtag ggaaaccctt tctctacaaa | 22140 |
| | aaaaatttaa aatcagccc aggtgcagtg gctcagcct gtaatccca cactttggga | 22200 |
| | ggccgaggca ggtggatcac ctgaggttgg gattcaaga ccagcctgga caacaatggt | 22260 |
| | gaacctccat ctctactaaa aatacaataa attaacggg ggggtggtgt gcatgagcc | 22320 |
| | tgtaatctta gctactcggg agtctgagc acaagaattg ctgaaactcg ggagacagag | 22380 |
| | gttcagtgta gccaaatca caccactgga ctccagccta ggtgacagag tgagactccg | 22440 |
| | tttcaaaaaa aaaaaaaaaa tgccgggtgc agtggctgac gectcaatc ccagcacttt | 22500 |
| | gggaggctgg ggcaggtgga tcacctgagg tcaggagttt gagaccagcc tggccaacat | 22560 |
| | aaaaccccat ctctactaaa tacaanaatt agctgggcat ggtgctaggc acctgtaatc | 22620 |
| [0029] | ccagctactc aagaggctga ggcaggagaa ttgcttgaac ctgggaggtg gagettgcag | 22680 |
| | tgaggcgagg tcaitgceact gcactccagc etgggcgtct caaaaaacaa aaaattgccc | 22740 |
| | aagtgtagt acacacacct gtagttccag ctactcagga agctgagtg ggaagattac | 22800 |
| | ttgagcccgg gaggtcaagg ctgcagcaag ccatgattgc acccctgcac tccagcttga | 22860 |
| | gcaacaaage aagaccctgt ctcaaaaaa aaaaaaagat ataaaatttc tgtccagcca | 22920 |
| | gctcttttg caccactatt tctatctatg tataaaacce aagtgtcate tttctctatg | 22980 |
| | aggcttgagt aagggtcatt ttataaatac acattagtat cactaggctc tattcattaa | 23040 |
| | ggactctgtt ctgaacaag cttctgaggg aagtactgtt cttatccca ttttacagat | 23100 |
| | aaggaaattg aggctaagag cggctcatgga atttaccag attctcaca ctcaaaagga | 23160 |
| | gcagagctgg gattctaatc agttgtctc caagtctctg cttttccca cctctgcctc | 23220 |
| | ctagagcctt aggaggtggc tggtaggggg tggtaggaa tctcacatct caaggtgtat | 23280 |
| | ctgaagcaca cacaaccag tcttagaat tcaaatgaag taccctatgg caaatatgca | 23340 |
| | atcataatc taattttacc taigacagta gtgtcaccaa gagaacacat ttactcaggc | 23400 |
| | tcacaatggt gatgtaaaat ctccatctcc cagcgcatt tcagtatact tataataaag | 23460 |
| | aggcagcatg taatttatta atttcattat tgcctcaaaa tcagetgact catgggttct | 23520 |
| | ctcaattcaa ttatggcttc tttgctttct gaattgtcta ggagfataat tacaatttcc | 23580 |
| | cttctattt caagccaaa ttgaagctgt attatataca attggtcttg cttttctcc | 23640 |
| | catcttttac ttatttgtea gcaattattt ctgatgttca acctgctctc caactgcaca | 23700 |
| | gtateccatg atactttggt cttatgagta aaaatgactt ttgatcagct gggcatcgtg | 23760 |

| | |
|--|-------|
| gagagggcag tggggaggga aagagtgatg aggatggact tgcctgata acgettatct | 23820 |
| catttttggg acagatgta aaaggaaatt tattttgttg ttttgagac agggctctgc | 23880 |
| tcigtgtccc aggcctggagt gcagtgccgt gatctctgct cactgcaacc tcegectccc | 23940 |
| gggttcaaga aattctcatg cctcagcctc ccaagtagct ggggattaca ggeatgtgcc | 24000 |
| accactcctg gccaaatfff gtatffffg tagagacagg gtttcaacag ggfttcacca | 24060 |
| tgttgccag gctggctca aactcctgac ctgagggat ctcagectcc caaagtgetg | 24120 |
| ggattacagg cgtgagccac tgcgcaaat ttatatetaa aactggatag agtactttga | 24180 |
| aacaatggta gattatattg gactatatta gccattetaa ccaaggccca gaatcctgcc | 24240 |
| atggaagcct aagtaactgg tttcactaac ttataaaaat tggaaatcag tttagaaaaa | 24300 |
| ctaggttatg catttttagg aaactctga tttgaaacag atctaacatg acagatcttt | 24360 |
| tatacctgtt tctctctgc ataaacagaa acttgagaat ggtggatttc ctcagaccac | 24420 |
| atcaattagg aaaaaaggg cttcttcat attagagaca aaatgcttc tactgcaacg | 24480 |
| tgttgattac atcttcagta ttgaaatgt attcatttgc ctttcccctc atgttttttt | 24540 |
| tcttttata ttttgtttg cagattcaag atgattgga gtatgttgc atggtgattg | 24600 |
| atcgtatfff tctgtgggtt ttcacctgg tgtcattct agggacagca ggattgttcc | 24660 |
| tgcaaccctt gatggccagg gaagatgat aagcactaag ctgtgtcctt gctgggaga | 24720 |
| cttcttctg tcagggcagg agggagctgc ttctagtaa gaactgactt tctgttata | 24780 |
| agctaccagc tttgtttttg gcattctgag gtttacttat tttccactta tcttggaatc | 24840 |
| [0030] atgcaaaaa aaaaatgca agagtattta ttaccgataa atgaacattt aactagcctt | 24900 |
| tttggtatgg taaagagatg tcaaaaatgt attctatgtg attagtatgc tatgctatgg | 24960 |
| aatatatacg taaaaatgtt tctttttagt tgttgaaca aaactggata gaaaaatget | 25020 |
| gttcagaaat atgaaaagtc attcagttaa cactacagat ctcccagtaa ittttcttat | 25080 |
| ttagcccata atctctttga aggtttatac taattcagca atcccacatc gttaccatt | 25140 |
| tcttaccatg catttctctg tctttactgg gtctaaaggg ctatgctccc atttcagaga | 25200 |
| gcttcaacta cttctcttgc atacttctaa attataccat gagaaatcat gcttagttat | 25260 |
| tcattgttaa tataactgtc ttagtacacc ataaactggg tggattataa acaacagaaa | 25320 |
| cttctcagtt ttggaggttg ggaggctcaa ggtcaaggca ccagcaaatf tgggtctctg | 25380 |
| tgagggctct cttctcaaa ggtgccttc tagctgtgtc ctcacatgac tgaagggact | 25440 |
| agetatctct gtgggtctta ttttataagg gactaacc cttcatgag agcagagccc | 25500 |
| ccatggccta atcaccitc caaggcccca cttctatct aagacaatca cgtgggaat | 25560 |
| aggtttcaac atatgaattg gggaggaca catttggacc acagcatgaa cttttagaac | 25620 |
| agggtttctc agccttagca ctatggacat tttggctgg ataaatatgt gttgttacag | 25680 |
| aatgggggta tccigtgat ttaggatct ttagcagtac cctagectca actcactaga | 25740 |
| tgcaatgac ataccttct tcttaccag ttatgataac caagaatgct tccattgtta | 25800 |
| aatgttccct taggagcaaa attgcccctg gttgagaaac attgctttag acaaattgtt | 25860 |
| aagagtatac tgtaetacac tctgaaaact taacgtgatc atcaceactg acagatgatt | 25920 |
| cacagagact gtttgaatct tgtctcaact gtttttctg tgcaaaaata aaatggacag | 25980 |

| | |
|--|-------|
| aattgcagcc cgetgtgact caigtctcaa taagtcaaaa gaaagatgtc gataaaaatt | 26040 |
| tatataataa aatcataagt aacagtaag gtagtataag agggatcagg gatgtatagc | 26100 |
| aactaaggta ggtagctggc aggcaatcta aatccatcac accagccttt cactcattaa | 26160 |
| atggcattaa acacctgect acgattaaat gcaaattaga tagggctccc tccgccitcc | 26220 |
| aaagagcatt ggcttgaact tagataggtt acitattata aataaatgag gtgtttgtga | 26280 |
| tctcaacagc taagagtctt aaattgaacg agggttctct tcaagtgttg ctacctggtc | 26340 |
| acacctgaag tggtagacatt tagagatgga atttaactgt ttttaactgtg atacattata | 26400 |
| ctgtactaaa tcattttacg tgiactagta ataggctaag attgattaca tctaaaggcc | 26460 |
| cttgcaactc taagattcta ttattgtaat tgttagaatg aaggagagaa aactgaaata | 26520 |
| ttacagggat ataacagtgt gcatatacca aattagaata ctgtgtttca tattagaaga | 26580 |
| ttgttttctc acagaatgat tttagaccan atatgtttga gacagagttt tgctcttgtt | 26640 |
| gccagctgg agtgcaatgg cgcagctctg gctcactgca gcctccaect cccaggttca | 26700 |
| agcgattctc ctgectcagc ctcttgagta gctgggacta caggcgcctg ctacctgcc | 26760 |
| cgactaattt ttgtattct tagtagagac gggccttcae catgttggc aggetagtct | 26820 |
| cgaactccta acctctggcg atccaectgc ctccagctcc caaagtgett ggattacaga | 26880 |
| tgtgagccac tgcctccggc cctaaatag ttttttaaat ggggttcatg taattgtagt | 26940 |
| ggactgacta ttctaagatc aaggataaag agatactacc acaatttata tagaagatgg | 27000 |
| ttctattaat tgtgggaaat gtggacaaga ggactgaaat taatgttaag gatatgctac | 27060 |
| tgcgtgtcca caggagtgtt ctactgtatg accttacagt ggaagctaaq ctacagaaat | 27120 |
| [0031] agttaacaca ataattaagc atctaaagaa taaagtaagc cttaaaggag ttcccaattc | 27180 |
| ctgttttca tttatttita aaatgttggg taiggaanaag cagcagcaca itaagtgtt | 27240 |
| gttattatta ttatttgaga ctgagtittg ctcttgttgc ccaggctgga gtgcaatgga | 27300 |
| gtgactcag ctaccgccaa cctccgccac ctgggttcaa gcgattctcc tgccgcagcc | 27360 |
| tcccaggtag ctgggattac aggtgtgcac caccacctg gctaatttca tatttttagt | 27420 |
| agagacgggg ttctccacg ttggtcagge tggctctgaa ctccaacct caggtagaac | 27480 |
| gccaccctcg acctccaaa gtgctgggat tacagggtg agccaccgtg cccggccaca | 27540 |
| ttaaagtaatt attatataca gcatcacatt aagtaattat atcaagtagt cagcttttta | 27600 |
| aatatagcag tataatatta tattaaagat tagctgttac tcaagttagta caggaaagtt | 27660 |
| tacataccct taccnaatgc agaaaagttt taaaatcagt ctccaatac aactggaatt | 27720 |
| ctccagcaca gtcnaaggat gaactttact gttgattata aattaglatt alltgccagg | 27780 |
| atacaatac tagattttc actagaccag ttccagataat attttgctat ttttacaaga | 27840 |
| tcaaatgtat ctcateagtt attacttcag tcatacagcc aactgttcaa atggatcctc | 27900 |
| tgttaacata aattgaggtt agcaacttag tctgttaaag cttgcacfaa atttaacaca | 27960 |
| taacttcatc ttccataatt ttataggtgc catcagatat atgtgtgta actaaatgta | 28020 |
| taactcagtc ccttgggagg ctccacttat ttgcatttcc aatatgaact ggtattaata | 28080 |
| tatttgccca tttataaata acaggaacaa aaagcccaag agatccaaca attgaaacga | 28140 |
| aaagaaaagt ccacagaaac atccgatcaa gaaactgggc tatgaatttc caatcttcaa | 28200 |
| caacctgtta ggaaaaaat aaaaatgcat taataattg taaa | 28244 |