(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114729355 A
(43)申请公布日 2022.07.08

(21)申请号 202080057853.2
(22)申请日 2020.06.19
(30)优先权数据
62/864,988 2019.06.21 US
62/871,356 2019.07.08 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/038703 2020.06.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/257631 EN 2020.12.24
(71)申请人 奎里斯公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 S.辛克利 D.布朗 S.阿加瓦尔 D.埃尔鲍姆
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 易方方
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

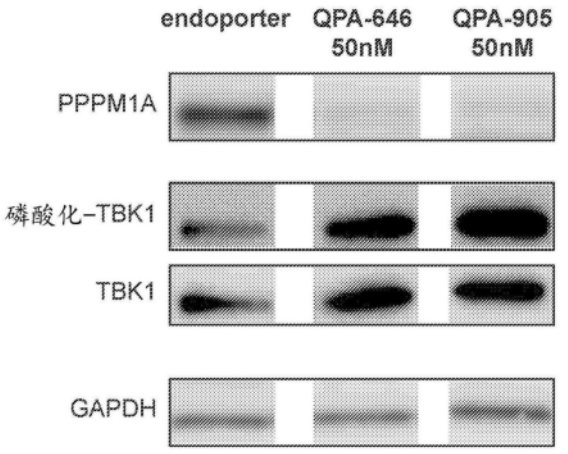
权利要求书13页 说明书128页 附图43页

(54)发明名称

PPM1A抑制剂以及使用其的方法

(57)摘要

本文公开了PPM1A的抑制剂,包含PPM1A反义寡核苷酸序列,以及用于治疗与TBK1的活性或表达降低相关的神经疾病(如肌萎缩侧索硬化和额颞叶痴呆)的方法。还提供了包含PPM1A抑制剂的药物组合物,所述PPM1A抑制剂包含PPM1A反义寡核苷酸,其用于治疗神经疾病,以及用于治疗神经疾病的包含所公开的PPM1A抑制剂(例如,PPM1A反义寡核苷酸)的药物的制备。



Western印记

CN 114729355 A

1.一种包含寡核苷酸的化合物,所述寡核苷酸包含具有核碱基序列的连接的核苷,所述核碱基序列与从SEQ ID NO:1的至少核苷酸41,932至核苷酸42,787和从核苷酸44,874至核苷酸44,990转录的转录物的等长部分至少90%互补,其中所述连接的核苷的至少一个核苷键是非天然键。

2.一种寡核苷酸,其包含具有核碱基序列的连接的核苷,所述核碱基序列与从SEQ ID NO:1的至少核苷酸41,932至核苷酸42,787和从核苷酸44,874至核苷酸44,990转录的转录物的等长部分至少90%互补,其中所述连接的核苷的至少一个核苷键是非天然键。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的寡核苷酸,其中从SEQ ID NO:1的核苷酸41,932至核苷酸42,787和从核苷酸44,874至核苷酸44,990转录的转录物包含SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866的任一序列。

4.一种包含寡核苷酸的化合物,所述寡核苷酸包含具有核碱基序列的连接的核苷,所述核碱基序列与同SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866具有至少90%同一性的转录物的等长部分或与SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866的连续15至50个核碱基部分至少90%互补,其中所述连接的核苷的至少一个核苷键是非天然键。

5.一种寡核苷酸,其包含具有核碱基序列的连接的核苷,所述核碱基序列与同SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866具有至少90%同一性的转录物的等长部分,或与SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866的连续15至50个核碱基部分至少90%互补,其中所述连接的核苷的至少一个核苷键是非天然键。

6.根据权利要求4或权利要求5所述的寡核苷酸,其中所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分,其与SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959任一个的等长部分具有至少90%同一性。

7.根据权利要求4-6中任一项所述的寡核苷酸,其中所述核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分,其与SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959任一个的等长部分具有至少90%同一性。

8.根据权利要求4-6中任一项所述的寡核苷酸,其中所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分,其与SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的等长部分具有至少90%同一性。

9.根据权利要求4-6中任一项所述的寡核苷酸,其中所述核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分,其与SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的等长部分具有至少90%同一性。

10.根据权利要求4或权利要求5所述的寡核苷酸,其中所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分,其与SEQ ID NO:2864的位置457-1410的任一个内的核碱基的等长部分至少90%互补。

11.根据权利要求4-5或权利要求10中任一项所述的寡核苷酸,其中所述核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分,其与SEQ ID NO:2864的位置457-1410的任一个内的核碱基的等长部分至少90%互补。

12.根据权利要求4-5或权利要求10中任一项所述的寡核苷酸,其中所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分,其与SEQ ID NO:2864的位置542-814、895-1006、1025-

1117或1361-1407的任一个内的核碱基的等长部分至少90％互补。

13.根据权利要求10-12中任一项所述的寡核苷酸，其中所述核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的位置542-814、895-1006、1025-1117或1361-1407的任一个内的核碱基的等长部分至少90％互补。

14.根据权利要求10或权利要求12所述的寡核苷酸，其中所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的部分542-561、555-574、559-578、599-618、602-621、603-622、604-623、605-624、606-625、607-626、608-627、609-628、625-644、642-661、644-663、646-665、648-667、650-669、652-671、655-674、656-675、708-727、709-728、794-813、795-814、895-914、900-919、905-924、910-929、915-934、962-981、967-986、972-991、977-996、987-1006、1025-1044、1030-1049、1034-1053、1040-1059、1045-1064、1098-1117、1361-1380、1366-1385、1371-1390、1378-1397和1386-1405的任一个内的核碱基的等长部分至少90％互补。

15.根据权利要求10-14中任一项所述的寡核苷酸，其中所述核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的部分542-561、555-574、559-578、599-618、602-621、603-622、604-623、605-624、606-625、607-626、608-627、609-628、625-644、642-661、644-663、646-665、648-667、650-669、652-671、655-674、656-675、708-727、709-728、794-813、795-814、895-914、900-919、905-924、910-929、915-934、962-981、967-986、972-991、977-996、987-1006、1025-1044、1030-1049、1034-1053、1040-1059、1045-1064、1098-1117、1361-1380、1366-1385、1371-1390、1378-1397和1386-1405的任一个内的核碱基的等长部分至少90％互补。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含选自以下的至少一个核苷键：磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、次膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如，包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3’氨基核糖或5’氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键键和硼磷酸键键，或其任何组合。

17.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸，其中所述核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。

18.根据权利要求17所述的寡核苷酸，其中所述硫代磷酸酯核苷间键处于Rp构型或Sp构型之一。

19.根据权利要求1-18中任一项所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含一个或多个手性中心和/或双键。

20.根据权利要求19所述的寡核苷酸，其中寡核苷酸以选自几何异构体、对映异构体和非对映异构体的立体异构体形式存在。

21.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸，其中所述核苷酸序列的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

22.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核碱基。

23.根据权利要求22所述的寡核苷酸,其中所述至少一个修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶或5-甲氧基尿嘧啶。

24.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个具有修饰的糖部分的核苷。

25.根据权利要求24所述的寡核苷酸,其中所述修饰的糖部分是以下之一:2'-OMe修饰的糖部分、双环糖部分、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限乙基2'-4'-桥接核酸(cEt)、S-cEt、己糖醇核酸(HNA)和三环类似物(例如,tcDNA)。

26.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个具有修饰的糖部分的核苷。

27.根据权利要求26所述的寡核苷酸,其中所述修饰的糖部分独立地是以下之一:2'-OMe修饰的糖部分、双环糖部分、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限乙基2'-4'-桥接核酸(cEt)、S-cEt、己糖醇核酸(HNA)和三环类似物(例如,tcDNA)。

28.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含10个2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)核苷。

29.根据权利要求28所述的寡核苷酸,其中所述2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)核苷的5个位于所述寡核苷酸的3'末端,和其中所述2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)核苷的5个位于所述寡核苷酸的5'末端。

30.根据权利要求24-29中任一项所述的寡核苷酸,其中至少一个具有修饰的糖部分的核苷或者具有修饰的糖部分的核苷是核糖核苷。

31.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个脱氧核糖核苷。

32.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个脱氧核糖核苷。

33.根据权利要求1-17中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含:

e.间隔区段,其包含连接的脱氧核糖核苷、2'-氟代阿拉伯糖核酸(FANA)和氟代环己烯基核酸(F-CeNA)的一种或多种;

f.5'翼区,其包含连接的核苷;和

g.3'翼区,其包含连接的核苷;

h.其中中心区域包含至少8个连续核碱基的区域,其与位于5'翼区段和3'翼区段之间的SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863或SEQ ID NO:2868-2959的任一个的等长部分具有至少80%同一性;其中所述5'翼区和所述3'翼区分别包含至少两个连接的核苷;和其中每个翼区的至少一个核苷包含修饰的糖。

34.根据权利要求33所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区的所述至少两个连接的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键连接和/或其中所述3'翼区的所述至少两个连接的核苷独立地通过硫代磷酸酯核苷间键连接。

35.根据权利要求33或权利要求34所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区的每个核苷间键和/或所述3'翼区的每个核苷间键独立地是硫代磷酸酯核苷间键。

36.根据权利要求33或权利要求34所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区还包含至少一个磷酸二酯核苷间键。

37.根据权利要求33或权利要求34所述的寡核苷酸,其中所述3'翼区还包含至少一个磷酸二酯核苷间键。

38.根据权利要求33所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区的所述至少两个连接的核苷通过磷酸二酯核苷间键连接和/或其中所述3'翼区的所述至少两个连接的核苷独立地通过磷酸二酯核苷间键连接。

39.根据权利要求33-38中任一项所述的寡核苷酸,其中所述中心区域的至少一个所述核苷间键是磷酸二酯键。

40.根据权利要求39所述的寡核苷酸,其中所述中心区域的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个或至少九个所述核苷间键是磷酸二酯键。

41.根据权利要求33-38中任一项所述的寡核苷酸,其中所述中心区域的至少一个所述核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

42.根据权利要求41所述的寡核苷酸,其中所述中心区域的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个或至少九个所述核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

43.根据权利要求33-34或权利要求41-42中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的所有核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

44.根据权利要求33-43中任一项所述的寡核苷酸,其中所述硫代磷酸酯核苷间键的任一个或全部是处于Rp构型、Sp构型中或者Rp和Sp构型的任何组合中。

45.根据权利要求33-44中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个修饰的糖部分。

46.根据权利要求45所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区或所述3'翼区包含至少一个修饰的糖部分。

47.根据权利要求45所述的寡核苷酸,其中所述中心区域包含至少一个修饰的糖部分。

48.根据权利要求45-47中任一项所述的寡核苷酸,其中所述至少一个修饰的糖部分是以下任一个:2'-OMe修饰的糖部分、双环糖部分、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限乙基2'-4'-桥接核酸(cEt)、S-cEt、己糖醇核酸(HNA)和三环类似物(例如,tcDNA)。

49.根据权利要求45-48中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含一个或多个2'-MOE核苷。

50.根据权利要求49所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区或所述3'翼区包含一个或多个2'-MOE核苷。

51.根据权利要求49或权利要求50所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区或所述3'翼区包含两个、三个、四个或五个2'-MOE核苷。

52.根据权利要求51所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区或所述3'翼区的每个核苷是2'-MOE核苷。

53.根据权利要求49所述的寡核苷酸,其中所述中心区域包含一个或多个2'-MOE核苷。

54.根据权利要求53所述的寡核苷酸,其中所述中心区域包含两个、三个、四个、五个、

六个、七个、八个、九个或十个2'-MOE核苷。

55.根据权利要求54所述的寡核苷酸，其中所述中心区域的每个核苷是2'-MOE核苷。

56.根据权利要求49-55中任一项所述的寡核苷酸，其中所述一个或多个2'-MOE核苷通过硫代磷酸酯核苷间键连接。

57.根据权利要求33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含以下任一模式的糖修饰：eeeee-d10-eeeee、eee-d8-eee、eee-d10-eee、eeee-d10-eeee和eeee-d8-eeee，其中e＝2'-MOE核苷和d＝脱氧核糖核苷。

58.根据权利要求57所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含以下任一模式的核苷间键：ssssssoooooooossssss；ooooossssssssssooooo；ooooooooooooooossssss；soossssssssssssssss；sssssssssssssssssoos；sssssooooooooooooo；sssssssssssssssssss；sssooooooooooss；soossssssssos；sossssssssss；sssssssssssos；sssssssssssooo；ooossssssssss；sssooooooooooss；ooossssssssssooo；sssssssssssssss；sssssssssssssooo；ooossssssssssss；sossssssssssssos；sossssssssssssss；sssssssssssssos；ssssooooooooooss；ooooossssssssssoooo；sssssssssssssssss；sssssssssssssoooo；soossssssssssssoos；soossssssssssssss；sssssssssssssssoos；ooooossssssssssss；ssssooooooooss；ooooossssssssoooo；sssssssssssssoooo；ooooossssssssssss；soossssssssssoos；soossssssssssss；sssssssssssssoos；或sssssssssssssss；其中s＝硫代磷酸酯键，和o＝磷酸二酯键。

59.根据权利要求57或权利要求58所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸分别包含以下任何模式的糖修饰和核苷间键组合：ssssooooooooossss

a)eeeee-d10-eeeee和sssssooooooooossssss；

b)eeeee-d10-eeeee和ooooossssssssssooooo；

c)eeeee-d10-eeeee和sssssssssssssssssss；

d)eee-d8-eee和ssssooooooosss；

e)eee-d8-eee和ooossssssssooo

f)eee-d8-eee和sssssssssssss；

g)eee-d10-eee和ssssooooooooosss；

h)eee-d10-eee和ooossssssssssooo；

i)eee-d10-eee和sssssssssssssss；

j)eeee-d10-eeee和ssssooooooooossss；

k)eeee-d10-eeee和ooooossssssssssoooo；

l)eeee-d10-eeee和sssssssssssssssss；

m)eeee-d8-eeee和ssssooooooossss，

n)eeee-d8-eeee和ooooossssssssoooo，

o)eeee-d8-eeee和sssssssssssssss，

其中e＝2'-MOE核苷和d＝脱氧核糖核苷，和其中s＝硫代磷酸酯键，和o＝磷酸二酯键。

60.根据权利要求33-59中任一项所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核碱基。

61.根据权利要求60所述的寡核苷酸,其中所述5'翼区或所述3'翼区包含所述至少一个修饰的核碱基。

62.根据权利要求60所述的寡核苷酸,其中所述中心区域包含所述至少一个修饰的核碱基。

63.根据权利要求60-62中任一项所述的寡核苷酸,其中所述至少一个修饰的核碱基是5'-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶或5-甲氧基尿嘧啶。

64.根据权利要求60-63中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述5'翼区或所述3'翼区中的每个胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶。

65.根据权利要求60-64中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述中心区域中的每个胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶。

66.根据权利要求33所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含以下糖修饰和核苷间键组合:

eeeee-d10-eeeee和sssssssssssssssssss,其中e=2'-MOE核苷和d=脱氧核糖核苷,和其中s=硫代磷酸酯键,

其中所述2'MOE核苷的每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

67.根据前述任一项权利要求所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸还包含缀合物部分。

68.根据权利要求67所述的寡核苷酸,其中所述缀合物部分是位于所述寡核苷酸的3'末端的胆固醇缀合物。

69.一种药物组合物,其包含权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的赋形剂。

70.一种在有需要的患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物。

71.根据权利要求70所述的方法,其中所述神经疾病选自以下:肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

72.一种在细胞中增加自噬的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。

73.一种在细胞中增加TBK1 ser172磷酸化的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。

74.一种在细胞中增加TBK1功能的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。

75.一种在细胞中抑制PPM1A的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。

76.一种在细胞中抑制RIPK1活性的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。

77.根据权利要求72-76中任一项所述的方法,其中所述细胞是需要治疗神经疾病的患

者的细胞。

78.根据权利要求77所述的方法，其中所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

79.根据权利要求72-75中任一项所述的方法，其中所述暴露在体内或离体进行。

80.根据权利要求72-79中任一项所述的方法，其中所述暴露包括向有此需要的患者施用所述PPM1A抑制剂。

81.根据权利要求72-80中任一项所述的方法，其中所述PPM1A抑制剂通过局部、胃肠外、鞘内、脑池内、口服、直肠、口腔、舌下、阴道、肺部、气管内、鼻内、经皮或十二指肠内施用。

82.根据权利要求81所述的方法，其中所述PPM1A抑制剂通过鞘内施用。

83.根据权利要求72-82中任一项所述的方法，其中施用治疗有效量的所述PPM1A抑制剂。

84.根据权利要求77-78或80-83中任一项所述的方法，其中所述患者是人。

85.根据权利要求72-84中任一项所述的方法，其中所述PPM1A抑制剂包括权利要求1-68中任一项所述的PPM1A反义寡核苷酸，其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物。

86.根据权利要求69所述的药物组合物，其中所述药物组合物适于局部、鞘内、胃肠外、口服、肺部、气管内、鼻内、经皮、直肠、口腔、舌下、阴道、脑池内或十二指肠内施用。

87.PPM1A抑制剂在制备用于治疗神经疾病的药物中的用途。

88.根据权利要求87所述的用途，其中所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

89.根据权利要求87或权利要求88所述的用途，其中所述PPM1A抑制剂是权利要求1-68中任一项所述的PPM1A反义寡核苷酸。

90.一种在有需要的患者中治疗神经疾病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物，所述药物组合物包含PPM1A抑制剂和药学上可接受的赋形剂。

91.根据权利要求90所述的方法，其中所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克

病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

92.根据权利要求90或权利要求91所述的方法,其中所述PPM1A抑制剂是权利要求1-68中任一项所述的PPM1A反义寡核苷酸,其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物。

93.根据权利要求90-92中任一项所述的方法,其中所述药物组合物通过局部、胃肠外、鞘内、脑池内、口服、直肠、口腔、舌下、阴道、肺部、气管内、鼻内、经皮或十二指肠内施用。

94.根据权利要求90-93中任一项所述的方法,其中所述药物组合物通过鞘内施用。

95.根据权利要求90-94中任一项所述的方法,其中所述患者是人。

96.权利要求1-68中任一项所述的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐,其用作药物。

97.权利要求1-68中任一项所述的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐,其用于治疗神经疾病。

98.根据权利要求96或权利要求97所述的PPM1A反义寡核苷酸,其中所述神经疾病选自以下:肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

99.一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其选自以下:

PPM1A反义寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一项的核苷酸序列,或其药学上可接受的盐;

其中所述核苷酸序列的至少一个核苷键选自以下:磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、次膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如,包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3'氨基核糖或5'氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸酯键、硒磷酸酯键和硼磷酸酯键;和/或

其中所述连接的核苷的至少一个核苷被选自以下的组分取代:2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-MOE)核苷、2'-O-甲基核苷、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限甲氧基乙基(cMOE)、受限乙基(cET)和肽核酸(PNA)。

100.根据权利要求99所述的PPM1A反义寡核苷酸,其中所述核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。

101.根据权利要求100所述的PPM1A反义寡核苷酸,其中所述硫代磷酸酯核苷间键处于Rp构型或Sp构型之一中。

102.根据权利要求99或权利要求100所述的PPM1A反义寡核苷酸,其中所述核苷酸序列的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

103.一种药物组合物,其包含权利要求99-102中任一项所述的反义寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的赋形剂。

104.根据权利要求70-71、77-78和90-95中任一项所述的方法,其中通过测量在所述患者血浆、脊髓液、脑脊液、胞外囊泡(例如,CSF外泌体)、血液、尿液、淋巴液、粪便或组织中轻神经丝(NEFL)、重神经丝(NEFH)、磷酸化神经丝重链(pNFH)、TDP-43或$p75^{ECD}$的存在或表达水平鉴定所治疗的患者。

105.根据权利要求104所述的方法,其中通过测量在脑脊液(CSF)中磷酸化神经丝重链(pNFH)鉴定所治疗的患者。

106.根据权利要求105所述的方法,其中在所述患者的所述CSF中的所述pNFH用于预测在初始施用后和/或持续治疗期间C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者的疾病状态和存活率。

107.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:利鲁唑(Rilutek)、曲鲁唑、依达拉奉(Radicava)、卡巴拉汀、多奈哌齐、加兰他敏、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、抗精神病药、胆碱酯酶抑制剂、美金刚、苯二氮卓类抗焦虑药、AMX0035(ELYBRIO®)、ZILUCOPLAN(RA101495)、双AON鞘内施用(例如,BIIB067、BIIB078)、BIIB100、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺能药物(例如,罗匹尼罗、普拉克索、罗替戈汀)、甲羟孕酮、KCNQ2/KCNQ3开放剂、普多匹定、PrimeC(环丙沙星和西乐葆的组合)、锂、抗惊厥药和神经兴奋剂、呼吸护理、物理疗法、职业疗法、言语疗法和营养支持。

108.根据权利要求107所述的方法,其中所述神经疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)或者伴FTD的ALS的任何一种。

109.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:美金刚、卡巴拉汀、加兰他敏、多奈哌齐Aricept®、Exelon®(卡巴拉汀)、Razadyne®、Aducanumab、BAN2401、BIIB091(gosuranemab)、BIIB076、BIIB080(IONIS-MAPTRx)、Elayta(CT1812)、MK1942、同种异体hMSC、尼洛替尼、ABT-957、阿维a、ABT-354、GV1001、利鲁唑、CAD106、CNP520、AD-35、瑞拉帕地、DHP1401、T-817MA、TC-5619、TPI-287、RVT-101、LY450139、JNJ-54861911、达格列净、GSK239512、PF-04360365、ASP0777、SB-742457(5-HT6受体拮抗剂)、PF-03654746(H3受体拮抗剂)、GSK933776(Fc-失活的抗β淀粉样蛋白(Aβ)单克隆抗体(mAb))、Posiphen((+)-酒石酸苯羟基丙氨酸)、AMX0035(ELYBRIO®)、辅酶Q10或其任何组合。

110.根据权利要求109所述的方法,其中所述神经疾病是阿尔茨海默氏病。

111.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:左旋多巴、卡比多巴-左旋多巴、普拉克索、罗匹尼罗、罗替戈汀、阿扑吗啡、司来吉兰、雷沙吉兰、恩他卡朋、托卡朋、金刚烷胺、苯海索、BIIB054(辛帕奈单抗)、BIIB094、BIIB118、ABBV-0805、唑尼

沙胺、脑深部刺激、脑源性神经营养因子、干细胞移植、烟酸、脑干刺激、尼古丁、大麻隆、PF-06649751、DNL201、LRRK2抑制剂、CK1抑制剂、依拉地平、CLR4001、IRX4204、育亨宾、辅酶Q10、OXB-102、度洛西汀、吡格列酮、preladenant或其任何组合。

112.根据权利要求111所述的方法，其中所述神经疾病是帕金森氏病。

113.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：UCB0107、ABBV-8E12、F-18AV1451、BIIB092、C2N-8E12、tideglusib、深经颅磁刺激、硫辛酸、托芬那酸、锂、AZP2006、胶质细胞系衍生神经营养因子、NBMI、suvorxant、唑吡坦、TPI287、达夫奈肽、匹莫范色林、左旋多巴、卡比多巴-左旋多巴、普拉克索、罗匹尼罗、罗替戈汀、阿扑吗啡、司来吉兰、雷沙吉兰、恩他卡朋、托卡朋、金刚烷胺、苯海索、BIIB054(辛帕奈单抗)、BIIB094、BIIB118、ABBV-0805、唑尼沙胺、脑深部刺激、脑源性神经营养因子、干细胞移植、烟酸、脑干刺激、尼古丁、大麻隆、PF-06649751、DNL201、LRRK2抑制剂、CK1抑制剂、依拉地平、CLR4001、IRX4204、育亨宾、辅酶Q10、OXB-102、度洛西汀、吡格列酮、preladenant或其任何组合。

114.根据权利要求113所述的方法，其中所述神经疾病是进行性核上性麻痹(PSP)。

115.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：特苯那嗪、氘代丁苯那嗪、物理疗法、利培酮、氟哌啶醇、氯丙嗪、氯硝西泮、地西泮、苯二氮卓类、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、喹硫平、卡巴醇、丙戊酸盐、拉莫三嗪、普利多匹定、δ-9-四氢大麻酚、大麻二酚、干细胞疗法、ISIS-443139、尼洛替尼、白藜芦醇、neflamapimod、非诺贝特、肌酸、RO7234292、SAGE-718、WVE-120102、WVE-120101、dimebon、米诺环素、脑深部刺激、熊二醇、辅酶Q10、OMS643762、VX15/2503、PF-02545920、BN82451B、SEN0014196、奥氮平、泰必利(tiapride)或其任何组合。

116.根据权利要求115所述的方法，其中所述神经疾病是亨廷顿氏病。

117.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：抗凝剂、抗抑郁剂、肌肉松弛剂、兴奋剂、抗惊厥剂、抗焦虑药、促红细胞生成素、高压治疗、康复疗法(例如，身体、职业、言语、心理或职业咨询)或其任何组合。

118.根据权利要求117所述的方法，其中所述神经疾病是脑外伤。

119.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：AXER-204、格列本脲、5-羟基色氨酸(5-HTP)、L-3,4-二羟苯丙氨酸(L-DOPA)或康复疗法(例如，物理疗法、职业疗法、娱乐疗法、使用辅助设备、改进的运动和健康饮食策略)或其任何组合。

120.根据权利要求119所述的方法，其中所述神经疾病是脊髓损伤。

121.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需

要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：TPI-287、锂、职业疗法、物理疗法和言语疗法，或其任何组合，可以选择作为附加疗法。

122.根据权利要求121所述的方法，其中所述神经疾病是皮质基底节变性。

123.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：加巴喷丁、普瑞巴林、拉莫三嗪、卡马西平、度洛西汀、加巴喷丁类、三环类抗抑郁药、5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂、阿片类、神经毒素、右美沙芬、烟酰胺核苷、靶向神经元抗原的自身抗体(TS-HDS和FGFR3)或其任何组合。

124.根据权利要求123所述的方法，其中所述神经病是化疗诱发的神经病。

125.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：曲鲁唑、BHV-4157或其组合。

126.根据权利要求125所述的方法，其中所述神经疾病是脊髓小脑性共济失调。

127.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：抗癫痫药物、言语疗法、物理疗法、职业疗法、Adrabetadex、Arimoclomol、N-乙酰基-L-亮氨酸或其任何组合。

128.根据权利要求127所述的方法，其中所述神经疾病是C型尼曼-皮克病。

129.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：物理和职业疗法、骨科手术、骨科设备、PXT3003或其任何组合。

130.根据权利要求129所述的方法，其中所述神经疾病是夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)。

131.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：酶替代疗法：艾杜硫酶(Elaprase)、手术干预(扁桃体切除术和/或腺样体切除术)、RGX-121基因疗法、阿达木单抗、MT2013-31或其任何组合。

132.根据权利要求131所述的方法，其中所述神经疾病是II型粘多糖贮积症(MPSIIA)。

133.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者权利要求69所述的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：物理、职业和言语疗法、隐形眼镜和人工泪液、遗传咨询或其任何组合。

134.根据权利要求133所述的方法，其中所述神经疾病是粘脂贮积症IV。

135.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:抗惊厥药、物理和职业疗法、半乳糖苷酶、半乳糖苷酶的基因递送、LYS-GM101基因疗法或其任何组合。

136.根据权利要求135所述的方法,其中所述神经疾病是GM1神经节苷脂贮积症。

137.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:物理和职业疗法、使用设备如支架、助行器、轮椅、免疫抑制剂、BYM338或其任何组合。

138.根据权利要求137所述的方法,其中所述神经疾病是散发性包涵体肌炎(sIBM)。

139.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:皮质类固醇、秋水仙碱、氨苯砜、硫唑嘌呤或其任何组合。

140.根据权利要求139所述的方法,其中所述神经疾病是亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)。

141.一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:酶替代疗法、底物还原疗法、N-乙酰半胱氨酸、GZ/SAR402671、伊米苷酶或其任何组合。

142.根据权利要求141所述的方法,其中所述神经疾病是戈谢氏病。

143.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述转录物包含SEQ ID NO:2864的序列并且进一步从SEQ ID NO:1的核苷酸8,470-8,926、44,991-45,990、49,055-49,164、50,647-50,704和51,703-58,336转录。

144.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述转录物包含SEQ ID NO:2865的序列并且进一步从SEQ ID NO:1的核苷酸8,470-8,926、9,629-9,730和44,911-47,804转录。

145.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述转录物包含SEQ ID NO:2866的序列并且进一步从SEQ ID NO:1的核苷酸4,999-5,295、49,055-49,164、50,647-50,704和51,703-58,336转录。

146.一种在患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括选择使用权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物治疗的患者,其中通过以下方法选择用于治疗的所述患者,所述方法包括在所述患者的血浆、脊髓液、脑脊液、胞外囊泡(例如,CSF外泌体)、血液、尿液、淋巴液、粪便或组织中测量轻神经丝(NEFL)、重神经丝(NEFH)、磷酸化神经丝重链(pNFH)、TDP-43或$p75^{ECD}$的存在或表达水平。

147.根据权利要求146所述的方法,其中通过测量脑脊液(CSF)中磷酸化神经丝重链(pNFH)鉴定所治疗的所述患者。

148.根据权利要求147所述的方法,其中在所述患者的所述CSF中的所述pNFH用于预测在初始施用后和/或持续治疗期间C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者的疾病状态

和存活率。

149.一种在患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括选择使用权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物治疗的患者,其中所述方法包括:

确定是否所述患者在选自以下的一个或多个ALS相关基因中具有突变:TBK1、TARDBP、SQSTM1、VCP、C9orf72、FUS和CHCHD10;

根据确定鉴定所述患者是治疗的候选患者;和

任选地向所述候选患者施用权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物。

150.一种在患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,其中通过以下方法选择用于治疗的所述患者,所述方法包括在所述患者的血浆、脊髓液、脑脊液、胞外囊泡(例如,CSF外泌体)、血液、尿液、淋巴液、粪便或组织中测量轻神经丝(NEFL)、重神经丝(NEFH)、磷酸化神经丝重链(pNFH)、TDP-43或$p75^{ECD}$的存在或表达水平。

151.根据权利要求146所述的方法,其中通过测量脑脊液(CSF)中磷酸化神经丝重链(pNFH)鉴定所治疗的所述患者。

152.根据权利要求147所述的方法,其中在所述患者的所述CSF中的所述pNFH用于预测在初始施用后和/或持续治疗期间C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者的疾病状态和存活率。

153.一种在患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用权利要求1-68中任一项所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者权利要求69所述的药物组合物,其中通过包括以下的方法选择用于治疗的所述患者:

确定是否所述患者在选自以下的一个或多个ALS相关基因中具有突变:TBK1、TARDBP、SQSTM1、VCP、C9orf72、FUS和CHCHD10;

根据确定鉴定所述患者是治疗的候选患者。

PPM1A抑制剂以及使用其的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年6月21日提交的美国临时专利申请号62/864,988和2019年7月8日提交的美国临时专利申请号62/871,356的权益和优先权,其每一个的全部公开内容出于所有目的其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已以ASCII格式电子提交的序列表,其全部内容通过引用并入本文。所述ASCII副本创建于2020年6月17日,文件名为QRL-001WO_SL.txt,文件大小为821,932字节。

背景技术

[0005] 运动神经元疾病是一类导致运动神经元退化和死亡的神经系统疾病,运动神经元是协调大脑肌肉自主运动的神经元。运动神经元疾病可能是散发的或遗传的,并且可能影响上运动神经元和/或下运动神经元。运动神经元疾病包括肌萎缩侧索硬化、进行性延髓麻痹、假性延髓麻痹、原发性侧索硬化、进行性肌萎缩、脊髓性肌萎缩和脊髓灰质炎后综合征。

[0006] 肌萎缩侧索硬化(ALS)是一组运动神经元疾病,在美国影响约15,000人。ALS的特征是上下运动神经元的退化和死亡,导致随意肌肉控制的丧失。运动神经元死亡伴随着肌肉震颤和萎缩。ALS的早期症状包括肌肉痉挛(muscle cramps)、肌肉痉挛(muscle spasticity)、肌肉无力(例如,影响手臂、腿、颈部或横膈膜)、口齿不清和鼻音、以及咀嚼或吞咽困难。最终会失去力量和对运动的控制,包括言语、进食和呼吸所必需的运动。疾病进展可能伴随着体重减轻、营养不良、焦虑、抑郁、肺炎风险增加、肌肉痉挛、神经病变和可能的痴呆。大多数诊断患有ALS的人在首次出现症状后五年内死于呼吸衰竭。目前,对ALS尚无有效治疗。

[0007] ALS出现在所有年龄段的个体中,但最常见于55至75岁之间的个体,男性的发病率略高。ALS可表征为散发性或家族性。散发性ALS似乎是随机发生的,占所有ALS发病率的90%以上。家族性ALS占所有ALS发病率的5-10%。十几个基因的基因突变与家族性ALS相关,包括9号染色体开放阅读框架72(“C9ORF72”)的突变,其占家族性ALS病例的25-40%,以及铜-锌超氧化物歧化酶1(“SOD1”)的突变,其占家族性ALS病例的12-20%。

[0008] 有趣的是,一些ALS相关基因(如TBK1、TARDBP、SQSTM1、VCP、FUS、CHCHD10和C9ORF72)的突变也与额颞叶痴呆(FTD)和伴有FTD的ALS相关。FTD是指由大脑额叶和颞叶神经元丢失引起的一系列进行性神经退行性疾病。FTD的特征是行为和性格的改变,以及语言功能障碍。FTD的形式包括行为变异FTD(bvFTD)、语义变异原发性进行性失语症(svPPA)和非流利变异原发性进行性失语症(nfvPPA)。伴有FTD的ALS的特征是与FTD相关的症状,以及ALS的症状,如肌肉无力、萎缩、肌束震颤、痉挛、言语障碍(构音障碍)和无法吞咽(吞咽困难)。个体通常在5到10年内死于FTD,而伴有FTD的ALS通常会在出现首个疾病症状后2到3年内导致死亡。

[0009] 与ALS一样,对于FTD或伴有FTD的ALS没有已知的治愈方法,也没有已知可以预防

或延缓这两种疾病的进展的治疗方法。

[0010] 因此，迫切需要鉴定能够预防、改善和治疗神经疾病的化合物，如肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

发明内容

[0011] 本文描述的是蛋白磷酸酶1A(PPM1A)抑制剂。本申请部分地基于惊人的发现，即本文所述的PPM1A抑制剂可用于治疗神经疾病，包括运动神经元疾病。例如，本文所述的PPM1A抑制剂可用于治疗任何肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。本文所述的PPM1A抑制剂包括PPM1A反义寡核苷酸和其他PPM1A反义治疗剂。

[0012] 本文公开了一种化合物，其包含寡核苷酸，所述寡核苷酸包含具有核碱基序列的连接的核苷，所述核碱基序列与某一转录物的等长部分至少90％互补，所述转录物从SEQ ID NO:1的至少核苷酸41,932至核苷酸42,787和从核苷酸44,874至核苷酸44,990转录，其中所述连接的核苷的至少一个核苷键是非天然键。本文还公开了一种寡核苷酸，其包含具有核碱基序列的连接的核苷，所述核碱基序列与某一转录物的等长部分至少90％互补，所述转录物从SEQ ID NO:1的至少核苷酸41,932至核苷酸42,787和从核苷酸44,874至核苷酸44,990转录，其中所述连接的核苷的至少一个核苷键是非天然键。在各种实施方式中，从SEQ ID NO:1的至少核苷酸41,932至核苷酸42,787和从核苷酸44,874至核苷酸44,990转录的转录物包含SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866的任一序列。

[0013] 本文还公开了一种化合物，其包含寡核苷酸，所述寡核苷酸包含具有核碱基序列的连接的核苷，所述核碱基序列与同SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866，具有至少90％同一性的转录物的等长部分或者与SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866的连续15至50个核碱基部分至少90％互补，其中所述连接的核苷的至少一个核苷键是非天然键。本文还公开了一种寡核苷酸，其包含具有核碱基序列的连接的核苷，所述核碱基序列与同SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866具有至少90％同一性的转录物的等长部分，或者与SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865或SEQ ID NO:2866的连续15至50个核碱基部分具有至少90％同一性，其中所述连接的核苷的至少一个核苷键是非天然键。

[0014] 在各种实施方式中，所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959任一

个的等长部分具有至少90%同一性。在各种实施方式中，核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959任一个的等长部分具有至少90%同一性。在各种实施方式中，所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NOs:2914-2959的任一个的等长部分具有至少90%同一性。在各种实施方式中，核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的等长部分具有至少90%同一性。

[0015] 在各种实施方式中，所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的位置457-1410的任一个内的核碱基的等长部分至少90%互补。在各种实施方式中，所述核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的位置457-1410的任一个内的核碱基的等长部分至少90%互补。在各种实施方式中，所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的位置542-814、895-1006、1025-1117或1361-1407的任一个内的核碱基的等长部分至少90%互补。在各种实施方式中，所述核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的位置542-814、895-1006、1025-1117或1361-1407的任一个内的核碱基的等长部分至少90%互补。

[0016] 在各种实施方式中，所述核碱基序列包含至少10个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的部分542-561、555-574、559-578、599-618、602-621、603-622、604-623、605-624、606-625、607-626、608-627、609-628、625-644、642-661、644-663、646-665、648-667、650-669、652-671、655-674、656-675、708-727、709-728、794-813、795-814、895-914、900-919、905-924、910-929、915-934、962-981、967-986、972-991、977-996、987-1006、1025-1044、1030-1049、1034-1053、1040-1059、1045-1064、1098-1117、1361-1380、1366-1385、1371-1390、1378-1397和1386-1405的任一个内的核碱基的等长部分至少90%互补。

[0017] 在各种实施方式中，所述核碱基序列包含至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的部分542-561、555-574、559-578、599-618、602-621、603-622、604-623、605-624、606-625、607-626、608-627、609-628、625-644、642-661、644-663、646-665、648-667、650-669、652-671、655-674、656-675、708-727、709-728、794-813、795-814、895-914、900-919、905-924、910-929、915-934、962-981、967-986、972-991、977-996、987-1006、1025-1044、1030-1049、1034-1053、1040-1059、1045-1064、1098-1117、1361-1380、1366-1385、1371-1390、1378-1397和1386-1405的任一个内的核碱基的等长部分至少90%互补。

[0018] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含选自以下的至少一个核苷键：磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、次膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如，包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3'氨基核糖或5'氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键，或其任何组合。

[0019] 在各种实施方式中，所述核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。在各

种实施方式中，所述硫代磷酸酯核苷间键处于Rp构型或Sp构型之一。在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含一个或多个手性中心和/或双键。在各种实施方式中，寡核苷酸以选自几何异构体、对映异构体和非对映异构体的立体异构体形式存在。在各种实施方式中，所述核苷酸序列的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

[0020] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核碱基。在各种实施方式中，所述至少一个修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶或5-甲氧基尿嘧啶。

[0021] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含至少一个具有修饰的糖部分的核苷。在各种实施方式中，所述修饰的糖部分是以下之一：2'-OMe修饰的糖部分、双环糖部分、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限乙基2'-4'-桥接核酸(cEt)、S-cEt、己糖醇核酸(HNA)和三环类似物(例如，tcDNA)。在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个具有修饰的糖部分的核苷。在各种实施方式中，所述修饰的糖部分独立地是以下之一：2'-OMe修饰的糖部分、双环糖部分、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限乙基2'-4'-桥接核酸(cEt)、S-cEt、己糖醇核酸(HNA)和三环类似物(例如，tcDNA)。

[0022] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含10个2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)核苷。在各种实施方式中，5个所述2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)核苷位于所述寡核苷酸的3'末端，和其中5个所述2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)核苷位于所述寡核苷酸的5'末端。在各种实施方式中，至少一个具有修饰的糖部分的核苷或者具有修饰的糖部分的核苷是核糖核苷。在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含至少一个脱氧核糖核苷。在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个脱氧核糖核苷。

[0023] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含：

[0024] a.间隔区段，其包含连接的脱氧核糖核苷、2'-氟代阿拉伯糖核酸(FANA)和氟代环己烯基核酸(F-CeNA)的一种或多种；

[0025] b.5'翼区，其包含连接的核苷；和

[0026] c.3'翼区，其包含连接的核苷；

[0027] d.其中中心区域包含至少8个连续核碱基的区域，其与位于5'翼区段和3'翼区段之间的SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863或SEQ ID NO:2868-2959的任一个的等长部分具有至少80％同一性；其中所述5'翼区和所述3'翼区分别包含至少两个连接的核苷；和其中每个翼区的至少一个核苷包含修饰的糖。

[0028] 在各种实施方式中，所述5'翼区的所述至少两个连接的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键连接和/或其中所述3'翼区的所述至少两个连接的核苷独立地通过硫代磷酸酯核苷间键连接。在各种实施方式中，所述5'翼区的每个核苷间键和/或所述3'翼区的每个核苷间键独立地是硫代磷酸酯核苷间键。在各种实施方式中，所述5'翼区还包含至少一个磷酸二酯核苷间键。在各种实施方式中，所述3'翼区还包含至少一个磷酸二酯核苷间键。

[0029] 在各种实施方式中，所述5'翼区的所述至少两个连接的核苷通过磷酸二酯核苷间键连接和/或其中所述3'翼区的所述至少两个连接的核苷独立地通过磷酸二酯核苷间键连接。在各种实施方式中，所述中心区域的至少一个所述核苷间键是磷酸二酯键。在各种实施方式中，所述中心区域的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至

少八个或至少九个所述核苷间键是磷酸二酯键。

[0030] 在各种实施方式中，所述中心区域的至少一个所述核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。在各种实施方式中，所述中心区域的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个或至少九个所述核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。在各种实施方式中，所述寡核苷酸的所有核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。在各种实施方式中，所述硫代磷酸酯核苷间键的任一个或全部是处于Rp构型、Sp构型中或者Rp和Sp构型的任何组合中。

[0031] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含至少一个修饰的糖部分。在各种实施方式中，所述5'翼区或所述3'翼区包含至少一个修饰的糖部分。在各种实施方式中，所述中心区域包含至少一个修饰的糖部分。在各种实施方式中，所述至少一个修饰的糖部分是以下任一个：2'-OMe修饰的糖部分、双环糖部分、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限乙基2'-4'-桥接核酸(cEt)、S-cEt、己糖醇核酸(HNA)和三环类似物(例如，tcDNA)。

[0032] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含一个或多个2'-MOE核苷。在各种实施方式中，所述5'翼区或所述3'翼区包含一个或多个2'-MOE核苷。在各种实施方式中，所述5'翼区或所述3'翼区包含两个、三个、四个或五个2'-MOE核苷。在各种实施方式中，所述5'翼区或所述3'翼区的每个核苷是2'-MOE核苷。

[0033] 在各种实施方式中，所述中心区域包含一个或多个2'-MOE核苷。在各种实施方式中，所述中心区域包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个2'-MOE核苷。在各种实施方式中，所述中心区域的每个核苷是2'-MOE核苷。在各种实施方式中，所述一个或多个2'-MOE核苷通过硫代磷酸酯核苷间键连接。

[0034] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含以下任一模式的糖修饰：eeeee-d10-eeeee、eee-d8-eee、eee-d10-eee、eeee-d10-eeee和eeee-d8-eeee，其中e＝2'-MOE核苷和d＝脱氧核糖核苷。在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含以下任一模式的核苷间键：sssssooooooooossssss；ooooossssssssssooooo；ooooooooooooooossssss；soossssssssssssssss；sssssssssssssssssoos；sssssooooooooooooo；sssssssssssssssssss；sssoooooooss；ooosssssssooo；sssssssssssss；sossssssssss；sossssssssss；sssssssssssos；sssssssssssoo；ooosssssssssss；sssooooooooooss；ooosssssssssssooo；sssssssssssssss；sssssssssssssooo；ooosssssssssssss；sossssssssssssos；sossssssssssssss；sssssssssssssos；ssssoooooooooossss；ooooossssssssssoooo；sssssssssssssssss；sssssssssssssooooo；soossssssssssssoos；soossssssssssssss；sssssssssssssssoos；ooooossssssssssss；ssssooooooooss；ooooossssssssoooo；sssssssssssooooo；ooooossssssssssss；soossssssssssoos；soossssssssssss；sssssssssssssoos；或sssssssssssssss；其中s＝硫代磷酸酯键，和o＝磷酸二酯键。

[0035] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸分别包含以下任何模式的糖修饰和核苷间键组合：ssssooooooooossss

[0036] a)eeeee-d10-eeeee和ssssssooooooooossssss；

[0037] b)eeeee-d10-eeeee和ooooossssssssssooooo；

[0038] c)eeeee-d10-eeeee和sssssssssssssssssss；

[0039] d)eee-d8-eee和ssssooooooosss；

[0040] e)eee-d8-eee和ooosssssssooo

[0041] f)eee-d8-eee和sssssssssssss；

[0042] g)eee-d10-eee和sssoooooooooosss；

[0043] h)eee-d10-eee和ooosssssssssooo；

[0044] i)eee-d10-eee和sssssssssssssss；

[0045] j)eeee-d10-eeee和ssssooooooooossss；

[0046] k)eeee-d10-eeee和oooossssssssssoooo；

[0047] l)eeee-d10-eeee和ssssssssssssssssss；

[0048] m)eeee-d8-eeee和ssssooooooossss，

[0049] n)eeee-d8-eeee和oooossssssssoooo，

[0050] o)eeee-d8-eeee和sssssssssssssss，

[0051] 其中e＝2'-MOE核苷和d＝脱氧核糖核苷，和其中s＝硫代磷酸酯键，和o＝磷酸二酯键。

[0052] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核碱基。在各种实施方式中，所述5'翼区或所述3'翼区包含所述至少一个修饰的核碱基。在各种实施方式中，所述中心区域包含所述至少一个修饰的核碱基。在各种实施方式中，所述至少一个修饰的核碱基是5'-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶或5-甲氧基尿嘧啶。在各种实施方式中，在所述5'翼区或所述3'翼区中的每个胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶。在各种实施方式中，在所述中心区域中的每个胞嘧啶是5'-甲基胞嘧啶。

[0053] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸包含以下糖修饰和核苷间键组合：

[0054] eeeee-d10-eeeee和ssssssssssssssssss，其中e＝2'-MOE核苷和d＝脱氧核糖核苷，和其中s＝硫代磷酸酯键，

[0055] 其中所述2'MOE核苷的每个胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。

[0056] 在各种实施方式中，所述寡核苷酸还包含缀合物部分。在各种实施方式中，所述缀合物部分是位于所述寡核苷酸的3'末端的胆固醇缀合物。

[0057] 本文还公开了一种药物组合物，其包含上文公开的任一寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的赋形剂。

[0058] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病的方法，所述方法包括向所述患者施用上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物。

[0059] 在各种实施方式中，所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

[0060] 本文还公开了一种在细胞中增加自噬的方法，所述方法包括将所述细胞暴露于

PPM1A抑制剂。本文还公开了一种在细胞中增加TBK1 ser172磷酸化的方法，所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。本文还公开了一种在细胞中增加TBK1功能的方法，所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。本文还公开了一种在细胞中抑制PPM1A的方法，所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。本文还公开了一种在细胞中抑制RIPK1活性的方法，所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。

[0061] 在各种实施方式中，所述细胞是需要治疗神经疾病的患者的细胞。在各种实施方式中，所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病在各种实施方式中，所述暴露在体内或离体进行。在各种实施方式中，所述暴露包括向需要其的患者施用所述PPM1A抑制剂。

[0062] 在各种实施方式中，所述PPM1A抑制剂通过局部、胃肠外、鞘内、脑池内、口服、直肠、口腔、舌下、阴道、肺部、气管内、鼻内、经皮或十二指肠内施用。在各种实施方式中，所述PPM1A抑制剂通过鞘内施用。在各种实施方式中，施用治疗有效量的所述PPM1A抑制剂。在各种实施方式中，所述患者是人。

[0063] 在各种实施方式中，所述PPM1A抑制剂包括上文所述的任一寡核苷酸所述的PPM1A反义寡核苷酸，其药学上可接受的盐，或者上文所公开的药物组合物。在各种实施方式中，所述药物组合物适于局部、鞘内、胃肠外、口服、肺部、气管内、鼻内、经皮、直肠、口腔、舌下、阴道、脑池内或十二指肠内施用。

[0064] 本文还公开了PPM1A抑制剂在制备用于治疗神经疾病的药物中的用途。在各种实施方式中，所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。在各种实施方式中，所述PPM1A抑制剂是上文公开的任一寡核苷酸所述的PPM1A反义寡核苷酸。

[0065] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物，所述药物组合物包含PPM1A抑制剂和药学上可接受的赋形剂。在各种实施方式中，所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-

Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。在各种实施方式中,所述PPM1A抑制剂是上文公开的任一寡核苷酸所述的PPM1A反义寡核苷酸,其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物。

[0066] 在各种实施方式中,所述药物组合物通过局部、胃肠外、鞘内、脑池内、口服、直肠、口腔、舌下、阴道、肺部、气管内、鼻内、经皮或十二指肠内施用。在各种实施方式中,所述药物组合物通过鞘内施用。在各种实施方式中,所述患者是人。

[0067] 本文还公开了上文公开的任一寡核苷酸所述的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐,其用作药物。本文还公开了上文公开的任一寡核苷酸所述的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐,其用于治疗神经疾病。在各种实施方式中,所述神经疾病选自以下:肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

[0068] 本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其选自以下:PPM1A反义寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一项的核苷酸序列,或其药学上可接受的盐;其中所述核苷酸序列的至少一个核苷键选自以下:磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、次膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如,包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3'氨基核糖或5'氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键;和/或其中所述连接的核苷的至少一个核苷被选自以下的组分取代:2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-MOE)核苷、2'-O-甲基核苷、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限甲氧基乙基(cMOE)、受限乙基(cET)和肽核酸(PNA)。

[0069] 在各种实施方式中,所述核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,所述硫代磷酸酯核苷间键处于Rp构型或Sp构型之一中。在各种实施方式中,所述核苷酸序列的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

[0070] 本文还公开了一种药物组合物,其包含上文公开的任一寡核苷酸所述的反义寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的赋形剂。在各种实施方式中,通过测量在所述患者血浆、脊髓液、脑脊液、胞外囊泡(例如,CSF外泌体)、血液、尿液、淋巴液、粪便或组织中轻神经丝(NEFL)、重神经丝重(NEFH)、磷酸化神经丝重链(pNFH)、TDP-43或$p75^{ECD}$的存在或表达水平鉴定所治疗的患者。在各种实施方式中,通过测量在脑脊液(CSF)中磷酸化神经丝重链(pNFH)鉴定所治疗的患者。在各种实施方式中,在所述患者的所述CSF中的所述pNFH用于预测在初始施用后和/或持续治疗期间C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者的疾病状态和存活率。

[0071] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其

药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：利鲁唑(Rilutek)、曲鲁唑、依达拉奉(Radicava)、卡巴拉汀、多奈哌齐、加兰他敏、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、抗精神病药、胆碱酯酶抑制剂、美金刚、苯二氮卓类抗焦虑药、AMX0035(ELYBRIO®)、ZILUCOPLAN(RA101495)、双AON鞘内施用(例如，BIIB067、BIIB078)、BIIB100、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺能药物(例如，罗匹尼罗、普拉克索、罗替戈汀)、甲羟孕酮、KCNQ2/KCNQ3开放剂、普多匹定、PrimeC(环丙沙星和西乐葆的组合)、锂、抗惊厥药和神经兴奋剂、呼吸护理、物理疗法、职业疗法、言语疗法和营养支持。在各种实施方式中，所述神经疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)或者伴FTD的ALS的任何一种。

[0072] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：美金刚、卡巴拉汀、加兰他敏、多奈哌齐Aricept®、Exelon®(卡巴拉汀)、Razadyne®、Aducanumab、BAN2401、BIIB091(gosuranemab)、BIIB076、BIIB080(IONIS-MAPTRx)、Elayta(CT1812)、MK1942、同种异体hMSC、尼洛替尼、ABT-957、阿维a、ABT-354、GV1001、利鲁唑、CAD106、CNP520、AD-35、瑞拉帕地、DHP1401、T-817MA、TC-5619、TPI-287、RVT-101、LY450139、JNJ-54861911、达格列净、GSK239512、PF-04360365、ASP0777、SB-742457(5-HT6受体拮抗剂)、PF-03654746(H3受体拮抗剂)、GSK933776(Fc-失活的抗β淀粉样蛋白(Aβ)单克隆抗体(mAb))、Posiphen((+)-酒石酸苯羟基丙氨酸)、AMX0035(ELYBRIO®)、辅酶Q10或其任何组合。在各种实施方式中，所述神经疾病是阿尔茨海默氏病。

[0073] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：左旋多巴、卡比多巴-左旋多巴、普拉克索、罗匹尼罗、罗替戈汀、阿扑吗啡、司来吉兰、雷沙吉兰、恩他卡朋、托卡朋、金刚烷胺、苯海索、BIIB054(辛帕奈单抗)、BIIB094、BIIB118、ABBV-0805、唑尼沙胺、脑深部刺激、脑源性神经营养因子、干细胞移植、烟酸、脑干刺激、尼古丁、大麻隆、PF-06649751、DNL201、LRRK2抑制剂、CK1抑制剂、依拉地平、CLR4001、IRX4204、育亨宾、辅酶Q10、OXB-102、度洛西汀、吡格列酮、preladenant或其任何组合。在各种实施方式中，所述神经疾病是帕金森氏病。

[0074] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：UCB0107、ABBV-8E12、F-18AV1451、BIIB092、C2N-8E12、tideglusib、深经颅磁刺激、硫辛酸、托芬那酸、锂、AZP2006、胶质细胞系衍生神经营养因子、NBMI、suvorxant、唑吡坦、TPI 287、达夫奈肽、匹莫范色林、左旋多巴、卡比多巴-左旋多巴、普拉克索、罗匹尼罗、罗替戈汀、阿扑吗啡、司来吉兰、雷沙吉兰、恩他卡朋、托卡朋、金刚烷胺、苯海索、BIIB054(辛帕奈单抗)、BIIB094、BIIB118、ABBV-0805、唑尼沙胺、脑深部刺激、脑源性神经营养因子、干细胞移植、烟酸、脑干刺激、尼古丁、大麻隆、PF-06649751、DNL201、LRRK2抑制剂、CK1抑制剂、依拉地平、CLR4001、IRX4204、育亨宾、辅酶Q10、OXB-102、度洛西汀、吡格列酮、preladenant或其任

何组合。在各种实施方式中，所述神经疾病是进行性核上性麻痹(PSP)。

[0075] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：特苯那嗪、氘代丁苯那嗪、物理疗法、利培酮、氟哌啶醇、氯丙嗪、氯硝西泮、地西泮、苯二氮卓类、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、喹硫平、卡巴醇、丙戊酸盐、拉莫三嗪、普利多匹定、δ-9-四氢大麻酚、大麻二酚、干细胞疗法、ISIS-443139、尼洛替尼、白藜芦醇、neflamapimod、非诺贝特、肌酸、RO7234292、SAGE-718、WVE-120102、WVE-120101、dimebon、米诺环素、脑深部刺激、熊二醇、辅酶Q10、OMS643762、VX15/2503、PF-02545920、BN82451B、SEN0014196、奥氮平、泰必利(tiapride)或其任何组合。在各种实施方式中，所述神经疾病是亨廷顿氏病。

[0076] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：抗凝剂、抗抑郁剂、肌肉松弛剂、兴奋剂、抗惊厥剂、抗焦虑药、促红细胞生成素、高压治疗、康复疗法(例如，身体、职业、言语、心理或职业咨询)或其任何组合。在各种实施方式中，所述神经疾病是脑外伤。

[0077] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：AXER-204、格列本脲、5-羟基色氨酸(5-HTP)、L-3,4-二羟苯丙氨酸(L-DOPA)或康复疗法(例如，物理疗法、职业疗法、娱乐疗法、使用辅助设备、改进的运动和健康饮食策略)或其任何组合。在各种实施方式中，所述神经疾病是脊髓损伤。

[0078] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：TPI-287、锂、职业疗法、物理疗法和言语疗法，或其任何组合，可以选择作为附加疗法。在各种实施方式中，所述神经疾病是皮质基底节变性。

[0079] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：加巴喷丁、普瑞巴林、拉莫三嗪、卡马西平、度洛西汀、加巴喷丁类、三环类抗抑郁药、5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂、阿片类、神经毒素、右美沙芬、烟酰胺核苷、靶向神经元抗原的自身抗体(TS-HDS和FGFR3)或其任何组合。在各种实施方式中，所述神经病是化疗诱发的神经病。

[0080] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，或者上文公开的药物组合物，与选自以下的第二治疗剂联用，包括：曲鲁唑、BHV-4157或其组合。在各种实施方式中，所述神经疾病是脊髓小脑性共济失调。

[0081] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法，所述方

法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:抗癫痫药物、言语疗法、物理疗法、职业疗法、Adrabetadex、Arimoclomol、N-乙酰基-L-亮氨酸或其任何组合。在各种实施方式中,所述神经疾病是C型尼曼-皮克病。

[0082] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:物理和职业疗法、骨科手术、骨科设备、PXT3003或其任何组合。在各种实施方式中,所述神经疾病是夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)。

[0083] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:酶替代疗法:艾杜硫酶(Elaprase)、手术干预(扁桃体切除术和/或腺样体切除术)、RGX-121基因疗法、阿达木单抗、MT2013-31或其任何组合。在各种实施方式中,所述神经疾病是II型粘多糖贮积症(MPSIIA)。

[0084] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:物理、职业和言语疗法、隐形眼镜和人工泪液、遗传咨询或其任何组合。在各种实施方式中,所述神经疾病是粘脂贮积症IV。

[0085] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:抗惊厥药、物理和职业疗法、半乳糖苷酶、半乳糖苷酶的基因递送、LYS-GM101基因疗法或其任何组合。在各种实施方式中,所述神经疾病是GM1神经节苷脂贮积症。

[0086] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:物理和职业疗法、使用设备如支架、助行器、轮椅、免疫抑制剂、BYM338或其任何组合。在各种实施方式中,所述神经疾病是散发性包涵体肌炎(sIBM)。

[0087] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:皮质类固醇、秋水仙碱、氨苯砜、硫唑嘌呤或其任何组合。在各种实施方式中,所述神经疾病是亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)。

[0088] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病和/或神经病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,与选自以下的第二治疗剂联用,包括:酶替代疗法、底物还原疗法、N-乙酰半胱氨酸、GZ/SAR402671、伊米苷酶或其任何组合。在各种

实施方式中,所述神经疾病是戈谢氏病。

[0089] 在各种实施方式中,所述转录物包含SEQ ID NO:2864的序列并且进一步从SEQ ID NO:1的核苷酸8,470-8,926、44,991-45,990、49,055-49,164、50,647-50,704和51,703-58,336转录。在各种实施方式中,所述转录物包含SEQ ID NO:2865的序列并且进一步从SEQ ID NO:1的核苷酸8,470-8,926、9,629-9,730和44,911-47,804转录。在各种实施方式中,所述转录物包含SEQ ID NO:2866的序列并且进一步从SEQ ID NO:1的核苷酸4,999-5,295、49,055-49,164、50,647-50,704和51,703-58,336转录。

[0090] 本文还公开了一种在患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括选择使用上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物治疗的患者,其中通过以下方法选择用于治疗的所述患者,所述方法包括在所述患者的血浆、脊髓液、脑脊液、胞外囊泡(例如,CSF外泌体)、血液、尿液、淋巴液、粪便或组织中测量轻神经丝(NEFL)、重神经丝重(NEFH)、磷酸化神经丝重链(pNFH)、TDP-43或$p75^{ECD}$的存在或表达水平。在各种实施方式中,通过测量脑脊液(CSF)中磷酸化神经丝重链(pNFH)鉴定所治疗的所述患者。在各种实施方式中,在所述患者的所述CSF中的所述pNFH用于预测在初始施用后和/或持续治疗期间C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者的疾病状态和存活率。

[0091] 本文还公开了一种在患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括选择使用上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物治疗的患者,其中所述方法包括:确定是否所述患者在选自以下的一个或多个ALS相关基因中具有突变:TBK1、TARDBP、SQSTM1、VCP、C9orf72、FUS和CHCHD10;根据确定鉴定所述患者是治疗的候选患者;和任选地向所述候选患者施用上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物。

[0092] 本文还公开了一种在患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,其中通过以下方法选择用于治疗的所述患者,所述方法包括在所述患者的血浆、脊髓液、脑脊液、胞外囊泡(例如,CSF外泌体)、血液、尿液、淋巴液、粪便或组织中测量轻神经丝(NEFL)、重神经丝重(NEFH)、磷酸化神经丝重链(pNFH)、TDP-43或$p75^{ECD}$的存在或表达水平。在各种实施方式中,通过测量脑脊液(CSF)中磷酸化神经丝重链(pNFH)鉴定所治疗的所述患者。在各种实施方式中,在所述患者的所述CSF中的所述pNFH用于预测在初始施用后和/或持续治疗期间C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者的疾病状态和存活率。

[0093] 本文还供了一种在患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用上文公开的任一寡核苷酸所述的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,或者上文公开的药物组合物,其中通过包括以下的方法选择用于治疗的所述患者:确定是否所述患者在选自以下的一个或多个ALS相关基因中具有突变:TBK1、TARDBP、SQSTM1、VCP、C9orf72、FUS和CHCHD10;根据确定鉴定所述患者是治疗的候选患者。

附图说明

[0094] 图1是显示在仅使用转染试剂(“仅Lipofectamine 3000”)处理或使用不同浓度(5nM、20nM、50nM、200nM或500nM)的PPM1A AON候选物(QPA-905、QPA-972、QPA-1034、QPA-1045和QPA-1371)转染72小时的BP6074细胞中PPM1A水平的RT-qPCT分析的条形图。所有实

验均重复三次进行(n＝3)。

[0095] 图2A是显示通过RT-qPCR评价的PPM1A的量的条形图。SY5Y细胞未经处理,仅用转染试剂(“仅Lipofectamine 3000”)处理,或者用不同浓度(5nM、20nM、50nM、200nM或500nM)PPM1A AON QPA-1371、siRNA对照(“si对照”,50nM)或PPM1A siRNA(“siPPM1A”,50nM)转染。在转染后48小时进行RT-qPCR。

[0096] 图2B是显示通过RT-qPCR评价的PPM1A的量的条形图。SY5Y细胞未经处理,仅用转染试剂(“仅endoporter”)处理,或者用不同浓度(5nM、20nM、50nM、200nM或500nM)PPM1AAON候选物(QPA-905、QPA-972、QPA-1034、QPA-1045、QPA-1371或QPA-895)、siRNA对照(“si对照”,50nM)或PPM1A siRNA(“siPPM1A”,50nM)转染。在转染后48小时进行RT-qPCR。

[0097] 图3A是显示如通过Western印迹所评价的以占健康对照细胞的百分比计的磷酸化TBK1与总TBK1比率(“pTBK1/TBK1”)的条形图。BP6074细胞仅使用RNAiMax转染试剂(“亲本细胞”)处理或使用5μM PPM1A AON候选物QPA-1045或QPA-1371转染。转染后24小时更换细胞培养基,48小时后收集蛋白(n＝3;*,p<0.05;**,p<0.01)。将GAPDH蛋白水平用于归一化pTBK1和TBK1蛋白水平。

[0098] 图3B是显示如通过Western印迹所评价的PPM1A的量的条形图。BP6074细胞仅使用RNAiMax转染试剂(“亲本细胞”)处理或使用5μM PPM1A AON候选物QPA-1045或QPA-1371转染。转染后24小时更换细胞培养基,48小时后收集蛋白(n＝3;**,p<0.01)。

[0099] 图4A-图4Y是各种候选反义寡核苷酸的RNA敲低效力的线图,在SY5Y细胞中量化了随着AON浓度的增加PPM1A RNA的减少情况。图4A代表SEQ ID NO:2898(QPA-962)的RNA敲低效力;图4B代表SEQ ID NO:2899(QPA-967)的RNA敲低效力;图4C代表SEQ ID NO:2900(QPA-972)的RNA敲低效力;图4D代表SEQ ID NO:2901(QPA-977)的RNA敲低效力;图4E代表SEQ ID NO:2902(QPA-987)的RNA敲低效力;图4F代表SEQ ID NO:2903(QPA-1025)的RNA敲低效力;图4G代表SEQ ID NO:2904(QPA-1030)的RNA敲低效力;图4H代表SEQ ID NO:2905(QPA-1034)的RNA敲低效力;图4I代表SEQ ID NO:2906(QPA-1040)的RNA敲低效力;图4J代表SEQ ID NO:2907(QPA-1045)的RNA敲低效力;图4K代表SEQ ID NO:2909(QPA-1361)的RNA敲低效力;图4L代表SEQ ID NO:2910(QPA-1366)的RNA敲低效力;图4M代表SEQ ID NO:2911(QPA-1371)的RNA敲低效力;图4N代表SEQ ID NO:2912(QPA-1378)的RNA敲低效力;图4O代表SEQ ID NO:2913(QPA-1386)的RNA敲低效力;图4P代表SEQ ID NO:2868(QPA-542)的RNA敲低效力;图4Q代表SEQ ID NO:2869(QPA-555)的RNA敲低效力;图4R代表SEQ ID NO:2883(QPA-646)的RNA敲低效力;图4S代表SEQ ID NO:2870(QPA-559)的RNA敲低效力;图4T代表SEQ ID NO:2908(QPA-1098)的RNA敲低效力;图4U代表SEQ ID NO:2893(QPA-895)的RNA敲低效力;图4V代表SEQ ID NO:2894(QPA-900)的RNA敲低效力;图4W代表SEQ ID NO:2895(QPA-905)的RNA敲低效力;图4X代表SEQ ID NO:2896(QPA-910)的RNA敲低效力;和图4Y代表SEQ ID NO:2897(QPA-915)的RNA敲低效力。

[0100] 图5A-5T和图6A-6K是各种候选反义寡核苷酸的线图,在人运动神经元中量化了随着AON浓度的增加PPM1A RNA的减少情况。图5A代表SEQ ID NO:2883(QPA-646)的RNA敲低效力;图5B代表SEQ ID NO:2893(QPA-895)的RNA敲低效力;图5C代表SEQ ID NO:2895(QPA-905)的RNA敲低效力;图5D代表SEQ ID NO:2911(QPA-1371)的RNA敲低效力;图5E代表SEQ ID NO:2896(QPA-910)的RNA敲低效力;图5F代表SEQ ID NO:2897(QPA-915)的RNA敲低效

力;图5G代表SEQ ID NO:2900(QPA-972)的RNA敲低效力;图5H代表SEQ ID NO:2905(QPA-1034)的RNA敲低效力;图5I代表SEQ ID NO:2906(QPA-1040)的RNA敲低效力;图5J代表SEQ ID NO:2907(QPA-1045)的RNA敲低效力;图5K代表SEQ ID NO:2871(QPA-599)的RNA敲低效力;图5L代表SEQ ID NO:2876(QPA-606)的RNA敲低效力;图5M代表SEQ ID NO:2880(QPA-625)的RNA敲低效力;图5N代表SEQ ID NO:2881(QPA-642)的RNA敲低效力;图5O代表SEQ ID NO:2882(QPA-644)的RNA敲低效力;图5P代表SEQ ID NO:2884(QPA-648)的RNA敲低效力;图5Q代表SEQ ID NO:2885(QPA-650)的RNA敲低效力;图5R代表SEQ ID NO:2886(QPA-652)的RNA敲低效力;图5S代表SEQ ID NO:2887(QPA-655)的RNA敲低效力;图5T代表SEQ ID NO:2888(QPA-656)的RNA敲低效力;图6A代表SEQ ID NO:2872(QPA-602)的RNA敲低效力;图6B代表SEQ ID NO:2873(QPA-603)的RNA敲低效力;图6C代表SEQ ID NO:2874(QPA-604)的RNA敲低效力;图6D代表SEQ ID NO:2875(QPA-605)的RNA敲低效力;图6E代表SEQ ID NO:2877(QPA-607)的RNA敲低效力;图6F代表SEQ ID NO:2878(QPA-608)的RNA敲低效力;图6G代表SEQ ID NO:2879(QPA-609)的RNA敲低效力;图6H代表SEQ ID NO:2889(QPA-708)的RNA敲低效力;图6I代表SEQ ID NO:2890(QPA-709)的RNA敲低效力;图6J代表SEQ ID NO:2891(QPA-794)的RNA敲低效力;和图6K代表SEQ ID NO:2892(QPA-795)的RNA敲低效力。

[0101] 图7A和图7B显示了使用PPM1A AON(QPA-895、QPA-905、QPA-915、QPA-1045、QPA-1371、AND QPA-646)处理后在两个ALS iPSC细胞系(TBK1和C9orf72)中PPM1A表达减少。

[0102] 图8显示了响应于使用具有胆固醇缀合物基团的PPM1A AON(QPA-606-C、QPA-642-C、QPA-644-C)的处理在人运动神经元中PPM1A相对量减少。

[0103] 图9显示了响应于使用PPM1A AON(QPA-646和QPA-915)的处理PPM1A蛋白的减少。

[0104] 图10显示了响应于使用PPM1A AON(QPA-642、QPA-646、QPA-1371、QPA-905和QPA-915)的处理在野生型iPSC来源的运动神经元中PPM1A蛋白水平降低。

[0105] 图11A-11C显示了在使用PPM1AAON(QPA-646和QPA-905)处理的人运动神经元中Western印迹分析的定性和定量结果。

[0106] 图12A-12D显示了在使用PPM1A AON(QPA-646)处理的野生型iPSC来源的人运动神经元中Western印迹分析的定性和定量结果。

[0107] 图13显示了响应于使用PPM1A AON(QPA-905、QPA-1045和QPA-895)处理在蛋白毒性应激神经退行性模型中细胞存活的挽救。

具体实施方式

[0108] 现在将更具体地描述本公开内容的特征和其他细节。在进一步描述本发明之前,在此收集在说明书、实例和所附权利要求中使用的某些术语。这些定义应根据本公开内容的其余部分来阅读,并为本领域技术人员所理解。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同含义。

[0109] 定义

[0110] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等通常是指获得所需的药理学和/或生理学效果。就部分或完全治愈疾病和/或归因于该疾病的副作用而言,该效果可以是治疗性的。如本文所用,术语“治疗”涵盖对哺乳动物,特别是人的疾病的任何治疗,并且包括:(a)抑制疾病,例如,防止疾病的严重程度或范围增加;(b)缓解

疾病，例如，导致疾病的部分或完全改善；(c)防止疾病复发，例如，防止疾病从此前成功治疗的疾病症状或治疗的疾病恢复到活跃状态。

[0111] “预防”包括推迟在受试者中出现的状态、病症、疾病或状况的临床症状、并发症或生化指标的起始，所受受试者可能患有或易患所述状态、病症、疾病或状况，但尚未经历或表现出所述状态、病症、疾病或状况。“预防”包括在受试者中预防性治疗状态、病症、疾病或状况或其进展，包括在受试者中预防性治疗所述状态、病症、疾病或状况的临床症状、并发症或生化指标或其进展。

[0112] 如本文所用，术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”可互换地指与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂等。将此类介质和药剂用于药物活性物质在本领域中是众所周知的。所述组合物还可以包含提供补充的、附加的或增强的治疗功能的其他活性化合物。

[0113] 如本文所用，术语“药物组合物”指包含至少一种生物活性化合物，例如，如本文所公开的PPM1A反义寡核苷酸(AON)，与一种或多种药学上可接受的赋形剂一起配制的组合物。

[0114] “个体”、“患者”或“受试者”可互换使用，包括任何动物，包括哺乳动物，优选小鼠、大鼠、其他啮齿类动物、家兔、犬、猫、猪、牛、绵羊、马或非人灵长类动物，最优选人。本发明的化合物可以施用于哺乳动物，如人，但也可以是其他哺乳动物，如需要兽医治疗的动物，例如，家养动物(例如，犬、猫等)、农场动物(例如，奶牛、绵羊、猪、马等)和实验室动物(例如，大鼠、小鼠、豚鼠、非人灵长类动物等)。在一些实施方式中，在本发明的方法中治疗的哺乳动物理想地是需要调节PPM1A表达和/或活性的哺乳动物。

[0115] 患有ALS、FTD、伴有FTD的ALS或另一种神经或运动神经元疾病的患者可以是被诊断患有该疾病或表现出该疾病症状的患者。患有ALS、FTD、伴有FTD的ALS或其他神经或运动神经元疾病的患者可以是先前患有该疾病并且在康复或经历疾病和/或疾病症状的完全或部分改善后经历疾病或疾病症状的完全或部分复发。患有ALS、FTD、伴有FTD的ALS或其他神经或运动神经元疾病或病况的患者可以是携带与疾病或病况表现相关的基因突变的患者。例如，患有ALS的患者可以是在以下任何一者中具有基因突变的患者：SOD1、C9orf72、Ataxin 2(ATXN2)、带电多泡体蛋白2B(CHMP2B)、Dynactin 1(DCTN1)、人表皮生长因子受体4(ERBB4)、FIG4磷酸肌醇5-磷酸酶(FIG4)、NIMA相关激酶1(NEK1)、异质核核糖核蛋白A1(HNRNPA1)、重神经丝(NEFH)、外周蛋白(PRPH)、TAR DNA结合蛋白43(TDP43或TARDP)、肉瘤融合蛋白(FUS)、Ubiquilin-2(UBQLN2)、驱动蛋白家族成员5A(KIF5A)、含缬酪肽的蛋白(VCP)、Alsin(ALS2)、Senataxin(SETX)、Sigma非阿片样物质胞内受体1(SIGMAR1)、端粒运动神经元1的存活(SMN1)、痉挛性截瘫11、常染色体隐性遗传(SPG11)、瞬时受体电位阳离子通道亚家族M成员7(TRPM7)、囊泡相关膜蛋白相关蛋白B/C(VAPB)、血管生成素(ANG)、Profilin-1(PFN1)、基质蛋白-3(MATR3)、Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain Containing 10(CHCHD10)、微管蛋白α4A(TUBA4A)、TBK1、C21orf2、Sequestosome-1(SQSTM1，也称为泛素结合蛋白p62)和/或optineurin(OPTN)，特别地，其中所述突变与ALS或者发展成ALS的高风险相关。

[0116] 处于ALS、FTD、伴有FTD的ALS，或者其他神经或运动神经元疾病风险中的患者可以包括那些有所述疾病家族史或所述疾病遗传易感性的患者(例如，携带与例如高疾病风险

相关的基因突变的患者)，或者暴露于增加疾病风险的环境因素的患者。例如，如果患者携带以下任何突变，则患者可能处于ALS的风险中：SOD1、C9orf72、ATXN2、CHMP2B、DCTN1、ERBB4、FIG4、HNRNPA1、NEFH、PRPH、NEK1、TDP43、FUS、UBQLN2、KIF5A、VCP、ALS2、SETX、SIGMAR1、SMN1、SPG11、TRPM7、VAPB、ANG、PFN1、MATR3、CHCHD10、TUBA4A、TBK1、SQSTM1、C21orf2和/或OPTN，特别地，其中所述突变与ALS或者发展成ALS的高风险相关。处于风险中的患者还可以包括那些被诊断为患有与ALS、FTD、伴有FTD的ALS或者其他神经或运动神经元疾病高合并症的疾病或病况的患者(例如，患有痴呆的患者，其与ALS、FTD和延髓发病ALS家族史的高几率显著相关(参见Trojsi,F.等，(2017)“Comorbidity of dementia with amyotrophic lateral sclerosis(ALS):insights from a large multicenter Italian cohort”J Neurol 264:2224-31))。

[0117] 如本文所用，“PPM1A”(也称为蛋白磷酸酶，Mg^{2+}/Mn^{2+}依赖性1A，蛋白磷酸酶1A(以前称为2C)、镁依赖性，α亚型，蛋白磷酸酶1A，EC 3.1.3.16，蛋白磷酸酶2Cα亚型，蛋白磷酸酶IA、磷酸酶2Cα、PP2C-α、PPPM1A和PP2CA)指由Entrez Gene ID号5494鉴定的基因或基因产物(例如，由所述基因编码的蛋白或mRNA转录物(包括pre-mRNA))及其等位基因变体，以及在非人物种(例如，非人灵长类动物或小鼠)中发现的直系同源物。

[0118] 如本文所用，“TBK1”(也称为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶TBK1、NF-κ-B激活激酶、T2K、NAK、EC 2.7.11、FTDALS4 3、IIAE8和TANK结合激酶1)指由Entrez Gene ID号29110鉴定的基因或基因产物(例如，由所述基因编码的蛋白或mRNA转录物(包括pre-mRNA))及其等位基因变体，以及在非人物种(例如，非人灵长类动物或小鼠)中发现的直系同源物。

[0119] 在本说明书中，术语“治疗有效量”指将引起研究人员、兽医、医生或其他临床医生所寻求的组织、系统、动物、或人的生物学或医学应答的主题PPM1A抑制剂的量。本发明的PPM1A抑制剂以治疗有效量施用以治疗和/或预防疾病、病况、病症或状态，例如，ALS、FTD、伴有FTD的ALS，或者其他运动神经元疾病或神经疾病或病况。或者，PPM1A抑制剂的治疗有效量是实现所需治疗和/或预防作用所需的量，如导致预防或减少与TBK1抑制、TBK1活性降低或不希望的或有害的PPM1A活性相关的疾病相关症状的量。

[0120] 术语“PPM1A AON”或“PPM1A反义寡核苷酸”指与PPM1A基因产物(如PPM1A mRNA转录物)的一部分互补的反义寡核苷酸。PPM1A AON的实例包括具有SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863的任一序列的PPM1A AON和具有SEQ ID NO:2868-2959的任一序列的PPM1A间隔体AON。“PPM1A AON”还包括PPM1A间隔体AON。

[0121] 术语“PPM1A间隔体AON”指在“5→3”方向具有至少三个不同结构区域的PPM1A AON，包括5’翼区、中央区域和3’翼区。中央区域包含一段核苷，其能够募集和激活RNAseH。例如，中央区域包含连接的DNA核苷、2’-氟阿拉伯糖核酸(FANA)和氟代环己烯基核酸(F-CeNA)。

[0122] 如本文所用，术语“药学上可接受的盐”指可存在于本发明组合物中使用的PPM1A抑制剂中的酸性或碱性基团的盐。包含在本发明组合物中的本质上是碱性的PPM1A抑制剂能够与各种无机酸和有机酸形成多种盐。可用于制备此类碱性化合物的药学上可接受的酸加成盐的酸是形成无毒酸加成盐的酸，例如，含有药学上可接受的阴离子的盐，包括但不限于苹果酸盐、草酸盐、氯离子、溴离子、碘离子、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、醋酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒

石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(例如,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。除了上述酸之外,本发明组合物中包含的PPM1A抑制剂包含氨基部分,其可以与各种氨基酸形成药学上可接受的盐。在本发明组合物中包含的酸性化合物能够与各种药学上可接受的阳离子形成碱盐。这种盐的实例包括碱金属或碱土金属盐,特别是钙、镁、钠、锂、锌、钾和铁盐。本公开内容的药学上可接受的盐包括例如PPM1A AON的药学上可接受的盐,其包含SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一核苷酸序列。

[0123] 本公开内容的PPM1A抑制剂可以包含一个或多个手性中心、基团、键和/或双键,因此,以立体异构体的形式存在,如几何异构体、对映异构体或非对映异构体。当在本文中使用时,术语"立体异构体"由所有几何异构体、对映异构体或非对映异构体组成。这些化合物可以用符号"R"或"S"(或"Rp"或"Sp")表示,这取决于立体原子周围的取代基的构型,例如,立体碳、磷或硫原子。在一些实施方式中,化合物的一个或多个键可以具有Rp或Sp构型(例如,一个或多个硫代磷酸酯键具有Rp或Sp构型)。每个硫代磷酸酯键的构型可以独立于另一个硫代磷酸酯键(例如,一个硫代磷酸酯键具有Rp构型,而第二个硫代磷酸酯键具有Sp构型)。本发明包括这些化合物的各种立体异构体及其混合物。立体异构体包括对映异构体和非对映异构体。对映异构体或非对映异构体的混合物在命名法中可指定为"(±)",但本领域技术人员将认识到结构可隐含地表示手性中心。本发明的PPM1A抑制剂的单个立体异构体可以由含有不对称或立体中心的市售初始原料合成制备,或通过制备外消旋混合物然后通过本领域普通技术人员熟知的拆分方法制备。这些拆分方法的实例包括(1)将对映异构体混合物连接到手性助剂上,通过重结晶或色谱分离所得非对映异构体混合物,并从助剂中释放光学纯产物,(2)使用光学活性拆分剂形成盐,或(3)在手性色谱柱上直接分离光学对映体混合物。立体异构体混合物也可以通过众所周知的方法拆分成其组分立体异构体,如手性相气相色谱法、手性相超临界流体色谱法、手性相模拟移动床色谱法、手性相高效液相色谱法、将所述化合物结晶为手性盐络合物或将所述化合物在手性溶剂中结晶。立体异构体也可以通过众所周知的不对称合成方法从立体异构体纯的中间体、试剂和催化剂中获得。

[0124] 本发明的PPM1A抑制剂的单个立体异构体可以由含有不对称或立体中心的市售初始原料合成制备,或通过制备外消旋混合物然后通过本领域普通技术人员熟知的拆分方法制备。这些拆分方法的实例包括(1)将对映异构体混合物连接到手性助剂上,通过重结晶或色谱分离所得非对映异构体混合物,并从助剂中释放光学纯产物,(2)使用光学活性拆分剂形成盐,或(3)在手性色谱柱上直接分离光学对映体混合物。立体异构体混合物也可以通过众所周知的方法拆分成其组分立体异构体,如手性相气相色谱法、手性相超临界流体色谱法、手性相模拟移动床色谱法、手性相高效液相色谱法、将所述化合物结晶为手性盐络合物或将所述化合物在手性溶剂中结晶。立体异构体也可以通过众所周知的不对称合成方法从立体异构体纯的中间体、试剂和催化剂中获得。

[0125] 本文公开的PPM1A抑制剂可以与药学上可接受的溶剂如水、乙醇等以溶剂化和非溶剂化形式存在,并且本发明旨在涵盖溶剂化和非溶剂化形式。

[0126] 本发明还包括同位素标记的本发明化合物(例如,同位素标记的PPM1A抑制剂),除

了一个或多个原子被具有不同于自然界中最丰富的原子质量或质量数的原子质量或质量数的原子替代之外，其与本文所述的那些相同。可以掺入本发明化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素，如分别为^{2}H、^{3}H、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}O、^{17}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F和^{36}Cl。

[0127] 某些同位素标记的公开化合物(例如，用^{3}H和^{14}C标记的那些)可用于化合物和/或底物组织分布测定。特别优选氚化(即，^{3}H)和碳14(即，^{14}C)同位素，因为其易于制备和可检测。此外，用较重的同位素(如氘(即，^{2}H)取代)可以提供某些治疗优势，这是由于代谢稳定性更高(例如，体内半衰期增加或剂量要求降低)而产生的，因此在某些情况下可能是优选的。

[0128] 如本文所用，“2’-O-(2-甲氧基乙基)”(也称为2’-MOE和2’-O(CH2)2OCH3和MOE)指呋喃糖环2’位的O-甲氧基乙基修饰。2’-O-(2-甲氧基乙基)修饰的糖是修饰的糖。

[0129] 如本文所用，“2’-MOE核苷”(也称为2’-O-(2-甲氧基乙基)核苷)指包含2’-MOE修饰的糖部分的核苷。

[0130] 如本文所用，“2’-取代的核苷”指在呋喃糖环的2’位包含H或OH意外的取代基的核苷。在某些实施方式中，2’取代的核苷包括具有双环糖修饰的核苷。

[0131] 如本文所用，“双环糖”指通过两个原子桥接修饰的呋喃糖环。双环糖是一种修饰的糖。

[0132] 如本文所用，“双环核苷”(也称为BNA)指具有糖部分的核苷，所述糖部分包含连接糖环的两个碳原子的桥，从而形成双环系统。在某些实施方式中，桥连接糖环的4’-碳和2’-碳。

[0133] 如本文所用，“cEt”或“受限乙基”指具有糖部分的双环核苷，所述糖部分包含连接4’-碳和2’-碳的桥，其中所述桥具有式：4’-CH(CH_3)—O-2’。

[0134] 如本文所用，“受限乙基核苷”(也称为cEt核苷)指包含双环糖部分的核苷，所述双环糖部分包含4’-CH(CH_3)—O-2’桥。在一些实施方式中，cEt可以被修饰。在一些实施方式中，cEt可以是S-cEt。在一些其他实施方式中，cEt可以是R-cEt。

[0135] 如本文所用，“核苷间键”指连接糖的3’和5’位置或糖模拟物的相应位置的原子或基团。在一些实施方式中，如本文所用，“非天然键”指“修饰的核苷间键”。

[0136] 如本文所用，在寡核苷酸的上下文中，“连续的”指彼此直接相邻的核苷、核碱基、糖部分或核苷间键。例如，“连续的核碱基”指在序列中彼此直接相邻的核碱基。

[0137] 如本文所用，“修饰的核碱基”指除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶之外的任何核碱基。修饰的核碱基的实例包括5-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶或5-甲氧基尿嘧啶。“修饰的核碱基”指嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)，以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。

[0138] 如本文所用，“5-甲基胞嘧啶”指用附接到5位的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是修饰的核碱基。

[0139] 如本文所用，“修饰的核苷”指独立地具有修饰的糖部分和/或修饰的核碱基的核苷。通用碱基是修饰的核碱基，可以与五种未修饰的核碱基中的任何一种配对。修饰的核苷包括无碱基核苷，其缺乏核碱基。

[0140] 如本文所用，“连接的核苷”是以连续序列连接的核苷(即，在连接的核苷之间不存

在额外的核苷)。

[0141] 如本文所用,“杂交”指互补寡核苷酸和/或核酸的配对或退火。尽管不限于特定机制,但最常见的杂交机制涉及氢键,其可以是互补核碱基之间的Watson-Crick、Hoosteen或反向Hoosteen氢键。

[0142] 如本文所用,“增加活性量”指相对于未处理或对照样品中的转录表达或活性增加的活性。

[0143] 如本文所用,“错配”或“非互补核碱基”指第一核酸的核碱基不能与第二或靶核酸的相应核碱基配对的情况。

[0144] 如本文所用,“修饰的核苷间键”指天然存在的核苷间键(例如,磷酸二酯核苷间键)的取代或任何变化。“硫代磷酸酯键”指修饰的核苷间键,其中磷酸二酯核苷间键的非桥连氧原子之一被硫原子取代。

[0145] 如本文所用,“修饰的寡核苷酸”指包含至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖和/或修饰的核碱基的寡核苷酸。

[0146] 如本文所用,“修饰的糖”或“修饰的糖部分”指修饰的呋喃糖部分或具有除呋喃糖部分以外的修饰的糖部分,其可以将核碱基连接到寡核苷酸中的另一个基团,如核苷间键、缀合物基团或末端基团。

[0147] 如本文所用,“单体”指寡聚物的单个单元。单体包括但不限于核苷和核苷酸,无论是天然存在的还是修饰的。

[0148] 如本文所用,“基序”指反义化合物中未修饰和修饰的核苷的模式。

[0149] 如本文所用,“天然糖部分”指在DNA(2'-H)或RNA(2'-OH)中存在的糖部分。

[0150] 如本文所用,“天然存在的核苷间键”指3'至5'磷酸二酯键。

[0151] 如本文所用,“核碱基”指能够与另一核酸的碱基配对的杂环部分。

[0152] 如本文所用,“核碱基互补性”指能够与另一核碱基进行碱基配对的核碱基。例如,在DNA中,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)互补。例如,在RNA中,腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)互补。在某些实施方式中,互补核碱基是指能够与其靶核酸的核碱基进行碱基配对的反义化合物的核碱基。例如,如果反义化合物的某个位置的核碱基能够与靶核酸的某个位置的核碱基形成氢键,则认为寡核苷酸和靶核酸之间的氢键位置在该核碱基对处是互补的。

[0153] 如本文所用,“核碱基序列”指独立于任何糖、键和/或核碱基修饰的连续核碱基的顺序。

[0154] 如本文所用,“核苷”指与糖连接的核碱基。术语“核苷”还包括“修饰的核苷”,其独立地具有修饰的糖部分和/或修饰的核碱基。

[0155] 如本文所用,“核苷模拟物”包括用于取代糖或糖和碱基的那些结构,并且不一定是寡聚化合物的一个或多个位置处的键,例如具有吗啉基、环己烯基、环己基、四氢吡喃基、双环或三环糖模拟物的核苷模拟物,例如,非呋喃糖单元。核苷酸模拟物包括用于取代寡聚化合物的核苷和在一个或多个位置处的连接的那些结构,例如肽核酸或吗啉基(通过—N(H)—C(=O)—O—或其他非磷酸二酯键连接的吗啉基)。糖替代物与稍宽的核苷模拟物重叠,但仅用于指示糖单元(呋喃糖环)的替换。本文提供的四氢吡喃环是糖替代物的实例,其中呋喃糖基团已被四氢吡喃环系统取代。“模拟物”指被糖、核碱基和/或核苷间键取代的基团。通常,使用模拟物代替糖或糖-核苷间键组合,并且保留核碱基以与所选靶点杂交。

[0156] 如本文所用，“核苷酸”指具有与核苷的糖部分共价连接的磷酸基团的核苷。

[0157] 如本文所用，“寡聚化合物”或“寡聚物”指连接的单体亚基的聚合物，其能够与核酸分子的至少一个区域杂交。

[0158] 如本文所用，“寡核苷酸”是指连接的核苷的聚合物，每个核苷可以被修饰或未修饰，彼此独立。

[0159] 本公开内容提供了用于在患者中治疗、改善或预防神经疾病的方法，所述神经疾病例如但不限于肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病，包括向患者施用有效抑制PPM1A活性和/或表达和/或增加TBK1表达、磷酸化和/或活性的PPM1A抑制剂，其中所述组合物包含治疗有效量的PPM1A抑制剂和药学上可接受的赋形剂。本文还提供了治疗、改善或预防神经疾病的方法，所述神经疾病例如但不限于肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病，以神经疾病相关的症状为特征的病况或病症，所述神经疾病例如但不限于肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病，包括向患者施用有效抑制PPM1A活性和/或表达和/或增加TBK1表达、磷酸化和/或活性的PPM1A抑制剂，其中所述组合物包含治疗有效量的PPM1A抑制剂(例如，a PPM1A AON)和药学上可接受的赋形剂。

[0160] 例如，在一些实施方式中，用于治疗、改善或预防神经疾病，例如但不限于肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病，以神经疾病相关的症状为特征的病况或病症，例如但不限于肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性

核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病的方法,包括向患者施用药学上可接受的组合物,例如,药学上可接受的制剂(包括一种或多种PPM1A抑制剂)。PPM1A抑制剂可以抑制PPM1A活性,例如,PPM1A磷酸酶活性和/或PPM1A表达水平,例如,PPM1A mRNA和/或蛋白表达。不希望受理论束缚,PPM1A抑制剂可以通过降低活性PPM1A的量来抑制PPM1A活性和/或表达并增加TBK1表达、磷酸化和/或活性,从而使总TBK1的更大部分保持磷酸化形式。

[0161] 本公开内容还提供药物组合物,其包含本文公开的PPM1A抑制剂与一种或多种药学或化妆品可接受的赋形剂一起配制。这些制剂包括适合于口服、舌下、气管内、鼻内、阴道、直肠、局部、透皮、肺、鞘内、脑池内、口腔和胃肠外(例如,皮下、肌内、皮内、十二指肠内或静脉内)施用的制剂,或适用于局部使用,例如,作为适合局部应用于皮肤和/或粘膜的组合物的一部分,例如,凝胶、糊剂、蜡、乳膏、喷雾剂、液体、泡沫、乳液、软膏、局部溶液、透皮贴剂、粉末、蒸气或酊剂形式的组合物。尽管在任何给定情况下最合适的施用形式将取决于所治疗疾病的程度和严重程度以及所使用的特定PPM1A抑制剂的性质。

[0162] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含PPM1A抑制剂或其药学上可接受的盐(例如,PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一核苷酸序列)。

[0163] 本公开内容还提供了包括使用包含如本文公开的PPM1A抑制剂(例如,SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一PPM1A AON)与一种或多种药学上可接受的赋形剂一起配制的药物组合物的方法。本文提供的示例性组合物包含基本上包含如上所述的PPM1A抑制剂和一种或多种药学上可接受的赋形剂的组合物。制剂包括适合于口服、舌下、气管内、鼻内、直肠、阴道、局部、透皮、肺、鞘内、脑池内、口腔和胃肠外(例如,皮下、肌内、皮内、十二指肠内或静脉内)施用或局部使用的制剂。在任何给定情况下,最合适的施用形式将取决于个体试图在受试者中预防的状态、病症、疾病或病况的临床症状、并发症或生化指标;试图在受试者中预防的状态、病症、疾病或病况;和/或特定化合物的性质和/或所使用的组合物。

[0164] PPM1A抑制剂

[0165] 在某些实施方式中,PPM1A水平(例如,PPM1A mRNA或蛋白水平)和/或活性(例如,生物活性,例如,PPM1A磷酸酶活性)可以使用靶向PPM1A基因或PPM1A基因产物(例如,PPM1A mRNA)的化合物或组合物降低。类似地,靶向PPM1A基因或PPM1A基因产物(例如,PPM1A mRNA或PPM1A pre-mRNA)的化合物或组合物可以增加磷酸化TBK1(pTBK1)水平(例如,pTBK1蛋白水平)和/或活性(例如,TBK1生物活性,例如,激酶活性)。在各种实施方式中,此类PPM1A抑制剂是PPM1A反义治疗剂,例如,靶向PPM1A基因或PPM1A基因产物(例如,PPM1A mRNA)的反义寡核苷酸(AON)。

[0166] PPM1A抑制剂可以是但不限于化合物如PPM1A抗体和抗体片段(例如,PPM1A单克隆抗体、PPM1A Fab片段(例如,$F(ab')_2$和Fab')、PPM1A可变片段(例如,PPM1A单链可变片段、二聚体单链可变片段和单域抗体)和PPM1A双特异性单克隆抗体)、PPM1A的小分子抑制剂、

PPM1A基于核苷酸的抑制剂(例如,PPM1A shRNA、PPM1A siRNA、PPM1A PNA、PPM1A LNA或PPM1A吗啉代寡聚物),或者包含此类化合物的组合物。

[0167] PPM1A抗体包括,例如,抗PPM1A抗体p6c7(目录号ab14824;Abcam,Cambridge,MA,USA)、抗PPM1A,克隆7F12抗体(目录号MAB S415;Millipore,Burlington,MA,USA)和抗PPM1A克隆4E11(目录号SAB1402318,Sigma-Aldrich,Burlington,MA,USA)。

[0168] PPM1A小分子抑制剂包括植物生物碱血根碱(参见Aburai等,(2010)"Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells"Biosci Biotechnol Biochem.74(3):548-52)。其他PPM1A小分子抑制剂包括蛋白水解靶向嵌合体(PROTACS),如诱导PPM1A蛋白蛋白水解的PROTACS。

[0169] PPM1A反义治疗剂

[0170] 反义治疗剂是一类可用于抑制基因表达的基于核酸的化合物。反义治疗剂可以是基于单链或双链脱氧核糖核酸(DNA)、基于核糖核酸(RNA)或DNA/RNA化学类似物的化合物。在通常情况下,反义治疗剂被设计为包括与从给定基因转录的mRNA或pre-mRNA序列互补或几乎互补的核苷酸序列,以促进反义治疗剂与pre-mRNA或mRNA之间的结合。不受理论的束缚,据信在大多数情况下反义治疗剂通过与mRNA或pre-mRNA结合而起作用,从而抑制蛋白翻译、改变pre-mRNA剪接成成熟mRNA和/或引起mRNA的破坏。在大多数情况下,反义治疗性核苷酸序列与靶基因或mRNA有意义序列的一部分互补。本文所述的PPM1A反义治疗剂是基于寡核苷酸的化合物,其包括与PPM1A基因有义、PPM1A pre-mRNA有义和/或PPM1A mRNA有义序列或其一部分互补的寡核苷酸序列。本文所述的PPM1A反义治疗剂还可以是能够结合PPM1A基因有义、PPM1A pre-mRNA有义和/或PPM1A mRNA有义序列或其一部分的基于核苷酸化学类似物的化合物。PPM1A反义治疗剂包括PPM1A反义寡核苷酸、PPM1A shRNA、PPM1A siRNA、PPM1A PNA、PPM1A LNA和PPM1A吗啉代寡聚物。

[0171] 反义寡核苷酸(AON)是基于短寡核苷酸的序列,包括与靶RNA序列互补的寡核苷酸序列。AON的长度通常在8至50个核苷酸之间,例如,长度为20个核苷酸。AON可以包括化学修饰的核苷(例如,2'-O-甲基化核苷或2'-O-(2-甲氧基乙基)核苷)以及修饰的核苷间键(例如,硫代磷酸酯键)。本文所述的PPM1A AON包括与PPM1A RNA序列互补的寡核苷酸序列,如PPM1A mRNA转录物。本文所述的PPM1A AON可以包括化学修饰的核苷和修饰的核苷间键(例如,硫代磷酸酯键)。

[0172] 肽核酸(PNA)是一种人工核磁的短聚合物,其结构类似于DNA或RNA。PNA包括由通过肽键连接的重复N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元组成的主链。本文所述的PPM1A PNA可用作以高特异性结合PPM1A RNA序列并抑制PPM1A基因表达的反义治疗剂。

[0173] 锁定核酸(LNA)是包含一个或多个修饰的RNA核苷酸的寡核苷酸序列,其中核糖部分被连接2'氧和4'碳的额外桥修饰。据信LNA比类似的寡核苷酸序列具有更高的Tm。本文所述的PPM1A LNA可用作以高特异性结合PPM1A RNA序列并抑制PPM1A基因表达的反义治疗剂。

[0174] 吗啉代寡聚物是寡核苷酸化合物,其包括连接到通过二氨基磷酸酯基团连接的亚甲基吗啉环骨架上的DNA碱基。本发明的吗啉代寡聚物可以设计为结合特定的目标PPM1A RNA序列(例如,目标PPM1A mRNA或PPM1A pre-mRNA序列),从而阻止基因表达。本文所述的

PPM1A吗啉代寡聚物可用作以高特异性结合PPM1A mRNA序列并抑制PPM1A基因表达的反义治疗剂。本文所述的PPM1A吗啉代寡聚物还可用于结合PPM1A pre-mRNA序列，改变PPM1A pre-mRNA剪接和PPM1A基因表达。

[0175] 小发夹RNA(shRNA)通常是具有发夹样结构的RNA分子，可用于沉默基因表达。shRNA通常从编码shRNA序列的质粒中表达，并且可以从病毒载体中表达以允许慢病毒、腺病毒或腺相关病毒表达。不受理论束缚，据信shRNA通过利用RNA干扰(RNAi)过程来抑制基因表达。简而言之，shRNA转录物由Drosha和Dicer处理，然后负载到RNA诱导的沉默复合体(RISC)上，从而允许靶向特定的mRNA，以及mRNA降解或抑制蛋白翻译。本文所述的PPM1A shRNA能够抑制PPM1A基因表达。

[0176] 小干扰RNA(siRNA)是长度约为20-25个碱基对的双链RNA分子，其利用RNAi机制(例如，Drosha和RISC)结合并靶向mRNA进行降解。siRNA不依赖于质粒或载体进行表达，通常可以直接递送至靶细胞，例如，通过转染。PPM1A siRNA是双链RNA序列，包含与PPM1A mRNA序列互补的RNA序列，可防止PPM1A蛋白翻译。

[0177] PPM1A反义治疗剂(例如，本文所述的PPM1A反义寡核苷酸)中包含的核苷酸数量可能会有所不同。例如，在一些实施方式中，反义寡核苷酸的长度为12至15个核苷酸。在一些实施方式中，反义寡核苷酸的长度为15至20个核苷酸。在一些实施方式中，反义寡核苷酸的长度为20至40个核苷酸。在一些实施方式中，反义寡核苷酸的长度为20至22个核苷酸。在一些实施方式中，反义寡核苷酸的长度为22至40个核苷酸。在一些实施方式中，反义寡核苷酸的长度为20至30个、25至35个或者30至40个核苷酸。

[0178] PPM1A反义寡核苷酸

[0179] 本文所述的PPM1A反义寡核苷酸(AON)是与PPM1A基因产物的一部分互补的短合成寡核苷酸序列，如PPM1A转录物(例如，PPM1A mRNA转录物)。

[0180] 在各种实施方式中，PPM1A AON包含具有核碱基序列的连接的核苷，其与PPM1A基因产物(如PPM1A mRNA序列)的一部分至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％互补。在一些实施方式中，PPM1A AON可以包含非双链寡核苷酸。在一些实施方式中，PPM1A AON可以包含两个寡核苷酸的双螺旋，其中第一寡核苷酸包含与PPM1A mRNA序列完全或几乎完全互补的核苷酸序列，第二寡核苷酸包含与第一寡核苷酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列。AON结合特异性可以通过测量解离常数、解链温度(Tm)等参数或其他标准(如蛋白或RNA表达水平的变化)或测量PPM1A活性或表达的其他测定来评估。

[0181] 如本文所公开的PPM1A AON可以是长度5至100个核苷酸的寡核苷酸序列，例如，长度10至40个核苷酸，例如，长度14至40个核苷酸，长度10至30个核苷酸，例如，长度14至30个核苷酸，例如，长度14至25个核苷酸，长度15至22个核苷酸，长度18至21个核苷酸，或者长度18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。

[0182] 本文所述的PPM1A AON还包括反义寡核苷酸，其包含下表1中列出的寡核苷酸序列。表1中的“起始位置”列是指PPM1A mRNA转录物(SEQ ID NO:2864)中与PPM1A AON序列互补的第一个位置。例如，“起始位置”为457的寡核苷酸序列与SEQ ID NO:2864的位置457处的第一个核苷酸互补。

[0183] 表1:PPM1A AON序列和相应靶序列

[0184]

SEQ ID NO:	起始位置	PPM1A AON 序列（5'→3'）*	SEQ ID NO:	靶序列（5'→3'）
2	457	ATGTCTTGATCCTCTAGGTC	956	GACCTAGAGGATCAAGACAT
3	458	TATGTCTTGATCCTCTAGGT	957	ACCTAGAGGATCAAGACATA
4	459	TTATGTCTTGATCCTCTAGG	958	CCTAGAGGATCAAGACATAA
5	460	ATTATGTCTTGATCCTCTAG	959	CTAGAGGATCAAGACATAAT
6	461	CATTATGTCTTGATCCTCTA	960	TAGAGGATCAAGACATAATG
7	462	CCATTATGTCTTGATCCTCT	961	AGAGGATCAAGACATAATGG
8	463	CCCATTATGTCTTGATCCTC	962	GAGGATCAAGACATAATGGG
9	464	TCCCATTATGTCTTGATCCT	963	AGGATCAAGACATAATGGGA
10	465	CTCCCATTATGTCTTGATCC	964	GGATCAAGACATAATGGGAG
11	466	GCTCCCATTATGTCTTGATC	965	GATCAAGACATAATGGGAGC
12	467	TGCTCCCATTATGTCTTGAT	966	ATCAAGACATAATGGGAGCA
13	468	ATGCTCCCATTATGTCTTGA	967	TCAAGACATAATGGGAGCAT
14	469	AATGCTCCCATTATGTCTTG	968	CAAGACATAATGGGAGCATT
15	470	AAATGCTCCCATTATGTCTT	969	AAGACATAATGGGAGCATTT
16	471	AAAATGCTCCCATTATGTCT	970	AGACATAATGGGAGCATTTT
17	472	AAAAATGCTCCCATTATGTC	971	GACATAATGGGAGCATTTTT
18	473	TAAAAATGCTCCCATTATGT	972	ACATAATGGGAGCATTTTTA
19	474	CTAAAAATGCTCCCATTATG	973	CATAATGGGAGCATTTTTAG
20	475	TCTAAAAATGCTCCCATTAT	974	ATAATGGGAGCATTTTTAGA
21	476	GTCTAAAAATGCTCCCATTA	975	TAATGGGAGCATTTTTAGAC
22	477	TGTCTAAAAATGCTCCCATT	976	AATGGGAGCATTTTTAGACA

[0185]

23	478	TTGTCTAAAAATGCTCCCAT	977	ATGGGAGCATTTTTAGACAA
24	479	CTTGTCTAAAAATGCTCCCA	978	TGGGAGCATTTTTAGACAAG
25	480	GCTTGTCTAAAAATGCTCCC	979	GGGAGCATTTTTAGACAAGC
26	481	GGCTTGTCTAAAAATGCTCC	980	GGAGCATTTTTAGACAAGCC
27	482	TGGCTTGTCTAAAAATGCTC	981	GAGCATTTTTAGACAAGCCA
28	483	TTGGCTTGTCTAAAAATGCT	982	AGCATTTTTAGACAAGCCAA
29	484	TTTGGCTTGTCTAAAAATGC	983	GCATTTTTAGACAAGCCAAA
30	485	CTTTGGCTTGTCTAAAAATG	984	CATTTTTAGACAAGCCAAAG
31	486	TCTTTGGCTTGTCTAAAAAT	985	ATTTTTAGACAAGCCAAAGA
32	487	ATCTTTGGCTTGTCTAAAAA	986	TTTTTAGACAAGCCAAAGAT
33	488	CATCTTTGGCTTGTCTAAAA	987	TTTTAGACAAGCCAAAGATG
34	489	CCATCTTTGGCTTGTCTAAA	988	TTTAGACAAGCCAAAGATGG
35	490	TCCATCTTTGGCTTGTCTAA	989	TTAGACAAGCCAAAGATGGA
36	491	TTCCATCTTTGGCTTGTCTA	990	TAGACAAGCCAAAGATGGAA
37	492	TTTCCATCTTTGGCTTGTCT	991	AGACAAGCCAAAGATGGAAA
38	493	TTTTCCATCTTTGGCTTGTC	992	GACAAGCCAAAGATGGAAAA
39	494	CTTTTCCATCTTTGGCTTGT	993	ACAAGCCAAAGATGGAAAAG
40	495	GCTTTTCCATCTTTGGCTTG	994	CAAGCCAAAGATGGAAAAGC
41	496	TGCTTTTCCATCTTTGGCTT	995	AAGCCAAAGATGGAAAAGCA
42	497	ATGCTTTTCCATCTTTGGCT	996	AGCCAAAGATGGAAAAGCAT
43	498	TATGCTTTTCCATCTTTGGC	997	GCCAAAGATGGAAAAGCATA
44	499	TTATGCTTTTCCATCTTTGG	998	CCAAAGATGGAAAAGCATAA
45	500	ATTATGCTTTTCCATCTTTG	999	CAAAGATGGAAAAGCATAAT
46	501	CATTATGCTTTTCCATCTTT	1000	AAAGATGGAAAAGCATAATG
47	502	GCATTATGCTTTTCCATCTT	1001	AAGATGGAAAAGCATAATGC
48	503	GGCATTATGCTTTTCCATCT	1002	AGATGGAAAAGCATAATGCC
49	504	GGGCATTATGCTTTTCCATC	1003	GATGGAAAAGCATAATGCCC
50	505	TGGGCATTATGCTTTTCCAT	1004	ATGGAAAAGCATAATGCCCA
51	506	CTGGGCATTATGCTTTTCCA	1005	TGGAAAAGCATAATGCCCAG
52	507	CCTGGGCATTATGCTTTTCC	1006	GGAAAAGCATAATGCCCAGG
53	508	CCCTGGGCATTATGCTTTTC	1007	GAAAAGCATAATGCCCAGGG
54	509	CCCCTGGGCATTATGCTTTT	1008	AAAAGCATAATGCCCAGGGG
55	510	GCCCCTGGGCATTATGCTTT	1009	AAAGCATAATGCCCAGGGGC
56	511	TGCCCCTGGGCATTATGCTT	1010	AAGCATAATGCCCAGGGGCA
57	512	CTGCCCCTGGGCATTATGCT	1011	AGCATAATGCCCAGGGGCAG
58	513	CCTGCCCCTGGGCATTATGC	1012	GCATAATGCCCAGGGGCAGG
59	514	CCCTGCCCCTGGGCATTATG	1013	CATAATGCCCAGGGGCAGGG
60	515	ACCCTGCCCCTGGGCATTAT	1014	ATAATGCCCAGGGGCAGGGT
61	516	TACCCTGCCCCTGGGCATTA	1015	TAATGCCCAGGGGCAGGGTA
62	517	TTACCCTGCCCCTGGGCATT	1016	AATGCCCAGGGGCAGGGTAA
63	518	ATTACCCTGCCCCTGGGCAT	1017	ATGCCCAGGGGCAGGGTAAT
64	519	CATTACCCTGCCCCTGGGCA	1018	TGCCCAGGGGCAGGGTAATG
65	520	CCATTACCCTGCCCCTGGGC	1019	GCCCAGGGGCAGGGTAATGG
66	521	CCCATTACCCTGCCCCTGGG	1020	CCCAGGGGCAGGGTAATGGG
67	522	ACCCATTACCCTGCCCCTGG	1021	CCAGGGGCAGGGTAATGGGT
68	523	AACCCATTACCCTGCCCCTG	1022	CAGGGGCAGGGTAATGGGTT

[0186]

69	524	CAACCCATTACCCTGCCCCT	1023	AGGGGCAGGGTAATGGGTTG
70	525	GCAACCCATTACCCTGCCCC	1024	GGGGCAGGGTAATGGGTTGC
71	526	CGCAACCCATTACCCTGCCC	1025	GGGCAGGGTAATGGGTTGCG
72	527	TCGCAACCCATTACCCTGCC	1026	GGCAGGGTAATGGGTTGCGA
73	528	ATCGCAACCCATTACCCTGC	1027	GCAGGGTAATGGGTTGCGAT
74	529	TATCGCAACCCATTACCCTG	1028	CAGGGTAATGGGTTGCGATA
75	530	ATATCGCAACCCATTACCCT	1029	AGGGTAATGGGTTGCGATAT
76	531	CATATCGCAACCCATTACCC	1030	GGGTAATGGGTTGCGATATG
77	532	CCATATCGCAACCCATTACC	1031	GGTAATGGGTTGCGATATGG
78	533	CCCATATCGCAACCCATTAC	1032	GTAATGGGTTGCGATATGGG
79	534	GCCCATATCGCAACCCATTA	1033	TAATGGGTTGCGATATGGGC
80	535	AGCCCATATCGCAACCCATT	1034	AATGGGTTGCGATATGGGCT
81	536	TAGCCCATATCGCAACCCAT	1035	ATGGGTTGCGATATGGGCTA
82	537	TTAGCCCATATCGCAACCCA	1036	TGGGTTGCGATATGGGCTAA
83	538	CTTAGCCCATATCGCAACCC	1037	GGGTTGCGATATGGGCTAAG
84	539	GCTTAGCCCATATCGCAACC	1038	GGTTGCGATATGGGCTAAGC
85	540	TGCTTAGCCCATATCGCAAC	1039	GTTGCGATATGGGCTAAGCA
86	541	CTGCTTAGCCCATATCGCAA	1040	TTGCGATATGGGCTAAGCAG
87	542	GCTGCTTAGCCCATATCGCA	1041	TGCGATATGGGCTAAGCAGC
88	543	TGCTGCTTAGCCCATATCGC	1042	GCGATATGGGCTAAGCAGCA
89	544	ATGCTGCTTAGCCCATATCG	1043	CGATATGGGCTAAGCAGCAT
90	545	CATGCTGCTTAGCCCATATC	1044	GATATGGGCTAAGCAGCATG
91	546	GCATGCTGCTTAGCCCATAT	1045	ATATGGGCTAAGCAGCATGC
92	547	TGCATGCTGCTTAGCCCATA	1046	TATGGGCTAAGCAGCATGCA
93	548	TTGCATGCTGCTTAGCCCAT	1047	ATGGGCTAAGCAGCATGCAA
94	549	CTTGCATGCTGCTTAGCCCA	1048	TGGGCTAAGCAGCATGCAAG
95	550	CCTTGCATGCTGCTTAGCCC	1049	GGGCTAAGCAGCATGCAAGG
96	551	GCCTTGCATGCTGCTTAGCC	1050	GGCTAAGCAGCATGCAAGGC
97	552	AGCCTTGCATGCTGCTTAGC	1051	GCTAAGCAGCATGCAAGGCT
98	553	CAGCCTTGCATGCTGCTTAG	1052	CTAAGCAGCATGCAAGGCTG
99	554	CCAGCCTTGCATGCTGCTTA	1053	TAAGCAGCATGCAAGGCTGG
100	555	GCCAGCCTTGCATGCTGCTT	1054	AAGCAGCATGCAAGGCTGGC
101	556	CGCCAGCCTTGCATGCTGCT	1055	AGCAGCATGCAAGGCTGGCG
102	557	ACGCCAGCCTTGCATGCTGC	1056	GCAGCATGCAAGGCTGGCGT
103	558	CACGCCAGCCTTGCATGCTG	1057	CAGCATGCAAGGCTGGCGTG
104	559	ACACGCCAGCCTTGCATGCT	1058	AGCATGCAAGGCTGGCGTGT
105	560	AACACGCCAGCCTTGCATGC	1059	GCATGCAAGGCTGGCGTGTT
106	561	CAACACGCCAGCCTTGCATG	1060	CATGCAAGGCTGGCGTGTTG
107	562	TCAACACGCCAGCCTTGCAT	1061	ATGCAAGGCTGGCGTGTTGA
108	563	TTCAACACGCCAGCCTTGCA	1062	TGCAAGGCTGGCGTGTTGAA
109	564	TTTCAACACGCCAGCCTTGC	1063	GCAAGGCTGGCGTGTTGAAA
110	565	ATTTCAACACGCCAGCCTTG	1064	CAAGGCTGGCGTGTTGAAAT
111	566	CATTTCAACACGCCAGCCTT	1065	AAGGCTGGCGTGTTGAAATG
112	567	CCATTTCAACACGCCAGCCT	1066	AGGCTGGCGTGTTGAAATGG
113	568	TCCATTTCAACACGCCAGCC	1067	GGCTGGCGTGTTGAAATGGA
114	569	CTCCATTTCAACACGCCAGC	1068	GCTGGCGTGTTGAAATGGAG

[0187]

115	570	CCTCCATTTCAACACGCCAG	1069	CTGGCGTGTTGAAATGGAGG
116	571	TCCTCCATTTCAACACGCCA	1070	TGGCGTGTTGAAATGGAGGA
117	572	ATCCTCCATTTCAACACGCC	1071	GGCGTGTTGAAATGGAGGAT
118	573	CATCCTCCATTTCAACACGC	1072	GCGTGTTGAAATGGAGGATG
119	574	GCATCCTCCATTTCAACACG	1073	CGTGTTGAAATGGAGGATGC
120	575	TGCATCCTCCATTTCAACAC	1074	GTGTTGAAATGGAGGATGCA
121	576	GTGCATCCTCCATTTCAACA	1075	TGTTGAAATGGAGGATGCAC
122	577	TGTGCATCCTCCATTTCAAC	1076	GTTGAAATGGAGGATGCACA
123	578	ATGTGCATCCTCCATTTCAA	1077	TTGAAATGGAGGATGCACAT
124	579	TATGTGCATCCTCCATTTCA	1078	TGAAATGGAGGATGCACATA
125	580	GTATGTGCATCCTCCATTTC	1079	GAAATGGAGGATGCACATAC
126	581	CGTATGTGCATCCTCCATTT	1080	AAATGGAGGATGCACATACG
127	582	CCGTATGTGCATCCTCCATT	1081	AATGGAGGATGCACATACGG
128	583	GCCGTATGTGCATCCTCCAT	1082	ATGGAGGATGCACATACGGC
129	584	AGCCGTATGTGCATCCTCCA	1083	TGGAGGATGCACATACGGCT
130	585	CAGCCGTATGTGCATCCTCC	1084	GGAGGATGCACATACGGCTG
131	586	ACAGCCGTATGTGCATCCTC	1085	GAGGATGCACATACGGCTGT
132	587	CACAGCCGTATGTGCATCCT	1086	AGGATGCACATACGGCTGTG
133	588	TCACAGCCGTATGTGCATCC	1087	GGATGCACATACGGCTGTGA
134	589	ATCACAGCCGTATGTGCATC	1088	GATGCACATACGGCTGTGAT
135	590	GATCACAGCCGTATGTGCAT	1089	ATGCACATACGGCTGTGATC
136	591	CGATCACAGCCGTATGTGCA	1090	TGCACATACGGCTGTGATCG
137	592	CCGATCACAGCCGTATGTGC	1091	GCACATACGGCTGTGATCGG
138	593	ACCGATCACAGCCGTATGTG	1092	CACATACGGCTGTGATCGGT
139	594	AACCGATCACAGCCGTATGT	1093	ACATACGGCTGTGATCGGTT
140	595	AAACCGATCACAGCCGTATG	1094	CATACGGCTGTGATCGGTTT
141	596	CAAACCGATCACAGCCGTAT	1095	ATACGGCTGTGATCGGTTTG
142	597	GCAAACCGATCACAGCCGTA	1096	TACGGCTGTGATCGGTTTGC
143	598	GGCAAACCGATCACAGCCGT	1097	ACGGCTGTGATCGGTTTGCC
144	599	TGGCAAACCGATCACAGCCG	1098	CGGCTGTGATCGGTTTGCCA
145	600	TTGGCAAACCGATCACAGCC	1099	GGCTGTGATCGGTTTGCCAA
146	601	CTTGGCAAACCGATCACAGC	1100	GCTGTGATCGGTTTGCCAAG
147	602	ACTTGGCAAACCGATCACAG	1101	CTGTGATCGGTTTGCCAAGT
148	603	CACTTGGCAAACCGATCACA	1102	TGTGATCGGTTTGCCAAGTG
149	604	CCACTTGGCAAACCGATCAC	1103	GTGATCGGTTTGCCAAGTGG
150	605	TCCACTTGGCAAACCGATCA	1104	TGATCGGTTTGCCAAGTGGA
151	606	GTCCACTTGGCAAACCGATC	1105	GATCGGTTTGCCAAGTGGAC
152	607	AGTCCACTTGGCAAACCGAT	1106	ATCGGTTTGCCAAGTGGACT
153	608	AAGTCCACTTGGCAAACCGA	1107	TCGGTTTGCCAAGTGGACTT
154	609	CAAGTCCACTTGGCAAACCG	1108	CGGTTTGCCAAGTGGACTTG
155	610	TCAAGTCCACTTGGCAAACC	1109	GGTTTGCCAAGTGGACTTGA
156	611	TTCAAGTCCACTTGGCAAAC	1110	GTTTGCCAAGTGGACTTGAA
157	612	ATTCAAGTCCACTTGGCAAA	1111	TTTGCCAAGTGGACTTGAAT
158	613	GATTCAAGTCCACTTGGCAA	1112	TTGCCAAGTGGACTTGAATC
159	614	CGATTCAAGTCCACTTGGCA	1113	TGCCAAGTGGACTTGAATCG
160	615	ACGATTCAAGTCCACTTGGC	1114	GCCAAGTGGACTTGAATCGT

[0188]

161	616	CACGATTCAAGTCCACTTGG	1115	CCAAGTGGACTTGAATCGTG
162	617	CCACGATTCAAGTCCACTTG	1116	CAAGTGGACTTGAATCGTGG
163	618	ACCACGATTCAAGTCCACTT	1117	AAGTGGACTTGAATCGTGGT
164	619	GACCACGATTCAAGTCCACT	1118	AGTGGACTTGAATCGTGGTC
165	620	TGACCACGATTCAAGTCCAC	1119	GTGGACTTGAATCGTGGTCA
166	621	ATGACCACGATTCAAGTCCA	1120	TGGACTTGAATCGTGGTCAT
167	622	AATGACCACGATTCAAGTCC	1121	GGACTTGAATCGTGGTCATT
168	623	GAATGACCACGATTCAAGTC	1122	GACTTGAATCGTGGTCATTC
169	624	AGAATGACCACGATTCAAGT	1123	ACTTGAATCGTGGTCATTCT
170	625	AAGAATGACCACGATTCAAG	1124	CTTGAATCGTGGTCATTCTT
171	626	AAAGAATGACCACGATTCAA	1125	TTGAATCGTGGTCATTCTTT
172	627	CAAAGAATGACCACGATTCA	1126	TGAATCGTGGTCATTCTTTG
173	628	GCAAAGAATGACCACGATTC	1127	GAATCGTGGTCATTCTTTGC
174	629	AGCAAAGAATGACCACGATT	1128	AATCGTGGTCATTCTTTGCT
175	630	CAGCAAAGAATGACCACGAT	1129	ATCGTGGTCATTCTTTGCTG
176	631	ACAGCAAAGAATGACCACGA	1130	TCGTGGTCATTCTTTGCTGT
177	632	CACAGCAAAGAATGACCACG	1131	CGTGGTCATTCTTTGCTGTG
178	633	ACACAGCAAAGAATGACCAC	1132	GTGGTCATTCTTTGCTGTGT
179	634	TACACAGCAAAGAATGACCA	1133	TGGTCATTCTTTGCTGTGTA
180	635	ATACACAGCAAAGAATGACC	1134	GGTCATTCTTTGCTGTGTAT
181	636	CATACACAGCAAAGAATGAC	1135	GTCATTCTTTGCTGTGTATG
182	637	TCATACACAGCAAAGAATGA	1136	TCATTCTTTGCTGTGTATGA
183	638	ATCATACACAGCAAAGAATG	1137	CATTCTTTGCTGTGTATGAT
184	639	CATCATACACAGCAAAGAAT	1138	ATTCTTTGCTGTGTATGATG
185	640	CCATCATACACAGCAAAGAA	1139	TTCTTTGCTGTGTATGATGG
186	641	CCCATCATACACAGCAAAGA	1140	TCTTTGCTGTGTATGATGGG
187	642	GCCCATCATACACAGCAAAG	1141	CTTTGCTGTGTATGATGGGC
188	643	TGCCCATCATACACAGCAAA	1142	TTTGCTGTGTATGATGGGCA
189	644	ATGCCCATCATACACAGCAA	1143	TTGCTGTGTATGATGGGCAT
190	645	CATGCCCATCATACACAGCA	1144	TGCTGTGTATGATGGGCATG
191	646	GCATGCCCATCATACACAGC	1145	GCTGTGTATGATGGGCATGC
192	647	AGCATGCCCATCATACACAG	1146	CTGTGTATGATGGGCATGCT
193	648	CAGCATGCCCATCATACACA	1147	TGTGTATGATGGGCATGCTG
194	649	CCAGCATGCCCATCATACAC	1148	GTGTATGATGGGCATGCTGG
195	650	ACCAGCATGCCCATCATACA	1149	TGTATGATGGGCATGCTGGT
196	651	AACCAGCATGCCCATCATAC	1150	GTATGATGGGCATGCTGGTT
197	652	GAACCAGCATGCCCATCATA	1151	TATGATGGGCATGCTGGTTC
198	653	AGAACCAGCATGCCCATCAT	1152	ATGATGGGCATGCTGGTTCT
199	654	GAGAACCAGCATGCCCATCA	1153	TGATGGGCATGCTGGTTCTC
200	655	TGAGAACCAGCATGCCCATC	1154	GATGGGCATGCTGGTTCTCA
201	656	CTGAGAACCAGCATGCCCAT	1155	ATGGGCATGCTGGTTCTCAG
202	657	CCTGAGAACCAGCATGCCCA	1156	TGGGCATGCTGGTTCTCAGG
203	658	ACCTGAGAACCAGCATGCCC	1157	GGGCATGCTGGTTCTCAGGT
204	659	AACCTGAGAACCAGCATGCC	1158	GGCATGCTGGTTCTCAGGTT
205	660	CAACCTGAGAACCAGCATGC	1159	GCATGCTGGTTCTCAGGTTG
206	661	GCAACCTGAGAACCAGCATG	1160	CATGCTGGTTCTCAGGTTGC

[0189]

207	662	GGCAACCTGAGAACCAGCAT	1161	ATGCTGGTTCTCAGGTTGCC
208	663	TGGCAACCTGAGAACCAGCA	1162	TGCTGGTTCTCAGGTTGCCA
209	664	TTGGCAACCTGAGAACCAGC	1163	GCTGGTTCTCAGGTTGCCAA
210	665	TTTGGCAACCTGAGAACCAG	1164	CTGGTTCTCAGGTTGCCAAA
211	666	ATTTGGCAACCTGAGAACCA	1165	TGGTTCTCAGGTTGCCAAAT
212	667	TATTTGGCAACCTGAGAACC	1166	GGTTCTCAGGTTGCCAAATA
213	668	GTATTTGGCAACCTGAGAAC	1167	GTTCTCAGGTTGCCAAATAC
214	669	AGTATTTGGCAACCTGAGAA	1168	TTCTCAGGTTGCCAAATACT
215	670	CAGTATTTGGCAACCTGAGA	1169	TCTCAGGTTGCCAAATACTG
216	671	GCAGTATTTGGCAACCTGAG	1170	CTCAGGTTGCCAAATACTGC
217	672	AGCAGTATTTGGCAACCTGA	1171	TCAGGTTGCCAAATACTGCT
218	673	CAGCAGTATTTGGCAACCTG	1172	CAGGTTGCCAAATACTGCTG
219	674	ACAGCAGTATTTGGCAACCT	1173	AGGTTGCCAAATACTGCTGT
220	675	CACAGCAGTATTTGGCAACC	1174	GGTTGCCAAATACTGCTGTG
221	676	TCACAGCAGTATTTGGCAAC	1175	GTTGCCAAATACTGCTGTGA
222	677	CTCACAGCAGTATTTGGCAA	1176	TTGCCAAATACTGCTGTGAG
223	678	GCTCACAGCAGTATTTGGCA	1177	TGCCAAATACTGCTGTGAGC
224	679	TGCTCACAGCAGTATTTGGC	1178	GCCAAATACTGCTGTGAGCA
225	680	ATGCTCACAGCAGTATTTGG	1179	CCAAATACTGCTGTGAGCAT
226	681	AATGCTCACAGCAGTATTTG	1180	CAAATACTGCTGTGAGCATT
227	682	AAATGCTCACAGCAGTATTT	1181	AAATACTGCTGTGAGCATTT
228	683	CAAATGCTCACAGCAGTATT	1182	AATACTGCTGTGAGCATTTG
229	684	ACAAATGCTCACAGCAGTAT	1183	ATACTGCTGTGAGCATTTGT
230	685	AACAAATGCTCACAGCAGTA	1184	TACTGCTGTGAGCATTTGTT
231	686	TAACAAATGCTCACAGCAGT	1185	ACTGCTGTGAGCATTTGTTA
232	687	CTAACAAATGCTCACAGCAG	1186	CTGCTGTGAGCATTTGTTAG
233	688	TCTAACAAATGCTCACAGCA	1187	TGCTGTGAGCATTTGTTAGA
234	689	ATCTAACAAATGCTCACAGC	1188	GCTGTGAGCATTTGTTAGAT
235	690	GATCTAACAAATGCTCACAG	1189	CTGTGAGCATTTGTTAGATC
236	691	TGATCTAACAAATGCTCACA	1190	TGTGAGCATTTGTTAGATCA
237	692	GTGATCTAACAAATGCTCAC	1191	GTGAGCATTTGTTAGATCAC
238	693	TGTGATCTAACAAATGCTCA	1192	TGAGCATTTGTTAGATCACA
239	694	ATGTGATCTAACAAATGCTC	1193	GAGCATTTGTTAGATCACAT
240	695	GATGTGATCTAACAAATGCT	1194	AGCATTTGTTAGATCACATC
241	696	TGATGTGATCTAACAAATGC	1195	GCATTTGTTAGATCACATCA
242	697	GTGATGTGATCTAACAAATG	1196	CATTTGTTAGATCACATCAC
243	698	GGTGATGTGATCTAACAAAT	1197	ATTTGTTAGATCACATCACC
244	699	TGGTGATGTGATCTAACAAA	1198	TTTGTTAGATCACATCACCA
245	700	TTGGTGATGTGATCTAACAA	1199	TTGTTAGATCACATCACCAA
246	701	ATTGGTGATGTGATCTAACA	1200	TGTTAGATCACATCACCAAT
247	702	TATTGGTGATGTGATCTAAC	1201	GTTAGATCACATCACCAATA
248	703	TTATTGGTGATGTGATCTAA	1202	TTAGATCACATCACCAATAA
249	704	GTTATTGGTGATGTGATCTA	1203	TAGATCACATCACCAATAAC
250	705	GGTTATTGGTGATGTGATCT	1204	AGATCACATCACCAATAACC
251	706	TGGTTATTGGTGATGTGATC	1205	GATCACATCACCAATAACCA
252	707	CTGGTTATTGGTGATGTGAT	1206	ATCACATCACCAATAACCAG

[0190]

253	708	CCTGGTTATTGGTGATGTGA	1207	TCACATCACCAATAACCAGG
254	709	TCCTGGTTATTGGTGATGTG	1208	CACATCACCAATAACCAGGA
255	710	ATCCTGGTTATTGGTGATGT	1209	ACATCACCAATAACCAGGAT
256	711	AATCCTGGTTATTGGTGATG	1210	CATCACCAATAACCAGGATT
257	712	AAATCCTGGTTATTGGTGAT	1211	ATCACCAATAACCAGGATTT
258	713	AAAATCCTGGTTATTGGTGA	1212	TCACCAATAACCAGGATTTT
259	714	TAAAATCCTGGTTATTGGTG	1213	CACCAATAACCAGGATTTTA
260	715	TTAAAATCCTGGTTATTGGT	1214	ACCAATAACCAGGATTTTAA
261	716	TTTAAAATCCTGGTTATTGG	1215	CCAATAACCAGGATTTTAAA
262	717	CTTTAAAATCCTGGTTATTG	1216	CAATAACCAGGATTTTAAAG
263	718	CCTTTAAAATCCTGGTTATT	1217	AATAACCAGGATTTTAAAGG
264	719	CCCTTTAAAATCCTGGTTAT	1218	ATAACCAGGATTTTAAAGGG
265	720	ACCCTTTAAAATCCTGGTTA	1219	TAACCAGGATTTTAAAGGGT
266	721	GACCCTTTAAAATCCTGGTT	1220	AACCAGGATTTTAAAGGGTC
267	722	AGACCCTTTAAAATCCTGGT	1221	ACCAGGATTTTAAAGGGTCT
268	723	CAGACCCTTTAAAATCCTGG	1222	CCAGGATTTTAAAGGGTCTG
269	724	GCAGACCCTTTAAAATCCTG	1223	CAGGATTTTAAAGGGTCTGC
270	725	TGCAGACCCTTTAAAATCCT	1224	AGGATTTTAAAGGGTCTGCA
271	726	CTGCAGACCCTTTAAAATCC	1225	GGATTTTAAAGGGTCTGCAG
272	727	CCTGCAGACCCTTTAAAATC	1226	GATTTTAAAGGGTCTGCAGG
273	728	TCCTGCAGACCCTTTAAAAT	1227	ATTTTAAAGGGTCTGCAGGA
274	729	CTCCTGCAGACCCTTTAAAA	1228	TTTTAAAGGGTCTGCAGGAG
275	730	GCTCCTGCAGACCCTTTAAA	1229	TTTAAAGGGTCTGCAGGAGC
276	731	TGCTCCTGCAGACCCTTTAA	1230	TTAAAGGGTCTGCAGGAGCA
277	732	GTGCTCCTGCAGACCCTTTA	1231	TAAAGGGTCTGCAGGAGCAC
278	733	GGTGCTCCTGCAGACCCTTT	1232	AAAGGGTCTGCAGGAGCACC
279	734	AGGTGCTCCTGCAGACCCTT	1233	AAGGGTCTGCAGGAGCACCT
280	735	AAGGTGCTCCTGCAGACCCT	1234	AGGGTCTGCAGGAGCACCTT
281	736	GAAGGTGCTCCTGCAGACCC	1235	GGGTCTGCAGGAGCACCTTC
282	737	AGAAGGTGCTCCTGCAGACC	1236	GGTCTGCAGGAGCACCTTCT
283	738	CAGAAGGTGCTCCTGCAGAC	1237	GTCTGCAGGAGCACCTTCTG
284	739	ACAGAAGGTGCTCCTGCAGA	1238	TCTGCAGGAGCACCTTCTGT
285	740	CACAGAAGGTGCTCCTGCAG	1239	CTGCAGGAGCACCTTCTGTG
286	741	CCACAGAAGGTGCTCCTGCA	1240	TGCAGGAGCACCTTCTGTGG
287	742	TCCACAGAAGGTGCTCCTGC	1241	GCAGGAGCACCTTCTGTGGA
288	743	TTCCACAGAAGGTGCTCCTG	1242	CAGGAGCACCTTCTGTGGAA
289	744	TTTCCACAGAAGGTGCTCCT	1243	AGGAGCACCTTCTGTGGAAA
290	745	TTTTCCACAGAAGGTGCTCC	1244	GGAGCACCTTCTGTGGAAAA
291	746	ATTTTCCACAGAAGGTGCTC	1245	GAGCACCTTCTGTGGAAAAT
292	747	CATTTTCCACAGAAGGTGCT	1246	AGCACCTTCTGTGGAAAATG
293	748	ACATTTTCCACAGAAGGTGC	1247	GCACCTTCTGTGGAAAATGT
294	749	TACATTTTCCACAGAAGGTG	1248	CACCTTCTGTGGAAAATGTA
295	750	TTACATTTTCCACAGAAGGT	1249	ACCTTCTGTGGAAAATGTAA
296	751	TTTACATTTTCCACAGAAGG	1250	CCTTCTGTGGAAAATGTAAA
297	752	CTTTACATTTTCCACAGAAG	1251	CTTCTGTGGAAAATGTAAAG
298	753	TCTTTACATTTTCCACAGAA	1252	TTCTGTGGAAAATGTAAAGA

[0191]

299	754	TTCTTTACATTTTCCACAGA	1253	TCTGTGGAAAATGTAAAGAA
300	755	ATTCTTTACATTTTCCACAG	1254	CTGTGGAAAATGTAAAGAAT
301	756	CATTCTTTACATTTTCCACA	1255	TGTGGAAAATGTAAAGAATG
302	757	CCATTCTTTACATTTTCCAC	1256	GTGGAAAATGTAAAGAATGG
303	758	TCCATTCTTTACATTTTCCA	1257	TGGAAAATGTAAAGAATGGA
304	759	TTCCATTCTTTACATTTTCC	1258	GGAAAATGTAAAGAATGGAA
305	760	ATTCCATTCTTTACATTTTC	1259	GAAAATGTAAAGAATGGAAT
306	761	GATTCCATTCTTTACATTTT	1260	AAAATGTAAAGAATGGAATC
307	762	TGATTCCATTCTTTACATTT	1261	AAATGTAAAGAATGGAATCA
308	763	CTGATTCCATTCTTTACATT	1262	AATGTAAAGAATGGAATCAG
309	764	TCTGATTCCATTCTTTACAT	1263	ATGTAAAGAATGGAATCAGA
310	765	TTCTGATTCCATTCTTTACA	1264	TGTAAAGAATGGAATCAGAA
311	766	GTTCTGATTCCATTCTTTAC	1265	GTAAAGAATGGAATCAGAAC
312	767	TGTTCTGATTCCATTCTTTA	1266	TAAAGAATGGAATCAGAACA
313	768	CTGTTCTGATTCCATTCTTT	1267	AAAGAATGGAATCAGAACAG
314	769	CCTGTTCTGATTCCATTCTT	1268	AAGAATGGAATCAGAACAGG
315	770	ACCTGTTCTGATTCCATTCT	1269	AGAATGGAATCAGAACAGGT
316	771	AACCTGTTCTGATTCCATTC	1270	GAATGGAATCAGAACAGGTT
317	772	AAACCTGTTCTGATTCCATT	1271	AATGGAATCAGAACAGGTTT
318	773	AAAACCTGTTCTGATTCCAT	1272	ATGGAATCAGAACAGGTTTT
319	774	GAAAACCTGTTCTGATTCCA	1273	TGGAATCAGAACAGGTTTTC
320	775	AGAAAACCTGTTCTGATTCC	1274	GGAATCAGAACAGGTTTTCT
321	776	CAGAAAACCTGTTCTGATTC	1275	GAATCAGAACAGGTTTTCTG
322	777	CCAGAAAACCTGTTCTGATT	1276	AATCAGAACAGGTTTTCTGG
323	778	TCCAGAAAACCTGTTCTGAT	1277	ATCAGAACAGGTTTTCTGGA
324	779	CTCCAGAAAACCTGTTCTGA	1278	TCAGAACAGGTTTTCTGGAG
325	780	TCTCCAGAAAACCTGTTCTG	1279	CAGAACAGGTTTTCTGGAGA
326	781	ATCTCCAGAAAACCTGTTCT	1280	AGAACAGGTTTTCTGGAGAT
327	782	AATCTCCAGAAAACCTGTTC	1281	GAACAGGTTTTCTGGAGATT
328	783	CAATCTCCAGAAAACCTGTT	1282	AACAGGTTTTCTGGAGATTG
329	784	TCAATCTCCAGAAAACCTGT	1283	ACAGGTTTTCTGGAGATTGA
330	785	ATCAATCTCCAGAAAACCTG	1284	CAGGTTTTCTGGAGATTGAT
331	786	CATCAATCTCCAGAAAACCT	1285	AGGTTTTCTGGAGATTGATG
332	787	TCATCAATCTCCAGAAAACC	1286	GGTTTTCTGGAGATTGATGA
333	788	TTCATCAATCTCCAGAAAAC	1287	GTTTTCTGGAGATTGATGAA
334	789	GTTCATCAATCTCCAGAAAA	1288	TTTTCTGGAGATTGATGAAC
335	790	TGTTCATCAATCTCCAGAAA	1289	TTTCTGGAGATTGATGAACA
336	791	GTGTTCATCAATCTCCAGAA	1290	TTCTGGAGATTGATGAACAC
337	792	TGTGTTCATCAATCTCCAGA	1291	TCTGGAGATTGATGAACACA
338	793	ATGTGTTCATCAATCTCCAG	1292	CTGGAGATTGATGAACACAT
339	794	CATGTGTTCATCAATCTCCA	1293	TGGAGATTGATGAACACATG
340	795	TCATGTGTTCATCAATCTCC	1294	GGAGATTGATGAACACATGA
341	796	CTCATGTGTTCATCAATCTC	1295	GAGATTGATGAACACATGAG
342	797	TCTCATGTGTTCATCAATCT	1296	AGATTGATGAACACATGAGA
343	798	CTCTCATGTGTTCATCAATC	1297	GATTGATGAACACATGAGAG
344	799	ACTCTCATGTGTTCATCAAT	1298	ATTGATGAACACATGAGAGT

[0192]

345	800	AACTCTCATGTGTTCATCAA	1299	TTGATGAACACATGAGAGTT
346	801	TAACTCTCATGTGTTCATCA	1300	TGATGAACACATGAGAGTTA
347	802	ATAACTCTCATGTGTTCATC	1301	GATGAACACATGAGAGTTAT
348	803	CATAACTCTCATGTGTTCAT	1302	ATGAACACATGAGAGTTATG
349	804	ACATAACTCTCATGTGTTCA	1303	TGAACACATGAGAGTTATGT
350	805	GACATAACTCTCATGTGTTC	1304	GAACACATGAGAGTTATGTC
351	806	TGACATAACTCTCATGTGTT	1305	AACACATGAGAGTTATGTCA
352	807	CTGACATAACTCTCATGTGT	1306	ACACATGAGAGTTATGTCAG
353	808	TCTGACATAACTCTCATGTG	1307	CACATGAGAGTTATGTCAGA
354	809	CTCTGACATAACTCTCATGT	1308	ACATGAGAGTTATGTCAGAG
355	810	TCTCTGACATAACTCTCATG	1309	CATGAGAGTTATGTCAGAGA
356	811	TTCTCTGACATAACTCTCAT	1310	ATGAGAGTTATGTCAGAGAA
357	812	CTTCTCTGACATAACTCTCA	1311	TGAGAGTTATGTCAGAGAAG
358	813	TCTTCTCTGACATAACTCTC	1312	GAGAGTTATGTCAGAGAAGA
359	814	TTCTTCTCTGACATAACTCT	1313	AGAGTTATGTCAGAGAAGAA
360	815	TTTCTTCTCTGACATAACTC	1314	GAGTTATGTCAGAGAAGAAA
361	816	GTTTCTTCTCTGACATAACT	1315	AGTTATGTCAGAGAAGAAAC
362	817	TGTTTCTTCTCTGACATAAC	1316	GTTATGTCAGAGAAGAAACA
363	818	ATGTTTCTTCTCTGACATAA	1317	TTATGTCAGAGAAGAAACAT
364	819	CATGTTTCTTCTCTGACATA	1318	TATGTCAGAGAAGAAACATG
365	820	CCATGTTTCTTCTCTGACAT	1319	ATGTCAGAGAAGAAACATGG
366	821	ACCATGTTTCTTCTCTGACA	1320	TGTCAGAGAAGAAACATGGT
367	822	CACCATGTTTCTTCTCTGAC	1321	GTCAGAGAAGAAACATGGTG
368	823	GCACCATGTTTCTTCTCTGA	1322	TCAGAGAAGAAACATGGTGC
369	824	TGCACCATGTTTCTTCTCTG	1323	CAGAGAAGAAACATGGTGCA
370	825	CTGCACCATGTTTCTTCTCT	1324	AGAGAAGAAACATGGTGCAG
371	826	TCTGCACCATGTTTCTTCTC	1325	GAGAAGAAACATGGTGCAGA
372	827	ATCTGCACCATGTTTCTTCT	1326	AGAAGAAACATGGTGCAGAT
373	828	TATCTGCACCATGTTTCTTC	1327	GAAGAAACATGGTGCAGATA
374	829	CTATCTGCACCATGTTTCTT	1328	AAGAAACATGGTGCAGATAG
375	830	TCTATCTGCACCATGTTTCT	1329	AGAAACATGGTGCAGATAGA
376	831	TTCTATCTGCACCATGTTTC	1330	GAAACATGGTGCAGATAGAA
377	832	CTTCTATCTGCACCATGTTT	1331	AAACATGGTGCAGATAGAAG
378	833	ACTTCTATCTGCACCATGTT	1332	AACATGGTGCAGATAGAAGT
379	834	CACTTCTATCTGCACCATGT	1333	ACATGGTGCAGATAGAAGTG
380	835	CCACTTCTATCTGCACCATG	1334	CATGGTGCAGATAGAAGTGG
381	836	CCCACTTCTATCTGCACCAT	1335	ATGGTGCAGATAGAAGTGGG
382	837	ACCCACTTCTATCTGCACCA	1336	TGGTGCAGATAGAAGTGGGT
383	838	GACCCACTTCTATCTGCACC	1337	GGTGCAGATAGAAGTGGGTC
384	839	TGACCCACTTCTATCTGCAC	1338	GTGCAGATAGAAGTGGGTCA
385	840	TTGACCCACTTCTATCTGCA	1339	TGCAGATAGAAGTGGGTCAA
386	841	GTTGACCCACTTCTATCTGC	1340	GCAGATAGAAGTGGGTCAAC
387	842	TGTTGACCCACTTCTATCTG	1341	CAGATAGAAGTGGGTCAACA
388	843	CTGTTGACCCACTTCTATCT	1342	AGATAGAAGTGGGTCAACAG
389	844	GCTGTTGACCCACTTCTATC	1343	GATAGAAGTGGGTCAACAGC
390	845	AGCTGTTGACCCACTTCTAT	1344	ATAGAAGTGGGTCAACAGCT

[0193]

391	846	CAGCTGTTGACCCACTTCTA	1345	TAGAAGTGGGTCAACAGCTG
392	847	ACAGCTGTTGACCCACTTCT	1346	AGAAGTGGGTCAACAGCTGT
393	848	TACAGCTGTTGACCCACTTC	1347	GAAGTGGGTCAACAGCTGTA
394	849	CTACAGCTGTTGACCCACTT	1348	AAGTGGGTCAACAGCTGTAG
395	850	CCTACAGCTGTTGACCCACT	1349	AGTGGGTCAACAGCTGTAGG
396	851	ACCTACAGCTGTTGACCCAC	1350	GTGGGTCAACAGCTGTAGGT
397	852	CACCTACAGCTGTTGACCCA	1351	TGGGTCAACAGCTGTAGGTG
398	853	ACACCTACAGCTGTTGACCC	1352	GGGTCAACAGCTGTAGGTGT
399	854	GACACCTACAGCTGTTGACC	1353	GGTCAACAGCTGTAGGTGTC
400	855	AGACACCTACAGCTGTTGAC	1354	GTCAACAGCTGTAGGTGTCT
401	856	AAGACACCTACAGCTGTTGA	1355	TCAACAGCTGTAGGTGTCTT
402	857	TAAGACACCTACAGCTGTTG	1356	CAACAGCTGTAGGTGTCTTA
403	858	TTAAGACACCTACAGCTGTT	1357	AACAGCTGTAGGTGTCTTAA
404	859	ATTAAGACACCTACAGCTGT	1358	ACAGCTGTAGGTGTCTTAAT
405	860	AATTAAGACACCTACAGCTG	1359	CAGCTGTAGGTGTCTTAATT
406	861	AAATTAAGACACCTACAGCT	1360	AGCTGTAGGTGTCTTAATTT
407	862	GAAATTAAGACACCTACAGC	1361	GCTGTAGGTGTCTTAATTTC
408	863	AGAAATTAAGACACCTACAG	1362	CTGTAGGTGTCTTAATTTCT
409	864	GAGAAATTAAGACACCTACA	1363	TGTAGGTGTCTTAATTTCTC
410	865	GGAGAAATTAAGACACCTAC	1364	GTAGGTGTCTTAATTTCTCC
411	866	GGGAGAAATTAAGACACCTA	1365	TAGGTGTCTTAATTTCTCCC
412	867	GGGGAGAAATTAAGACACCT	1366	AGGTGTCTTAATTTCTCCCC
413	868	TGGGGAGAAATTAAGACACC	1367	GGTGTCTTAATTTCTCCCCA
414	869	TTGGGGAGAAATTAAGACAC	1368	GTGTCTTAATTTCTCCCCAA
415	870	GTTGGGGAGAAATTAAGACA	1369	TGTCTTAATTTCTCCCCAAC
416	871	TGTTGGGGAGAAATTAAGAC	1370	GTCTTAATTTCTCCCCAACA
417	872	ATGTTGGGGAGAAATTAAGA	1371	TCTTAATTTCTCCCCAACAT
418	873	TATGTTGGGGAGAAATTAAG	1372	CTTAATTTCTCCCCAACATA
419	874	GTATGTTGGGGAGAAATTAA	1373	TTAATTTCTCCCCAACATAC
420	875	AGTATGTTGGGGAGAAATTA	1374	TAATTTCTCCCCAACATACT
421	876	AAGTATGTTGGGGAGAAATT	1375	AATTTCTCCCCAACATACTT
422	877	TAAGTATGTTGGGGAGAAAT	1376	ATTTCTCCCCAACATACTTA
423	878	ATAAGTATGTTGGGGAGAAA	1377	TTTCTCCCCAACATACTTAT
424	879	AATAAGTATGTTGGGGAGAA	1378	TTCTCCCCAACATACTTATT
425	880	AAATAAGTATGTTGGGGAGA	1379	TCTCCCCAACATACTTATTT
426	881	GAAATAAGTATGTTGGGGAG	1380	CTCCCCAACATACTTATTTC
427	882	TGAAATAAGTATGTTGGGGA	1381	TCCCCAACATACTTATTTCA
428	883	ATGAAATAAGTATGTTGGGG	1382	CCCCAACATACTTATTTCAT
429	884	AATGAAATAAGTATGTTGGG	1383	CCCAACATACTTATTTCATT
430	885	TAATGAAATAAGTATGTTGG	1384	CCAACATACTTATTTCATTA
431	886	TTAATGAAATAAGTATGTTG	1385	CAACATACTTATTTCATTAA
432	887	GTTAATGAAATAAGTATGTT	1386	AACATACTTATTTCATTAAC
433	888	AGTTAATGAAATAAGTATGT	1387	ACATACTTATTTCATTAACT
434	889	CAGTTAATGAAATAAGTATG	1388	CATACTTATTTCATTAACTG
435	890	ACAGTTAATGAAATAAGTAT	1389	ATACTTATTTCATTAACTGT
436	891	CACAGTTAATGAAATAAGTA	1390	TACTTATTTCATTAACTGTG

[0194]

437	892	CCACAGTTAATGAAATAAGT	1391	ACTTATTTCATTAACTGTGG
438	893	TCCACAGTTAATGAAATAAG	1392	CTTATTTCATTAACTGTGGA
439	894	CTCCACAGTTAATGAAATAA	1393	TTATTTCATTAACTGTGGAG
440	895	TCTCCACAGTTAATGAAATA	1394	TATTTCATTAACTGTGGAGA
441	896	GTCTCCACAGTTAATGAAAT	1395	ATTTCATTAACTGTGGAGAC
442	897	AGTCTCCACAGTTAATGAAA	1396	TTTCATTAACTGTGGAGACT
443	898	GAGTCTCCACAGTTAATGAA	1397	TTCATTAACTGTGGAGACTC
444	899	TGAGTCTCCACAGTTAATGA	1398	TCATTAACTGTGGAGACTCA
445	900	TTGAGTCTCCACAGTTAATG	1399	CATTAACTGTGGAGACTCAA
446	901	CTTGAGTCTCCACAGTTAAT	1400	ATTAACTGTGGAGACTCAAG
447	902	TCTTGAGTCTCCACAGTTAA	1401	TTAACTGTGGAGACTCAAGA
448	903	CTCTTGAGTCTCCACAGTTA	1402	TAACTGTGGAGACTCAAGAG
449	904	CCTCTTGAGTCTCCACAGTT	1403	AACTGTGGAGACTCAAGAGG
450	905	ACCTCTTGAGTCTCCACAGT	1404	ACTGTGGAGACTCAAGAGGT
451	906	AACCTCTTGAGTCTCCACAG	1405	CTGTGGAGACTCAAGAGGTT
452	907	AAACCTCTTGAGTCTCCACA	1406	TGTGGAGACTCAAGAGGTTT
453	908	TAAACCTCTTGAGTCTCCAC	1407	GTGGAGACTCAAGAGGTTTA
454	909	GTAAACCTCTTGAGTCTCCA	1408	TGGAGACTCAAGAGGTTTAC
455	910	AGTAAACCTCTTGAGTCTCC	1409	GGAGACTCAAGAGGTTTACT
456	911	AAGTAAACCTCTTGAGTCTC	1410	GAGACTCAAGAGGTTTACTT
457	912	AAAGTAAACCTCTTGAGTCT	1411	AGACTCAAGAGGTTTACTTT
458	913	CAAAGTAAACCTCTTGAGTC	1412	GACTCAAGAGGTTTACTTTG
459	914	ACAAAGTAAACCTCTTGAGT	1413	ACTCAAGAGGTTTACTTTGT
460	915	TACAAAGTAAACCTCTTGAG	1414	CTCAAGAGGTTTACTTTGTA
461	916	CTACAAAGTAAACCTCTTGA	1415	TCAAGAGGTTTACTTTGTAG
462	917	CCTACAAAGTAAACCTCTTG	1416	CAAGAGGTTTACTTTGTAGG
463	918	TCCTACAAAGTAAACCTCTT	1417	AAGAGGTTTACTTTGTAGGA
464	919	TTCCTACAAAGTAAACCTCT	1418	AGAGGTTTACTTTGTAGGAA
465	920	GTTCCTACAAAGTAAACCTC	1419	GAGGTTTACTTTGTAGGAAC
466	921	TGTTCCTACAAAGTAAACCT	1420	AGGTTTACTTTGTAGGAACA
467	922	CTGTTCCTACAAAGTAAACC	1421	GGTTTACTTTGTAGGAACAG
468	923	CCTGTTCCTACAAAGTAAAC	1422	GTTTACTTTGTAGGAACAGG
469	924	TCCTGTTCCTACAAAGTAAA	1423	TTTACTTTGTAGGAACAGGA
470	925	TTCCTGTTCCTACAAAGTAA	1424	TTACTTTGTAGGAACAGGAA
471	926	TTTCCTGTTCCTACAAAGTA	1425	TACTTTGTAGGAACAGGAAA
472	927	CTTTCCTGTTCCTACAAAGT	1426	ACTTTGTAGGAACAGGAAAG
473	928	ACTTTCCTGTTCCTACAAAG	1427	CTTTGTAGGAACAGGAAAGT
474	929	AACTTTCCTGTTCCTACAAA	1428	TTTGTAGGAACAGGAAAGTT
475	930	GAACTTTCCTGTTCCTACAA	1429	TTGTAGGAACAGGAAAGTTC
476	931	TGAACTTTCCTGTTCCTACA	1430	TGTAGGAACAGGAAAGTTCA
477	932	ATGAACTTTCCTGTTCCTAC	1431	GTAGGAACAGGAAAGTTCAT
478	933	AATGAACTTTCCTGTTCCTA	1432	TAGGAACAGGAAAGTTCATT
479	934	AAATGAACTTTCCTGTTCCT	1433	AGGAACAGGAAAGTTCATTT
480	935	GAAATGAACTTTCCTGTTCC	1434	GGAACAGGAAAGTTCATTTC
481	936	AGAAATGAACTTTCCTGTTC	1435	GAACAGGAAAGTTCATTTCT
482	937	AAGAAATGAACTTTCCTGTT	1436	AACAGGAAAGTTCATTTCTT

[0195]

483	938	GAAGAAATGAACTTTCCTGT	1437	ACAGGAAAGTTCATTTCTTC
484	939	TGAAGAAATGAACTTTCCTG	1438	CAGGAAAGTTCATTTCTTCA
485	940	GTGAAGAAATGAACTTTCCT	1439	AGGAAAGTTCATTTCTTCAC
486	941	TGTGAAGAAATGAACTTTCC	1440	GGAAAGTTCATTTCTTCACA
487	942	GTGTGAAGAAATGAACTTTC	1441	GAAAGTTCATTTCTTCACAC
488	943	TGTGTGAAGAAATGAACTTT	1442	AAAGTTCATTTCTTCACACA
489	944	TTGTGTGAAGAAATGAACTT	1443	AAGTTCATTTCTTCACACAA
490	945	CTTGTGTGAAGAAATGAACT	1444	AGTTCATTTCTTCACACAAG
491	946	TCTTGTGTGAAGAAATGAAC	1445	GTTCATTTCTTCACACAAGA
492	947	ATCTTGTGTGAAGAAATGAA	1446	TTCATTTCTTCACACAAGAT
493	948	GATCTTGTGTGAAGAAATGA	1447	TCATTTCTTCACACAAGATC
494	949	TGATCTTGTGTGAAGAAATG	1448	CATTTCTTCACACAAGATCA
495	950	GTGATCTTGTGTGAAGAAAT	1449	ATTTCTTCACACAAGATCAC
496	951	TGTGATCTTGTGTGAAGAAA	1450	TTTCTTCACACAAGATCACA
497	952	TTGTGATCTTGTGTGAAGAA	1451	TTCTTCACACAAGATCACAA
498	953	TTTGTGATCTTGTGTGAAGA	1452	TCTTCACACAAGATCACAAA
499	954	GTTTGTGATCTTGTGTGAAG	1453	CTTCACACAAGATCACAAAC
500	955	GGTTTGTGATCTTGTGTGAA	1454	TTCACACAAGATCACAAACC
501	956	TGGTTTGTGATCTTGTGTGA	1455	TCACACAAGATCACAAACCA
502	957	TTGGTTTGTGATCTTGTGTG	1456	CACACAAGATCACAAACCAA
503	958	CTTGGTTTGTGATCTTGTGT	1457	ACACAAGATCACAAACCAAG
504	959	ACTTGGTTTGTGATCTTGTG	1458	CACAAGATCACAAACCAAGT
505	960	TACTTGGTTTGTGATCTTGT	1459	ACAAGATCACAAACCAAGTA
506	961	TTACTTGGTTTGTGATCTTG	1460	CAAGATCACAAACCAAGTAA
507	962	ATTACTTGGTTTGTGATCTT	1461	AAGATCACAAACCAAGTAAT
508	963	GATTACTTGGTTTGTGATCT	1462	AGATCACAAACCAAGTAATC
509	964	GGATTACTTGGTTTGTGATC	1463	GATCACAAACCAAGTAATCC
510	965	CGGATTACTTGGTTTGTGAT	1464	ATCACAAACCAAGTAATCCG
511	966	GCGGATTACTTGGTTTGTGA	1465	TCACAAACCAAGTAATCCGC
512	967	AGCGGATTACTTGGTTTGTG	1466	CACAAACCAAGTAATCCGCT
513	968	CAGCGGATTACTTGGTTTGT	1467	ACAAACCAAGTAATCCGCTG
514	969	CCAGCGGATTACTTGGTTTG	1468	CAAACCAAGTAATCCGCTGG
515	970	TCCAGCGGATTACTTGGTTT	1469	AAACCAAGTAATCCGCTGGA
516	971	CTCCAGCGGATTACTTGGTT	1470	AACCAAGTAATCCGCTGGAG
517	972	TCTCCAGCGGATTACTTGGT	1471	ACCAAGTAATCCGCTGGAGA
518	973	TTCTCCAGCGGATTACTTGG	1472	CCAAGTAATCCGCTGGAGAA
519	974	TTTCTCCAGCGGATTACTTG	1473	CAAGTAATCCGCTGGAGAAA
520	975	CTTTCTCCAGCGGATTACTT	1474	AAGTAATCCGCTGGAGAAAG
521	976	TCTTTCTCCAGCGGATTACT	1475	AGTAATCCGCTGGAGAAAGA
522	977	TTCTTTCTCCAGCGGATTAC	1476	GTAATCCGCTGGAGAAAGAA
523	978	GTTCTTTCTCCAGCGGATTA	1477	TAATCCGCTGGAGAAAGAAC
524	979	CGTTCTTTCTCCAGCGGATT	1478	AATCCGCTGGAGAAAGAACG
525	980	TCGTTCTTTCTCCAGCGGAT	1479	ATCCGCTGGAGAAAGAACGA
526	981	TTCGTTCTTTCTCCAGCGGA	1480	TCCGCTGGAGAAAGAACGAA
527	982	ATTCGTTCTTTCTCCAGCGG	1481	CCGCTGGAGAAAGAACGAAT
528	983	AATTCGTTCTTTCTCCAGCG	1482	CGCTGGAGAAAGAACGAATT

[0196]

529	984	GAATTCGTTCTTTCTCCAGC	1483	GCTGGAGAAAGAACGAATTC
530	985	TGAATTCGTTCTTTCTCCAG	1484	CTGGAGAAAGAACGAATTCA
531	986	CTGAATTCGTTCTTTCTCCA	1485	TGGAGAAAGAACGAATTCAG
532	987	TCTGAATTCGTTCTTTCTCC	1486	GGAGAAAGAACGAATTCAGA
533	988	TTCTGAATTCGTTCTTTCTC	1487	GAGAAAGAACGAATTCAGAA
534	989	ATTCTGAATTCGTTCTTTCT	1488	AGAAAGAACGAATTCAGAAT
535	990	CATTCTGAATTCGTTCTTTC	1489	GAAAGAACGAATTCAGAATG
536	991	GCATTCTGAATTCGTTCTTT	1490	AAAGAACGAATTCAGAATGC
537	992	TGCATTCTGAATTCGTTCTT	1491	AAGAACGAATTCAGAATGCA
538	993	CTGCATTCTGAATTCGTTCT	1492	AGAACGAATTCAGAATGCAG
539	994	CCTGCATTCTGAATTCGTTC	1493	GAACGAATTCAGAATGCAGG
540	995	ACCTGCATTCTGAATTCGTT	1494	AACGAATTCAGAATGCAGGT
541	996	CACCTGCATTCTGAATTCGT	1495	ACGAATTCAGAATGCAGGTG
542	997	CCACCTGCATTCTGAATTCG	1496	CGAATTCAGAATGCAGGTGG
543	998	GCCACCTGCATTCTGAATTC	1497	GAATTCAGAATGCAGGTGGC
544	999	AGCCACCTGCATTCTGAATT	1498	AATTCAGAATGCAGGTGGCT
545	1000	GAGCCACCTGCATTCTGAAT	1499	ATTCAGAATGCAGGTGGCTC
546	1001	AGAGCCACCTGCATTCTGAA	1500	TTCAGAATGCAGGTGGCTCT
547	1002	CAGAGCCACCTGCATTCTGA	1501	TCAGAATGCAGGTGGCTCTG
548	1003	ACAGAGCCACCTGCATTCTG	1502	CAGAATGCAGGTGGCTCTGT
549	1004	TACAGAGCCACCTGCATTCT	1503	AGAATGCAGGTGGCTCTGTA
550	1005	TTACAGAGCCACCTGCATTC	1504	GAATGCAGGTGGCTCTGTAA
551	1006	ATTACAGAGCCACCTGCATT	1505	AATGCAGGTGGCTCTGTAAT
552	1007	CATTACAGAGCCACCTGCAT	1506	ATGCAGGTGGCTCTGTAATG
553	1008	TCATTACAGAGCCACCTGCA	1507	TGCAGGTGGCTCTGTAATGA
554	1009	ATCATTACAGAGCCACCTGC	1508	GCAGGTGGCTCTGTAATGAT
555	1010	AATCATTACAGAGCCACCTG	1509	CAGGTGGCTCTGTAATGATT
556	1011	GAATCATTACAGAGCCACCT	1510	AGGTGGCTCTGTAATGATTC
557	1012	TGAATCATTACAGAGCCACC	1511	GGTGGCTCTGTAATGATTCA
558	1013	CTGAATCATTACAGAGCCAC	1512	GTGGCTCTGTAATGATTCAG
559	1014	GCTGAATCATTACAGAGCCA	1513	TGGCTCTGTAATGATTCAGC
560	1015	CGCTGAATCATTACAGAGCC	1514	GGCTCTGTAATGATTCAGCG
561	1016	ACGCTGAATCATTACAGAGC	1515	GCTCTGTAATGATTCAGCGT
562	1017	CACGCTGAATCATTACAGAG	1516	CTCTGTAATGATTCAGCGTG
563	1018	ACACGCTGAATCATTACAGA	1517	TCTGTAATGATTCAGCGTGT
564	1019	CACACGCTGAATCATTACAG	1518	CTGTAATGATTCAGCGTGTG
565	1020	TCACACGCTGAATCATTACA	1519	TGTAATGATTCAGCGTGTGA
566	1021	TTCACACGCTGAATCATTAC	1520	GTAATGATTCAGCGTGTGAA
567	1022	ATTCACACGCTGAATCATTA	1521	TAATGATTCAGCGTGTGAAT
568	1023	CATTCACACGCTGAATCATT	1522	AATGATTCAGCGTGTGAATG
569	1024	CCATTCACACGCTGAATCAT	1523	ATGATTCAGCGTGTGAATGG
570	1025	GCCATTCACACGCTGAATCA	1524	TGATTCAGCGTGTGAATGGC
571	1026	AGCCATTCACACGCTGAATC	1525	GATTCAGCGTGTGAATGGCT
572	1027	GAGCCATTCACACGCTGAAT	1526	ATTCAGCGTGTGAATGGCTC
573	1028	AGAGCCATTCACACGCTGAA	1527	TTCAGCGTGTGAATGGCTCT
574	1029	GAGAGCCATTCACACGCTGA	1528	TCAGCGTGTGAATGGCTCTC

[0197]

575	1030	AGAGAGCCATTCACACGCTG	1529	CAGCGTGTGAATGGCTCTCT
576	1031	CAGAGAGCCATTCACACGCT	1530	AGCGTGTGAATGGCTCTCTG
577	1032	CCAGAGAGCCATTCACACGC	1531	GCGTGTGAATGGCTCTCTGG
578	1033	GCCAGAGAGCCATTCACACG	1532	CGTGTGAATGGCTCTCTGGC
579	1034	AGCCAGAGAGCCATTCACAC	1533	GTGTGAATGGCTCTCTGGCT
580	1035	CAGCCAGAGAGCCATTCACA	1534	TGTGAATGGCTCTCTGGCTG
581	1036	ACAGCCAGAGAGCCATTCAC	1535	GTGAATGGCTCTCTGGCTGT
582	1037	TACAGCCAGAGAGCCATTCA	1536	TGAATGGCTCTCTGGCTGTA
583	1038	ATACAGCCAGAGAGCCATTC	1537	GAATGGCTCTCTGGCTGTAT
584	1039	GATACAGCCAGAGAGCCATT	1538	AATGGCTCTCTGGCTGTATC
585	1040	CGATACAGCCAGAGAGCCAT	1539	ATGGCTCTCTGGCTGTATCG
586	1041	TCGATACAGCCAGAGAGCCA	1540	TGGCTCTCTGGCTGTATCGA
587	1042	CTCGATACAGCCAGAGAGCC	1541	GGCTCTCTGGCTGTATCGAG
588	1043	CCTCGATACAGCCAGAGAGC	1542	GCTCTCTGGCTGTATCGAGG
589	1044	CCCTCGATACAGCCAGAGAG	1543	CTCTCTGGCTGTATCGAGGG
590	1045	GCCCTCGATACAGCCAGAGA	1544	TCTCTGGCTGTATCGAGGGC
591	1046	GGCCCTCGATACAGCCAGAG	1545	CTCTGGCTGTATCGAGGGCC
592	1047	GGGCCCTCGATACAGCCAGA	1546	TCTGGCTGTATCGAGGGCCC
593	1048	AGGGCCCTCGATACAGCCAG	1547	CTGGCTGTATCGAGGGCCCT
594	1049	AAGGGCCCTCGATACAGCCA	1548	TGGCTGTATCGAGGGCCCTT
595	1050	CAAGGGCCCTCGATACAGCC	1549	GGCTGTATCGAGGGCCCTTG
596	1051	CCAAGGGCCCTCGATACAGC	1550	GCTGTATCGAGGGCCCTTGG
597	1052	CCCAAGGGCCCTCGATACAG	1551	CTGTATCGAGGGCCCTTGGG
598	1053	CCCCAAGGGCCCTCGATACA	1552	TGTATCGAGGGCCCTTGGGG
599	1054	TCCCCAAGGGCCCTCGATAC	1553	GTATCGAGGGCCCTTGGGGA
600	1055	ATCCCCAAGGGCCCTCGATA	1554	TATCGAGGGCCCTTGGGGAT
601	1056	AATCCCCAAGGGCCCTCGAT	1555	ATCGAGGGCCCTTGGGGATT
602	1057	AAATCCCCAAGGGCCCTCGA	1556	TCGAGGGCCCTTGGGGATTT
603	1058	AAAATCCCCAAGGGCCCTCG	1557	CGAGGGCCCTTGGGGATTTT
604	1059	CAAAATCCCCAAGGGCCCTC	1558	GAGGGCCCTTGGGGATTTTG
605	1060	TCAAAATCCCCAAGGGCCCT	1559	AGGGCCCTTGGGGATTTTGA
606	1061	ATCAAAATCCCCAAGGGCCC	1560	GGGCCCTTGGGGATTTTGAT
607	1062	AATCAAAATCCCCAAGGGCC	1561	GGCCCTTGGGGATTTTGATT
608	1063	TAATCAAAATCCCCAAGGGC	1562	GCCCTTGGGGATTTTGATTA
609	1064	GTAATCAAAATCCCCAAGGG	1563	CCCTTGGGGATTTTGATTAC
610	1065	TGTAATCAAAATCCCCAAGG	1564	CCTTGGGGATTTTGATTACA
611	1066	TTGTAATCAAAATCCCCAAG	1565	CTTGGGGATTTTGATTACAA
612	1067	TTTGTAATCAAAATCCCCAA	1566	TTGGGGATTTTGATTACAAA
613	1068	ATTTGTAATCAAAATCCCCA	1567	TGGGGATTTTGATTACAAAT
614	1069	CATTTGTAATCAAAATCCCC	1568	GGGGATTTTGATTACAAATG
615	1070	ACATTTGTAATCAAAATCCC	1569	GGGATTTTGATTACAAATGT
616	1071	CACATTTGTAATCAAAATCC	1570	GGATTTTGATTACAAATGTG
617	1072	ACACATTTGTAATCAAAATC	1571	GATTTTGATTACAAATGTGT
618	1073	GACACATTTGTAATCAAAAT	1572	ATTTTGATTACAAATGTGTC
619	1074	GGACACATTTGTAATCAAAA	1573	TTTTGATTACAAATGTGTCC
620	1075	TGGACACATTTGTAATCAAA	1574	TTTGATTACAAATGTGTCCA

[0198]

621	1076	ATGGACACATTTGTAATCAA	1575	TTGATTACAAATGTGTCCAT
622	1077	CATGGACACATTTGTAATCA	1576	TGATTACAAATGTGTCCATG
623	1078	CCATGGACACATTTGTAATC	1577	GATTACAAATGTGTCCATGG
624	1079	TCCATGGACACATTTGTAAT	1578	ATTACAAATGTGTCCATGGA
625	1080	TTCCATGGACACATTTGTAA	1579	TTACAAATGTGTCCATGGAA
626	1081	TTTCCATGGACACATTTGTA	1580	TACAAATGTGTCCATGGAAA
627	1082	TTTTCCATGGACACATTTGT	1581	ACAAATGTGTCCATGGAAAA
628	1083	CTTTTCCATGGACACATTTG	1582	CAAATGTGTCCATGGAAAAG
629	1084	CCTTTTCCATGGACACATTT	1583	AAATGTGTCCATGGAAAAGG
630	1085	ACCTTTTCCATGGACACATT	1584	AATGTGTCCATGGAAAAGGT
631	1086	GACCTTTTCCATGGACACAT	1585	ATGTGTCCATGGAAAAGGTC
632	1087	GGACCTTTTCCATGGACACA	1586	TGTGTCCATGGAAAAGGTCC
633	1088	AGGACCTTTTCCATGGACAC	1587	GTGTCCATGGAAAAGGTCCT
634	1089	TAGGACCTTTTCCATGGACA	1588	TGTCCATGGAAAAGGTCCTA
635	1090	GTAGGACCTTTTCCATGGAC	1589	GTCCATGGAAAAGGTCCTAC
636	1091	AGTAGGACCTTTTCCATGGA	1590	TCCATGGAAAAGGTCCTACT
637	1092	CAGTAGGACCTTTTCCATGG	1591	CCATGGAAAAGGTCCTACTG
638	1093	TCAGTAGGACCTTTTCCATG	1592	CATGGAAAAGGTCCTACTGA
639	1094	CTCAGTAGGACCTTTTCCAT	1593	ATGGAAAAGGTCCTACTGAG
640	1095	GCTCAGTAGGACCTTTTCCA	1594	TGGAAAAGGTCCTACTGAGC
641	1096	TGCTCAGTAGGACCTTTTCC	1595	GGAAAAGGTCCTACTGAGCA
642	1097	CTGCTCAGTAGGACCTTTTC	1596	GAAAAGGTCCTACTGAGCAG
643	1098	GCTGCTCAGTAGGACCTTTT	1597	AAAAGGTCCTACTGAGCAGC
644	1099	AGCTGCTCAGTAGGACCTTT	1598	AAAGGTCCTACTGAGCAGCT
645	1100	AAGCTGCTCAGTAGGACCTT	1599	AAGGTCCTACTGAGCAGCTT
646	1101	CAAGCTGCTCAGTAGGACCT	1600	AGGTCCTACTGAGCAGCTTG
647	1102	ACAAGCTGCTCAGTAGGACC	1601	GGTCCTACTGAGCAGCTTGT
648	1103	GACAAGCTGCTCAGTAGGAC	1602	GTCCTACTGAGCAGCTTGTC
649	1104	AGACAAGCTGCTCAGTAGGA	1603	TCCTACTGAGCAGCTTGTCT
650	1105	GAGACAAGCTGCTCAGTAGG	1604	CCTACTGAGCAGCTTGTCTC
651	1106	TGAGACAAGCTGCTCAGTAG	1605	CTACTGAGCAGCTTGTCTCA
652	1107	GTGAGACAAGCTGCTCAGTA	1606	TACTGAGCAGCTTGTCTCAC
653	1108	GGTGAGACAAGCTGCTCAGT	1607	ACTGAGCAGCTTGTCTCACC
654	1109	TGGTGAGACAAGCTGCTCAG	1608	CTGAGCAGCTTGTCTCACCA
655	1110	CTGGTGAGACAAGCTGCTCA	1609	TGAGCAGCTTGTCTCACCAG
656	1111	TCTGGTGAGACAAGCTGCTC	1610	GAGCAGCTTGTCTCACCAGA
657	1112	CTCTGGTGAGACAAGCTGCT	1611	AGCAGCTTGTCTCACCAGAG
658	1113	GCTCTGGTGAGACAAGCTGC	1612	GCAGCTTGTCTCACCAGAGC
659	1114	GGCTCTGGTGAGACAAGCTG	1613	CAGCTTGTCTCACCAGAGCC
660	1115	AGGCTCTGGTGAGACAAGCT	1614	AGCTTGTCTCACCAGAGCCT
661	1116	CAGGCTCTGGTGAGACAAGC	1615	GCTTGTCTCACCAGAGCCTG
662	1117	TCAGGCTCTGGTGAGACAAG	1616	CTTGTCTCACCAGAGCCTGA
663	1118	TTCAGGCTCTGGTGAGACAA	1617	TTGTCTCACCAGAGCCTGAA
664	1119	CTTCAGGCTCTGGTGAGACA	1618	TGTCTCACCAGAGCCTGAAG
665	1120	ACTTCAGGCTCTGGTGAGAC	1619	GTCTCACCAGAGCCTGAAGT
666	1121	GACTTCAGGCTCTGGTGAGA	1620	TCTCACCAGAGCCTGAAGTC

[0199]

667	1122	GGACTTCAGGCTCTGGTGAG	1621	CTCACCAGAGCCTGAAGTCC
668	1123	TGGACTTCAGGCTCTGGTGA	1622	TCACCAGAGCCTGAAGTCCA
669	1124	ATGGACTTCAGGCTCTGGTG	1623	CACCAGAGCCTGAAGTCCAT
670	1125	CATGGACTTCAGGCTCTGGT	1624	ACCAGAGCCTGAAGTCCATG
671	1126	TCATGGACTTCAGGCTCTGG	1625	CCAGAGCCTGAAGTCCATGA
672	1127	ATCATGGACTTCAGGCTCTG	1626	CAGAGCCTGAAGTCCATGAT
673	1128	TATCATGGACTTCAGGCTCT	1627	AGAGCCTGAAGTCCATGATA
674	1129	ATATCATGGACTTCAGGCTC	1628	GAGCCTGAAGTCCATGATAT
675	1130	AATATCATGGACTTCAGGCT	1629	AGCCTGAAGTCCATGATATT
676	1131	CAATATCATGGACTTCAGGC	1630	GCCTGAAGTCCATGATATTG
677	1132	TCAATATCATGGACTTCAGG	1631	CCTGAAGTCCATGATATTGA
678	1133	TTCAATATCATGGACTTCAG	1632	CTGAAGTCCATGATATTGAA
679	1134	TTTCAATATCATGGACTTCA	1633	TGAAGTCCATGATATTGAAA
680	1135	CTTTCAATATCATGGACTTC	1634	GAAGTCCATGATATTGAAAG
681	1136	TCTTTCAATATCATGGACTT	1635	AAGTCCATGATATTGAAAGA
682	1137	ATCTTTCAATATCATGGACT	1636	AGTCCATGATATTGAAAGAT
683	1138	GATCTTTCAATATCATGGAC	1637	GTCCATGATATTGAAAGATC
684	1139	AGATCTTTCAATATCATGGA	1638	TCCATGATATTGAAAGATCT
685	1140	CAGATCTTTCAATATCATGG	1639	CCATGATATTGAAAGATCTG
686	1141	TCAGATCTTTCAATATCATG	1640	CATGATATTGAAAGATCTGA
687	1142	TTCAGATCTTTCAATATCAT	1641	ATGATATTGAAAGATCTGAA
688	1143	CTTCAGATCTTTCAATATCA	1642	TGATATTGAAAGATCTGAAG
689	1144	TCTTCAGATCTTTCAATATC	1643	GATATTGAAAGATCTGAAGA
690	1145	TTCTTCAGATCTTTCAATAT	1644	ATATTGAAAGATCTGAAGAA
691	1146	CTTCTTCAGATCTTTCAATA	1645	TATTGAAAGATCTGAAGAAG
692	1147	TCTTCTTCAGATCTTTCAAT	1646	ATTGAAAGATCTGAAGAAGA
693	1148	ATCTTCTTCAGATCTTTCAA	1647	TTGAAAGATCTGAAGAAGAT
694	1149	CATCTTCTTCAGATCTTTCA	1648	TGAAAGATCTGAAGAAGATG
695	1150	TCATCTTCTTCAGATCTTTC	1649	GAAAGATCTGAAGAAGATGA
696	1151	ATCATCTTCTTCAGATCTTT	1650	AAAGATCTGAAGAAGATGAT
697	1152	GATCATCTTCTTCAGATCTT	1651	AAGATCTGAAGAAGATGATC
698	1153	TGATCATCTTCTTCAGATCT	1652	AGATCTGAAGAAGATGATCA
699	1154	CTGATCATCTTCTTCAGATC	1653	GATCTGAAGAAGATGATCAG
700	1155	ACTGATCATCTTCTTCAGAT	1654	ATCTGAAGAAGATGATCAGT
701	1156	AACTGATCATCTTCTTCAGA	1655	TCTGAAGAAGATGATCAGTT
702	1157	GAACTGATCATCTTCTTCAG	1656	CTGAAGAAGATGATCAGTTC
703	1158	TGAACTGATCATCTTCTTCA	1657	TGAAGAAGATGATCAGTTCA
704	1159	ATGAACTGATCATCTTCTTC	1658	GAAGAAGATGATCAGTTCAT
705	1160	AATGAACTGATCATCTTCTT	1659	AAGAAGATGATCAGTTCATT
706	1161	TAATGAACTGATCATCTTCT	1660	AGAAGATGATCAGTTCATTA
707	1162	ATAATGAACTGATCATCTTC	1661	GAAGATGATCAGTTCATTAT
708	1163	GATAATGAACTGATCATCTT	1662	AAGATGATCAGTTCATTATC
709	1164	GGATAATGAACTGATCATCT	1663	AGATGATCAGTTCATTATCC
710	1165	AGGATAATGAACTGATCATC	1664	GATGATCAGTTCATTATCCT
711	1166	AAGGATAATGAACTGATCAT	1665	ATGATCAGTTCATTATCCTT
712	1167	CAAGGATAATGAACTGATCA	1666	TGATCAGTTCATTATCCTTG

[0200]

713	1168	GCAAGGATAATGAACTGATC	1667	GATCAGTTCATTATCCTTGC
714	1169	TGCAAGGATAATGAACTGAT	1668	ATCAGTTCATTATCCTTGCA
715	1170	ATGCAAGGATAATGAACTGA	1669	TCAGTTCATTATCCTTGCAT
716	1171	CATGCAAGGATAATGAACTG	1670	CAGTTCATTATCCTTGCATG
717	1172	ACATGCAAGGATAATGAACT	1671	AGTTCATTATCCTTGCATGT
718	1173	CACATGCAAGGATAATGAAC	1672	GTTCATTATCCTTGCATGTG
719	1174	TCACATGCAAGGATAATGAA	1673	TTCATTATCCTTGCATGTGA
720	1175	ATCACATGCAAGGATAATGA	1674	TCATTATCCTTGCATGTGAT
721	1176	CATCACATGCAAGGATAATG	1675	CATTATCCTTGCATGTGATG
722	1177	CCATCACATGCAAGGATAAT	1676	ATTATCCTTGCATGTGATGG
723	1178	ACCATCACATGCAAGGATAA	1677	TTATCCTTGCATGTGATGGT
724	1179	TACCATCACATGCAAGGATA	1678	TATCCTTGCATGTGATGGTA
725	1180	ATACCATCACATGCAAGGAT	1679	ATCCTTGCATGTGATGGTAT
726	1181	GATACCATCACATGCAAGGA	1680	TCCTTGCATGTGATGGTATC
727	1182	AGATACCATCACATGCAAGG	1681	CCTTGCATGTGATGGTATCT
728	1183	CAGATACCATCACATGCAAG	1682	CTTGCATGTGATGGTATCTG
729	1184	CCAGATACCATCACATGCAA	1683	TTGCATGTGATGGTATCTGG
730	1185	CCCAGATACCATCACATGCA	1684	TGCATGTGATGGTATCTGGG
731	1186	TCCCAGATACCATCACATGC	1685	GCATGTGATGGTATCTGGGA
732	1187	ATCCCAGATACCATCACATG	1686	CATGTGATGGTATCTGGGAT
733	1188	CATCCCAGATACCATCACAT	1687	ATGTGATGGTATCTGGGATG
734	1189	ACATCCCAGATACCATCACA	1688	TGTGATGGTATCTGGGATGT
735	1190	AACATCCCAGATACCATCAC	1689	GTGATGGTATCTGGGATGTT
736	1191	TAACATCCCAGATACCATCA	1690	TGATGGTATCTGGGATGTTA
737	1192	ATAACATCCCAGATACCATC	1691	GATGGTATCTGGGATGTTAT
738	1193	CATAACATCCCAGATACCAT	1692	ATGGTATCTGGGATGTTATG
739	1194	CCATAACATCCCAGATACCA	1693	TGGTATCTGGGATGTTATGG
740	1195	CCCATAACATCCCAGATACC	1694	GGTATCTGGGATGTTATGGG
741	1196	TCCCATAACATCCCAGATAC	1695	GTATCTGGGATGTTATGGGA
742	1197	TTCCCATAACATCCCAGATA	1696	TATCTGGGATGTTATGGGAA
743	1198	TTTCCCATAACATCCCAGAT	1697	ATCTGGGATGTTATGGGAAA
744	1199	ATTTCCCATAACATCCCAGA	1698	TCTGGGATGTTATGGGAAAT
745	1200	CATTTCCCATAACATCCCAG	1699	CTGGGATGTTATGGGAAATG
746	1201	TCATTTCCCATAACATCCCA	1700	TGGGATGTTATGGGAAATGA
747	1202	TTCATTTCCCATAACATCCC	1701	GGGATGTTATGGGAAATGAA
748	1203	CTTCATTTCCCATAACATCC	1702	GGATGTTATGGGAAATGAAG
749	1204	TCTTCATTTCCCATAACATC	1703	GATGTTATGGGAAATGAAGA
750	1205	CTCTTCATTTCCCATAACAT	1704	ATGTTATGGGAAATGAAGAG
751	1206	GCTCTTCATTTCCCATAACA	1705	TGTTATGGGAAATGAAGAGC
752	1207	AGCTCTTCATTTCCCATAAC	1706	GTTATGGGAAATGAAGAGCT
753	1208	GAGCTCTTCATTTCCCATAA	1707	TTATGGGAAATGAAGAGCTC
754	1209	AGAGCTCTTCATTTCCCATA	1708	TATGGGAAATGAAGAGCTCT
755	1210	CAGAGCTCTTCATTTCCCAT	1709	ATGGGAAATGAAGAGCTCTG
756	1211	ACAGAGCTCTTCATTTCCCA	1710	TGGGAAATGAAGAGCTCTGT
757	1212	CACAGAGCTCTTCATTTCCC	1711	GGGAAATGAAGAGCTCTGTG
758	1213	TCACAGAGCTCTTCATTTCC	1712	GGAAATGAAGAGCTCTGTGA

[0201]

759	1214	ATCACAGAGCTCTTCATTTC	1713	GAAATGAAGAGCTCTGTGAT
760	1215	AATCACAGAGCTCTTCATTT	1714	AAATGAAGAGCTCTGTGATT
761	1216	AAATCACAGAGCTCTTCATT	1715	AATGAAGAGCTCTGTGATTT
762	1217	AAAATCACAGAGCTCTTCAT	1716	ATGAAGAGCTCTGTGATTTT
763	1218	CAAAATCACAGAGCTCTTCA	1717	TGAAGAGCTCTGTGATTTTG
764	1219	ACAAAATCACAGAGCTCTTC	1718	GAAGAGCTCTGTGATTTTGT
765	1220	TACAAAATCACAGAGCTCTT	1719	AAGAGCTCTGTGATTTTGTA
766	1221	TTACAAAATCACAGAGCTCT	1720	AGAGCTCTGTGATTTTGTAA
767	1222	CTTACAAAATCACAGAGCTC	1721	GAGCTCTGTGATTTTGTAAG
768	1223	TCTTACAAAATCACAGAGCT	1722	AGCTCTGTGATTTTGTAAGA
769	1224	ATCTTACAAAATCACAGAGC	1723	GCTCTGTGATTTTGTAAGAT
770	1225	GATCTTACAAAATCACAGAG	1724	CTCTGTGATTTTGTAAGATC
771	1226	GGATCTTACAAAATCACAGA	1725	TCTGTGATTTTGTAAGATCC
772	1227	TGGATCTTACAAAATCACAG	1726	CTGTGATTTTGTAAGATCCA
773	1228	CTGGATCTTACAAAATCACA	1727	TGTGATTTTGTAAGATCCAG
774	1229	TCTGGATCTTACAAAATCAC	1728	GTGATTTTGTAAGATCCAGA
775	1230	GTCTGGATCTTACAAAATCA	1729	TGATTTTGTAAGATCCAGAC
776	1231	AGTCTGGATCTTACAAAATC	1730	GATTTTGTAAGATCCAGACT
777	1232	AAGTCTGGATCTTACAAAAT	1731	ATTTTGTAAGATCCAGACTT
778	1233	CAAGTCTGGATCTTACAAAA	1732	TTTTGTAAGATCCAGACTTG
779	1234	TCAAGTCTGGATCTTACAAA	1733	TTTGTAAGATCCAGACTTGA
780	1235	TTCAAGTCTGGATCTTACAA	1734	TTGTAAGATCCAGACTTGAA
781	1236	CTTCAAGTCTGGATCTTACA	1735	TGTAAGATCCAGACTTGAAG
782	1237	ACTTCAAGTCTGGATCTTAC	1736	GTAAGATCCAGACTTGAAGT
783	1238	GACTTCAAGTCTGGATCTTA	1737	TAAGATCCAGACTTGAAGTC
784	1239	TGACTTCAAGTCTGGATCTT	1738	AAGATCCAGACTTGAAGTCA
785	1240	GTGACTTCAAGTCTGGATCT	1739	AGATCCAGACTTGAAGTCAC
786	1241	AGTGACTTCAAGTCTGGATC	1740	GATCCAGACTTGAAGTCACT
787	1242	CAGTGACTTCAAGTCTGGAT	1741	ATCCAGACTTGAAGTCACTG
788	1243	TCAGTGACTTCAAGTCTGGA	1742	TCCAGACTTGAAGTCACTGA
789	1244	ATCAGTGACTTCAAGTCTGG	1743	CCAGACTTGAAGTCACTGAT
790	1245	CATCAGTGACTTCAAGTCTG	1744	CAGACTTGAAGTCACTGATG
791	1246	TCATCAGTGACTTCAAGTCT	1745	AGACTTGAAGTCACTGATGA
792	1247	GTCATCAGTGACTTCAAGTC	1746	GACTTGAAGTCACTGATGAC
793	1248	GGTCATCAGTGACTTCAAGT	1747	ACTTGAAGTCACTGATGACC
794	1249	AGGTCATCAGTGACTTCAAG	1748	CTTGAAGTCACTGATGACCT
795	1250	AAGGTCATCAGTGACTTCAA	1749	TTGAAGTCACTGATGACCTT
796	1251	CAAGGTCATCAGTGACTTCA	1750	TGAAGTCACTGATGACCTTG
797	1252	TCAAGGTCATCAGTGACTTC	1751	GAAGTCACTGATGACCTTGA
798	1253	CTCAAGGTCATCAGTGACTT	1752	AAGTCACTGATGACCTTGAG
799	1254	TCTCAAGGTCATCAGTGACT	1753	AGTCACTGATGACCTTGAGA
800	1255	TTCTCAAGGTCATCAGTGAC	1754	GTCACTGATGACCTTGAGAA
801	1256	TTTCTCAAGGTCATCAGTGA	1755	TCACTGATGACCTTGAGAAA
802	1257	CTTTCTCAAGGTCATCAGTG	1756	CACTGATGACCTTGAGAAAG
803	1258	ACTTTCTCAAGGTCATCAGT	1757	ACTGATGACCTTGAGAAAGT
804	1259	AACTTTCTCAAGGTCATCAG	1758	CTGATGACCTTGAGAAAGTT

[0202]

805	1260	AAACTTTCTCAAGGTCATCA	1759	TGATGACCTTGAGAAAGTTT
806	1261	CAAACTTTCTCAAGGTCATC	1760	GATGACCTTGAGAAAGTTTG
807	1262	GCAAACTTTCTCAAGGTCAT	1761	ATGACCTTGAGAAAGTTTGC
808	1263	TGCAAACTTTCTCAAGGTCA	1762	TGACCTTGAGAAAGTTTGCA
809	1264	TTGCAAACTTTCTCAAGGTC	1763	GACCTTGAGAAAGTTTGCAA
810	1265	ATTGCAAACTTTCTCAAGGT	1764	ACCTTGAGAAAGTTTGCAAT
811	1266	CATTGCAAACTTTCTCAAGG	1765	CCTTGAGAAAGTTTGCAATG
812	1267	TCATTGCAAACTTTCTCAAG	1766	CTTGAGAAAGTTTGCAATGA
813	1268	TTCATTGCAAACTTTCTCAA	1767	TTGAGAAAGTTTGCAATGAA
814	1269	CTTCATTGCAAACTTTCTCA	1768	TGAGAAAGTTTGCAATGAAG
815	1270	ACTTCATTGCAAACTTTCTC	1769	GAGAAAGTTTGCAATGAAGT
816	1271	TACTTCATTGCAAACTTTCT	1770	AGAAAGTTTGCAATGAAGTA
817	1272	CTACTTCATTGCAAACTTTC	1771	GAAAGTTTGCAATGAAGTAG
818	1273	ACTACTTCATTGCAAACTTT	1772	AAAGTTTGCAATGAAGTAGT
819	1274	GACTACTTCATTGCAAACTT	1773	AAGTTTGCAATGAAGTAGTC
820	1275	CGACTACTTCATTGCAAACT	1774	AGTTTGCAATGAAGTAGTCG
821	1276	TCGACTACTTCATTGCAAAC	1775	GTTTGCAATGAAGTAGTCGA
822	1277	GTCGACTACTTCATTGCAAA	1776	TTTGCAATGAAGTAGTCGAC
823	1278	TGTCGACTACTTCATTGCAA	1777	TTGCAATGAAGTAGTCGACA
824	1279	GTGTCGACTACTTCATTGCA	1778	TGCAATGAAGTAGTCGACAC
825	1280	GGTGTCGACTACTTCATTGC	1779	GCAATGAAGTAGTCGACACC
826	1281	AGGTGTCGACTACTTCATTG	1780	CAATGAAGTAGTCGACACCT
827	1282	CAGGTGTCGACTACTTCATT	1781	AATGAAGTAGTCGACACCTG
828	1283	ACAGGTGTCGACTACTTCAT	1782	ATGAAGTAGTCGACACCTGT
829	1284	AACAGGTGTCGACTACTTCA	1783	TGAAGTAGTCGACACCTGTT
830	1285	AAACAGGTGTCGACTACTTC	1784	GAAGTAGTCGACACCTGTTT
831	1286	CAAACAGGTGTCGACTACTT	1785	AAGTAGTCGACACCTGTTTG
832	1287	ACAAACAGGTGTCGACTACT	1786	AGTAGTCGACACCTGTTTGT
833	1288	TACAAACAGGTGTCGACTAC	1787	GTAGTCGACACCTGTTTGTA
834	1289	ATACAAACAGGTGTCGACTA	1788	TAGTCGACACCTGTTTGTAT
835	1290	TATACAAACAGGTGTCGACT	1789	AGTCGACACCTGTTTGTATA
836	1291	TTATACAAACAGGTGTCGAC	1790	GTCGACACCTGTTTGTATAA
837	1292	CTTATACAAACAGGTGTCGA	1791	TCGACACCTGTTTGTATAAG
838	1293	CCTTATACAAACAGGTGTCG	1792	CGACACCTGTTTGTATAAGG
839	1294	CCCTTATACAAACAGGTGTC	1793	GACACCTGTTTGTATAAGGG
840	1295	TCCCTTATACAAACAGGTGT	1794	ACACCTGTTTGTATAAGGGA
841	1296	TTCCCTTATACAAACAGGTG	1795	CACCTGTTTGTATAAGGGAA
842	1297	CTTCCCTTATACAAACAGGT	1796	ACCTGTTTGTATAAGGGAAG
843	1298	ACTTCCCTTATACAAACAGG	1797	CCTGTTTGTATAAGGGAAGT
844	1299	GACTTCCCTTATACAAACAG	1798	CTGTTTGTATAAGGGAAGTC
845	1300	CGACTTCCCTTATACAAACA	1799	TGTTTGTATAAGGGAAGTCG
846	1301	TCGACTTCCCTTATACAAAC	1800	GTTTGTATAAGGGAAGTCGA
847	1302	CTCGACTTCCCTTATACAAA	1801	TTTGTATAAGGGAAGTCGAG
848	1303	TCTCGACTTCCCTTATACAA	1802	TTGTATAAGGGAAGTCGAGA
849	1304	GTCTCGACTTCCCTTATACA	1803	TGTATAAGGGAAGTCGAGAC
850	1305	TGTCTCGACTTCCCTTATAC	1804	GTATAAGGGAAGTCGAGACA

[0203]

851	1306	TTGTCTCGACTTCCCTTATA	1805	TATAAGGGAAGTCGAGACAA
852	1307	GTTGTCTCGACTTCCCTTAT	1806	ATAAGGGAAGTCGAGACAAC
853	1308	TGTTGTCTCGACTTCCCTTA	1807	TAAGGGAAGTCGAGACAACA
854	1309	ATGTTGTCTCGACTTCCCTT	1808	AAGGGAAGTCGAGACAACAT
855	1310	CATGTTGTCTCGACTTCCCT	1809	AGGGAAGTCGAGACAACATG
856	1311	TCATGTTGTCTCGACTTCCC	1810	GGGAAGTCGAGACAACATGA
857	1312	CTCATGTTGTCTCGACTTCC	1811	GGAAGTCGAGACAACATGAG
858	1313	ACTCATGTTGTCTCGACTTC	1812	GAAGTCGAGACAACATGAGT
859	1314	CACTCATGTTGTCTCGACTT	1813	AAGTCGAGACAACATGAGTG
860	1315	ACACTCATGTTGTCTCGACT	1814	AGTCGAGACAACATGAGTGT
861	1316	CACACTCATGTTGTCTCGAC	1815	GTCGAGACAACATGAGTGTG
862	1317	TCACACTCATGTTGTCTCGA	1816	TCGAGACAACATGAGTGTGA
863	1318	ATCACACTCATGTTGTCTCG	1817	CGAGACAACATGAGTGTGAT
864	1319	AATCACACTCATGTTGTCTC	1818	GAGACAACATGAGTGTGATT
865	1320	AAATCACACTCATGTTGTCT	1819	AGACAACATGAGTGTGATTT
866	1321	AAAATCACACTCATGTTGTC	1820	GACAACATGAGTGTGATTTT
867	1322	CAAAATCACACTCATGTTGT	1821	ACAACATGAGTGTGATTTTG
868	1323	TCAAAATCACACTCATGTTG	1822	CAACATGAGTGTGATTTTGA
869	1324	ATCAAAATCACACTCATGTT	1823	AACATGAGTGTGATTTTGAT
870	1325	GATCAAAATCACACTCATGT	1824	ACATGAGTGTGATTTTGATC
871	1326	AGATCAAAATCACACTCATG	1825	CATGAGTGTGATTTTGATCT
872	1327	CAGATCAAAATCACACTCAT	1826	ATGAGTGTGATTTTGATCTG
873	1328	ACAGATCAAAATCACACTCA	1827	TGAGTGTGATTTTGATCTGT
874	1329	AACAGATCAAAATCACACTC	1828	GAGTGTGATTTTGATCTGTT
875	1330	AAACAGATCAAAATCACACT	1829	AGTGTGATTTTGATCTGTTT
876	1331	AAAACAGATCAAAATCACAC	1830	GTGTGATTTTGATCTGTTTT
877	1332	GAAAACAGATCAAAATCACA	1831	TGTGATTTTGATCTGTTTTC
878	1333	GGAAAACAGATCAAAATCAC	1832	GTGATTTTGATCTGTTTTCC
879	1334	TGGAAAACAGATCAAAATCA	1833	TGATTTTGATCTGTTTTCCA
880	1335	TTGGAAAACAGATCAAAATC	1834	GATTTTGATCTGTTTTCCAA
881	1336	TTTGGAAAACAGATCAAAAT	1835	ATTTTGATCTGTTTTCCAAA
882	1337	ATTTGGAAAACAGATCAAAA	1836	TTTTGATCTGTTTTCCAAAT
883	1338	CATTTGGAAAACAGATCAAA	1837	TTTGATCTGTTTTCCAAATG
884	1339	GCATTTGGAAAACAGATCAA	1838	TTGATCTGTTTTCCAAATGC
885	1340	TGCATTTGGAAAACAGATCA	1839	TGATCTGTTTTCCAAATGCA
886	1341	GTGCATTTGGAAAACAGATC	1840	GATCTGTTTTCCAAATGCAC
887	1342	GGTGCATTTGGAAAACAGAT	1841	ATCTGTTTTCCAAATGCACC
888	1343	GGGTGCATTTGGAAAACAGA	1842	TCTGTTTTCCAAATGCACCC
889	1344	TGGGTGCATTTGGAAAACAG	1843	CTGTTTTCCAAATGCACCCA
890	1345	TTGGGTGCATTTGGAAAACA	1844	TGTTTTCCAAATGCACCCAA
891	1346	TTTGGGTGCATTTGGAAAAC	1845	GTTTTCCAAATGCACCCAAA
892	1347	CTTTGGGTGCATTTGGAAAA	1846	TTTTCCAAATGCACCCAAAG
893	1348	ACTTTGGGTGCATTTGGAAA	1847	TTTCCAAATGCACCCAAAGT
894	1349	TACTTTGGGTGCATTTGGAA	1848	TTCCAAATGCACCCAAAGTA
895	1350	ATACTTTGGGTGCATTTGGA	1849	TCCAAATGCACCCAAAGTAT
896	1351	GATACTTTGGGTGCATTTGG	1850	CCAAATGCACCCAAAGTATC

[0204]

897	1352	CGATACTTTGGGTGCATTTG	1851	CAAATGCACCCAAAGTATCG
898	1353	GCGATACTTTGGGTGCATTT	1852	AAATGCACCCAAAGTATCGC
899	1354	GGCGATACTTTGGGTGCATT	1853	AATGCACCCAAAGTATCGCC
900	1355	TGGCGATACTTTGGGTGCAT	1854	ATGCACCCAAAGTATCGCCA
901	1356	CTGGCGATACTTTGGGTGCA	1855	TGCACCCAAAGTATCGCCAG
902	1357	TCTGGCGATACTTTGGGTGC	1856	GCACCCAAAGTATCGCCAGA
903	1358	TTCTGGCGATACTTTGGGTG	1857	CACCCAAAGTATCGCCAGAA
904	1359	CTTCTGGCGATACTTTGGGT	1858	ACCCAAAGTATCGCCAGAAG
905	1360	GCTTCTGGCGATACTTTGGG	1859	CCCAAAGTATCGCCAGAAGC
906	1361	TGCTTCTGGCGATACTTTGG	1860	CCAAAGTATCGCCAGAAGCA
907	1362	CTGCTTCTGGCGATACTTTG	1861	CAAAGTATCGCCAGAAGCAG
908	1363	ACTGCTTCTGGCGATACTTT	1862	AAAGTATCGCCAGAAGCAGT
909	1364	CACTGCTTCTGGCGATACTT	1863	AAGTATCGCCAGAAGCAGTG
910	1365	TCACTGCTTCTGGCGATACT	1864	AGTATCGCCAGAAGCAGTGA
911	1366	TTCACTGCTTCTGGCGATAC	1865	GTATCGCCAGAAGCAGTGAA
912	1367	CTTCACTGCTTCTGGCGATA	1866	TATCGCCAGAAGCAGTGAAG
913	1368	TCTTCACTGCTTCTGGCGAT	1867	ATCGCCAGAAGCAGTGAAGA
914	1369	TTCTTCACTGCTTCTGGCGA	1868	TCGCCAGAAGCAGTGAAGAA
915	1370	CTTCTTCACTGCTTCTGGCG	1869	CGCCAGAAGCAGTGAAGAAG
916	1371	CCTTCTTCACTGCTTCTGGC	1870	GCCAGAAGCAGTGAAGAAGG
917	1372	TCCTTCTTCACTGCTTCTGG	1871	CCAGAAGCAGTGAAGAAGGA
918	1373	CTCCTTCTTCACTGCTTCTG	1872	CAGAAGCAGTGAAGAAGGAG
919	1374	CCTCCTTCTTCACTGCTTCT	1873	AGAAGCAGTGAAGAAGGAGG
920	1375	GCCTCCTTCTTCACTGCTTC	1874	GAAGCAGTGAAGAAGGAGGC
921	1376	TGCCTCCTTCTTCACTGCTT	1875	AAGCAGTGAAGAAGGAGGCA
922	1377	CTGCCTCCTTCTTCACTGCT	1876	AGCAGTGAAGAAGGAGGCAG
923	1378	TCTGCCTCCTTCTTCACTGC	1877	GCAGTGAAGAAGGAGGCAGA
924	1379	CTCTGCCTCCTTCTTCACTG	1878	CAGTGAAGAAGGAGGCAGAG
925	1380	ACTCTGCCTCCTTCTTCACT	1879	AGTGAAGAAGGAGGCAGAGT
926	1381	AACTCTGCCTCCTTCTTCAC	1880	GTGAAGAAGGAGGCAGAGTT
927	1382	CAACTCTGCCTCCTTCTTCA	1881	TGAAGAAGGAGGCAGAGTTG
928	1383	CCAACTCTGCCTCCTTCTTC	1882	GAAGAAGGAGGCAGAGTTGG
929	1384	TCCAACTCTGCCTCCTTCTT	1883	AAGAAGGAGGCAGAGTTGGA
930	1385	GTCCAACTCTGCCTCCTTCT	1884	AGAAGGAGGCAGAGTTGGAC
931	1386	TGTCCAACTCTGCCTCCTTC	1885	GAAGGAGGCAGAGTTGGACA
932	1387	TTGTCCAACTCTGCCTCCTT	1886	AAGGAGGCAGAGTTGGACAA
933	1388	CTTGTCCAACTCTGCCTCCT	1887	AGGAGGCAGAGTTGGACAAG
934	1389	ACTTGTCCAACTCTGCCTCC	1888	GGAGGCAGAGTTGGACAAGT
935	1390	TACTTGTCCAACTCTGCCTC	1889	GAGGCAGAGTTGGACAAGTA
936	1391	GTACTTGTCCAACTCTGCCT	1890	AGGCAGAGTTGGACAAGTAC
937	1392	GGTACTTGTCCAACTCTGCC	1891	GGCAGAGTTGGACAAGTACC
938	1393	AGGTACTTGTCCAACTCTGC	1892	GCAGAGTTGGACAAGTACCT
939	1394	CAGGTACTTGTCCAACTCTG	1893	CAGAGTTGGACAAGTACCTG
940	1395	CCAGGTACTTGTCCAACTCT	1894	AGAGTTGGACAAGTACCTGG
941	1396	TCCAGGTACTTGTCCAACTC	1895	GAGTTGGACAAGTACCTGGA
942	1397	TTCCAGGTACTTGTCCAACT	1896	AGTTGGACAAGTACCTGGAA

[0205]

943	1398	ATTCCAGGTACTTGTCCAAC	1897	GTTGGACAAGTACCTGGAAT
944	1399	CATTCCAGGTACTTGTCCAA	1898	TTGGACAAGTACCTGGAATG
945	1400	GCATTCCAGGTACTTGTCCA	1899	TGGACAAGTACCTGGAATGC
946	1401	TGCATTCCAGGTACTTGTCC	1900	GGACAAGTACCTGGAATGCA
947	1402	CTGCATTCCAGGTACTTGTC	1901	GACAAGTACCTGGAATGCAG
948	1403	TCTGCATTCCAGGTACTTGT	1902	ACAAGTACCTGGAATGCAGA
949	1404	CTCTGCATTCCAGGTACTTG	1903	CAAGTACCTGGAATGCAGAG
950	1405	ACTCTGCATTCCAGGTACTT	1904	AAGTACCTGGAATGCAGAGT
951	1406	TACTCTGCATTCCAGGTACT	1905	AGTACCTGGAATGCAGAGTA
952	1407	CTACTCTGCATTCCAGGTAC	1906	GTACCTGGAATGCAGAGTAG
953	1408	TCTACTCTGCATTCCAGGTA	1907	TACCTGGAATGCAGAGTAGA
954	1409	TTCTACTCTGCATTCCAGGT	1908	ACCTGGAATGCAGAGTAGAA
955	1410	CTTCTACTCTGCATTCCAGG	1909	CCTGGAATGCAGAGTAGAAG

[0206] *寡核苷酸的至少一个核苷键选自硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、亚膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如，包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3’氨基核糖或5’氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键。

[0207] 下表2标识了PPM1A AON序列。

[0208] 表2:PPM1A AON序列。与表1相比，此处的PPM1A AON序列具有尿嘧啶核碱基代替胸腺嘧啶核碱基。

[0209]

SEQ ID NO:	AON 序列(5’→3’)*	SEQ ID NO:	AON 序列 (5’→ 3’)
1910	AUGUCUUGAUCCUCUAGGUC	2387	AAAUGAACUUUCCUGUUCCU
1911	UAUGUCUUGAUCCUCUAGGU	2388	GAAAUGAACUUUCCUGUUCC
1912	UUAUGUCUUGAUCCUCUAGG	2389	AGAAAUGAACUUUCCUGUUC
1913	AUUAUGUCUUGAUCCUCUAG	2390	AAGAAAUGAACUUUCCUGUU
1914	CAUUAUGUCUUGAUCCUCUA	2391	GAAGAAAUGAACUUUCCUGU
1915	CCAUUAUGUCUUGAUCCUCU	2392	UGAAGAAAUGAACUUUCCUG
1916	CCCAUUAUGUCUUGAUCCUC	2393	GUGAAGAAAUGAACUUUCCU
1917	UCCCAUUAUGUCUUGAUCCU	2394	UGUGAAGAAAUGAACUUUCC
1918	CUCCCAUUAUGUCUUGAUCC	2395	GUGUGAAGAAAUGAACUUUC
1919	GCUCCCAUUAUGUCUUGAUC	2396	UGUGUGAAGAAAUGAACUUU
1920	UGCUCCCAUUAUGUCUUGAU	2397	UUGUGUGAAGAAAUGAACUU
1921	AUGCUCCCAUUAUGUCUUGA	2398	CUUGUGUGAAGAAAUGAACU
1922	AAUGCUCCCAUUAUGUCUUG	2399	UCUUGUGUGAAGAAAUGAAC
1923	AAAUGCUCCCAUUAUGUCUU	2400	AUCUUGUGUGAAGAAAUGAA
1924	AAAAUGCUCCCAUUAUGUCU	2401	GAUCUUGUGUGAAGAAAUGA

[0210]

1925	AAAAAUGCUCCCAUUAUGUC	2402	UGAUCUUGUGUGAAGAAAUG
1926	UAAAAAUGCUCCCAUUAUGU	2403	GUGAUCUUGUGUGAAGAAAU
1927	CUAAAAAUGCUCCCAUUAUG	2404	UGUGAUCUUGUGUGAAGAAA
1928	UCUAAAAAUGCUCCCAUUAU	2405	UUGUGAUCUUGUGUGAAGAA
1929	GUCUAAAAAUGCUCCCAUUA	2406	UUUGUGAUCUUGUGUGAAGA
1930	UGUCUAAAAAUGCUCCCAUU	2407	GUUUGUGAUCUUGUGUGAAG
1931	UUGUCUAAAAAUGCUCCCAU	2408	GGUUUGUGAUCUUGUGUGAA
1932	CUUGUCUAAAAAUGCUCCCA	2409	UGGUUUGUGAUCUUGUGUGA
1933	GCUUGUCUAAAAAUGCUCCC	2410	UUGGUUUGUGAUCUUGUGUG
1934	GGCUUGUCUAAAAAUGCUCC	2411	CUUGGUUUGUGAUCUUGUGU
1935	UGGCUUGUCUAAAAAUGCUC	2412	ACUUGGUUUGUGAUCUUGUG
1936	UUGGCUUGUCUAAAAAUGCU	2413	UACUUGGUUUGUGAUCUUGU
1937	UUUGGCUUGUCUAAAAAUGC	2414	UUACUUGGUUUGUGAUCUUG
1938	CUUUGGCUUGUCUAAAAAUG	2415	AUUACUUGGUUUGUGAUCUU
1939	UCUUUGGCUUGUCUAAAAAU	2416	GAUUACUUGGUUUGUGAUCU
1940	AUCUUUGGCUUGUCUAAAAA	2417	GGAUUACUUGGUUUGUGAUC
1941	CAUCUUUGGCUUGUCUAAAA	2418	CGGAUUACUUGGUUUGUGAU
1942	CCAUCUUUGGCUUGUCUAAA	2419	GCGGAUUACUUGGUUUGUGA
1943	UCCAUCUUUGGCUUGUCUAA	2420	AGCGGAUUACUUGGUUUGUG
1944	UUCCAUCUUUGGCUUGUCUA	2421	CAGCGGAUUACUUGGUUUGU
1945	UUUCCAUCUUUGGCUUGUCU	2422	CCAGCGGAUUACUUGGUUUG
1946	UUUUCCAUCUUUGGCUUGUC	2423	UCCAGCGGAUUACUUGGUUU
1947	CUUUUCCAUCUUUGGCUUGU	2424	CUCCAGCGGAUUACUUGGUU
1948	GCUUUUCCAUCUUUGGCUUG	2425	UCUCCAGCGGAUUACUUGGU
1949	UGCUUUUCCAUCUUUGGCUU	2426	UUCUCCAGCGGAUUACUUGG
1950	AUGCUUUUCCAUCUUUGGCU	2427	UUUCUCCAGCGGAUUACUUG
1951	UAUGCUUUUCCAUCUUUGGC	2428	CUUUCUCCAGCGGAUUACUU
1952	UUAUGCUUUUCCAUCUUUGG	2429	UCUUUCUCCAGCGGAUUACU
1953	AUUAUGCUUUUCCAUCUUUG	2430	UUCUUUCUCCAGCGGAUUAC
1954	CAUUAUGCUUUUCCAUCUUU	2431	GUUCUUUCUCCAGCGGAUUA
1955	GCAUUAUGCUUUUCCAUCUU	2432	CGUUCUUUCUCCAGCGGAUU
1956	GGCAUUAUGCUUUUCCAUCU	2433	UCGUUCUUUCUCCAGCGGAU
1957	GGGCAUUAUGCUUUUCCAUC	2434	UUCGUUCUUUCUCCAGCGGA
1958	UGGGCAUUAUGCUUUUCCAU	2435	AUUCGUUCUUUCUCCAGCGG
1959	CUGGGCAUUAUGCUUUUCCA	2436	AAUUCGUUCUUUCUCCAGCG
1960	CCUGGGCAUUAUGCUUUUCC	2437	GAAUUCGUUCUUUCUCCAGC
1961	CCCUGGGCAUUAUGCUUUUC	2438	UGAAUUCGUUCUUUCUCCAG
1962	CCCCUGGGCAUUAUGCUUUU	2439	CUGAAUUCGUUCUUUCUCCA
1963	GCCCCUGGGCAUUAUGCUUU	2440	UCUGAAUUCGUUCUUUCUCC
1964	UGCCCCUGGGCAUUAUGCUU	2441	UUCUGAAUUCGUUCUUUCUC
1965	CUGCCCCUGGGCAUUAUGCU	2442	AUUCUGAAUUCGUUCUUUCU
1966	CCUGCCCCUGGGCAUUAUGC	2443	CAUUCUGAAUUCGUUCUUUC
1967	CCCUGCCCCUGGGCAUUAUG	2444	GCAUUCUGAAUUCGUUCUUU
1968	ACCCUGCCCCUGGGCAUUAU	2445	UGCAUUCUGAAUUCGUUCUU
1969	UACCCUGCCCCUGGGCAUUA	2446	CUGCAUUCUGAAUUCGUUCU
1970	UUACCCUGCCCCUGGGCAUU	2447	CCUGCAUUCUGAAUUCGUUC

[0211]

1971	AUUACCCUGCCCCUGGGCAU	2448	ACCUGCAUUCUGAAUUCGUU
1972	CAUUACCCUGCCCCUGGGCA	2449	CACCUGCAUUCUGAAUUCGU
1973	CCAUUACCCUGCCCCUGGGC	2450	CCACCUGCAUUCUGAAUUCG
1974	CCCAUUACCCUGCCCCUGGG	2451	GCCACCUGCAUUCUGAAUUC
1975	ACCCAUUACCCUGCCCCUGG	2452	AGCCACCUGCAUUCUGAAUU
1976	AACCCAUUACCCUGCCCCUG	2453	GAGCCACCUGCAUUCUGAAU
1977	CAACCCAUUACCCUGCCCCU	2454	AGAGCCACCUGCAUUCUGAA
1978	GCAACCCAUUACCCUGCCCC	2455	CAGAGCCACCUGCAUUCUGA
1979	CGCAACCCAUUACCCUGCCC	2456	ACAGAGCCACCUGCAUUCUG
1980	UCGCAACCCAUUACCCUGCC	2457	UACAGAGCCACCUGCAUUCU
1981	AUCGCAACCCAUUACCCUGC	2458	UUACAGAGCCACCUGCAUUC
1982	UAUCGCAACCCAUUACCCUG	2459	AUUACAGAGCCACCUGCAUU
1983	AUAUCGCAACCCAUUACCCU	2460	CAUUACAGAGCCACCUGCAU
1984	CAUAUCGCAACCCAUUACCC	2461	UCAUUACAGAGCCACCUGCA
1985	CCAUAUCGCAACCCAUUACC	2462	AUCAUUACAGAGCCACCUGC
1986	CCCAUAUCGCAACCCAUUAC	2463	AAUCAUUACAGAGCCACCUG
1987	GCCCAUAUCGCAACCCAUUA	2464	GAAUCAUUACAGAGCCACCU
1988	AGCCCAUAUCGCAACCCAUU	2465	UGAAUCAUUACAGAGCCACC
1989	UAGCCCAUAUCGCAACCCAU	2466	CUGAAUCAUUACAGAGCCAC
1990	UUAGCCCAUAUCGCAACCCA	2467	GCUGAAUCAUUACAGAGCCA
1991	CUUAGCCCAUAUCGCAACCC	2468	CGCUGAAUCAUUACAGAGCC
1992	GCUUAGCCCAUAUCGCAACC	2469	ACGCUGAAUCAUUACAGAGC
1993	UGCUUAGCCCAUAUCGCAAC	2470	CACGCUGAAUCAUUACAGAG
1994	CUGCUUAGCCCAUAUCGCAA	2471	ACACGCUGAAUCAUUACAGA
1995	GCUGCUUAGCCCAUAUCGCA	2472	CACACGCUGAAUCAUUACAG
1996	UGCUGCUUAGCCCAUAUCGC	2473	UCACACGCUGAAUCAUUACA
1997	AUGCUGCUUAGCCCAUAUCG	2474	UUCACACGCUGAAUCAUUAC
1998	CAUGCUGCUUAGCCCAUAUC	2475	AUUCACACGCUGAAUCAUUA
1999	GCAUGCUGCUUAGCCCAUAU	2476	CAUUCACACGCUGAAUCAUU
2000	UGCAUGCUGCUUAGCCCAUA	2477	CCAUUCACACGCUGAAUCAU
2001	UUGCAUGCUGCUUAGCCCAU	2478	GCCAUUCACACGCUGAAUCA
2002	CUUGCAUGCUGCUUAGCCCA	2479	AGCCAUUCACACGCUGAAUC
2003	CCUUGCAUGCUGCUUAGCCC	2480	GAGCCAUUCACACGCUGAAU
2004	GCCUUGCAUGCUGCUUAGCC	2481	AGAGCCAUUCACACGCUGAA
2005	AGCCUUGCAUGCUGCUUAGC	2482	GAGAGCCAUUCACACGCUGA
2006	CAGCCUUGCAUGCUGCUUAG	2483	AGAGAGCCAUUCACACGCUG
2007	CCAGCCUUGCAUGCUGCUUA	2484	CAGAGAGCCAUUCACACGCU
2008	GCCAGCCUUGCAUGCUGCUU	2485	CCAGAGAGCCAUUCACACGC
2009	CGCCAGCCUUGCAUGCUGCU	2486	GCCAGAGAGCCAUUCACACG
2010	ACGCCAGCCUUGCAUGCUGC	2487	AGCCAGAGAGCCAUUCACAC
2011	CACGCCAGCCUUGCAUGCUG	2488	CAGCCAGAGAGCCAUUCACA
2012	ACACGCCAGCCUUGCAUGCU	2489	ACAGCCAGAGAGCCAUUCAC
2013	AACACGCCAGCCUUGCAUGC	2490	UACAGCCAGAGAGCCAUUCA
2014	CAACACGCCAGCCUUGCAUG	2491	AUACAGCCAGAGAGCCAUUC
2015	UCAACACGCCAGCCUUGCAU	2492	GAUACAGCCAGAGAGCCAUU
2016	UUCAACACGCCAGCCUUGCA	2493	CGAUACAGCCAGAGAGCCAU

[0212]

2017	UUUCAACACGCCAGCCUUGC	2494	UCGAUACAGCCAGAGAGCCA
2018	AUUUCAACACGCCAGCCUUG	2495	CUCGAUACAGCCAGAGAGCC
2019	CAUUUCAACACGCCAGCCUU	2496	CCUCGAUACAGCCAGAGAGC
2020	CCAUUUCAACACGCCAGCCU	2497	CCCUCGAUACAGCCAGAGAG
2021	UCCAUUUCAACACGCCAGCC	2498	GCCCUCGAUACAGCCAGAGA
2022	CUCCAUUUCAACACGCCAGC	2499	GGCCCUCGAUACAGCCAGAG
2023	CCUCCAUUUCAACACGCCAG	2500	GGGCCCUCGAUACAGCCAGA
2024	UCCUCCAUUUCAACACGCCA	2501	AGGGCCCUCGAUACAGCCAG
2025	AUCCUCCAUUUCAACACGCC	2502	AAGGGCCCUCGAUACAGCCA
2026	CAUCCUCCAUUUCAACACGC	2503	CAAGGGCCCUCGAUACAGCC
2027	GCAUCCUCCAUUUCAACACG	2504	CCAAGGGCCCUCGAUACAGC
2028	UGCAUCCUCCAUUUCAACAC	2505	CCCAAGGGCCCUCGAUACAG
2029	GUGCAUCCUCCAUUUCAACA	2506	CCCCAAGGGCCCUCGAUACA
2030	UGUGCAUCCUCCAUUUCAAC	2507	UCCCCAAGGGCCCUCGAUAC
2031	AUGUGCAUCCUCCAUUUCAA	2508	AUCCCCAAGGGCCCUCGAUA
2032	UAUGUGCAUCCUCCAUUUCA	2509	AAUCCCCAAGGGCCCUCGAU
2033	GUAUGUGCAUCCUCCAUUUC	2510	AAAUCCCCAAGGGCCCUCGA
2034	CGUAUGUGCAUCCUCCAUUU	2511	AAAAUCCCCAAGGGCCCUCG
2035	CCGUAUGUGCAUCCUCCAUU	2512	CAAAAUCCCCAAGGGCCCUC
2036	GCCGUAUGUGCAUCCUCCAU	2513	UCAAAAUCCCCAAGGGCCCU
2037	AGCCGUAUGUGCAUCCUCCA	2514	AUCAAAAUCCCCAAGGGCCC
2038	CAGCCGUAUGUGCAUCCUCC	2515	AAUCAAAAUCCCCAAGGGCC
2039	ACAGCCGUAUGUGCAUCCUC	2516	UAAUCAAAAUCCCCAAGGGC
2040	CACAGCCGUAUGUGCAUCCU	2517	GUAAUCAAAAUCCCCAAGGG
2041	UCACAGCCGUAUGUGCAUCC	2518	UGUAAUCAAAAUCCCCAAGG
2042	AUCACAGCCGUAUGUGCAUC	2519	UUGUAAUCAAAAUCCCCAAG
2043	GAUCACAGCCGUAUGUGCAU	2520	UUUGUAAUCAAAAUCCCCAA
2044	CGAUCACAGCCGUAUGUGCA	2521	AUUUGUAAUCAAAAUCCCCA
2045	CCGAUCACAGCCGUAUGUGC	2522	CAUUUGUAAUCAAAAUCCCC
2046	ACCGAUCACAGCCGUAUGUG	2523	ACAUUUGUAAUCAAAAUCCC
2047	AACCGAUCACAGCCGUAUGU	2524	CACAUUUGUAAUCAAAAUCC
2048	AAACCGAUCACAGCCGUAUG	2525	ACACAUUUGUAAUCAAAAUC
2049	CAAACCGAUCACAGCCGUAU	2526	GACACAUUUGUAAUCAAAAU
2050	GCAAACCGAUCACAGCCGUA	2527	GGACACAUUUGUAAUCAAAA
2051	GGCAAACCGAUCACAGCCGU	2528	UGGACACAUUUGUAAUCAAA
2052	UGGCAAACCGAUCACAGCCG	2529	AUGGACACAUUUGUAAUCAA
2053	UUGGCAAACCGAUCACAGCC	2530	CAUGGACACAUUUGUAAUCA
2054	CUUGGCAAACCGAUCACAGC	2531	CCAUGGACACAUUUGUAAUC
2055	ACUUGGCAAACCGAUCACAG	2532	UCCAUGGACACAUUUGUAAU
2056	CACUUGGCAAACCGAUCACA	2533	UUCCAUGGACACAUUUGUAA
2057	CCACUUGGCAAACCGAUCAC	2534	UUUCCAUGGACACAUUUGUA
2058	UCCACUUGGCAAACCGAUCA	2535	UUUUCCAUGGACACAUUUGU
2059	GUCCACUUGGCAAACCGAUC	2536	CUUUUCCAUGGACACAUUUG
2060	AGUCCACUUGGCAAACCGAU	2537	CCUUUUCCAUGGACACAUUU
2061	AAGUCCACUUGGCAAACCGA	2538	ACCUUUUCCAUGGACACAUU
2062	CAAGUCCACUUGGCAAACCG	2539	GACCUUUUCCAUGGACACAU

[0213]

2063	UCAAGUCCACUUGGCAAACC	2540	GGACCUUUUCCAUGGACACA
2064	UUCAAGUCCACUUGGCAAAC	2541	AGGACCUUUUCCAUGGACAC
2065	AUUCAAGUCCACUUGGCAAA	2542	UAGGACCUUUUCCAUGGACA
2066	GAUUCAAGUCCACUUGGCAA	2543	GUAGGACCUUUUCCAUGGAC
2067	CGAUUCAAGUCCACUUGGCA	2544	AGUAGGACCUUUUCCAUGGA
2068	ACGAUUCAAGUCCACUUGGC	2545	CAGUAGGACCUUUUCCAUGG
2069	CACGAUUCAAGUCCACUUGG	2546	UCAGUAGGACCUUUUCCAUG
2070	CCACGAUUCAAGUCCACUUG	2547	CUCAGUAGGACCUUUUCCAU
2071	ACCACGAUUCAAGUCCACUU	2548	GCUCAGUAGGACCUUUUCCA
2072	GACCACGAUUCAAGUCCACU	2549	UGCUCAGUAGGACCUUUUCC
2073	UGACCACGAUUCAAGUCCAC	2550	CUGCUCAGUAGGACCUUUUC
2074	AUGACCACGAUUCAAGUCCA	2551	GCUGCUCAGUAGGACCUUUU
2075	AAUGACCACGAUUCAAGUCC	2552	AGCUGCUCAGUAGGACCUUU
2076	GAAUGACCACGAUUCAAGUC	2553	AAGCUGCUCAGUAGGACCUU
2077	AGAAUGACCACGAUUCAAGU	2554	CAAGCUGCUCAGUAGGACCU
2078	AAGAAUGACCACGAUUCAAG	2555	ACAAGCUGCUCAGUAGGACC
2079	AAAGAAUGACCACGAUUCAA	2556	GACAAGCUGCUCAGUAGGAC
2080	CAAAGAAUGACCACGAUUCA	2557	AGACAAGCUGCUCAGUAGGA
2081	GCAAAGAAUGACCACGAUUC	2558	GAGACAAGCUGCUCAGUAGG
2082	AGCAAAGAAUGACCACGAUU	2559	UGAGACAAGCUGCUCAGUAG
2083	CAGCAAAGAAUGACCACGAU	2560	GUGAGACAAGCUGCUCAGUA
2084	ACAGCAAAGAAUGACCACGA	2561	GGUGAGACAAGCUGCUCAGU
2085	CACAGCAAAGAAUGACCACG	2562	UGGUGAGACAAGCUGCUCAG
2086	ACACAGCAAAGAAUGACCAC	2563	CUGGUGAGACAAGCUGCUCA
2087	UACACAGCAAAGAAUGACCA	2564	UCUGGUGAGACAAGCUGCUC
2088	AUACACAGCAAAGAAUGACC	2565	CUCUGGUGAGACAAGCUGCU
2089	CAUACACAGCAAAGAAUGAC	2566	GCUCUGGUGAGACAAGCUGC
2090	UCAUACACAGCAAAGAAUGA	2567	GGCUCUGGUGAGACAAGCUG
2091	AUCAUACACAGCAAAGAAUG	2568	AGGCUCUGGUGAGACAAGCU
2092	CAUCAUACACAGCAAAGAAU	2569	CAGGCUCUGGUGAGACAAGC
2093	CCAUCAUACACAGCAAAGAA	2570	UCAGGCUCUGGUGAGACAAG
2094	CCCAUCAUACACAGCAAAGA	2571	UUCAGGCUCUGGUGAGACAA
2095	GCCCAUCAUACACAGCAAAG	2572	CUUCAGGCUCUGGUGAGACA
2096	UGCCCAUCAUACACAGCAAA	2573	ACUUCAGGCUCUGGUGAGAC
2097	AUGCCCAUCAUACACAGCAA	2574	GACUUCAGGCUCUGGUGAGA
2098	CAUGCCCAUCAUACACAGCA	2575	GGACUUCAGGCUCUGGUGAG
2099	GCAUGCCCAUCAUACACAGC	2576	UGGACUUCAGGCUCUGGUGA
2100	AGCAUGCCCAUCAUACACAG	2577	AUGGACUUCAGGCUCUGGUG
2101	CAGCAUGCCCAUCAUACACA	2578	CAUGGACUUCAGGCUCUGGU
2102	CCAGCAUGCCCAUCAUACAC	2579	UCAUGGACUUCAGGCUCUGG
2103	ACCAGCAUGCCCAUCAUACA	2580	AUCAUGGACUUCAGGCUCUG
2104	AACCAGCAUGCCCAUCAUAC	2581	UAUCAUGGACUUCAGGCUCU
2105	GAACCAGCAUGCCCAUCAUA	2582	AUAUCAUGGACUUCAGGCUC
2106	AGAACCAGCAUGCCCAUCAU	2583	AAUAUCAUGGACUUCAGGCU
2107	GAGAACCAGCAUGCCCAUCA	2584	CAAUAUCAUGGACUUCAGGC
2108	UGAGAACCAGCAUGCCCAUC	2585	UCAAUAUCAUGGACUUCAGG

[0214]

2109	CUGAGAACCAGCAUGCCCAU	2586	UUCAAUAUCAUGGACUUCAG
2110	CCUGAGAACCAGCAUGCCCA	2587	UUUCAAUAUCAUGGACUUCA
2111	ACCUGAGAACCAGCAUGCCC	2588	CUUUCAAUAUCAUGGACUUC
2112	AACCUGAGAACCAGCAUGCC	2589	UCUUUCAAUAUCAUGGACUU
2113	CAACCUGAGAACCAGCAUGC	2590	AUCUUUCAAUAUCAUGGACU
2114	GCAACCUGAGAACCAGCAUG	2591	GAUCUUUCAAUAUCAUGGAC
2115	GGCAACCUGAGAACCAGCAU	2592	AGAUCUUUCAAUAUCAUGGA
2116	UGGCAACCUGAGAACCAGCA	2593	CAGAUCUUUCAAUAUCAUGG
2117	UUGGCAACCUGAGAACCAGC	2594	UCAGAUCUUUCAAUAUCAUG
2118	UUUGGCAACCUGAGAACCAG	2595	UUCAGAUCUUUCAAUAUCAU
2119	AUUUGGCAACCUGAGAACCA	2596	CUUCAGAUCUUUCAAUAUCA
2120	UAUUUGGCAACCUGAGAACC	2597	UCUUCAGAUCUUUCAAUAUC
2121	GUAUUUGGCAACCUGAGAAC	2598	UUCUUCAGAUCUUUCAAUAU
2122	AGUAUUUGGCAACCUGAGAA	2599	CUUCUUCAGAUCUUUCAAUA
2123	CAGUAUUUGGCAACCUGAGA	2600	UCUUCUUCAGAUCUUUCAAU
2124	GCAGUAUUUGGCAACCUGAG	2601	AUCUUCUUCAGAUCUUUCAA
2125	AGCAGUAUUUGGCAACCUGA	2602	CAUCUUCUUCAGAUCUUUCA
2126	CAGCAGUAUUUGGCAACCUG	2603	UCAUCUUCUUCAGAUCUUUC
2127	ACAGCAGUAUUUGGCAACCU	2604	AUCAUCUUCUUCAGAUCUUU
2128	CACAGCAGUAUUUGGCAACC	2605	GAUCAUCUUCUUCAGAUCUU
2129	UCACAGCAGUAUUUGGCAAC	2606	UGAUCAUCUUCUUCAGAUCU
2130	CUCACAGCAGUAUUUGGCAA	2607	CUGAUCAUCUUCUUCAGAUC
2131	GCUCACAGCAGUAUUUGGCA	2608	ACUGAUCAUCUUCUUCAGAU
2132	UGCUCACAGCAGUAUUUGGC	2609	AACUGAUCAUCUUCUUCAGA
2133	AUGCUCACAGCAGUAUUUGG	2610	GAACUGAUCAUCUUCUUCAG
2134	AAUGCUCACAGCAGUAUUUG	2611	UGAACUGAUCAUCUUCUUCA
2135	AAAUGCUCACAGCAGUAUUU	2612	AUGAACUGAUCAUCUUCUUC
2136	CAAAUGCUCACAGCAGUAUU	2613	AAUGAACUGAUCAUCUUCUU
2137	ACAAAUGCUCACAGCAGUAU	2614	UAAUGAACUGAUCAUCUUCU
2138	AACAAAUGCUCACAGCAGUA	2615	AUAAUGAACUGAUCAUCUUC
2139	UAACAAAUGCUCACAGCAGU	2616	GAUAAUGAACUGAUCAUCUU
2140	CUAACAAAUGCUCACAGCAG	2617	GGAUAAUGAACUGAUCAUCU
2141	UCUAACAAAUGCUCACAGCA	2618	AGGAUAAUGAACUGAUCAUC
2142	AUCUAACAAAUGCUCACAGC	2619	AAGGAUAAUGAACUGAUCAU
2143	GAUCUAACAAAUGCUCACAG	2620	CAAGGAUAAUGAACUGAUCA
2144	UGAUCUAACAAAUGCUCACA	2621	GCAAGGAUAAUGAACUGAUC
2145	GUGAUCUAACAAAUGCUCAC	2622	UGCAAGGAUAAUGAACUGAU
2146	UGUGAUCUAACAAAUGCUCA	2623	AUGCAAGGAUAAUGAACUGA
2147	AUGUGAUCUAACAAAUGCUC	2624	CAUGCAAGGAUAAUGAACUG
2148	GAUGUGAUCUAACAAAUGCU	2625	ACAUGCAAGGAUAAUGAACU
2149	UGAUGUGAUCUAACAAAUGC	2626	CACAUGCAAGGAUAAUGAAC
2150	GUGAUGUGAUCUAACAAAUG	2627	UCACAUGCAAGGAUAAUGAA
2151	GGUGAUGUGAUCUAACAAAU	2628	AUCACAUGCAAGGAUAAUGA
2152	UGGUGAUGUGAUCUAACAAA	2629	CAUCACAUGCAAGGAUAAUG
2153	UUGGUGAUGUGAUCUAACAA	2630	CCAUCACAUGCAAGGAUAAU
2154	AUUGGUGAUGUGAUCUAACA	2631	ACCAUCACAUGCAAGGAUAA

[0215]

2155	UAUUGGUGAUGUGAUCUAAC	2632	UACCAUCACAUGCAAGGAUA
2156	UUAUUGGUGAUGUGAUCUAA	2633	AUACCAUCACAUGCAAGGAU
2157	GUUAUUGGUGAUGUGAUCUA	2634	GAUACCAUCACAUGCAAGGA
2158	GGUUAUUGGUGAUGUGAUCU	2635	AGAUACCAUCACAUGCAAGG
2159	UGGUUAUUGGUGAUGUGAUC	2636	CAGAUACCAUCACAUGCAAG
2160	CUGGUUAUUGGUGAUGUGAU	2637	CCAGAUACCAUCACAUGCAA
2161	CCUGGUUAUUGGUGAUGUGA	2638	CCCAGAUACCAUCACAUGCA
2162	UCCUGGUUAUUGGUGAUGUG	2639	UCCCAGAUACCAUCACAUGC
2163	AUCCUGGUUAUUGGUGAUGU	2640	AUCCCAGAUACCAUCACAUG
2164	AAUCCUGGUUAUUGGUGAUG	2641	CAUCCCAGAUACCAUCACAU
2165	AAAUCCUGGUUAUUGGUGAU	2642	ACAUCCCAGAUACCAUCACA
2166	AAAAUCCUGGUUAUUGGUGA	2643	AACAUCCCAGAUACCAUCAC
2167	UAAAAUCCUGGUUAUUGGUG	2644	UAACAUCCCAGAUACCAUCA
2168	UUAAAAUCCUGGUUAUUGGU	2645	AUAACAUCCCAGAUACCAUC
2169	UUUAAAAUCCUGGUUAUUGG	2646	CAUAACAUCCCAGAUACCAU
2170	CUUUAAAAUCCUGGUUAUUG	2647	CCAUAACAUCCCAGAUACCA
2171	CCUUUAAAAUCCUGGUUAUU	2648	CCCAUAACAUCCCAGAUACC
2172	CCCUUUAAAAUCCUGGUUAU	2649	UCCCAUAACAUCCCAGAUAC
2173	ACCCUUUAAAAUCCUGGUUA	2650	UUCCCAUAACAUCCCAGAUA
2174	GACCCUUUAAAAUCCUGGUU	2651	UUUCCCAUAACAUCCCAGAU
2175	AGACCCUUUAAAAUCCUGGU	2652	AUUUCCCAUAACAUCCCAGA
2176	CAGACCCUUUAAAAUCCUGG	2653	CAUUUCCCAUAACAUCCCAG
2177	GCAGACCCUUUAAAAUCCUG	2654	UCAUUUCCCAUAACAUCCCA
2178	UGCAGACCCUUUAAAAUCCU	2655	UUCAUUUCCCAUAACAUCCC
2179	CUGCAGACCCUUUAAAAUCC	2656	CUUCAUUUCCCAUAACAUCC
2180	CCUGCAGACCCUUUAAAAUC	2657	UCUUCAUUUCCCAUAACAUC
2181	UCCUGCAGACCCUUUAAAAU	2658	CUCUUCAUUUCCCAUAACAU
2182	CUCCUGCAGACCCUUUAAAA	2659	GCUCUUCAUUUCCCAUAACA
2183	GCUCCUGCAGACCCUUUAAA	2660	AGCUCUUCAUUUCCCAUAAC
2184	UGCUCCUGCAGACCCUUUAA	2661	GAGCUCUUCAUUUCCCAUAA
2185	GUGCUCCUGCAGACCCUUUA	2662	AGAGCUCUUCAUUUCCCAUA
2186	GGUGCUCCUGCAGACCCUUU	2663	CAGAGCUCUUCAUUUCCCAU
2187	AGGUGCUCCUGCAGACCCUU	2664	ACAGAGCUCUUCAUUUCCCA
2188	AAGGUGCUCCUGCAGACCCU	2665	CACAGAGCUCUUCAUUUCCC
2189	GAAGGUGCUCCUGCAGACCC	2666	UCACAGAGCUCUUCAUUUCC
2190	AGAAGGUGCUCCUGCAGACC	2667	AUCACAGAGCUCUUCAUUUC
2191	CAGAAGGUGCUCCUGCAGAC	2668	AAUCACAGAGCUCUUCAUUU
2192	ACAGAAGGUGCUCCUGCAGA	2669	AAAUCACAGAGCUCUUCAUU
2193	CACAGAAGGUGCUCCUGCAG	2670	AAAAUCACAGAGCUCUUCAU
2194	CCACAGAAGGUGCUCCUGCA	2671	CAAAAUCACAGAGCUCUUCA
2195	UCCACAGAAGGUGCUCCUGC	2672	ACAAAAUCACAGAGCUCUUC
2196	UUCCACAGAAGGUGCUCCUG	2673	UACAAAAUCACAGAGCUCUU
2197	UUUCCACAGAAGGUGCUCCU	2674	UUACAAAAUCACAGAGCUCU
2198	UUUUCCACAGAAGGUGCUCC	2675	CUUACAAAAUCACAGAGCUC
2199	AUUUUCCACAGAAGGUGCUC	2676	UCUUACAAAAUCACAGAGCU
2200	CAUUUUCCACAGAAGGUGCU	2677	AUCUUACAAAAUCACAGAGC

[0216]

2201	ACAUUUUCCACAGAAGGUGC	2678	GAUCUUACAAAAUCACAGAG
2202	UACAUUUUCCACAGAAGGUG	2679	GGAUCUUACAAAAUCACAGA
2203	UUACAUUUUCCACAGAAGGU	2680	UGGAUCUUACAAAAUCACAG
2204	UUUACAUUUUCCACAGAAGG	2681	CUGGAUCUUACAAAAUCACA
2205	CUUUACAUUUUCCACAGAAG	2682	UCUGGAUCUUACAAAAUCAC
2206	UCUUUACAUUUUCCACAGAA	2683	GUCUGGAUCUUACAAAAUCA
2207	UUCUUUACAUUUUCCACAGA	2684	AGUCUGGAUCUUACAAAAUC
2208	AUUCUUUACAUUUUCCACAG	2685	AAGUCUGGAUCUUACAAAAU
2209	CAUUCUUUACAUUUUCCACA	2686	CAAGUCUGGAUCUUACAAAA
2210	CCAUUCUUUACAUUUUCCAC	2687	UCAAGUCUGGAUCUUACAAA
2211	UCCAUUCUUUACAUUUUCCA	2688	UUCAAGUCUGGAUCUUACAA
2212	UUCCAUUCUUUACAUUUUCC	2689	CUUCAAGUCUGGAUCUUACA
2213	AUUCCAUUCUUUACAUUUUC	2690	ACUUCAAGUCUGGAUCUUAC
2214	GAUUCCAUUCUUUACAUUUU	2691	GACUUCAAGUCUGGAUCUUA
2215	UGAUUCCAUUCUUUACAUUU	2692	UGACUUCAAGUCUGGAUCUU
2216	CUGAUUCCAUUCUUUACAUU	2693	GUGACUUCAAGUCUGGAUCU
2217	UCUGAUUCCAUUCUUUACAU	2694	AGUGACUUCAAGUCUGGAUC
2218	UUCUGAUUCCAUUCUUUACA	2695	CAGUGACUUCAAGUCUGGAU
2219	GUUCUGAUUCCAUUCUUUAC	2696	UCAGUGACUUCAAGUCUGGA
2220	UGUUCUGAUUCCAUUCUUUA	2697	AUCAGUGACUUCAAGUCUGG
2221	CUGUUCUGAUUCCAUUCUUU	2698	CAUCAGUGACUUCAAGUCUG
2222	CCUGUUCUGAUUCCAUUCUU	2699	UCAUCAGUGACUUCAAGUCU
2223	ACCUGUUCUGAUUCCAUUCU	2700	GUCAUCAGUGACUUCAAGUC
2224	AACCUGUUCUGAUUCCAUUC	2701	GGUCAUCAGUGACUUCAAGU
2225	AAACCUGUUCUGAUUCCAUU	2702	AGGUCAUCAGUGACUUCAAG
2226	AAAACCUGUUCUGAUUCCAU	2703	AAGGUCAUCAGUGACUUCAA
2227	GAAAACCUGUUCUGAUUCCA	2704	CAAGGUCAUCAGUGACUUCA
2228	AGAAAACCUGUUCUGAUUCC	2705	UCAAGGUCAUCAGUGACUUC
2229	CAGAAAACCUGUUCUGAUUC	2706	CUCAAGGUCAUCAGUGACUU
2230	CCAGAAAACCUGUUCUGAUU	2707	UCUCAAGGUCAUCAGUGACU
2231	UCCAGAAAACCUGUUCUGAU	2708	UUCUCAAGGUCAUCAGUGAC
2232	CUCCAGAAAACCUGUUCUGA	2709	UUUCUCAAGGUCAUCAGUGA
2233	UCUCCAGAAAACCUGUUCUG	2710	CUUUCUCAAGGUCAUCAGUG
2234	AUCUCCAGAAAACCUGUUCU	2711	ACUUUCUCAAGGUCAUCAGU
2235	AAUCUCCAGAAAACCUGUUC	2712	AACUUUCUCAAGGUCAUCAG
2236	CAAUCUCCAGAAAACCUGUU	2713	AAACUUUCUCAAGGUCAUCA
2237	UCAAUCUCCAGAAAACCUGU	2714	CAAACUUUCUCAAGGUCAUC
2238	AUCAAUCUCCAGAAAACCUG	2715	GCAAACUUUCUCAAGGUCAU
2239	CAUCAAUCUCCAGAAAACCU	2716	UGCAAACUUUCUCAAGGUCA
2240	UCAUCAAUCUCCAGAAAACC	2717	UUGCAAACUUUCUCAAGGUC
2241	UUCAUCAAUCUCCAGAAAAC	2718	AUUGCAAACUUUCUCAAGGU
2242	GUUCAUCAAUCUCCAGAAAA	2719	CAUUGCAAACUUUCUCAAGG
2243	UGUUCAUCAAUCUCCAGAAA	2720	UCAUUGCAAACUUUCUCAAG
2244	GUGUUCAUCAAUCUCCAGAA	2721	UUCAUUGCAAACUUUCUCAA
2245	UGUGUUCAUCAAUCUCCAGA	2722	CUUCAUUGCAAACUUUCUCA
2246	AUGUGUUCAUCAAUCUCCAG	2723	ACUUCAUUGCAAACUUUCUC

[0217]

2247	CAUGUGUUCAUCAAUCUCCA	2724	UACUUCAUUGCAAACUUUCU
2248	UCAUGUGUUCAUCAAUCUCC	2725	CUACUUCAUUGCAAACUUUC
2249	CUCAUGUGUUCAUCAAUCUC	2726	ACUACUUCAUUGCAAACUUU
2250	UCUCAUGUGUUCAUCAAUCU	2727	GACUACUUCAUUGCAAACUU
2251	CUCUCAUGUGUUCAUCAAUC	2728	CGACUACUUCAUUGCAAACU
2252	ACUCUCAUGUGUUCAUCAAU	2729	UCGACUACUUCAUUGCAAAC
2253	AACUCUCAUGUGUUCAUCAA	2730	GUCGACUACUUCAUUGCAAA
2254	UAACUCUCAUGUGUUCAUCA	2731	UGUCGACUACUUCAUUGCAA
2255	AUAACUCUCAUGUGUUCAUC	2732	GUGUCGACUACUUCAUUGCA
2256	CAUAACUCUCAUGUGUUCAU	2733	GGUGUCGACUACUUCAUUGC
2257	ACAUAACUCUCAUGUGUUCA	2734	AGGUGUCGACUACUUCAUUG
2258	GACAUAACUCUCAUGUGUUC	2735	CAGGUGUCGACUACUUCAUU
2259	UGACAUAACUCUCAUGUGUU	2736	ACAGGUGUCGACUACUUCAU
2260	CUGACAUAACUCUCAUGUGU	2737	AACAGGUGUCGACUACUUCA
2261	UCUGACAUAACUCUCAUGUG	2738	AAACAGGUGUCGACUACUUC
2262	CUCUGACAUAACUCUCAUGU	2739	CAAACAGGUGUCGACUACUU
2263	UCUCUGACAUAACUCUCAUG	2740	ACAAACAGGUGUCGACUACU
2264	UUCUCUGACAUAACUCUCAU	2741	UACAAACAGGUGUCGACUAC
2265	CUUCUCUGACAUAACUCUCA	2742	AUACAAACAGGUGUCGACUA
2266	UCUUCUCUGACAUAACUCUC	2743	UAUACAAACAGGUGUCGACU
2267	UUCUUCUCUGACAUAACUCU	2744	UUAUACAAACAGGUGUCGAC
2268	UUUCUUCUCUGACAUAACUC	2745	CUUAUACAAACAGGUGUCGA
2269	GUUUCUUCUCUGACAUAACU	2746	CCUUAUACAAACAGGUGUCG
2270	UGUUUCUUCUCUGACAUAAC	2747	CCCUUAUACAAACAGGUGUC
2271	AUGUUUCUUCUCUGACAUAA	2748	UCCCUUAUACAAACAGGUGU
2272	CAUGUUUCUUCUCUGACAUA	2749	UUCCCUUAUACAAACAGGUG
2273	CCAUGUUUCUUCUCUGACAU	2750	CUUCCCUUAUACAAACAGGU
2274	ACCAUGUUUCUUCUCUGACA	2751	ACUUCCCUUAUACAAACAGG
2275	CACCAUGUUUCUUCUCUGAC	2752	GACUUCCCUUAUACAAACAG
2276	GCACCAUGUUUCUUCUCUGA	2753	CGACUUCCCUUAUACAAACA
2277	UGCACCAUGUUUCUUCUCUG	2754	UCGACUUCCCUUAUACAAAC
2278	CUGCACCAUGUUUCUUCUCU	2755	CUCGACUUCCCUUAUACAAA
2279	UCUGCACCAUGUUUCUUCUC	2756	UCUCGACUUCCCUUAUACAA
2280	AUCUGCACCAUGUUUCUUCU	2757	GUCUCGACUUCCCUUAUACA
2281	UAUCUGCACCAUGUUUCUUC	2758	UGUCUCGACUUCCCUUAUAC
2282	CUAUCUGCACCAUGUUUCUU	2759	UUGUCUCGACUUCCCUUAUA
2283	UCUAUCUGCACCAUGUUUCU	2760	GUUGUCUCGACUUCCCUUAU
2284	UUCUAUCUGCACCAUGUUUC	2761	UGUUGUCUCGACUUCCCUUA
2285	CUUCUAUCUGCACCAUGUUU	2762	AUGUUGUCUCGACUUCCCUU
2286	ACUUCUAUCUGCACCAUGUU	2763	CAUGUUGUCUCGACUUCCCU
2287	CACUUCUAUCUGCACCAUGU	2764	UCAUGUUGUCUCGACUUCCC
2288	CCACUUCUAUCUGCACCAUG	2765	CUCAUGUUGUCUCGACUUCC
2289	CCCACUUCUAUCUGCACCAU	2766	ACUCAUGUUGUCUCGACUUC
2290	ACCCACUUCUAUCUGCACCA	2767	CACUCAUGUUGUCUCGACUU
2291	GACCCACUUCUAUCUGCACC	2768	ACACUCAUGUUGUCUCGACU
2292	UGACCCACUUCUAUCUGCAC	2769	CACACUCAUGUUGUCUCGAC

[0218]

2293	UUGACCCACUUCUAUCUGCA	2770	UCACACUCAUGUUGUCUCGA
2294	GUUGACCCACUUCUAUCUGC	2771	AUCACACUCAUGUUGUCUCG
2295	UGUUGACCCACUUCUAUCUG	2772	AAUCACACUCAUGUUGUCUC
2296	CUGUUGACCCACUUCUAUCU	2773	AAAUCACACUCAUGUUGUCU
2297	GCUGUUGACCCACUUCUAUC	2774	AAAAUCACACUCAUGUUGUC
2298	AGCUGUUGACCCACUUCUAU	2775	CAAAAUCACACUCAUGUUGU
2299	CAGCUGUUGACCCACUUCUA	2776	UCAAAAUCACACUCAUGUUG
2300	ACAGCUGUUGACCCACUUCU	2777	AUCAAAAUCACACUCAUGUU
2301	UACAGCUGUUGACCCACUUC	2778	GAUCAAAAUCACACUCAUGU
2302	CUACAGCUGUUGACCCACUU	2779	AGAUCAAAAUCACACUCAUG
2303	CCUACAGCUGUUGACCCACU	2780	CAGAUCAAAAUCACACUCAU
2304	ACCUACAGCUGUUGACCCAC	2781	ACAGAUCAAAAUCACACUCA
2305	CACCUACAGCUGUUGACCCA	2782	AACAGAUCAAAAUCACACUC
2306	ACACCUACAGCUGUUGACCC	2783	AAACAGAUCAAAAUCACACU
2307	GACACCUACAGCUGUUGACC	2784	AAAACAGAUCAAAAUCACAC
2308	AGACACCUACAGCUGUUGAC	2785	GAAAACAGAUCAAAAUCACA
2309	AAGACACCUACAGCUGUUGA	2786	GGAAAACAGAUCAAAAUCAC
2310	UAAGACACCUACAGCUGUUG	2787	UGGAAAACAGAUCAAAAUCA
2311	UUAAGACACCUACAGCUGUU	2788	UUGGAAAACAGAUCAAAAUC
2312	AUUAAGACACCUACAGCUGU	2789	UUUGGAAAACAGAUCAAAAU
2313	AAUUAAGACACCUACAGCUG	2790	AUUUGGAAAACAGAUCAAAA
2314	AAAUUAAGACACCUACAGCU	2791	CAUUUGGAAAACAGAUCAAA
2315	GAAAUUAAGACACCUACAGC	2792	GCAUUUGGAAAACAGAUCAA
2316	AGAAAUUAAGACACCUACAG	2793	UGCAUUUGGAAAACAGAUCA
2317	GAGAAAUUAAGACACCUACA	2794	GUGCAUUUGGAAAACAGAUC
2318	GGAGAAAUUAAGACACCUAC	2795	GGUGCAUUUGGAAAACAGAU
2319	GGGAGAAAUUAAGACACCUA	2796	GGGUGCAUUUGGAAAACAGA
2320	GGGGAGAAAUUAAGACACCU	2797	UGGGUGCAUUUGGAAAACAG
2321	UGGGGAGAAAUUAAGACACC	2798	UUGGGUGCAUUUGGAAAACA
2322	UUGGGGAGAAAUUAAGACAC	2799	UUUGGGUGCAUUUGGAAAAC
2323	GUUGGGGAGAAAUUAAGACA	2800	CUUUGGGUGCAUUUGGAAAA
2324	UGUUGGGGAGAAAUUAAGAC	2801	ACUUUGGGUGCAUUUGGAAA
2325	AUGUUGGGGAGAAAUUAAGA	2802	UACUUUGGGUGCAUUUGGAA
2326	UAUGUUGGGGAGAAAUUAAG	2803	AUACUUUGGGUGCAUUUGGA
2327	GUAUGUUGGGGAGAAAUUAA	2804	GAUACUUUGGGUGCAUUUGG
2328	AGUAUGUUGGGGAGAAAUUA	2805	CGAUACUUUGGGUGCAUUUG
2329	AAGUAUGUUGGGGAGAAAUU	2806	GCGAUACUUUGGGUGCAUUU
2330	UAAGUAUGUUGGGGAGAAAU	2807	GGCGAUACUUUGGGUGCAUU
2331	AUAAGUAUGUUGGGGAGAAA	2808	UGGCGAUACUUUGGGUGCAU
2332	AAUAAGUAUGUUGGGGAGAA	2809	CUGGCGAUACUUUGGGUGCA
2333	AAAUAAGUAUGUUGGGGAGA	2810	UCUGGCGAUACUUUGGGUGC
2334	GAAAUAAGUAUGUUGGGGAG	2811	UUCUGGCGAUACUUUGGGUG
2335	UGAAAUAAGUAUGUUGGGGA	2812	CUUCUGGCGAUACUUUGGGU
2336	AUGAAAUAAGUAUGUUGGGG	2813	GCUUCUGGCGAUACUUUGGG
2337	AAUGAAAUAAGUAUGUUGGG	2814	UGCUUCUGGCGAUACUUUGG
2338	UAAUGAAAUAAGUAUGUUGG	2815	CUGCUUCUGGCGAUACUUUG

[0219]

2339	UUAAUGAAAUAAGUAUGUUG	2816	ACUGCUUCUGGCGAUACUUU
2340	GUUAAUGAAAUAAGUAUGUU	2817	CACUGCUUCUGGCGAUACUU
2341	AGUUAAUGAAAUAAGUAUGU	2818	UCACUGCUUCUGGCGAUACU
2342	CAGUUAAUGAAAUAAGUAUG	2819	UUCACUGCUUCUGGCGAUAC
2343	ACAGUUAAUGAAAUAAGUAU	2820	CUUCACUGCUUCUGGCGAUA
2344	CACAGUUAAUGAAAUAAGUA	2821	UCUUCACUGCUUCUGGCGAU
2345	CCACAGUUAAUGAAAUAAGU	2822	UUCUUCACUGCUUCUGGCGA
2346	UCCACAGUUAAUGAAAUAAG	2823	CUUCUUCACUGCUUCUGGCG
2347	CUCCACAGUUAAUGAAAUAA	2824	CCUUCUUCACUGCUUCUGGC
2348	UCUCCACAGUUAAUGAAAUA	2825	UCCUUCUUCACUGCUUCUGG
2349	GUCUCCACAGUUAAUGAAAU	2826	CUCCUUCUUCACUGCUUCUG
2350	AGUCUCCACAGUUAAUGAAA	2827	CCUCCUUCUUCACUGCUUCU
2351	GAGUCUCCACAGUUAAUGAA	2828	GCCUCCUUCUUCACUGCUUC
2352	UGAGUCUCCACAGUUAAUGA	2829	UGCCUCCUUCUUCACUGCUU
2353	UUGAGUCUCCACAGUUAAUG	2830	CUGCCUCCUUCUUCACUGCU
2354	CUUGAGUCUCCACAGUUAAU	2831	UCUGCCUCCUUCUUCACUGC
2355	UCUUGAGUCUCCACAGUUAA	2832	CUCUGCCUCCUUCUUCACUG
2356	CUCUUGAGUCUCCACAGUUA	2833	ACUCUGCCUCCUUCUUCACU
2357	CCUCUUGAGUCUCCACAGUU	2834	AACUCUGCCUCCUUCUUCAC
2358	ACCUCUUGAGUCUCCACAGU	2835	CAACUCUGCCUCCUUCUUCA
2359	AACCUCUUGAGUCUCCACAG	2836	CCAACUCUGCCUCCUUCUUC
2360	AAACCUCUUGAGUCUCCACA	2837	UCCAACUCUGCCUCCUUCUU
2361	UAAACCUCUUGAGUCUCCAC	2838	GUCCAACUCUGCCUCCUUCU
2362	GUAAACCUCUUGAGUCUCCA	2839	UGUCCAACUCUGCCUCCUUC
2363	AGUAAACCUCUUGAGUCUCC	2840	UUGUCCAACUCUGCCUCCUU
2364	AAGUAAACCUCUUGAGUCUC	2841	CUUGUCCAACUCUGCCUCCU
2365	AAAGUAAACCUCUUGAGUCU	2842	ACUUGUCCAACUCUGCCUCC
2366	CAAAGUAAACCUCUUGAGUC	2843	UACUUGUCCAACUCUGCCUC
2367	ACAAAGUAAACCUCUUGAGU	2844	GUACUUGUCCAACUCUGCCU
2368	UACAAAGUAAACCUCUUGAG	2845	GGUACUUGUCCAACUCUGCC
2369	CUACAAAGUAAACCUCUUGA	2846	AGGUACUUGUCCAACUCUGC
2370	CCUACAAAGUAAACCUCUUG	2847	CAGGUACUUGUCCAACUCUG
2371	UCCUACAAAGUAAACCUCUU	2848	CCAGGUACUUGUCCAACUCU
2372	UUCCUACAAAGUAAACCUCU	2849	UCCAGGUACUUGUCCAACUC
2373	GUUCCUACAAAGUAAACCUC	2850	UUCCAGGUACUUGUCCAACU
2374	UGUUCCUACAAAGUAAACCU	2851	AUUCCAGGUACUUGUCCAAC
2375	CUGUUCCUACAAAGUAAACC	2852	CAUUCCAGGUACUUGUCCAA
2376	CCUGUUCCUACAAAGUAAAC	2853	GCAUUCCAGGUACUUGUCCA
2377	UCCUGUUCCUACAAAGUAAA	2854	UGCAUUCCAGGUACUUGUCC
2378	UUCCUGUUCCUACAAAGUAA	2855	CUGCAUUCCAGGUACUUGUC
2379	UUUCCUGUUCCUACAAAGUA	2856	UCUGCAUUCCAGGUACUUGU
2380	CUUUCCUGUUCCUACAAAGU	2857	CUCUGCAUUCCAGGUACUUG
2381	ACUUUCCUGUUCCUACAAAG	2858	ACUCUGCAUUCCAGGUACUU
2382	AACUUUCCUGUUCCUACAAA	2859	UACUCUGCAUUCCAGGUACU
2383	GAACUUUCCUGUUCCUACAA	2860	CUACUCUGCAUUCCAGGUAC
2384	UGAACUUUCCUGUUCCUACA	2861	UCUACUCUGCAUUCCAGGUA

[0220]

2385	AUGAACUUUCCUGUUCCUAC	2862	UUCUACUCUGCAUUCCAGGU
2386	AAUGAACUUUCCUGUUCCUA	2863	CUUCUACUCUGCAUUCCAGG

[0221] *寡核苷酸的至少一个核苷键选自硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、亚膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如，包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3'氨基核糖或5'氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键。

[0222] 本文所述的特定PPM1A AON或其药学上可接受的盐的实例包括：

[0223] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:87的核苷酸序列(5' GCTGCTTAGCCCATATCGCA 3'(QPA-542))，或其药学上可接受的盐；

[0224] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:100的核苷酸序列(5' GCCAGCCTTGCATGCTGCTT 3'(QPA-555))，或其药学上可接受的盐；

[0225] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:104的核苷酸序列(5' ACACGCCAGCCTTGCATGCT 3'(QPA-559))，或其药学上可接受的盐；

[0226] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:144的核苷酸序列(5' TGGCAAACCGATCACAGCCG 3'(QPA-599))，或其药学上可接受的盐；

[0227] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:147的核苷酸序列(5' ACTTGGCAAACCGATCACAG 3'(QPA-602))，或其药学上可接受的盐；

[0228] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:148的核苷酸序列(5' CACTTGGCAAACCGATCACA 3'(QPA-603))，或其药学上可接受的盐；

[0229] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:149的核苷酸序列(5' CCACTTGGCAAACCGATCAC 3'(QPA-604))，或其药学上可接受的盐；

[0230] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:150的核苷酸序列(5' TCCACTTGGCAAACCGATCA 3'(QPA-605))，或其药学上可接受的盐；

[0231] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:151的核苷酸序列(5' GTCCACTTGGCAAACCGATC 3'(QPA-606))，或其药学上可接受的盐；

[0232] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:152的核苷酸序列(5' AGTCCACTTGGCAAACCGAT 3'(QPA-607))，或其药学上可接受的盐；

[0233] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:153的核苷酸序列(5' AAGTCCACTTGGCAAACCGA 3'(QPA-608))，或其药学上可接受的盐；

[0234] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:154的核苷酸序列(5' CAAGTCCACTTGGCAAACCG 3'(QPA-609))，或其药学上可接受的盐；

[0235] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:170的核苷酸序列(5' AAGAATGACCACGATTCAAG 3'(QPA-625))，或其药学上可接受的盐；

[0236] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:187的核苷酸序列(5' GCCCATCATACACAGCAAAG 3'(QPA-642))，或其药学上可接受的盐；

[0237] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:189的核苷酸序列(5' ATGCCCATCATACACAGCAA 3'(QPA-644))，或其药学上可接受的盐；

[0238] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:191的核苷酸序列(5' GCATGCCCATCATACACAGC 3'(QPA-646))，或其药学上可接受的盐；

[0239] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:193的核苷酸序列(5’ CAGCATGCCCATCATACACA 3’(QPA-648))，或其药学上可接受的盐；

[0240] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:195的核苷酸序列(5’ ACCAGCATGCCCATCATACA 3’(QPA-650))，或其药学上可接受的盐；

[0241] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:197的核苷酸序列(5’ GAACCAGCATGCCCATCATA 3’(QPA-652))，或其药学上可接受的盐；

[0242] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:200的核苷酸序列(5’ TGAGAACCAGCATGCCCATC 3’(QPA-655))，或其药学上可接受的盐；

[0243] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:201的核苷酸序列(5’ CTGAGAACCAGCATGCCCAT 3’(QPA-656))，或其药学上可接受的盐；

[0244] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:253的核苷酸序列(5’ CCTGGTTATTGGTGATGTGA 3’(QPA-708))，或其药学上可接受的盐；

[0245] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:254的核苷酸序列(5’ TCCTGGTTATTGGTGATGTG 3’(QPA-709))，或其药学上可接受的盐；

[0246] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:339的核苷酸序列(5’ CATGTGTTCATCAATCTCCA 3’(QPA-794))，或其药学上可接受的盐；

[0247] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:340的核苷酸序列(5’ TCATGTGTTCATCAATCTCC 3’(QPA-795))，或其药学上可接受的盐；

[0248] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:440的核苷酸序列(5’ TCTCCACAGTTAATGAAATA 3’(QPA-895))，或其药学上可接受的盐；

[0249] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:445的核苷酸序列(5’ TTGAGTCTCCACAGTTAATG 3’(QPA-900))，或其药学上可接受的盐；

[0250] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:450的核苷酸序列(5’ ACCTCTTGAGTCTCCACAGT 3’(QPA-905))，或其药学上可接受的盐；

[0251] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:455的核苷酸序列(5’ AGTAAACCTCTTGAGTCTCC 3’(QPA-910))，或其药学上可接受的盐；

[0252] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:460的核苷酸序列(5’ TACAAAGTAAACCTCTTGAG 3’(QPA-915))，或其药学上可接受的盐；

[0253] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:507的核苷酸序列(5’ ATTACTTGGTTTGTGATCTT 3’(QPA-962))，或其药学上可接受的盐；

[0254] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:512的核苷酸序列(5’ AGCGGATTACTTGGTTTGTG 3’(QPA-967))，或其药学上可接受的盐；

[0255] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:517的核苷酸序列(5’ TCTCCAGCGGATTACTTGGT 3’(QPA-972))，或其药学上可接受的盐；

[0256] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:522的核苷酸序列(5’ TTCTTTCTCCAGCGGATTAC 3’(QPA-977))，或其药学上可接受的盐；

[0257] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:532的核苷酸序列(5’ TCTGAATTCGTTCTTTCTCC 3’(QPA-987))，或其药学上可接受的盐；

[0258] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:570的核苷酸序列(5’

GCCATTCACACGCTGAATCA 3’(QPA-1025))，或其药学上可接受的盐；

[0259] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:575的核苷酸序列(5’AGAGAGCCATTCACACGCTG 3’(QPA-1030))，或其药学上可接受的盐；

[0260] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:579的核苷酸序列(5’AGCCAGAGAGCCATTCACAC 3’(QPA-1034)，或其药学上可接受的盐；

[0261] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:585的核苷酸序列(5’CGATACAGCCAGAGAGCCAT 3’(QPA-1040))，或其药学上可接受的盐；

[0262] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:590的核苷酸序列(5’GCCCTCGATACAGCCAGAGA 3’(QPA-1045))，或其药学上可接受的盐；

[0263] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:643的核苷酸序列(5’GCTGCTCAGTAGGACCTTTT 3’(QPA-1098))，或其药学上可接受的盐；

[0264] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:906的核苷酸序列(5’TGCTTCTGGCGATACTTTGG 3’(QPA-1361))，或其药学上可接受的盐；

[0265] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:911的核苷酸序列(5’TTCACTGCTTCTGGCGATAC 3’(QPA-1366))，或其药学上可接受的盐；

[0266] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:916的核苷酸序列(5’CCTTCTTCACTGCTTCTGGC 3’(QPA-1371))，或其药学上可接受的盐；

[0267] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:923的核苷酸序列(5’TCTGCCTCCTTCTTCACTGC 3’(QPA-1378))，或其药学上可接受的盐；和

[0268] • PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:931的核苷酸序列(5’TGTCCAACTCTGCCTCCTTC 3’(QPA-1386))，或其药学上可接受的盐。

[0269] 在各种实施方式中，PPM1A AON包含与具有至少10个连续核碱基的一部分的核碱基序列连接的核苷，其与表1或表2中所示任一AON序列(例如，SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863)的等长部分具有100％同一性。在各种实施方式中，PPM1A AON包含与具有至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分的核碱基序列连接的核苷，其与表1或表2中所示任一AON序列(例如，SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863)的等长部分具有100％同一性。

[0270] 本文还描述了与本文描述的PPM1A AON序列共享小于100％序列同一性的PPM1A AON。在各种实施方式中，PPM1AAON包含与具有至少10个连续核碱基的一部分的核碱基序列连接的核苷，其与表1或表2中所示任一AON序列(例如，SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863)的等长部分具有至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％同一性。在各种实施方式中，PPM1A AON包含与具有至少11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核碱基的一部分的核碱基序列连接的核苷，其与表1或表2中所示任一AON序列(例如，SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863)的等长部分具有100％同一性。

[0271] PPM1A间隔体AON

[0272] 在一些实施方式中，PPM1A AON具有间隔体设计或结构，在本文中也简称为“间隔体”。在间隔体结构中，PPM1A AON包含至少三个不同的结构区域，从“5→3”方向包括5’翼区、中心区域和3’翼区。

[0273] 在各种实施方式中,5’翼区包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个连接的核苷。在各种实施方式中,3’翼区包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个连接的核苷。5’和3’翼区(也称为侧翼区)包含至少一个与中心区域相邻的核苷,该中心区域包含一段连续的核苷。5’和3’翼区相对于其所包含的核苷的数量可以是对称的或不对称的。

[0274] 在各种实施方式中,5’翼区包含一个或多个RNA核苷(例如,核糖核苷)。在各种实施方式中,5’翼区包含一个或多个DNA核苷(例如,脱氧核糖核苷)。在各种实施方式中,5’翼区包含RNA核苷和DNA核苷两者。在各种实施方式中,3’翼区包含一个或多个RNA核苷。在各种实施方式中,3’翼区包含一个或多个DNA核苷。在各种实施方式中,3’翼区包含RNA核苷和DNA核苷两者。

[0275] 在各种实施方式中,中心区域包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个连续的核苷。在一些实施方式中,中心区域包含一段核苷,其能够募集和激活RNAseH。在一些实施方式中,中心区域包含一个或多个连接的DNA核苷、2’-氟代阿拉伯糖核酸(FANA)和氟代环己烯基核酸(F-CeNA)。在一些实施方式中,中心区域的所有核苷是DNA核苷。在一些实施方式中,中心区域包含一段连续的5-16个DNA核苷。在一些实施方式中,中心区域包含一段连续的6-15、7-14、8-13或9-11个DNA核苷。在各种实施方式中,中心区域包含DNA核苷和RNA核苷的混合物。

[0276] 在一些实施方式中,中心区域的所有核苷是DNA核苷。在进一步的实施方式中,中心区域可以由能够介导RNase H切割的DNA核苷和其他核苷(2’-氟代阿拉伯糖核酸(FANA)和氟代环己烯基核酸(F-CeNA))的混合物组成。在一些实施方式中,中心区域至少50%的核苷是DNA核苷,如至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%DNA核苷。

[0277] 在特定实施方式中,PPM1A AON包含5个连接的核苷的5’翼区、10个连接的核苷的中心区域和5个连接的核苷的3’区域,也称为5-10-5间隔体。在特定实施方式中,PPM1A AON包含3个连接的核苷的5’翼区、8个连接的核苷的中心区域和3个连接的核苷的3’区域,也称为3-8-3间隔体。在特定实施方式中,PPM1A AON包含3个连接的核苷的5’翼区、10个连接的核苷的中心区域和3个连接的核苷的3’区域,也称为3-10-3间隔体。在特定实施方式中,PPM1A AON包含4个连接的核苷的5’翼区、10个连接的核苷的中心区域和4个连接的核苷的3’区域,也称为4-10-4间隔体。在特定实施方式中,PPM1A AON包含4个连接的核苷的5’翼区、8个连接的核苷的中心区域和4个连接的核苷的3’区域,也称为4-8-4间隔体。

[0278] 本文中所述的实例PPM1A间隔体AON包含在下表3中鉴定的那些:

[0279] 表3:PPM1A间隔体AON。在5’末端的5个连接的核苷和在3’末端的5个连接的核苷代表翼区,并且可以包括核糖核苷和脱氧核糖核苷(包括修饰的核糖核苷和/或修饰的脱氧核糖核苷)的混合物,而在中央区域的十个连接的核苷是脱氧核糖核苷。在表3中AON序列的符号如下所示:W为鸟嘌呤、X为腺嘌呤、Y为胞嘧啶和Z为胸腺嘧啶。

[0280]

SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 2864 的初始位置	PPM1A AON 序列（5'-3'）
2868	542	WYZWYTTAGCCCATAZYWYX
2869	555	WYYXWCCTTGCATGCZWYZZ
2870	559	XYXYWCCAGCCTTGCXZWYZ
2871	599	ZWWYXAACCGATCACXWYYW
2872	602	XYZZWGCAAACCGATYXYXW
2873	603	YXYZZGGCAAACCGAZYXYX
2874	604	YYXYZTGGCAAACCGXZYXY
2875	605	ZYYXYTTGGCAAACCWXZYX
2876	606	WZYYXCTTGGCAAACYWXZY
2877	607	XWZYYACTTGGCAAAYYWXZ
2878	608	XXWZYCACTTGGCAAXYYWX
2879	609	YXXWZCCACTTGGCAXXYYW
2880	625	XXWXXTGACCACGATZYXXW
2881	642	WYYYXTCATACACAGYXXXW
2882	644	XZWYYCATCATACACXWYXX
2883	646	WYXZWCCCATCATACXYXWY
2884	648	YXWYXTGCCCATCATXYXYX
2885	650	XYYXWCATGCCCATCXZXYX
2886	652	WXXYYAGCATGCCCAZYXZX
2887	655	ZWXWXACCAGCATGCYYXZY
2888	656	YZWXWAACCAGCATGYYYXZ
2889	708	YYZWWTTATTGGTGAZWZWX
2890	709	ZYYZWGTTATTGGTGXZWZW

[0281]

2891	794	YXZWZGTTCATCAATYZYYX
2892	795	ZYXZWTGTTCATCAAZYZYY
2893	895	ZYZYYACAGTTAATGXXXZX
2894	900	ZZWXWTCTCCACAGTZXXZW
2895	905	XYYZYTTGAGTCTCCXYXWZ
2896	910	XWZXXACCTCTTGAGZYZYY
2897	915	ZXYXXAGTAAACCTCZZWXW
2898	962	XZZXYTTGGTTTGTGXZYZZ
2899	967	XWYWWATTACTTGGTZZWZW
2900	972	ZYZYYAGCGGATTACZZWWZ
2901	977	ZZYZZTCTCCAGCGGXZZXY
2902	987	ZYZWXATTCGTTCTTZYZYY
2903	1025	WYYXZTCACACGCTGXXZYX
2904	1030	XWXWXGCCATTCACAYWYZW
2905	1034	XWYYXGAGAGCCATTYXYXY
2906	1040	YWXZXCAGCCAGAGAWYYXZ
2907	1045	WYYYZCGATACAGCCXWXWX
2908	1098	WYZWYTCAGTAGGACYZZZZ
2909	1361	ZWYZZCTGGCGATACZZZWW
2910	1366	ZZYXYTGCTTCTGGCWXZXY
2911	1371	YYZZYTTCACTGCTTYZWWY
2912	1378	ZYZWYCTCCTTCTTCXYZWY
2913	1386	ZWZYYAACTCTGCCTYYZZY

[0282] 表4:PPM1A间隔体AON。在5’末端的5个连接的核苷和在3’末端的5个连接的核苷代表翼区,并且包括核糖核苷和脱氧核糖核苷(包括修饰的核糖核苷和/或修饰的脱氧核糖核苷)的混合物,而在中央区域的十个连接的核苷是脱氧核糖核苷。在表4中AON序列的符号如下所示:W为鸟嘌呤、X为腺嘌呤、Y为胞嘧啶和Z为胸腺嘧啶。

[0283]

SEQ ID NO:	PPM1A AON 序列 (5'→3')
2914	WYMWYTTAGCCCATAMYWYX
2915	WYYXWCCTTGCATGCMWYMM
2916	XYXYWCCAGCCTTGCXMWYM
2917	MWWYXAACCGATCACXWYYW
2918	XYMMWGCAAACCGATYXYXW
2919	YXYMMGGCAAACCGAMYXYX
2920	YYXYMTGGCAAACCGXMYXY
2921	MYYXYTTGGCAAACCWXMYX
2922	WMYYXCTTGGCAAACYWXMY
2923	XWMYYACTTGGCAAAYYWXM
2924	XXWMYCACTTGGCAAXYYWX
2925	YXXWMCCACTTGGCAXXYYW

[0284]

2926	XXWXXTGACCACGATMYXXW
2927	WYYYXTCATACACAGYXXXW
2928	XMWYYCATCATACACXWYXX
2929	WYXMWCCCATCATACXYXWY
2930	YXWYXTGCCCATCATXYXYX
2931	XYYXWCATGCCCATCXMXYX
2932	WXXYYAGCATGCCCAMYXMX
2933	MWXWXACCAGCATGCYYXMY
2934	YMWXWAACCAGCATGYYYXM
2935	YYMWWTTATTGGTGAMWMWX
2936	MYYMWGTTATTGGTGXMWMW
2937	YXMWMGTTCATCAATYMYYX
2938	MYXMWTGTTCATCAAMYMYY
2939	MYMYYACAGTTAATGXXXMX
2940	MMWXWTCTCCACAGTMXXMW
2941	XYYMYTTGAGTCTCCXYXWM
2942	XWMXXACCTCTTGAGMYMYY
2943	MXYXXAGTAAACCTCMMWXW
2944	XMMXYTTGGTTTGTGXMYMM
2945	XWYWWATTACTTGGTMMWMW
2946	MYMYYAGCGGATTACMMWWM
2947	MMYMMTCTCCAGCGGXMMXY
2948	MYMWXATTCGTTCTTMYMYY
2949	WYYXMTCACACGCTGXXMYX
2950	XWXWXGCCATTCACAYWYMW
2951	XWYYXGAGAGCCATTYXYXY
2952	YWXMXCAGCCAGAGAWYYXM
2953	WYYYMCGATACAGCCXWXWX
2954	WYMWYTCAGTAGGACYMMMM
2955	MWYMMCTGGCGATACMMMWW
2956	MMYXWTGCTTCTGGCWXMXY
2957	YYMMYTTCACTGCTTYMWWY
2958	MYMWYCTCCTTCTTCXYMWY
2959	MWMYYAACTCTGCCTYYMMY

[0285] 本文所述的其他示例性PPM1A间隔体AON包括：

[0286] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2868的核苷酸序列(5'WYZWYTTAGCCCATAZYWYX 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0287] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2869的核苷酸序列(5'WYYXWCCTTGCATGCZWYZZ 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙

基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0288] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2870的核苷酸序列(5'XYXYWCCAGCCTTGCXZWYZ3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0289] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2871的核苷酸序列(5'ZWWYXAACCGATCACXWYYW3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0290] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2872的核苷酸序列(5'XYZZWGCAAACCGATYXYXW3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0291] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2873的核苷酸序列(5'YXYZZGGCAAACCGAZYXYX3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0292] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2874的核苷酸序列(5'YYXYZTGGCAAACCGXZYXY3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0293] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2875的核苷酸序列(5'ZYYXYTTGGCAAACCWXZYX3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0294] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2876的核苷酸序列(5'WZYYXCTTGGCAAACYWXZY3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0295] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2877的核苷酸序列(5'XWZYYACTTGGCAAAYYWXZ3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0296] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2878的核苷酸序列(5'XXWZYCACTTGGCAAXYYWX3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0297] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2879的核苷酸序列(5'YXXWZCCACTTGGCAXXYYW

3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0298] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2880的核苷酸序列(5'XXWXXTGACCACGATZYXXW 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0299] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2881的核苷酸序列(5'WYYYXTCATACACAGYXXXW 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0300] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2882的核苷酸序列(5'XZWYYCATCATACACXWYXX 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0301] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2883的核苷酸序列(5'WYXZWCCCATCATACXYXWY 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0302] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2884的核苷酸序列(5'YXWYXTGCCCATCATXYXYX 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0303] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2885的核苷酸序列(5'XYYXWCATGCCCATCXZXYX 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0304] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2886的核苷酸序列(5'WXXYYAGCATGCCCAZYXZX 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0305] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2887的核苷酸序列(5'ZWXWXACCAGCATGCYYXZY 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0306] • PPM1A AON，其包含SEQ ID NO:2888的核苷酸序列(5'YZWXWAACCAGCATGYYYXZ 3')，或其药学上可接受的盐，其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤，Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0307] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2889的核苷酸序列(5'YYZWWTTATTGGTGAZWZWX 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0308] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2890的核苷酸序列(5'ZYYZWGTTATTGGTGXZWZW 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0309] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2891的核苷酸序列(5'YXZWZGTTCATCAATYZYYX 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0310] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2892的核苷酸序列(5'ZYXZWTGTTCATCAAZYZYY 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0311] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2893的核苷酸序列(5'ZYZYYACAGTTAATGXXXZX 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0312] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2894的核苷酸序列(5'ZZWXWTCTCCACAGTZXXZW 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0313] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2895的核苷酸序列(5'XYYZYTTGAGTCTCCXYXWZ 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0314] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2896的核苷酸序列(5'XWZXXACCTCTTGAGZYZYY 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0315] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2897的核苷酸序列(5'ZXYXXAGTAAACCTCZZWXW 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0316] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2898的核苷酸序列(5'XZZXYTTGGTTTGTGXZYZZ 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧

啶；

[0317] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2899的核苷酸序列(5'XWYWWATTACTTGGTZZWZW 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0318] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2900的核苷酸序列(5'ZYZYYAGCGGATTACZZWWZ 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0319] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2901的核苷酸序列(5'ZZYZZTCTCCAGCGGXZZXY 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0320] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2902的核苷酸序列(5'ZYZWXATTCGTTCTTZYZYY 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0321] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2903的核苷酸序列(5'WYYXZTCACACGCTGXXZYX 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0322] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2904的核苷酸序列(5'XWXWXGCCATTCACAYWYZW 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0323] • PPM1A反义AON,其包含SEQ ID NO:2905的核苷酸序列(5'XWYYXGAGAGCCATTYXYXY 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0324] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2906的核苷酸序列(5'YWXZXCAGCCAGAGAWYYXZ 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0325] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2907的核苷酸序列(5'WYYYZCGATACAGCCXWXWX 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶；

[0326] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2908的核苷酸序列(5'WYZWYTCAGTAGGACYZZZZ 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙

基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0327] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2909的核苷酸序列(5'ZWYZZCTGGCGATACZZZWW3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;和

[0328] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2910的核苷酸序列(5'ZZYXYTGCTTCTGGCWXZXY3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。

[0329] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2911的核苷酸序列(5'YYZZYTTCACTGCTTYZWWY3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0330] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2912的核苷酸序列(5'ZYZWYCTCCTTCTTCXYZWY3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0331] • PPM1A AON,其包含SEQ ID NO:2913的核苷酸序列(5'ZWZYYAACTCTGCCTYYZZY3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶;

[0332] 在各种实施方式中,示例性PPM1A间隔体AON具有一个或多个修饰的核苷间键。例如,在各种实施方式中,上文所述的PPM1A间隔体AON中的所有核苷间键(例如,SEQ ID NO:2868-2913)都是硫代磷酸酯键。

[0333] 对PPM1A AON的化学修饰

[0334] 如本文所述,PPM1A AON,如具有SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863中任一者的序列的PPM1A AON或具有SEQ ID NO:2868-2959中任一者的序列的PPM1A间隔体AON,可以包含对一个或多个核苷和/或一个或多个核苷间键的一种或多种化学修饰。核苷是一种碱基-糖组合。核苷的核碱基(也称为碱基)部分通常是杂环碱基部分。核苷酸是进一步包含与核苷的糖部分共价连接的磷酸基团的核苷。对于那些包含呋喃戊糖的核苷,磷酸基团可以连接到糖的2'、3'或5'羟基部分。寡核苷酸通过相邻核苷彼此共价连接形成,以形成线性聚合寡核苷酸。在寡核苷酸结构内,磷酸基团通常被称为形成寡核苷酸的核苷间键。

[0335] 对PPM1A AON的修饰包括对核苷间键和/或核苷(例如,核苷的糖部分或核碱基)的取代或改变。修饰的PPM1A AON可能优于天然形式,因为其具有理想的特性,例如增强细胞摄取、增强对核酸靶点的亲和性、增加核酸酶存在的稳定性或增加抑制活性。化学修饰的核苷、核碱基和核苷间键描述在Agrawal和Gait,History and Development of Nucleotide Analogues in Nucleic Acids Drugs,Drug Discovery Series No.68,Advances in Nucleic Acid Therapeutics,1-21(Agrawal和Gait编著,2019)中,其内容通过引用并入本

文。

[0336] 修饰的核苷间键

[0337] 在各种实施方式中,PPM1A AON,如具有SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863中任一者的序列的PPM1A AON或具有SEQ ID NO:2868-2959中任一者的序列的PPM1A间隔体AON,包含一个或多个修饰的核苷间键。RNA和DNA的天然存在的核苷间键是3'至5'磷酸二酯键。可以选择具有一个或多个修饰的(即,非天然存在的)核苷间键的PPM1A AON,而不是具有天然存在的核苷间键的反义化合物,因为这些化合物具有所需的性质,例如,增强的细胞摄取、增强的对靶核酸的亲和性和在核酸酶存在下增加的稳定性。

[0338] 在各种实施方式中,PPM1A AON包含带有一个或多个修饰的核苷间键的连接的核苷,这些键连接单个核苷。在各种实施方式中,PPM1A AON包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个或十九个修饰的核苷间键。修饰的核苷间键的实例包括以下任一者:硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、亚膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如,包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3'氨基核糖或5'氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键。

[0339] 在各种实施方式中,PPM1A AON的每个修饰的核苷间键可以独立于PPM1A AON的其他修饰的核苷间键进行设计。换言之,PPM1A AON的修饰核苷间键不必都是相同类型的修饰的核苷间键。在各种实施方式中,修饰的核苷间键散布在整个反义化合物中。

[0340] 在各种实施方式中,PPM1A AON包含至少一个硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,PPM1A AON包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、至少十五个、至少十六个、至少十七个、至少十八个或至少十九个硫代磷酸酯键。在特定实施方式中,PPM1A AON包含十三个、十五个、十七个或十九个硫代磷酸酯键。在特定实施方式中,PPM1A AON的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

[0341] 在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的核苷间键和天然存在的磷酸二酯键的混合物。例如,PPM1A AON包含至少一个磷酸二酯键和至少一个硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,PPM1A AON包含6至10个之间、6至9个之间、6至8个之间、7至10个之间、7至9个之间或者6、7或8个硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,PPM1A AON包含6、7、8、9或10个硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,PPM1A AON包含6至10个之间、6至9个之间、6至8个之间、7至10个之间、7至9个之间或者6、7或8个磷酸二酯键。在一些实施方式中,PPM1A AON包含6、7、8、9或10个磷酸二酯键。

[0342] 在特定实施方式中,PPM1A AON包含10个硫代磷酸酯键和9个磷酸二酯键。在特定实施方式中,PPM1A AON包含6个硫代磷酸酯键和7个磷酸二酯键。在特定实施方式中,PPM1A AON包含6个硫代磷酸酯键和9个磷酸二酯键。在特定实施方式中,PPM1A AON包含8个硫代磷酸酯键和9个磷酸二酯键。在特定实施方式中,PPM1A AON包含8个硫代磷酸酯键和7个磷酸二酯键。

[0343] 在一些实施方式中,PPM1A AON包含根据PPM1A AON的间隔体设计设计的核苷间连

接。在一些实施方式中,5'翼区包含至少一个修饰的核苷间键(例如,从天然存在的3'至5'磷酸二酯键的核苷间键修饰)。在一些实施方式中,5'翼区包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个修饰的核苷间键。在一些实施方式中,3'翼区包含至少一个修饰的核苷间键。在一些实施方式中,3'翼区包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个修饰的核苷间键。在一些实施方式中,中心区域包含至少一个修饰的核苷间键。在一些实施方式中,中心区域包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个修饰的核苷间键。

[0344] 在特定实施方式中,5'翼区的核苷间键是修饰的核苷间键,如硫代磷酸酯键。在特定实施方式中,3'翼区的所有核苷间键是修饰的核苷间键,如硫代磷酸酯键。在特定实施方式中,中心区域的所有核苷间键是修饰的核苷间键,如硫代磷酸酯键。在特定实施方式中,每个5'翼区、3'翼区和中心区域的所有核苷间键是修饰的核苷间键,如硫代磷酸酯键。

[0345] 在一些实施方式中,在5'翼区、3'翼区或中心区域中的一个或多个修饰的核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。在一些实施方式中,硫代磷酸酯键是立体化学纯硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,硫代磷酸酯键是Sp硫代磷酸酯键。在其他实施方式中,硫代磷酸酯键是Rp硫代磷酸酯键。

[0346] 在一些实施方式中,在5'翼区、3'翼区或中心区域中的一个或多个修饰的核苷间键可以是以下任一者:硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、亚膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如,包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3'氨基核糖或5'氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键。在各种实施方式中,5'翼区、3'翼区或中心区域的每个修饰的核苷间键可以独立于其他修饰的核苷间键进行设计。换言之,5'翼区、3'翼区和中心区域的修饰的核苷间键不需要均是相同类型的修饰的核苷间键。在各种实施方式中,修饰的核苷间键散布在整个反义化合物中。

[0347] 在各种实施方式中,5'翼区、3'翼区或中心区域的一个或多个核苷间键是天然存在的键(例如,磷酸二酯键)。在各种实施方式中,中心区域的所有核苷间键是未修饰的核苷间键(例如,磷酸二酯键)。

[0348] 在各种实施方式中,一个区域(例如,5'翼区、3'翼区或中心区域)的核苷间键不通榆另一区域的核苷间键。在特定实施方式中,5'翼区包含至少一个修饰的核苷间键、3'翼区包含至少一个修饰的核苷间键和中心区域的所有核苷间键是未修饰的核苷间键(例如,磷酸二酯键)。在一些实施方式中,寡核苷酸的中心区域包含磷酸二酯键,并且5'翼区和3'翼区分别包含一个或多个硫代磷酸酯键。在特定实施方式中,5'翼区的所有核苷间键是修饰的核苷间键,3'翼区的所有核苷间键是修饰的核苷间键,以及中心区域的所有核苷间键是未修饰的核苷间键(例如,磷酸二酯键)。

[0349] 在特定实施方式中,PPM1A间隔体AON是5-10-5间隔体,并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为:sssssssssssssssssss(其中"s"指硫代磷酸酯键),其中所有硫代磷酸酯键均在5'翼区或3'翼区和所有磷酸二酯键在PPM1AAON的中心区域。

[0350] 在特定实施方式中,PPM1A间隔体AON是5-10-5间隔体,并且PPM1A间隔体AON的核

苷间键表示为以下任一者：ssssssoooooooooossssss、ooooossssssssssooooo、oooooooooooooooossssss、soossssssssssssssoos、soossssssssssssssssss、sssssssssssssssoos和sssssoooooooooooooo(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1AAON的中心区域。在特定实施方式中，PPM1A间隔体AON是3-8-3间隔体，并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为：sssssssssssss(其中“s”指硫代磷酸酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1AAON的中心区域。

[0351] 在特定实施方式中，PPM1A间隔体AON是3-8-3间隔体，并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为以下任一者：sssooooooosss、ooossssssooo、sssssssssooo、sossssssssos、sossssssssss、sssssssssssos和ooossssssssss(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。在特定实施方式中，PPM1A间隔体AON是3-10-3间隔体，并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为：ssssssssssssss(其中“s”指硫代磷酸酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。

[0352] 在特定实施方式中，PPM1A间隔体AON是3-10-3间隔体，并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为以下任一者：sssooooooooosss、ooossssssssooo、sssssssssssooo、sossssssssssos、sossssssssssss、sssssssssssssos和ooossssssssssss(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。在特定实施方式中，PPM1A间隔体AON是4-10-4间隔体，并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为：ssssssssssssssss(其中“s”指硫代磷酸酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。

[0353] 在特定实施方式中，PPM1A间隔体AON是4-10-4间隔体，并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为以下任一者：ssssooooooooosssss、ooooossssssssooooo、sssssssssssssoooo、soossssssssssoos、soossssssssssssss、sssssssssssssoos和ooooossssssssssss(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。在特定实施方式中，PPM1A间隔体AON是4-8-4间隔体，并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为：ssssssssssssss(其中“s”指硫代磷酸酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。

[0354] 在特定实施方式中，PPM1A间隔体AON是4-8-4间隔体，并且PPM1A间隔体AON的核苷间键表示为以下任一者：ssssooooooosssss、ooooossssssooooo、sssssssssssooooo、soossssssssoos、soossssssssssss、sssssssssssoos和ooooossssssssss(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键)，其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。

[0355] 修饰的糖部分

[0356] PPM1A AON，如具有SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863中任一者的序列的PPM1A AON或具有SEQ ID NO:2868-2959中任一者的序列的PPM1A间隔体AON，可以包含一个或多个核苷，其中糖基可以被修饰。这种糖修饰的核苷可以赋予反义化合物增强的核酸酶稳定性、增加的结合亲和性或一些其他有益的生物学性质。

[0357] 在各种实施方式中，具有修饰的糖部分的核苷包含核糖，其中2′-OH基团可以被选自以下的任一者替代：OR、R、R′OR、SH、SR、NH_2、NR_2、N_3、CN、F、Cl、Br和I（其中R是烷基或芳基和R'是亚烷基）、2'-O-甲基（2'-OMe）核苷、2'-O-（2-甲氧基乙基）（2'MOE）核苷、肽核酸（PNA）、双环核酸（BNA）、2'-脱氧-2'-氟代核酸、2'-氟代-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸（LNA）、受限乙基2'-4'-桥接核酸（cEt）、S-cEt、吗啉代寡聚体、tcDNA、2′-O,4′-C-乙烯连接的核酸（ENA）、己糖醇核酸（HNA）和三环类似物（例如，tcDNA）。

[0358] 在某些实施方式中，核苷包含化学修饰的呋喃核糖环部分。化学修饰的呋喃核糖环的实例包括但不限于添加取代基（包括5'和2'取代基）、桥接非双环原子以形成双环核酸（BNA）、用S、N（R）或C（R_1）（R_2）（R、R_1和R_2分别独立地为H、C_1-C_{12}烷基或保护基团）取代核糖基环氧原子及其组合。化学修饰的糖的实例包括2'-F-5'-甲基取代的核苷（参见PCT国际申请WO2008/101157，公开日期2008年8月21日，针对其他公开的5',2'-双取代核苷）或具有S或CF_2的核糖环氧原子的替代，其进一步在2'位取代（参见公开的美国专利申请US2005-0130923，公开日期2005年6月16日）或者替代地BNA的5'位取代（参见PCT国际申请WO 2007/134181，公开日期2007年11月22日，其中LNA被例如5'-甲基或5'-乙烯基取代）。

[0359] 具有修饰的糖部分的核苷的实例包括但不限于包含5'-乙烯基、5'-甲基（R或5）、4'-S、2'-F、2'-OCH_3、2'-OCH_2CH_3、2'-OCH_2CH_2F和2'-O（CH2）$_2OCH_3$取代基的核苷。在2'位的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O—C_1-C_{10}烷基、OCF_3、OCH_2F、O（CH_2）$_2SCH_3$、O（CH_2）$_2$—O—N（R_m）（R_n）、O—CH_2—C（=O）—N（R_m）（R_n）和O—CH_2—C（=O）—N（R_1）—（CH_2）$_2$—N（R_m）（R_n）-，其中每个R_1、R_m和R_n独立地是H或者取代或非取代的C_1-C_{10}烷基。

[0360] 修饰的糖部分的其他实例包括2'-OMe修饰的糖部分、双环糖部分、2'-O-（2-甲氧基乙基）（2'MOE）、2'-脱氧-2'-氟核苷、2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸（LNA）、受限乙基2'-4'-桥接核酸（cEt）（4'-CH（CH_3）-O-2'）、S-受限乙基（S-cEt）2'-4'-桥接核酸、4'-CH_2-O-CH_2-2'、4'-CH_2-N（R）-2'、4'-CH（CH_2OCH_3）-O-2'（“受限MOE”或“cMOE”）、己糖醇核酸（HNA）和三环类似物（例如，tcDNA）。

[0361] 在一些实施方式中，PPM1A AON包含2'-O-甲基核苷（2'OMe）（例如，PPM1A AON包含一个或多个2'OMe修饰的糖）、2'-O-（2-甲氧基乙基）（2'-MOE）（例如，PPM1A AON包含一个或多个2'MOE修饰的糖（例如，2'-MOE））、肽核酸（PNA）（例如，PPM1A AON包含一个或多个通过酰胺键或羰基亚甲基键连接的N-（2-氨基乙基）-甘氨酸单元作为重复单元代替糖-磷酸骨架）、锁定核酸（LNA）（例如，PPM1A AON包含一个或多个锁定核糖，并且可以是2'-脱氧核苷酸或2'OMe核苷酸的混合物）、受限乙基2'-4'-桥接核酸（c-ET）（例如，PPM1A AON包含一个或多个cET糖）、cMOE（例如，PPM1A AON包含一个或多个cMOE糖）、吗啉代寡聚物（例如，PPM1A AON包含含有一个或多个PMO的骨架）、脱氧-2'-氟代核苷（例如，PPM1A AON包含一个或多个2'-氟代-β-D-阿拉伯糖核苷）、2'-O,4'-C-乙烯连接的核酸（ENA）（例如，PPM1A AON包含一个或多个ENA修饰的糖）、己糖醇核酸（HNA）（例如，PPM1A AON包含一个或多个HNA修饰的糖）或三环类似物（tcDNA）（例如，PPM1A AON包含一个或多个tcDNA修饰的糖）。

[0362] 如本文所用，“双环核苷”指包含双环糖部分的修饰的核苷。双环核苷的实例包括但不限于在4'和2'核糖基环原子之间包含桥的核苷。在某些实施方式中，本文提供的反义化合物包含一个或多个含有4'至2'桥的双环核苷。此类4'至2'桥接的双环核苷的实例包括但不限于下式之一：4'-（CH_2）—O-2'（LNA）；4'-（CH_2）—S-2'；4'-（CH_2）$_2$—O-2'（ENA）；4'-CH

(CH_3)—O-2'和4'-CH(CH_2OCH_3)—O-2'(及其类似物(参见美国专利号7,399,845,2008年7月15日授权));4'-C(CH_3)(CH_3)—O-2'(及其类似物(参见公开的国际申请WO/2009/006478,公开日期2009年1月8日));4'-CH_2—N(OCH_3)-2'(及其类似物(参见公开的国际申请WO/2008/150729,公开日期2008年12月11日));4'-CH_2—O—N(CH_3)-2'(参加公开的美国专利申请US2004-0171570,公开日期2004年9月2日);4'-CH_2—N(R)—O-2',其中R是H、C_1-C_{12}烷基或保护基团(参见美国专利号7,427,672,2008年9月23日授权);4'-CH_2—C(H)(CH_3)-2'(参见Chattopadhyaya等,J.Org.Chem.,2009,74,118-134);和4'-CH_2—C—(=CH_2)-2'(及其类似物)(参见公开的国际申请WO 2008/154401,公开日期2008年12月8日))。

[0363] 更多与双环核苷相关的报告也可以在已发表的文件中找到(参见例如:Singh等,Chem.Commun.,1998,4,455-456;Koshkin等,Tetrahedron,1998,54,3607-3630;Wahlestedt等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,2000,97,5633-5638;Kumar等,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222;Singh等,J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039;Srivastava等,J.Am.Chem.Soc.,2007,129(26)8362-8379;Elayadi等,Curr.Opinion Invest.Drugs,2001,2,558-561;Braasch等,Chem.Biol.,2001,8,1-7;和Orum等,Curr.Opinion Mol.Ther.,2001,3,239-243;美国专利号6,268,490;6,525,191;6,670,461;6,770,748;6,794,499;7,034,133;7,053,207;7,399,845;7,547,684;和7,696,345;美国专利公开号US2008-0039618;US2009-0012281;美国专利系列号60/989,574;61/026,995;61/026,998;61/056,564;61/086,231;61/097,787;和61/099,844;公开的PCT国际申请WO 1994/014226;WO 2004/106356;WO 2005/021570;WO2007/134181;WO 2008/150729;WO 2008/154401;和WO 2009/006478。可以制备具有一种或多种立体化学糖构型的前述双环核苷中的每一种,包括例如α-L-呋喃核糖和β-D-呋喃核糖(参见PCT国际申请PCT/DK98/00393,公开日期1999年3月25日,WO 99/14226)。

[0364] 在某些实施方式中,BNA核苷的双环糖部分包括但不限于在呋喃戊糖基糖部分的4'和2'位置之间具有至少一个桥的化合物,其中此类桥独立地包含1个或2至4个连接的基团,其独立地选自—[C(R_a)(R_b)]$_n$—、—C(R_a)=C(R_b)—、—C(R_a)=N—、—C(=O)—、—C(=NRa)—、—C(=S)—、—O—、—Si(R_a)$_2$—、—S(=O)$_x$—和—N(R_a)—;

[0365] 其中:

[0366] x是0、1或2;

[0367] n是1、2、3或4;

[0368] 每个R_a和R_b独立地是H、保护基团、羟基、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、杂环基团、取代的杂环基团、杂芳基、取代的杂芳基、C_5-C_7脂环基团、取代的C_5-C_7脂环基团、卤素、OJ_1、NJ_1J_2、SJ_1、N_3、$COOJ_1$、酰基(C(=O)—H)、取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)$_2$-J_1)或亚磺酰基(S(=O)-J_1);和

[0369] 每个J_1和J2独立地是H、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、酰基(C(=O)—H)、取代的酰基、杂环基团、取代的杂环基团、C_1-C_{12}氨基烷基、取代的C_1-C_{12}氨基烷基或保护基团。

[0370] 在某些实施方式中,双环糖部分的桥是—[C(R_a)(R_b)]$_n$—、—[—[C(R_a)(R_b)]$_n$—O—、—C(R_aR_b)—N(R)—O—或—C(R_aR_b)—O—N(R)—。在某些实施方式中,桥是4'-CH_2-2'、

4'-$(CH_2)_2$-2'、4'-$(CH_2)_3$-2'、4'-CH_2—O-2'、4'-$(CH_2)_2$—O-2'、4'-CH_2—O—N(R)-2'和4'-CH_2—N(R)—O-2'-,其中每个R独立地是H、保护基团或C_1-C_{12}烷基,每个R_a和R_b独立地是H、保护基团、羟基、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、杂环基团、取代的杂环基团、杂芳基、取代的杂芳基、C_5-C_7脂环基团、取代的C_5-C_7脂环基团、卤素、OJ_1、NJ_1J_2、SJ_1、N_3、$COOJ_1$、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)$_2$-J_1)或亚磺酰基(S(=O)-J_1)。

[0371] 在某些实施方式中,双环核苷由异构构型进一步定义。例如,包含4'-2'亚甲氧基桥的核苷可以是α-L构型或β-D构型。此前,α-L-亚甲氧基(4'-CH_2—O-2')BNA已被掺入显示反义活性反义寡核苷酸中(Frieden等,Nucleic Acids Research,2003,21,6365-6372)。

[0372] 在某些实施方式中,双环核苷包括但不限于α-L-亚甲氧基(4'-CH_2—O-2')BNA、β-D-亚甲氧基(4'-CH_2—O-2')BNA、亚乙氧基(4'-$(CH_2)_2$—O-2')BNA、氨氧基(4'-CH_2—O—N(R)-2')BNA、氧氨基(4'-CH_2—N(R)—O-2')BNA、甲基(亚甲氧基)(4'-$CH(CH_3)$—O-2')BNA、亚甲基硫代(4'-CH_2—S-2')BNA、亚甲基氨基(4'-CH_2—N(R)-2')BNA、甲基碳环(4'-CH_2—$CH(CH_3)$-2')BNA和丙烯碳环(4'-$(CH_2)_3$-2')BNA。

[0373] 如本文所用,"锁定核酸"或"LNA"或"LNA核苷"指在核苷糖单元的4'和2'位置之间具有连接两个碳原子的桥(例如,亚甲基、亚乙基、氨氧基或氧亚氨基桥)的修饰核苷,从而形成双环糖。此类双环糖的实例包括但不限于(A)α-L-亚甲氧基(4'-CH_2—O-2')LNA、(B)β-D-亚甲氧基(4'-CH_2—O-2')LNA、(C)亚乙氧基(4'-$(CH_2)_2$—O-2')LNA、(D)氨氧基(4'-CH_2—O—N(R)-2')LNA和(E)氧氨基(4'-CH_2—N(R)—O-2')LNA;其中R是H、C_1-C_{12}烷基或保护基团(参见美国专利号7,427,672,授权日期2008年9月23日)。

[0374] 如本文所用,LNA核苷包括但不限于在糖的4'和2'位之间具有至少一个桥的核苷,其中每个桥独立地包含1个或2至4个连接的基团,所述基团独立地选自—[C(R_1)(R_2)]$_n$—、—C(R_1)=C(R_2)—、—C(R_1)=N—、—C(=NR_1)—、—C(=O)—、—C(=S)—、—O—、—Si(R_1)$_2$—、—S(=O)$_x$—和—N(R_1)—;其中:x是0、1或2;n是1、2、3或4;每个R_1和R_2独立地是H、保护基团、羟基、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、杂环基团、取代的杂环基团、杂芳基、取代的杂芳基、C_5-C_7脂环基团、取代的C_5-C_7脂环基团、卤素、OJ_1、NJ_1J_2、SJ_1、N_3、$COOJ_1$、酰基(C(=O)—H)、取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)$_2$-J_1)或亚磺酰基(S(=O)-J_1);和每个J_1和J_2独立地是H、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、酰基(C(=O)—H)、取代的酰基、杂环基团、取代的杂环基团、C_1-C_{12}氨基烷基、取代的C_1-C_{12}氨基烷基或保护基团。

[0375] LNA的定义中涵盖的4'-2'桥接基团的实例包括但不限于下式之一:—[C(R_1)(R_2)]$_n$—、—[C(R_1)(R_2)]$_n$—O—、—C(R_1R_2)—N(R_1)—O—或—C(R_1R_2)—O—N(R_1)—。此外,LNA的定义中涵盖的其他桥接基团是4'-CH_2-2'、4'-$(CH_2)_2$-2'、4'-$(CH_2)_3$-2'、4'-CH_2—O-2'、4'-$(CH_2)_2$—O-2'、4'-CH_2—O—N(R_1)-2'和4'-CH_2—N(R_1)—O-2'-桥,其中每个R_1和R_2独立地是H、保护基团或C_1-C_{12}烷基。

[0376] 根据本发明的LNA的定义还包括LNA,其中核糖基糖环的2'-羟基与糖环的4'碳原子连接,从而形成桥以形成双环糖部分。桥可以是连接2'氧原子和4'碳原子的亚甲基(—CH_2—)基团,其使用术语亚甲氧基(4'-CH_2—O-2')LNA。此外,在该位置具有亚乙基桥接基团

的双环糖部分的情况下，使用术语亚乙氧基(4'-CH_2CH_2—O-2')。如本文所用，α-L-亚甲氧基(4'-CH_2-O-2')，亚甲氧基(4'-CH_2—O-2')LNA的异构体也涵盖在LNA的定义中。

[0377] 在一些实施方式中，PPM1A AON包含根据PPM1A间隔体AON的间隔体设计设计的修饰糖部分。在各种实施方式中，PPM1A间隔体AON包含一个或多个修饰的糖部分。在各种实施方式中，5'翼区包含至少一个修饰的糖部分。在各种实施方式中，3'翼区包含至少一个修饰的糖部分。在各种实施方式中，5'翼区包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个修饰的糖部分。在各种实施方式中，3'翼区包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个修饰的糖部分。在一些实施方式中，每个5'翼区和/或3'翼区包含1至7个修饰的糖部分，如2至6个修饰的糖部分、2至5个修饰的糖部分、2至4个修饰的糖部分或1至3个修饰的糖部分。在特定实施方式中，5'翼区包含3个修饰的糖部分和3'翼区包含3个修饰的糖部分。在特定实施方式中，5'翼区包含4个修饰的糖部分和3'翼区包含4个修饰的糖部分。在特定实施方式中，5'翼区包含5个修饰的糖部分和3'翼区包含5个修饰的糖部分。

[0378] 在各种实施方式中，在5'和3'翼区中具有修饰的糖部分的核苷是任何一种核糖，其中2'-OH基团可以被选自以下的任一基团取代：OR、R、R'OR、SH、SR、NH_2、NR_2、N_3、CN、F、Cl、Br和I(其中R是烷基或方剂和R'是亚烷基)、2'-O-甲基(2'-OMe)核苷、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'MOE)核苷、肽核酸(PNA)、双环核酸(BNA)、2'-脱氧-2'-氟代核苷、2'-氟代-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)、受限乙基2'-4'-桥接核酸(cEt)、S-cEt、吗啉代寡聚物、tcDNA、2'-O,4'-C-乙烯连接的核酸(ENA)、己糖醇核酸(HNA)和三环类似物(例如，tcDNA)。

[0379] 在一些实施方式中，5'翼区和/或3'翼区包含至少一个2'-MOE核苷。在一些实施方式中，5'和3'翼区两者包含至少一个2'-MOE核苷。在一些实施方式中，每个5'翼区和3'翼区包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个2'-MOE核苷。在一些实施方式中，在每个5'翼区和3'翼区的所有核苷是2'-MOE核苷。

[0380] 在其他实施方式中，翼区可以包含2'-MOE核苷和其他核苷(混合翼)两者，如DNA核苷和/或非-MOE修饰的核苷，如双环核苷(BNA)(例如，锁定核酸(LNA)核苷或受限乙基2'-4'桥接核酸(cEt)核苷)、2'-O-甲基核苷、三环DNA、S-cEt、吗啉基或其他2'取代的核苷。

[0381] 在一些实施方式中，5'翼区或3'翼区包含至少一个BNA(例如，至少一个LNA核苷或cET核苷)。在一些实施方式中，每个5'和3'翼区包含BNA。在一些实施方式中，在5'和3'翼区中的所有核苷是BNA。在进一步的实施方式中，在5'和/或3'翼区中的BNA独立地选自以下：β-D或α-L构型的氧-LNA、硫-LNA、氨基-LNA、cET和/或ENA或其组合。

[0382] 在一些实施方式中，5'和/或3'翼区包含至少一个2'-O-甲基核苷。在一些实施方式中，5'翼包含至少一个2'-O-甲基核苷。在一些实施方式中，5'和3'翼区包含2'-O-甲基核苷。在一些实施方式中，在翼区中的所有核苷是2'-O-甲基核苷。

[0383] 修饰的核碱基

[0384] 在各种实施方式中，PPM1A AON，如具有SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863中任一者的序列的PPM1A AON或具有SEQ ID NO:2868-2959中任一者的序列的PPM1A间隔体AON，包含一个或多个修饰的核碱基。修饰的核碱基的实例包括5-甲基胸腺嘧啶，例如，5-甲基胞嘧啶或5-甲氧基尿嘧啶，5-甲基嘌呤，例如，5-甲基鸟嘌呤，或假尿嘧啶。

[0385] 在各种实施方式中，PPM1A AON包含至少一个修饰的核碱基。在各种实施方式中，

PPM1A AON包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个修饰的核碱基。在各种实施方式中，PPM1A AON包含至少一个5-甲基胞嘧啶核碱基。在各种实施方式中，PPM1A AON包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个5-甲基胞嘧啶核碱基。

[0386] 在各种实施方式中，PPM1A AON包含修饰的和未修饰的核碱基两者。例如，PPM1A AON可以包含胞嘧啶和5-甲基胞嘧啶两者。在一些实施方式中，PPM1A AON可以包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个胞嘧啶，以及还包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个5-甲基胞嘧啶。

[0387] 在各种实施方式中，在PPM1A AON中每个特定类型的核碱基被相应修饰的核碱基替代。例如，PPM1A AON的每个鸟嘌呤被5-甲基鸟嘌呤替代。作为另一个实例，PPM1A AON的每个胞嘧啶被5-甲基胞嘧啶替代。

[0388] 在一些实施方式中，PPM1A AON包含修饰的核碱基，其是根据PPM1A间隔体AON的间隔体设计设计的。在各种实施方式中，5’翼区的连接的核苷、3’翼区的连接的核苷或中心区域的连接的核苷包含一个或多个修饰的核碱基。在一些实施方式中，5’翼区和/或3’翼区包含1至10个修饰的核碱基，如2至8个修饰的核碱基、3至6个修饰的核碱基或4至5个修饰的核碱基。在一些实施方式中，5’翼区和/或3’翼区包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个修饰的核碱基。在一些实施方式中，中心区域包含1至10个修饰的核碱基，如2至8个修饰的核碱基、3至6个修饰的核碱基或4至5个修饰的核碱基。在一些实施方式中，中心区域包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个修饰的核碱基。修饰的核碱基的实例包括5-甲基嘧啶，例如，5-甲基胞嘧啶或5-甲氧基尿嘧啶，5-甲基嘌呤，例如，5-甲基鸟嘌呤或假尿嘧啶。

[0389] 在各种实施方式中，在PPM1A AON的5’翼区和/或3’翼区中的至少一个胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代。在各种实施方式中，在5’翼区中的至少一个胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代。在各种实施方式中，在3’翼区中的至少一个胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代。在各种实施方式中，在中心区域中的至少一个胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代。在各种实施方式中，在5’翼区中的所有胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代。在各种实施方式中，在3’翼区中的所有胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代。在各种实施方式中，在中心区域的所有胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代。

[0390] 在特定实施方式中，在5’翼区中的所有胞嘧啶，在3’翼区中的所有胞嘧啶和在中心区域中的所有胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代。在特定实施方式中，在5’翼区中的所有胞嘧啶，在3’翼区中的所有胞嘧啶被修饰的核碱基(如5-甲基胞嘧啶)替代；然而，在中心区域中的所有胞嘧啶是未修饰的核碱基。

[0391] 修饰的寡核苷酸

[0392] 本文描述了修饰寡核苷酸的其他实施方式，其可包含上述任何修饰的核苷间键和/或修饰的核苷(例如，修饰的糖部分和/或修饰的核碱基)。

[0393] 在一些实施方式中，PPM1A AON，或其药学上可接受的盐，包含SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个，其中核苷序列的至少一个核苷被以下取代：2’-O-(2-甲氧基乙基)核苷、2’-O-甲基核苷、2’-脱氧-2’-氟代核苷、2’-氟代-β-D-阿拉伯糖核苷、双环核酸、桥接核酸、锁定核酸(LNA)、受限乙基

(cET)核酸、三环-DNA(tcDNA)、2'-O,4'-C-乙烯连接的核酸(ENA)或肽核酸(PNA)。在特定实施方式中,PPM1A AON的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,PPM1A AON的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。本文还描述了包含任何前述反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0394] 本文所述的PPM1A AON可以包含化学修饰的核苷,包括修饰的核糖核苷和修饰的脱氧核糖核苷。化学修饰的核苷包括2'-取代的核苷,其中糖环的2'位包含-H或-OH以外的部分(例如,-F或O-烷基)。例如,化学修饰的核苷包括但不限于2'-O-(2-甲氧基乙基)修饰,例如,2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤、2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤、2'-O-(2-甲氧基乙基)胞嘧啶和2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。

[0395] 在一些实施方式中,PPM1A AON可以包含化学修饰的核苷,例如,2'O-甲基核糖核苷,例如,2'O-甲基胞嘧啶、2'O-甲基鸟嘌呤、2'O-甲基尿嘧啶和/或2'O-甲基腺嘌呤。本文所述的PPM1A AON还可以包含一个或多个化学修饰的碱基,包括5-甲基嘧啶,例如,5-甲基胞嘧啶和/或5-甲基嘌呤,例如,5-甲基鸟嘌呤。本文所述的PPM1A AON还可以包含任何下述化学修饰的核苷:5-甲基-2'-O-甲基胞嘧啶、5-甲基-2'-O-甲基胸腺嘧啶、5-甲基胸腺嘧啶、5-甲基尿嘧啶和/或5-甲基2'-脱氧胸腺嘧啶。

[0396] 在一些实施方式中,可以预期的是,所公开的PPM1A AON可以任选地具有至少一个修饰的核碱基,例如,5-甲基胞嘧啶,和/或至少一个膦酸甲酯,其例如仅在5'或3'末端之一或在5'和3'末端或沿寡核苷酸序列被替代。

[0397] 在某些实施方式中,本公开提供了PPM1A AON与修饰核苷组合的混合形式,例如,PPM1A肽核酸(PNA)和PPM1A锁定核酸(LNA)的组合。化学修饰的核苷还包括但不限于锁定核酸(LNA)、2'-O-甲基、2'-氟代和2'-氟代-β-D-阿拉伯糖核苷酸(FANA)修饰。可以包括在本文所述的PPM1A AON中的化学修饰的核苷还描述在Johannes和Lucchino,(2018)"Current Challenges in Delivery and Cytosolic Translocation of Therapeutic RNAs"Nucleic Acid Ther.28(3):178-93;Rettig和Behlke,(2012)"Progress toward in vivo use of siRNAs-II"Mol Ther 20:483-512;和Khvorova和Watts,(2017)"The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility"Nat Biotechnol.,35(3):238-48中,其每一个的内容通过引用并入本文。

[0398] 本文所述的PPM1A AON可以包含促进寡核苷酸末端5'-磷酸盐和5'-磷酸盐抗磷酸酶类似物稳定的化学修饰。促进寡核苷酸末端5'-磷酸盐或其5'-磷酸盐抗磷酸酶类似物稳定的化学修饰包括但不限于5'-甲基膦酸酯、5'-亚甲基膦酸酯、5'-亚甲基膦酸酯类似物、5'-E-乙烯基膦酸酯(5'-E-VP)、5'-硫代磷酸酯和5'-C-甲基类似物。促进AON末端5'-磷酸盐和5'-磷酸盐抗磷酸酶类似物稳定的化学修饰描述在Khvorova和Watts,(2017)"The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility"Nat Biotechnol.,35(3):238-48,其内容通过引用并入本文。

[0399] 在本文所述的一些实施方式中,PPM1A AON,或其药学上可接受的盐,是修饰的寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个,其中PPM1A AON包含至少一个核苷或至少一个核苷间键的修饰。例如,在一些实施方式中,PPM1A AON,或其药学上可接受的盐,包含SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个,并且核苷酸序列

的至少一个核苷键是硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、烷基膦酸酯键、3-甲氧基丙基膦酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、甲基膦酸酯键、氨基烷基磷酸三酯键、亚烷基膦酸酯键、次膦酸酯键、氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、二氨基磷酸酯(例如,包含吗啉基二氨基磷酸酯(PMO)、3’氨基核糖或5’氨基核糖)键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键。

[0400] 本文所述PPM1A AON的一些实施方式中,核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。例如,本文所述PPM1A AON的一些实施方式中,核苷酸序列的一个、两个、三个或更多个核苷间键是硫代磷酸酯键。本文所述PPM1A AON的优选实施方式中,核苷酸序列的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。因此,在一些实施方式中,SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A AON的所有核苷酸键是硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A AON的一个或多个核苷酸键是硫代磷酸酯键。

[0401] 考虑的PPM1A AON可以任选地包含至少一个修饰的糖。例如,构成寡核苷酸的至少一个核苷酸的糖部分是核糖,其中2’-OH基团可以被选自以下的任一个替代:OR、R、R’OR、SH、SR、NH_2、NR_2、N_3、CN、F、Cl、Br和I(其中R是烷基或芳基和R’是亚烷基)。

[0402] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eeeee-d10-eeeee的核苷酸序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d10”表示连续的10个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含5个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含10个连续的DNA核碱基和3’翼区包含5个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有sssssooooooooosssss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键),其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0403] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eeeee-d10-eeeee的核苷酸序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d10”表示连续的10个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含5个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含10个连续的DNA核碱基和3’翼区包含5个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有sssssssssssssssssss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键),其中PPM1A AON的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0404] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eee-d8-eee的核苷酸序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d8”表示连续的8个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含3个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含8个连续的DNA核碱基和3’翼区包含3个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有sssooooooosss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键),其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’

翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0405] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eee-d8-eee的核苷酸序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d8”表示连续的8个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含3个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含8个连续的DNA核碱基和3’翼区包含3个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有ssssssssssssss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键),其中PPM1A AON的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0406] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eee-d10-eee的核苷酸序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d10”表示连续的10个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含3个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含10个连续的DNA核碱基和3’翼区包含3个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有sssooooooooosss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键),其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0407] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eee-d10-eee的核苷酸序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d10”表示连续的10个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含3个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含10个连续的DNA核碱基和3’翼区包含3个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有sssssssssssssss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键),其中PPM1A AON的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0408] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eeee-d10-eeee的核苷序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d10”表示连续的10个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含4个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含10个连续的DNA核碱基和3’翼区包含4个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1AAON的核苷间键可以具有ssssooooooooossss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键),其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0409] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eeee-d10-eeee的核苷序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d10”表示连续的10个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含4个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含10个连续的DNA核碱基和3’翼区包含4个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有ssssssssssssssss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键),其中PPM1A AON的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞

嘧啶)。

[0410] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eeee-d8-eeee的核苷序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d8”表示连续的8个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含4个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含8个连续的DNA核碱基和3’翼区包含4个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有ssssooooooossss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键和“o”指磷酸二酯键),其中所有硫代磷酸酯键均在5’翼区或3’翼区和所有磷酸二酯键在PPM1A AON的中心区域。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0411] 在特定实施方式中,PPM1A AON具有eeee-d8-eeee的核苷序列(其中“e”表示2’-O-MOE修饰的核苷,其中“d8”表示连续的8个DNA核碱基序列)。在该实施方式中,5’翼区包含4个2’-O-MOE修饰的核苷,间隔区包含8个连续的DNA核碱基和3’翼区包含4个2’-O-MOE修饰的核苷。PPM1A AON的核苷间键可以具有sssssssssssssss的序列(其中“s”指硫代磷酸酯键),其中PPM1A AON的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,PPM1A AON包含未修饰的胞嘧啶。在各种实施方式中,PPM1A AON包含修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。在各种实施方式中,5’翼区和3’翼区的所有胞嘧啶均是修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。

[0412] PPM1A基因产物

[0413] 在通常情况下,本文公开的PPM1A AON包含具有核碱基序列的连接的核苷,其与PPM1A基因产物的一部分至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。在本文公开的发明的实施方式中,PPM1A抑制剂可以靶向一个或多个物种的PPM1A基因的PPM1A基因产物。例如,PPM1A抑制剂可以靶向哺乳动物PPM1A基因的PPM1A基因产物,例如,人(即,Homo sapiens)PPM1A基因、啮齿类动物PPM1A基因(例如,小鼠(Mus musculus)PPM1A基因)和/或灵长类动物PPM1A基因(例如,Macaca fascicularis PPM1A基因或Macaca mulatta PPM1A基因)。在特定实施方式中,PPM1A抑制剂靶向人PPM1A基因产物。PPM1A基因产物可以是,例如,RNA基因产物,例如,mRNA基因产物或PPM1A基因的蛋白产物。在一些实施方式中,PPM1A抑制剂包含与PPM1A基因或PPM1A RNA(例如,PPM1A mRNA)的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列。在一些实施方式中,PPM1A抑制剂包含与多个物种的PPM1A基因或PPM1A RNA(例如,PPM1A mRNA)共有的核苷酸序列的一部分互补的核碱基序列。例如,在一些实施方式中,PPM1A抑制剂是PPM1A反应治疗剂,例如,PPM1A反义寡核苷酸,其与人、小鼠和/或灵长类动物PPM1A基因或PPM1A mRNA共有的核苷酸序列互补。

[0414] 在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是由PPM1A基因序列(例如,NCBI参考序列NG_029698.1的PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1)或PPM1A编码序列)的核苷酸41,932至核苷酸42,787和由核苷酸44,874至核苷酸44,990转录的PPM1A mRNA或其部分。在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是与PPM1A mRNA或其部分具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的核苷酸序列,所述PPM1A mRNA由PPM1A基因序列(例如,

NCBI参考序列NG_029698.1的PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1)或PPM1A编码序列)的核苷酸41,932至核苷酸42,787和由核苷酸44,874至核苷酸44,990转录。

[0415] 在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是PPM1A mRNA,其由PPM1A基因序列(例如,NCBI参考序列NG_029698.1的PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1))的任一核苷酸8470-8926、41933-42787、44874-45990、49055-49164、50647-50704和51703-58336转录。在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是由PPM1A基因序列的编码区转录的PPM1A mRNA,如包含PPM1A基因序列(例如,NCBI参考序列NG_029698.1的PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1))的核苷酸8470-8926、41933-42787、44874-45990、49055-49164、50647-50704和51703-58336的编码区。在各种实施方式中,PPM1A mRNA是PPM1A mRNA转录变体1,其对应于NCBI参考序列NM_021003.5(SEQ ID NO:2864)。

[0416] 在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是PPM1A mRNA,其由PPM1A基因序列(例如,NCBI参考序列NG_029698.1的PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1))的任一核苷酸8470-8926、9629-9730、41933-42787和44874-47804转录。在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是由PPM1A基因序列的编码区转录的PPM1A mRNA,如包含PPM1A基因序列(例如,NCBI参考序列NG_029698.1的PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1))的核苷酸8470-8926、9629-9730、41933-42787和44874-47804的编码区。在各种实施方式中,PPM1A mRNA是PPM1A mRNA转录变体2,其对应于NCBI参考序列177951.2(SEQ ID NO:2865)。

[0417] 在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是PPM1A mRNA,其由PPM1A基因序列(例如,NCBI参考序列NG_029698.1的PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1))的任一核苷酸4999-5295、41933-42787、44874-44990、49055-49164、50647-50704、51703-58336转录。在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是由PPM1A基因序列的编码区转录的PPM1A mRNA,如包含PPM1A基因序列(例如,NCBI参考序列NG_029698.1的PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1))的核苷酸4999-5295、41933-42787、44874-44990、49055-49164、50647-50704、51703-58336的编码区。在各种实施方式中,PPM1A mRNA是PPM1A mRNA转录变体3,其对应于NCBI参考序列177952.2(SEQ ID NO:2866)。

[0418] 在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是核苷酸序列,其包含PPM1A mRNA转录变体1(即,例如,PPM1A mRNA转录变体1的核苷酸457-1429,对应于NCBI参考序列NM_021003.5)的核苷酸457-1429或其部分。在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是核苷酸序列,其与PPM1A mRNA转录变体1(即,例如,PPM1A mRNA转录变体1的核苷酸457-1429,对应于NCBI参考序列NM_021003.5)的核苷酸457-1429或其部分具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0419] 在本文所述的一些实施方式中,PPM1A基因产物是PPM1A mRNA亚型转录物(例如,PPM1A mRNA转录变体1,对应于NCBI参考序列NM_021003.5(SEQ ID NO:2864))或其部分。在本文所述的一些实施方式中,PPM1A基因产物是核苷酸序列,其与PPM1A mRNA亚型转录物(即,例如,PPM1A mRNA转录变体1,对应于NCBI参考序列NM_021003.5(SEQ ID NO:2864))或其变体具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0420] PPM1A mRNA转录变体1,对应于NCBI参考序列NM_021003.5(SEQ ID NO:2864)

[0421] 1 agaggcggcg gcggcggcgg tggcggcgct agggacggga gcgcgcgcgg gagctagaga

[0422] 61 gcagtggtct cggcgctcgt ccggcccgca gcttcgggtc ctcaggcggc tgttgctccg

[0423] 121 gaacgggtgg ttggggaggg gggggtgggg ggactctaga cagctgaggc gcgaaagcga

[0424] 181 tgagtcctcg gctcttcctc ctccttctcc gggacccgct ctctgcctcc ctctccaacg

[0425] 241 cccggatgat ctgagccgcg agggcgccga cagccggggg cccggacgca gcccggctcc

[0426] 301 tcccctcctc cgccccttcc ccagcctgac ctggcccgcc gctgcagcgg tgacccctcc

[0427] 361 cccggctgcc gccgtcgccg ccgcggtgac cccctccccg gctgccgccg ccgccgcctc

[0428] 421 ggccgaccag ggacctgccc gcctgcggct gctccggacc tagaggatca agacataatg

[0429] 481 ggagcatttt tagacaagcc aaagatggaa aagcataatg cccaggggca gggtaatggg

[0430] 541 ttgcgatatg ggctaagcag catgcaaggc tggcgtgttg aaatggagga tgcacatacg

[0431] 601 gctgtgatcg gtttgccaag tggacttgaa tcgtggtcat tctttgctgt gtatgatggg

[0432] 661 catgctggtt ctcaggttgc caaatactgc tgtgagcatt tgttagatca catcaccaat

[0433] 721 aaccaggatt ttaaagggtc tgcaggagca ccttctgtgg aaaatgtaaa gaatggaatc

[0434] 781 agaacaggtt ttctggagat tgatgaacac atgagagtta tgtcagagaa gaaacatggt

[0435] 841 gcagatagaa gtgggtcaac agctgtaggt gtcttaattt ctccccaaca tacttatttc

[0436] 901 attaactgtg gagactcaag aggtttactt tgtaggaaca ggaaagttca tttcttcaca

[0437] 961 caagatcaca aaccaagtaa tccgctggag aaagaacgaa ttcagaatgc aggtggctct

[0438] 1021 gtaatgattc agcgtgtgaa tggctctctg gctgtatcga gggcccttgg ggattttgat

[0439] 1081 tacaaatgtg tccatggaaa aggtcctact gagcagcttg tctcaccaga gcctgaagtc

[0440] 1141 catgatattg aaagatctga agaagatgat cagttcatta tccttgcatg tgatggtatc

[0441] 1201 tgggatgtta tgggaaatga agagctctgt gattttgtaa gatccagact tgaagtcact

[0442] 1261 gatgaccttg agaaagtttg caatgaagta gtcgacacct gtttgtataa gggaagtcga

[0443] 1321 gacaacatga gtgtgatttt gatctgtttt ccaaatgcac ccaaagtatc gccagaagca

[0444] 1381 gtgaagaagg aggcagagtt ggacaagtac ctggaatgca gagtagaaga aatcataaag

[0445] 1441 aagcaggggg aaggcgtccc cgacttagtc catgtgatgc gcacattagc gagtgagaac

[0446] 1501 atccccagcc tcccaccagg gggtgaattg gcaagcaaga ggaatgttat tgaagccgtt

[0447] 1561 tacaatagac tgaatcctta caaaaatgac gacactgact ctacatcaac agatgatatg

[0448] 1621 tggtaaaact gctcatctag ccatggagtt taccttcacc tccaaaggag agtacagctc

[0449] 1681 aactttgttg aaacttttaa catccatcct caactttaag gaaggggata tgacatgggt

[0450] 1741 gagaatgatt acatcagaga acttcagcag tacaacagct agcccagaac tgatttttt

[0451] 1801 ttttttttt gtaaatttga gacttatgta agcgtgattt caaaccataa ttcgtgttgt

[0452] 1861 aaatcagact ccagcaattt ttgttgtatg attttgtttt tttgtaaagt gtaattgtcc

[0453] 1921 ttgtacaaaa tgctcatatt taattatgaa ctgctttaaa tcactatcaa agttacaaga

[0454] 1981 aatgtttggc ttattgtgtg atgcaacaga tatatagccc tttcaagtca tgttgtgttt

[0455] 2041 ggacttgggg ttggaacagg gagagcagca gccatgtcag ctacacgctc aaatgtgcag

[0456] 2101 atgattatgg aaaataacct caaaatctta caaagctgaa catccaagga gttattgaaa

[0457] 2161 actatcttaa atgttcttgg taggggagtt ggcattgttg ataaagccag tcccttcatt

[0458] 2221 taactgtctt tcaggatgtt ccttcgttgt ttccatgagt attgcaggta ataatacagt

[0459] 2281 gtattcataa gaatctcaat cttggggcta aatgccttgt ttctttgcac ctcttttcaa

[0460] 2341 gtccttacat ttaattacta attgataagc agcagcttcc tacatatagt aggaaactgc

[0461] 2401 cacatttttg ctatcatgat tggctgggcc tgctgctgtt cctagtaaga tattctgaat

[0462] 2461 tccatttat caataaagct tgatttaaca aacaagaaac ttaatcatgt atgtgtaatt

[0463] 2521 cctcttttac cctggccttt taaaacactg tgccgttgta atgagacgtt tctcataggg

[0464] 2581 aaagatgtta gtctctttta attggacaac actgtcactc aaggcataga tgaaactttc

[0465] 2641 cttccattag aaagactaaa agatttaatt cttggttgta ccttaatcta ttttttaaat

[0466] 2701 aggtttcttt caggctgctt atttttcatt aagatgtgta tcagcttgga tttgcctact

[0467] 2761 gtttaattaa aatatttatt gtcaaagttt gacaatctaa cactctatgg taggggtgtg

[0468] 2821 tgtgtgtgtg tttgtgagtg tgtgtttgcc tgtgattttt aattggccca tgtctttaga

[0469] 2881 atccaagtgg ttaagatgta tttgtgattt gaaatatagc atgttgataa tatttagctg

[0470] 2941 ttggccttta caaataactt tcaaagctta aggaattgta gatataaaaa taacctaatt

[0471] 3001 taatttaggc ttaaattcct ctgattaagc atgtgaaagt aagttttaaa atctgtcgca

[0472] 3061 ttgaaaagat tactgttccg tgcccttctg tatttttgtc tctttaggtt gaatattgta

[0473] 3121 tttatcacca tgtaatcatt cagtaggcag attcccacta gaaaactgtt gaaatgtaag

[0474] 3181 actaaaatac aacattgaat acaaaatcaa aattttgtgt ataaaaacca gtatagtcca

[0475] 3241 ttttgttata tttgtttttt ccctaacttg gaaatataca tatttgtata tatagcctta

[0476] 3301 aaattaatgt aaagttaggg gagtagtggg gaaagtaatg tgaaatgtct cagatttaag

[0477] 3361 tagttaaata ccagcaaaat cttttcatta tccctcttat tttgtgaggt gattaaatgt

[0478] 3421 aacttaattg tatttaattt atatcttatt ccagcatgaa tgaggaaaaa ctgaagtact

[0479] 3481 atttatattt agaaattcat atcagttgaa attacagaac caattccata cttacaataa

[0480] 3541 atacttaatg tctaaatctg tggtagagtg cgaagtatga taatgttcta agttatggct

[0481] 3601 ttgcaagcat ctaaatgtgc atttaatgaa taccagtgct tctagtatag actaattacc

[0482] 3661 agacatactg gtactgaaag ctaaatccct attataacaa accagttcct taatatttta

[0483] 3721 agtagactga caactttagt tccagaaatt gcaaaacttt gaactggact gtgtaatctt

[0484] 3781 ttgagatgca aaacttaagt cacaagtaga gtatgtgatg gaaagctgta tttcaaacca

[0485] 3841 taacagcata tttagagcct tttttttttg agtctttaaa caagagaaaa ttaaaatatt

[0486] 3901 cctgtcaaaa ttattagtat tgaaattagg cttggacacg agagagaacc gtatttgagt

[0487] 3961 gatgtgagaa gactaaatct tttccacatg agtcagcact gccatactaa taatttttt

[0488] 4021 actataaaaa tacaggaagg aagtatacat tataacagca gactgtgtgt gttcctgatt

[0489] 4081 cctggaggta atagtggggg gaaaccaacc atactttta aaggcacttt tgcacctcta

[0490] 4141 ttgtgcactt cattcttgta ccacttaaat tcttcacccc catccccttt ttttgtgcta

[0491] 4201 attagcatct cagggcaatg cctcaaaaat gtttgatgtg ttctgttctt tggagggaaa

[0492] 4261 aagttcttat gtgatgataa tatagtactc aaaatatact tttatcattt aaatgtctta

[0493] 4321 tttgctgcta tgaataggaa ataacatttt gtatagcagg ctctgtttta ccctaacatt

[0494] 4381 aaaaaatttc actgatcttt ctttcattaa cagggtagaa tctcctaatt tccactttct

[0495] 4441 tgggaatata cttttataga caatagaagc agttctcaat attagcatat actttaaaaa

[0496] 4501 atcaaagtga taacttaatt cagctttgga agtatctcaa acatattttt actttatagt

[0497] 4561 gcattaactt gcttctagag tacttaatgc aactgctcta gccacttaat tttttatact

[0498] 4621 aatctcaaca ttaagaaatt tggattaagt aataaattag ttatgtaatt caagtaatct

[0499] 4681 gaattacagc agtactttta gtgatcattc ataggactat atattaaccc agctaataac

[0500] 4741 tcagtttttt tacaaaatgt ttcgagtatt attggtaaaa cactgttcta ggctaagcac

[0501] 4801 attgggactg taaagaaatg agtagatcct tggcttcaag tttacatctg gacaatttat

[0502] 4861 aatctagtgt atgttagtat tataactgga tcactcatca aaaaatatat atatatatct

[0503] 4921 attgcccacc tgctatctac caggtactta gctgatcaag gcaggcccct gccctaaaga

[0504] 4981 ccttgtttat acttccttta ctcacctgaa aactgttctc cagtttattt tcttctctct

[0505] 5041 aaagttaaag agtaattcag aagaaaattt tgcttagcat aagaataaaa ttggactgaa

[0506] 5101 gaggcttaag cccattcagt atccttgatt gcatttatcc aacggccttt attcttcctg

[0507] 5161 ctgacagcag taactcagag gaataggtag tagatttctg aaaattatcc agccatggaa

[0508] 5221 atgtaggtgg ggtttgagtt taaggcattt aaaaatgtaa atatctctag ctaaatttat

[0509] 5281 cttaagtaga actctgtgtt tttgtaacac actgccagtg ttaatatcaa attttagcca

[0510] 5341 aattattact atgtgtttta atattttaaa ataatttcac tgcccatctt tactggacaa

[0511] 5401 actcatttgg agttcaactt gtgatttctg aaagaactga tgaaattggg tactgctttt

[0512] 5461 tttctccatt tttcgttttg ttttaatttt gaatttcatg gtatatactt ttagttcaaa

[0513] 5521 ctcagctgtt tgtacagtat tgtattagga tttggtatta gaaaagatgt gtaaatatct

[0514] 5581 tagtatataa ttgtttctca tttgaggttt ttcttctaag ggaccttaaa gagttttata

[0515] 5641 tacttttgct cacagaaact gctggtgaga ttaccatttt ttgagtatct agtcttctag

[0516] 5701 tttttctttt aggcattagg aagccttctt tagagttcaa aattttagaa gcctaatttg

[0517] 5761 ctcttacttc cttcaattat gtgccatgtg ttttggtttg tatatgtttt aaattgtata

[0518] 5821 tttccttgga atatgcttga aatatttaag aatacatttt caaaatgtat aatactgtat

[0519] 5881 tgttttgttg atcagaataa taagtctcag ttaaatgttt gttattactg atagtcaaaa

[0520] 5941 tgctcaatag aaatgatgag aggcattggt tccaattcat tgtcaaatga acgttttcta

[0521] 6001 attttgttca cagattcttt ccctttcgat tgttctgtat gttaagatag tggcttctgc

[0522] 6061 tctcactgtt ttcctattta tattactagc aggtaggagt gctaattaga aaaacttaga

[0523] 6121 tggtattgaa attacagttg acaacttata tttttatgag atggagaaaa aagattaagt

[0524] 6181 tgatataaca acaaagtgga ctttttttct tccttatcct gcacgaaata ttgcccttgt

[0525] 6241 ttcctctact ttcctcttgg tgttttctct ttttttcaaa cagaaacagg ccaattccat

[0526] 6301 tttcttgagc aagaaagctt agtgtgttac ttcatcaagg ccagctaata ctgtgttaaa

[0527] 6361 ccgggctgaa aatgagaaaa cttgggagat ggaggaatgg ggaaatggca gtgggatagg

[0528] 6421 tagggaagga ttactcttaa ttgttttaaa agccatagga aagtcttcct tgtacgtggc

[0529] 6481 tgtaaattta taagaactat tgtgtcacat aaaccaacaa gaatgaacct ttgctgcttc

[0530] 6541 agataatttg atttttccag caaggaaatt aataagttac tgattcttca gcatagaaac

[0531] 6601 aactgagaag aattaatgca atgtttcttc actagaaaac ccaacccttc atttcttttc

[0532] 6661 attgctccaa aacccagttt tcaactaatg gttttctcat taaactaaat gtttagaaaa

[0533] 6721 gttgtttaga gtttttcttt ttcttttaca tagtcctcct gatccagtat aagactattt

[0534] 6781 agtaacgtgc atttgtatgg tactatctaa agtaagttag attgatgtaa gagatcgggt

[0535] 6841 agctgcggaa caaaattagt tatatcctaa ttaggtacag tgaatgacac aaaatcattt

[0536] 6901 tagcaatgct tcttaacctt ttggggtcac aggcgttttg agactgatga atcctaggga

[0537] 6961 cttatttacc caggaaaatg cgtatataac atacatatct ccctaaagtt tacaatattg

[0538] 7021 tagtggttca tgggcccccc ggttaagagc ccattctaaa gtacaatagg gcatcatccc

[0539] 7081 ttttcctgca aagcccaaaa gtatatttct agggcatgaa aataacttga gtctatttta

[0540] 7141 aggaattgtt tcactctaga ggtagatagg ggacctggct agaatctgac attaaaatat

[0541] 7201 acttttaaa aaatattata tttggggtgg ggaaagtgat taaaaggtga aaaaaaaaca

[0542] 7261 tagtattcag aagttttgga ggttaatgtc tttctctaag atttgccact ttagaaattc

[0543] 7321 aacagaaaag aggtaaaaca gaaatggaat gtatctggaa catttttggc ctccatagtg

[0544] 7381 cagatatact atattaacaa gtaatacatt tatttacctg tcagatctcc aggttttaag

[0545] 7441 attttgagct ttctagtatt aggattcatt aaatgttcaa ttcatttcat attctaagga

[0546] 7501 attaggttat ttacttacta attcaggatg ttaaaataac atccaagtcg gacaaccacc

[0547] 7561 accaatgcac acagttaatg agatttctaa aatataataa gtacaatgta acaaacgtat

[0548] 7621 agaattttgc atttgttgcc aaaattagat gtttaatgac agcttattta attcccattt

[0549] 7681 gtgggacttc tggaacatag aaaccattat cttacctggt tatcccttga ctaaatagca

[0550] 7741 tatctgcagg aaaatatctt gtttgtagtg atatgcccca atagtgattg atttcactct

[0551] 7801 tgaaatgagt tatatcactt aatttgtata aatgttatga gtggagagac atgtacatgt

[0552] 7861 taaaagcatg ttgcattata tattcatttt ttaaactcta taaatgttaa gaataatata

[0553] 7921 attgcagaaa tatttttctt aaatacaatg tgtaacaaaa ttctccgtag caactcaccc

[0554] 7981 actttgcagt ttatgtgatc cacactttta aagaaattcc ataaatgtat attttgtatt

[0555] 8041 atgtattatt tcctggtcca aagaaaatat gtgaattcag ttctaacttt aagaatgtac

[0556] 8101 tgtttgtttt caagttcatt gaaaaattgc attcagcctg cgaatggttg cagattgtat

[0557] 8161 gttagatgaa aagtagaaat aatttctagt ttggaaaact ggtgccacta aataaacagg

[0558] 8221 caattacata a(SEQ ID NO:2864)

[0559] 在本文所述的一些实施方式中,PPM1A基因产物是PPM1A mRNA亚型转录物(例如,PPM1A mRNA转录变体2,对应于NCBI参考序列NM_177951.2(SEQ ID NO:2865))或其部分。在本文所述的一些实施方式中,PPM1A基因产物是核苷酸序列,其与PPM1A mRNA亚型转录物(例如,PPM1A mRNA转录变体2,对应于NCBI参考序列NM_177951.2(SEQ ID NO:2865))或其部分具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0560] 在本文所述的一些实施方式中,PPM1A基因产物是PPM1A mRNA亚型转录物(例如,PPM1A mRNA转录变体3,对应于NCBI参考序列NM_177952.2(SEQ ID NO:2866))或其部分。在本文所述的一些实施方式中,PPM1A基因产物是核苷酸序列,其与PPM1A mRNA亚型转录物(例如,PPM1A mRNA转录变体3,对应于NCBI参考序列NM_177952.2(SEQ ID NO:2866))或其部分具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0561] 在本文所述的一些实施方式中,PPM1A基因产物是Mus musculus PPM1A mRNA亚型转录物(例如,Mus musculus PPM1A mRNA α亚型转录物,对应于NCBI参考序列NM_008910.3

(SEQ ID NO:2867))或其部分。在本文所述的一些实施方式中,PPM1A基因产物是核苷酸序列,其与PPM1A mRNA亚型转录物(例如,Mus musculus PPM1A mRNA α亚型转录物,对应于NCBI参考序列NM_008910.3(SEQ ID NO:2867))或其部分具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性或100%同一性。

[0562] 在本公开内容的一些实施方式中,PPM1A基因产物是上文所述的PPM1A转录物以外的PPM1A mRNA转录变体(例如,PPM1A mRNA转录变体1,对应于NCBI参考序列NM_021003.5(SEQ ID NO:2864),PPM1A mRNA转录变体2,对应于NCBI参考序列NM_177951.2(SEQ ID NO:2865),PPM1A mRNA转录变体3,对应于NCBI参考序列NM_177952.2(SEQ ID NO:2866)或Mus musculus PPM1A mRNA α亚型转录物,对应于NCBI参考序列NM_008910.3(SEQ ID NO:2867))。在一些实施方式中,PPM1基因产物是核苷酸序列,其与PPM1A mRNA转录变体1,对应于NCBI参考序列NM_021003.5(SEQ ID NO:2864),PPM1A mRNA转录变体2,对应于NCBI参考序列NM_177951.2(SEQ ID NO:2865),PPM1A mRNA转录变体3,对应于NCBI参考序列NM_177952.2(SEQ ID NO:2866)或Mus musculus PPM1A mRNA α亚型转录物,对应于NCBI参考序列NM_008910.3(SEQ ID NO:2867)的核苷酸的核苷酸同源性具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性或100%同一性。在一些实施方式中,PPM1A基因产物是核苷酸序列,其与PPM1A mRNA转录变体1(即,SEQ ID NO:2864的核苷酸457-1429)或其部分的核苷酸457-1429的核苷酸同源性具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。

[0563] 靶向PPM1A基因产物的PPM1A AON

[0564] 在各种实施方式中,本文公开的PPM1A AON,如具有SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863的任一序列的PPM1A AON或具有SEQ ID NO:2868-2959的任一序列的PPM1A隔离体AON靶向PPM1A基因产物的特定部分,如PPM1A mRNA转录物(例如,SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865、SEQ ID NO:2866或SEQ ID NO:2867的任一个)。在一些实施方式中,PPM1A AON可以是寡核苷酸序列,其与PPM1A基因产物的一部分或与PPM1A基因序列至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。在本文所述的一些实施方式中,PPM1A AON靶向PPM1A基因产物的特定部分,如PPM1A mRNA转录物。由PPM1A AON靶向的PPM1A mRNA转录物的不同实施方式下面将更详细地描述。例如,如本文所描述的,PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷,其与PPM1A基因产物(例如,PPM1A mRNA转录物)至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%互补。在一些实施方式中,PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷,其与PPM1A基因产物(例如,PPM1A mRNA转录物)100%互补。在一些实施方式中,PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷,其与PPM1A基因序列或PPM1A mRNA序列的外显子的核苷酸序列至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%互补。在一些实施方式中,PPM1A AON包含含有核碱基序列的

连接的核苷酸，其与PPM1A基因序列或PPM1A mRNA序列的外显子的核苷酸序列100％互补。在一些实施方式中，PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷，其与PPM1A mRNA序列的非翻译区(UTR)的核苷酸序列(例如，PPM1A mRNA序列的5'UTR或3'UTR)至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％互补。在一些实施方式中，PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷，其与PPM1A mRNA序列的非翻译区(UTR)的核苷酸序列(例如，PPM1A mRNA序列的5'UTR或3'UTR)100％互补。

[0565] 在一些实施方式中，PPM1A AON靶向PPM1A基因产物的特定部分，PPM1A基因产物的特定部分具有10个核碱基的长度。在一些实施方式中，PPM1A AON靶向PPM1A基因产物的特定部分，PPM1A基因产物的特定部分具有11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核碱基的长度。

[0566] 在一些实施方式中，本文公开的PPM1A AON靶向PPM1A基因产物的连续核碱基部分，如PPM1A mRNA转录物(例如，SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865、SEQ ID NO:2866或SEQ ID NO:2867的任一个)。在各种实施方式中，PPM1A AON与PPM1A mRNA转录物(例如，SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865、SEQ ID NO:2866或SEQ ID NO:2867的任一个)的连续15至50个核碱基部分至少90％互补。在各种实施方式中，PPM1A AON与PPM1A mRNA转录物(例如，SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865、SEQ ID NO:2866或SEQ ID NO:2867的任一个)的连续15至50个核碱基部分至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％互补。在各种实施方式中，PPM1A AON与PPM1A mRNA转录物(例如，SEQ ID NO:2864、SEQ ID NO:2865、SEQ ID NO:2866或SEQ ID NO:2867的任一个)连续16至45个核碱基部分、17至35个核碱基部分、18至30个核碱基部分、19至28个核碱基部分或20至25个核碱基部分至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％互补。

[0567] 在一些实施方式中，PPM1A AON靶向PPM1A基因产物的特定部分，PPM1A基因产物的特定部分包含PPM1A mRNA转录变体1(SEQ ID NO:2864)的核苷酸457-1429。在一些实施方式中，PPM1A AON靶向PPM1A mRNA转录变体1(SEQ ID NO:2864)的核苷酸457-1429的特定部分。在一个实施方式中，PPM1A AON包含具有核碱基序列的连接的核苷，其具有至少10个连续核碱基的一部分，其与PPM1A mRNA转录变体1(SEQ ID NO:2864)的核苷酸457-1429的核碱基的等长部分至少90％互补。在一个实施方式中，PPM1A AON包含具有核碱基序列的连接的核苷，其具有至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18或至少19个连续核碱基的一部分，其与PPM1A mRNA转录变体1(SEQ ID NO:2864)的核苷酸457-1429的核碱基的等长部分至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％互补。

[0568] 在各种实施方式中，PPM1A AON靶向SEQ ID NO:2864的位置542-814、895-1006、1025-1117或1361-1407的任一个。在一个实施方式中，PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷，其与SEQ ID NO:2864的位置542-814、895-1006、1025-1117或1361-1407中核碱基的等长部分至少90％互补。在一个实施方式中，PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷，其具有至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18或至少19个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的位置542-814、895-1006、1025-1117或1361-1407中核碱基的等长部分至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少

96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％互补。

[0569] 在各种实施方式中，PPM1A AON靶向SEQ ID NO:2864的位置542-561、555-574、559-578、599-618、602-621、603-622、604-623、605-624、606-625、607-626、608-627、609-628、625-644、642-661、644-663、646-665、648-667、650-669、652-671、655-674、656-675、708-727、709-728、794-813、795-814、895-914、900-919、905-924、910-929、915-934、962-981、967-986、972-991、977-996、987-1006、1025-1044、1030-1049、1034-1053、1040-1059、1045-1064、1098-1117、1361-1380、1366-1385、1371-1390、1378-1397和1386-1405的任一个。在一个实施方式中，PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷，其具有至少10个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的位置542-561、555-574、559-578、599-618、602-621、603-622、604-623、605-624、606-625、607-626、608-627、609-628、625-644、642-661、644-663、646-665、648-667、650-669、652-671、655-674、656-675、708-727、709-728、794-813、795-814、895-914、900-919、905-924、910-929、915-934、962-981、967-986、972-991、977-996、987-1006、1025-1044、1030-1049、1034-1053、1040-1059、1045-1064、1098-1117、1361-1380、1366-1385、1371-1390、1378-1397和1386-1405中核碱基的等长部分至少90％互补。在一个实施方式中，PPM1A AON包含含有核碱基序列的连接的核苷，其具有至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18或至少19个连续核碱基的一部分，其与SEQ ID NO:2864的位置542-561、555-574、559-578、599-618、602-621、603-622、604-623、605-624、606-625、607-626、608-627、609-628、625-644、642-661、644-663、646-665、648-667、650-669、652-671、655-674、656-675、708-727、709-728、794-813、795-814、895-914、900-919、905-924、910-929、915-934、962-981、967-986、972-991、977-996、987-1006、1025-1044、1030-1049、1034-1053、1040-1059、1045-1064、1098-1117、1361-1380、1366-1385、1371-1390、1378-1397和1386-1405中核碱基的等长部分至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％互补。

[0570] 核酸酶介导的PPM1A抑制

[0571] 在一个方面中，本公开内容提供了降低PPM1A表达的核酸酶。在一些实施方式中，核酸酶可以是锌指核酸酶(ZFN)、大范围核酸酶、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)或成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白。

[0572] 在某些实施方式中，使用锌指核酸酶(ZFN)实现PPM1A抑制。合成ZFN由与例如FokI DNA切割结构域融合的锌指结合结构域组成。ZFN可以被设计/工程化用于编辑细胞的基因组，包括但不限于在广泛生物体中敲除或敲入基因表达。大范围核酸酶、TALEN或CRISPR相关蛋白可用于在患有或处于神经疾病风险中的患者的细胞中进行基因组工程，包括神经元，例如，运动神经元和神经系统的其他细胞。所述试剂可用于靶向启动子、蛋白编码区(外显子)、内含子、5’和3’UTR等。

[0573] CRISPR基因组编辑通常包含两个不同组分：(1)向导RNA和(2)核酸内切酶，特别是CRISPR相关(Cas)核酸酶(例如，Cas9)。向导RNA是内源性细菌crRNA和tracrRNA组合成单个嵌合向导RNA(gRNA)转录物。不受理论束缚，据信当gRNA和Cas在细胞中表达时，基因组靶序列可以被修饰或永久破坏。

[0574] 通过gRNA序列和PPM1A基因中目标DNA序列的互补序列之间的碱基配对，可以将gRNA/Cas复合物募集到靶序列，例如，PPM1A基因。适当基因组靶序列包含紧接在靶序列之

后的原型间隔相邻基序(PAM)序列。gRNA/Cas复合物的结合将Cas定位到PPM1A靶序列,允许野生型Cas切割两条DNA链,导致双链断裂。双链断裂通过两种一般修复途径之一进行修复:(1)非同源末端连接DNA修复途径或(2)同源定向修复途径。非同源修复途径可导致双链断裂处的插入/缺失,从而导致移码和/或过早终止密码子,从而有效地破坏靶基因的开放阅读框架。同源定向修复途径需要修复模板,用于修复双链断裂。

[0575] 在某些实施方式中,使用CRISPR基因组编辑降低PPM1A表达。在一些实施方式中,将gRNA对用于靶向PPM1A基因以降低和/或消除PPM1A的表达。在某些实施方式中,将一对gRNA用于减少PPM1A表达。在某些其他实施方式中,将多对gRNA用于减少PPM1A表达。gRNA对可以使用公知技术并基于PPM1A基因序列进行设计。在某些实施方式中,gRNA序列可以包含修饰,如gRNA的5'和3'末端的末端三个核苷酸中的2'O-甲基类似物和3'硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0576] 神经疾病

[0577] 本文所述的方法可以用于治疗神经疾病,包括但不限于,肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。

[0578] 运动神经元疾病是一组以运动神经元功能丧失为特征的疾病,运动神经元协调大脑肌肉的自主运动。运动神经元疾病可能影响上和/或下运动神经元,并且可能具有散发性或家族性来源。运动神经元疾病包括肌萎缩侧索硬化症(ALS或Lou Gehrig氏病)、进行性延髓麻痹、假性延髓麻痹、进行性肌肉萎缩、原发性侧索硬化症、脊髓性肌萎缩、脊髓灰质炎后综合征和伴有额颞叶痴呆的ALS。

[0579] 运动神经元疾病的症状包括肌肉衰退或衰弱、肌肉疼痛、痉挛、口齿不清、吞咽困难、失去肌肉控制、关节疼痛、四肢僵硬、呼吸困难、流口水和完全失去肌肉控制,包括呼吸、吞咽、进食、说话和肢体运动等基本功能。这些症状有时还伴有抑郁、记忆丧失、计划困难、语言缺陷、行为改变以及难以评估空间关系和/或人格变化。

[0580] 运动神经元疾病可以由熟练的临床医生,例如,神经科医生,使用各种工具和测试来评估和诊断。例如,运动神经元疾病的存在或发展风险可以通过血液和尿液测试(例如,检测肌酐激酶存在的测试)、磁共振成像(MRI)、肌电图(EMG)、神经传导研究(NCS)、脊椎穿刺、腰椎穿刺和/或肌肉活检来评估或诊断。运动神经元疾病可以借助身体检查和/或神经系统检查来诊断,以评估运动和感觉技能、神经功能、听力和言语、视力、协调和平衡、精神状态以及情绪或行为的变化。

[0581] 肌萎缩侧索硬化症

[0582] ALS是一种进行性运动神经元疾病,会破坏所有随意肌的信号。ALS会导致上运动神经元和下运动神经元的萎缩。ALS的症状包括延髓肌肉衰弱和消瘦、全身和双侧力量丧失、痉挛、肌肉痉挛(spasm)、肌肉痉挛(cramp)、肌束震颤、口齿不清、呼吸困难或呼吸能力丧失。一些患有ALS的个体也具有认知能力下降。在分子水平上,ALS的特征是运动神经元细

胞质中的蛋白和RNA聚集体，包含RNA结合蛋白TDP43的聚集体。

[0583] ALS最常见于40岁以上的男性，但也可能发生在女性和儿童身上。吸烟、接触铅等化学品或曾在军队服役的人患ALS的风险也会增加。大多数ALS病例是散发性的，而只有约10％的病例是家族性的。ALS的原因包括散发性或遗传性基因突变、谷氨酸水平高、蛋白处理不当。与ALS相关的基因突变包括基因SOD1、C9orf72、TARDP、FUS、ANG、ATXN2、CHCHD10、CHMP2B、DCTN1、ERBB4、FIG4、HNRPA1、MATR3、NEFH、OPTN、PFN1、PRPH、SETX、SIGMAR1、SMN1、SPG11、SQSTM1、TBK1、TRPM7、TUBA4A、UBQLN2、VAPB和VCP的突变。

[0584] 额颞叶痴呆

[0585] 额颞叶痴呆(FTD)是一种影响大脑额叶和颞叶的痴呆症。其平均发病年龄比阿尔茨海默氏病更早-40岁。FTD的症状包括行为和性格的极端变化、言语和语言问题，以及与运动相关的症状，如震颤、僵硬、肌肉痉挛、虚弱和吞咽困难。FTD的亚型包括行为变异性额颞叶痴呆(bvFTD)，其特征是人格和行为的变化和原发性进行性失语症(PPA)，其会影响语言技能、口语、写作和理解能力。FTD与tau蛋白积累(Pick体)和TDP43功能改变的功能有关。大约30％的FTD病例是家族性的，除了该疾病的家族史之外，没有其他风险因素是已知的。与FTD相关的基因突变包括在基因C9orf72、颗粒体蛋白前体(GRN)、微管相关蛋白tau(MAPT)、UBQLN2、VPC、CHMP2B、TARDP、FUS、ITM2B、CHCHD10、SQSTM1、PSEN1、PSEN2、CTSF、CYP27A1、TBK1和TBP中的突变。

[0586] 伴有额颞叶痴呆的肌萎缩侧索硬化症(伴有FTD的ALS)是一种临床综合征，其中FTD和ALS发生在同一个体中。有趣的是，C9orf72突变是家族性ALS和FTD的最常见原因。此外，TBK1、VCP、SQSTMI、UBQLN2和CHMP2B的突变也与伴有FTD的ALS相关。伴有FTD的ALS的症状包括人格的显着变化，以及肌肉无力、肌肉萎缩、肌束震颤、痉挛、构音障碍、吞咽困难以及脊髓、运动神经元以及大脑额叶和颞叶的退化。在分子水平上，伴有FTD的ALS的特征是TDP-43和/或FUS蛋白的积累。TBK1突变与ALS、FTD和伴有FTD的ALS相关。

[0587] TBK1和RIPK1的功能

[0588] 在一个方面中，本文所述的方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂以改变基因或基因产物(例如，mRNA或蛋白)的活性、功能或其他特征。例如，本文所述的方法包括增加或减少或抑制基因或基因产物的活性、功能或其他特征的方法。例如，本文描述的是增加TANK结合激酶1(也称为丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶TBK1；“TBK1”)残基磷酸化的方法。例如，本文描述的是增加细胞中TBK1丝氨酸残基172(ser172)磷酸化的方法，其中所述方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂。在一些实施方式中，患有ALS、FTD或伴有FTD的ALS患者的细胞中TBK1 ser172磷酸化增加。在一些实施方式中，增加TBK1 ser172磷酸化的方法包括将细胞暴露于SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸。

[0589] 本文还描述了增加细胞中TBK1功能的方法，其中所述方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂。例如，本文描述的是增加细胞中TBK1功能的方法，其中所述方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂。在一些实施方式中，在患有ALS、FTD或伴有FTD的ALS患者的细胞中，TBK1功能增加。在一些实施方式中，增加TBK1功能的方法包括将细胞暴露于SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸。

[0590] Tank结合激酶1(TBK1)是一种IKK激酶家族,可诱导1型干扰素活性并在自噬衔接子的磷酸化中起主要作用。TBK1的突变被认为会导致自噬受损并导致蛋白聚集体和ALS病理的累积。在ALS、FTD或伴有FTD的ALS患者中已鉴定出了在TBK1中的至少92个突变(参见Oakes等,(2017)“TBK1:a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation”Molecular Brain 10:5,pg.1-10)。此外,除了C9orf72、OPTN、SQSTM1/p62、UBQLN2和TDP43中的突变外,TBK1中的突变约占ALS和FTD患者的15%。此外,与功能突变丧失相关的TBK1单倍体不足已被鉴定为家族性ALS的主要驱动因素(参见Freischmidt等,(2015)“Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia”Nature Neuroscience,18(5):631-6)。

[0591] 自噬是泛素化蛋白和受损细胞器降解和回收的过程。异常蛋白聚集体是ALS病理学的一个标志,几个参与调控自噬的基因突变与ALS相关(例如,SQSTM1、SOD1、OPTN、VCP、UBQLN2和TBK1)。因此,自噬的破坏似乎有助于ALS病理学。

[0592] TBK1的Ser172残基磷酸化导致TBK1的构象变化,从而允许底物与蛋白的激酶结构域结合。TBK1磷酸化很多自噬衔接子,在ALS患者中鉴定的几个TBK1突变抑制了TBK1磷酸化这些衔接子的能力。其他TBK1突变导致mRNA和蛋白水平降低。此外,携带TBK1突变的个体也在不同的大脑区域显示TDP43阳性聚集体。因此,TBK1突变可能导致自噬减少和运动神经元中蛋白聚集体的积累。

[0593] PPM1A是丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶PP2C家族的成员。PP2C家族成员是细胞应激反应通路的负调控因子,参与调控细胞周期和NF-κB通路。PPM1A还使TBK1去磷酸化和失活。特别地,PPM1A使TBK1的Ser172去磷酸化。活化的TBK1可以磷酸化RIPK1,从而使RIPK1失活。因此,PPM1A间接使RIPK1失活。

[0594] 本公开内容部分地基于以下发现:增加TBK1活性,例如,增加患有TBK1单倍体不足的个体或个体的细胞中的TBK1活性,可用作治疗神经疾病的机制,例如,肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

[0595] 本公开内容部分地基于以下发现:增加TBK1活性,例如,增加患有TBK1单倍体不足的个体或个体的细胞中的残留TBK1活性,可以通过增加磷酸化TBK1的量来实现,例如,通过增加磷酸化Ser172 TBK1的量,例如,个体和/或患有TBK1单倍体不足的个体的细胞。本公开内容部分地基于以下发现:增加TBK1活性,例如,增加患有TBK1单倍体不足的个体或个体的细胞中的残留TBK1活性,可以通过增加磷酸化TBK1与总TBK1的比例来实现,例如,增加磷酸化Ser172 TBK1与未磷酸化Ser172 TBK1的比例,例如,个体和/或患有TBK1单倍体不足的个体的细胞。

[0596] 本公开内容进一步部分基于以下发现:增加TBK1活性(例如,增加个体和/或患有TBK1单倍体不足的个体的细胞中的残留TBK1活性),增加磷酸化TBK1的量(例如,增加磷酸化Ser172 TBK1的量,例如,在个体和/或患有TBK1单倍体不足的个体的细胞中),和/或增加

磷酸化TBK1与未磷酸化TBK1的比例(例如,增加磷酸化Ser172 TBK1的比率,例如,在个体和/或患有TBK1单倍体不足的个体的细胞中)可以通过抑制PPM1A活性和/或降低PPM1A蛋白水平来实现,例如,在患有TBK1单倍体不足的个体和/或个体的细胞中。不受理论束缚,据信抑制PPM1A活性和/或降低PPM1A蛋白水平可以通过向患者或患者的细胞施用PPM1A抑制剂,例如,本文所述的PPM1A抑制剂来实现。在特定实施方式中,本公开内容提供了抑制PPM1A活性和/或减少PPM1A蛋白的量的方法,通过向患者或患者的细胞(例如,患有神经疾病的患者或者患有神经疾病的患者的细胞,例如,肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病)施用PPM1A AON,例如,包含SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A AON。

[0597] 本文还公开了一种调节受体相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶1(也称为"RIPK1")活性的方法。例如,本文描述的是一种调节细胞中RIPK1活性的方法,其中所述方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂。在各种实施方式中,调控RIPK1的活性可用于治疗各种疾病,包括急性神经元损伤、多发性硬化症、ALS、阿尔茨海默氏病、溶酶体贮积症、帕金森氏病和其他人类中枢神经系统疾病。在一些实施方式中,在患有ALS、FTD或伴有FTD的ALS的患者中,RIPK1活性受到调节。在一些实施方式中,调节RIPK1活性的方法包括将细胞暴露于SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸。

[0598] TBK1通过在包括Thr189在内的多个位点直接磷酸化来调控RIPK1,从而通过阻断与其底物的相互作用来抑制RIPK1激酶活性。Degterev,A.等,Targeting RIPK1 for the Treatment of Human Diseases,PNAS(2019),116(20)9714-9722。因此,通过增加TANK结合激酶1残基的磷酸化来增加TBK1功能可导致RIPK1活性的抑制。

[0599] 治疗方法

[0600] 本公开内容部分地涉及在有需要的患者中治疗神经疾病(例如,肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病),包括施用公开的PPM1A抑制剂,例如,PPM1A AON。在一些实施方式中,本文提供了在有需要的患者中治疗神经疾病的方法,包括施用公开的PPM1A抑制剂。在本公开内容的一些实施方式中,可以向有需要的患者施用有效量的公开的PPM1A抑制剂以治疗神经疾病,例如,以恢复患有神经疾病的患者细胞中的自噬,和/或减少或抑制PPM1A。在本公开内容的一些实施方式中,可以向有需要的患者施用有效量的公开的PPM1A抑制剂以增加细胞中TBK1磷酸化(例如,TBK1 ser172磷酸化)和/或以

增加细胞中TBK1的功能(例如,TBK1激酶功能)。

[0601] 在一些实施方式中,提供了在有需要的患者中治疗与自噬受损和/或蛋白聚集(例如,TDP-43蛋白聚集,例如,在运动神经元中)相关的神经疾病的方法,包括施用所公开的化合物。在一些实施方式中,治疗神经疾病包括至少改善或减轻与神经疾病相关的一种症状(例如,减轻ALS患者的肌肉无力)。提供了在患有所述疾病的患者中治疗神经疾病(例如,肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病)的方法,其包括施用所公开的PPM1A抑制剂,例如,PPM1A AON。在一些实施方式中,提供了减缓神经疾病(例如,运动神经元疾病)进展的方法。

[0602] 本文提供了在有需要的受试者中治疗神经疾病、降低发生神经疾病的风险或延迟其发作的方法,包括施用公开的PPM1A抑制剂,例如,PPM1A AON。所述方法包括,例如,治疗处于发展成神经疾病风险中的受试者;例如,向所述受试者施用有效量的所公开的PPM1A AON。在该方法中可以治疗的神经疾病包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

[0603] 本公开内容的一部分是预防或治疗神经疾病(例如,肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病)的方法。此类方法可以包括向有需要的患者或处于风险中的患者施用药物制剂,其包含PPM1A AON,如本文公开的PPM1A AON。例如,提供了预防或治疗神经疾病的方法,包括向有需要的患者施用本文公开的PPM1A AON。

[0604] 在施用PPM1A抑制剂,例如,1天、2天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月或者更长时间后,使用上述方法治疗的患者可以出现在靶细胞(例如,运动神经元)中PPM1A的量降低至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或甚至95%。可以例如至少每天施用这种PPM1A抑制剂。PPM1A抑制剂可以口服施用。在一些实施方式中,PPM1A抑制剂通过鞘内或脑池内施用。例如,在本文所述的一个实施方式中,PPM1A抑制剂大约每3个月鞘内或脑池内施用。与不施用PPM1A抑制剂(如本文公开的一个)的患者相比,由于施用本文公开的PPM1A抑制剂而导致患者神经疾病

的临床表现或恶化延迟可以是至少例如6个月、1年、18个月或甚至2年或更长。

[0605] 在另一个方面中，本公开内容提供了预防、改善和/或治疗神经疾病(例如，运动神经元疾病)的方法。例如，本文描述了预防、改善和/或治疗ALS、FTD和伴有FTD的ALS的方法。在一些实施方式中，本公开内容提供了在患者中治疗神经疾病的方法，例如，在需要治疗神经疾病的患者中，其中所述方法包括向所述患者施用PPM1A抑制剂。在一些实施方式中，神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。

[0606] 在一些实施方式中，患者是哺乳动物，例如，人、灵长类、犬、猫、马、奶牛、山羊、绵羊、小鼠或大鼠。在特定实施方式中，患者是人患者，例如，需要治疗神经疾病的人患者，例如，ALS、FTD或伴有FTD的ALS。在一些实施方式中，患者是处于发展成神经疾病的风险中的患者，例如，ALS、FTD或伴有FTD的ALS。在一些实施方式中，患者是患有神经疾病的患者，例如，ALS、FTD或伴有FTD的ALS。在一些实施方式中，患者是显示出与神经疾病相关症状的患者，例如，ALS、FTD或伴有FTD的ALS。

[0607] 在另一个方面中，本文描述的是改变或恢复细胞功能或活性的方法，例如，运动神经元的细胞功能或活性。例如，本文描述的是一种改变或恢复有神经疾病风险或患有神经疾病的患者的运动神经元的细胞功能或活性的方法，例如，肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。在一些实施方式中，所述方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂，例如，PPM1A反义寡核苷酸。在一些实施方式中，所述方法包括在体内或离体将细胞暴露于PPM1A抑制剂。

[0608] 在本文所述的一个实施方式中，本公开内容提供了一种增加或恢复细胞中自噬的方法，其中所述方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂或使细胞与PPM1A抑制剂接触。在一些实施方式中，所述细胞是需要治疗神经疾病的患者的细胞。在一些实施方式中，神经疾病的以下任一者：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。在一些实施方式中，在体内或离体进行暴露或接触。例如，在本文所述的一个实施方式中，患有ALS、FTD或伴有FTD的ALS的患者细胞暴露于或与PPM1A抑制剂接触，例如，PPM1A反义治

疗剂,例如,SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸。

[0609] 本发明的PPM1A抑制剂例如PPM1A AON可以单独使用或彼此组合使用,其中至少两种本发明的PPM1A抑制剂在单一组合物中或作为治疗方案的一部分一起使用。本发明的PPM1A抑制剂也可以与其他药物联合使用以治疗神经疾病或病症。

[0610] 在各种实施方式中,治疗神经疾病的方法包括选择使用本文公开的PPM1A抑制剂治疗的患者。选择患者进行治疗可以包括测量某些神经疾病标志物的存在或表达水平。标志物的实例包括轻神经丝(NEFL)、重神经丝重(NEFH)、磷酸化神经丝重链(pNFH)、TDP-43或$p75^{ECD}$。此类标志物可以从血浆、脊髓液、脑脊液、细胞外囊泡(例如,CSF外泌体)、血液、尿液、淋巴液、粪便或患者的组织中测量。

[0611] 在特定实施方式中,通过测量脑脊液(CSF)中的磷酸化神经丝重链(pNFH)来选择要治疗的患者。在特定实施方式中,患者脑脊液中的pNFH用于预测C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者在初始施用后和/或持续治疗期间的疾病状态和存活率。

[0612] 在一些实施方式中,选择患者进行治疗可以包括确定患者是否表达疾病相关基因的突变。例如,疾病相关基因可以是ALS相关基因,选自以下任一者:TBK1、TARDBP、SQSTM1、VCP、C9orf72、FUS和CHCHD10。例如,根据确定患者包含疾病相关基因中的一个或多个突变,可以将该患者鉴定为用于治疗的候选患者。

[0613] 在各种实施方式中,可以向选择用于治疗的患者施用本文公开的PPM1A抑制剂和/或其药物组合物。

[0614] 治疗和评价

[0615] 在另一个方面中,本文所述的方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂以抑制或降低基因或基因产物例如mRNA或蛋白的活性或功能。例如,本文描述的是一种抑制细胞中PPM1A表达、活性和/或功能的方法。例如,本文描述的是抑制细胞中的PPM1A的方法,其中所述方法包括将细胞暴露于PPM1A抑制剂。在一些实施方式中,在患有ALS、FTD或伴有FTD的ALS的患者的细胞中,PPM1A表达、活性和/或功能被抑制。在一些实施方式中,抑制PPM1A的方法包括将细胞暴露于SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸。

[0616] 在本文所述的方法中,将细胞暴露于PPM1A抑制剂可以包括向患者施用PPM1A抑制剂或包含PPM1A抑制剂的药物组合物,例如,患有或处于发展成神经疾病风险中的患者,如肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。因此,本文所述的实施方式可以包括向需要治疗的患者施用PPM1A抑制剂或包含PPM1A抑制剂的药物组合物,例如,患有或处于发展成神经疾病风险中的患者,如肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神

经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。本文所述的方法包括施用PPM1A抑制剂的方法，其允许将治疗有效量的PPM1A抑制剂给予患者，例如，给予患者的细胞和/或给予患者治疗的部位。例如，本文所述的方法包括但不限于PPM1A抑制剂或包含PPM1A抑制剂的药物组合物通过局部、胃肠外、口服、口腔、舌下、肺部、鞘内、脑池内、气管内、鼻内、经皮、直肠、阴道或十二指肠内施用的方法。在特定实施方式中，PPM1A抑制剂通过口服施用。在一些实施方式中，PPM1A抑制剂通过鞘内或脑池内施用。在本文所述的实施方式中，所述方法包括施用治疗有效量的PPM1A抑制剂，例如，治疗有效量的PPM1A反义寡核苷酸。

[0617] 本文所述的方法包括向患者施用和/或将细胞暴露于PPM1A抑制剂或其药学上可接受的盐的方法，其中PPM1A抑制剂包括PPM1A反义寡核苷酸，例如，SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸。在一些实施方式中，将PPM1A抑制剂配制为包含PPM1A反义寡核苷酸或其药物组合物的药物制剂，例如，SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸。

[0618] 本文所述的方法还包括向患者施用和/或将细胞暴露于PPM1A抑制剂的方法，其中所述PPM1A抑制剂选自以下：PPM1A小发夹RNA(shRNA)、PPM1A小干扰RNA(siRNA)、PPM1A肽核酸(PNA)、PPM1A锁定核酸(LNA)和PPM1A吗啉代寡聚物。在一些实施方式中，将PPM1A抑制剂配制成药物组合物，其包含PPM1A shRNA、PPM1A siRNA、PPM1A PNA、PPM1A LNA或PPM1A吗啉代寡聚物，或者PPM1A shRNA、PPM1A siRNA、PPM1A PNA、PPM1A LNA或PPM1A吗啉代寡聚物的任一者的药学上可接受的盐。

[0619] 在其他方面中，本文所述的是PPM1A抑制剂在制备用于治疗神经疾病的药物中的用途。例如，本文所述的是PPM1A抑制剂在制备用于治疗ALS、FTD或伴有FTD的ALS的药物中的用途。在一些实施方式中，用于制备治疗药物的PPM1A抑制剂是PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐，例如，SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐。

[0620] 在其他方面中，本文描述的是一种在有需要的患者中治疗神经疾病的方法，其中所述方法包括向有需要的患者施用药物组合物，其包含治疗有效量的PPM1A抑制剂和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中，神经疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。在一些实施方式中，PPM1A抑制剂是PPM1A反义寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，例如，SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中，PPM1A抑制剂是PPM1AshRNA、PPM1A siRNA、PPM1A PNA、PPM1A LNA或

PPM1A吗啉代寡聚物。在一些实施方式中,PPM1A抑制剂是PPM1A shRNA、PPM1A siRNA、PPM1A PNA、PPM1A LNA或PPM1A吗啉代寡聚物的药学上可接受的盐。

[0621] 在本文所述的实施方式中,包含治疗有效量的PPM1A抑制剂和药学上可接受的赋形剂的药物组合物可以以多种方式施用以实现对患者的细胞和/或对有需要的患者进行治疗的位点的治疗性递送。例如,在本文所述的实施方式中,包含治疗有效量的PPM1A抑制剂和药学上可接受的赋形剂的药物组合物可以局部、胃肠外、鞘内、口服、肺部、气管内、鼻内、经皮、口腔、舌下、直肠、阴道或十二指肠内施用。在特定实施方式中,药物组合物口服施用。在一些实施方式中,药物组合物通过鞘内或脑池内施用。在本文所述的实施方式中,患者是哺乳动物,例如,人患者。

[0622] 在一些实施方式中,本文所述的是PPM1A抑制剂,其用作药物。例如,本文所述的是SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐,其用作药物。

[0623] 在一些实施方式中,PPM1A抑制剂,例如,本文所述的PPM1A反义寡核苷酸用于治疗神经疾病。例如,本文所述的是PPM1A抑制剂,其用作药物。例如,本文所述的是SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐,其用于治疗神经疾病。在一些实施方式中,神经疾病选自以下:神经疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)和戈谢氏病。

[0624] 如本文所述的,患者指有神经疾病风险、患有或诊断为神经疾病的任何动物,包括但不限于哺乳动物、灵长类动物和人类。在某些实施方式中,患者可以是非人哺乳动物,如猫、犬或马。患者可以是被诊断患有神经疾病的高风险个体、已被诊断患有神经疾病的人、以前患有神经系统疾病的人,或者被评价有神经疾病的症状或体征的个体,例如,TBK1表达信号或活性降低、自噬受损、TDP43聚集或与神经疾病相关的任何体征或症状,如肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病,如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

[0625] 如本文所用,“有需要的患者”是指患有神经疾病的任何症状或表现的患者,可能患有神经疾病的任何症状或表现的患者,或可能受益于本公开内容的用于治疗神经疾病的方法的任何患者。有需要的患者可以包括被诊断具有神经疾病风险的患者、过去患有神经疾病的患者、或之前曾接受过神经疾病治疗的患者。特别相关的是患有与TBK1表达或活性受损或有害PPM1A表达或活性相关的神经疾病的个体。

[0626] 如本文所用,“有效量”是指当给予患者时足以至少部分治疗病症的药剂的量。治疗有效量将根据病况的严重程度、组分的施用途径以及被治疗患者的年龄、体重等而变化。因此,所公开的PPM1A抑制剂的有效量是治疗患者的神经疾病所必需的PPM1A抑制剂的量,使得药剂的施用防止受试者发生神经疾病,防止神经疾病进展(例如,防止发作或神经疾病症状(如肌肉减弱、痉挛或肌束颤动)的严重程度增加),或者减轻或完全改善神经疾病的所有相关症状,例如,导致疾病消退。

[0627] 可以通过评价与神经疾病相关的总体症状、组织的组织学分析、生化测定、成像方法例如磁共振成像或其他已知方法来评价治疗有效性。例如,在向患有神经疾病的患者施用所公开的PPM1A抑制剂后,可以通过分析疾病的总体症状来评价治疗有效性,如肌肉力量和控制的变化或与神经疾病相关的大体病理学的其他方面。

[0628] 还可以在组织或细胞水平上评价治疗有效性,例如,通过获得组织活检(例如,脑、脊髓、肌肉或运动神经元组织活检)并评价大体组织或细胞形态或染色性质,或通过获取生物体液(例如,脑脊液、外泌体、血浆或尿液)并使用检查蛋白或RNA表达的生化测定来检查液体中PPM1A的表达。此类生化测定可以包括ddPCR、qRT-PCR、western印迹、ELISA和/或SIMOA。例如,可以评价指示疾病或神经疾病的蛋白水平(例如,TBK1或另一种蛋白或基因产物的水平),通过免疫细胞化学、免疫组织化学、Western印迹或Northern印迹方法,用于评价RNA水平的方法,如定量或半定量聚合酶链(例如,数字PCR(DigitalPCR、dPCR或dePCR)、qPCR等)反应在解离细胞或非解离细胞中进行。还可以评价在脊髓液、脑脊液、血浆、胞外囊泡(例如,外泌体样脑脊液胞外囊泡(“CSF外泌体”),如在Welton等,(2017)“Cerebrospinal fluid extracellular vesicle enrichment for protein biomarker discovery in neurological disease;multiple sclerosis”J Extracell Vesicles.,6(1):1-10;和Street等,(2012)“Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid”J Transl.Med.,10:5中描述的那些)、尿液、粪便、淋巴液、血液、血浆或血清中有用的生物标志物(例如,轻神经丝(NEFL)、重神经丝(NEFH)、TDP-43或p75胞外域($p75^{ECD}$))的存在或表达水平,以评价疾病状态和治疗有效性。有效性的其他测量方法可以包括力量持续时间常数(SDTC)、短间隔皮质抑制(SICI)、测力计、肢体等长肌力准确测试(ATLIS)、复合肌肉动作电位(CMAP)和ALSFRS-R。在某些实施方式中,尿神经营养因子受体p75胞外域($p75^{ECD}$)是肌萎缩侧索硬化症(ALS)的疾病进展和预后生物标志物。脑脊液(CSF)中的磷酸化神经丝重链(pNFH)可预测C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者的疾病状态和存活率。CSF pNFH可以作为临床试验的预后生物标志物,这将增加成功开发c9ALS治疗方法的可能性。

[0629] 在一些实施方式中,在评价治疗阿尔茨海默氏病的有效性时,可以使用心理表现来衡量有效性,如使用简易精神状态检查(MMSE)。为测量有效性,可以使用功能评估分期测试(FAST)、运动筛选任务、配对关联学习、空间工作记忆、反应时间、快速视觉信息处理、延迟匹配样本、模式识别记忆。

[0630] 在一些实施方式中,在评价针对帕金森氏病的治疗有效性时,可以使用统一帕金森氏病评定量表(UPDRS)作为性能衡量标准。用于量化UPDRS未测量的功能性能方面的其他指标可以包括Berg平衡量表(BBS)、前向功能范围测试(FFR)、后向功能范围测试(BFR)、定时“Up&Go”测试(TUG)和步态速度。

[0631] 在评价治疗有效性时，可以选择适宜的对照以确保有效评估。例如，可以将患有神经疾病的患者在施用所公开的PPM1A抑制剂后评价的症状与同一患者在治疗之前或在治疗过程的较早时间点或在另一名未诊断出患有神经疾病的患者中的那些症状进行比较。或者，可以将施用公开的PPM1A抑制剂后组织的生化或组织学分析结果与来自同一患者或未诊断患有神经疾病的个体或来自同一患者施用PPM1A抑制剂之前的组织的结果进行比较。或者，可以将使用PPM1A抑制剂后的血液、血浆、血清、细胞、尿液、淋巴液、脊髓液、脑脊液或粪便样本与来自未诊断出患有神经疾病的个体或来自同一患者在施用PPM1A抑制剂之前的可比样本进行比较。在一些实施方式中，可以将施用PPM1A抑制剂后的细胞外囊泡(例如，CSF外泌体)与未诊断患有神经疾病的个体或施用PPM1A抑制剂之前的同一患者的细胞外囊泡进行比较。

[0632] PPM1A抑制的验证可以通过直接或间接评估PPM1A表达水平或活性来确定。例如，测量PPM1A蛋白或RNA表达的生化测定可用于评价整体PPM1A抑制。例如，可以通过Western印迹测量细胞或组织中的PPM1A蛋白水平，以评价整体PPM1A水平。也可以通过Northern印迹或定量聚合酶链反应测量PPM1A mRNA水平，以确定整体PPM1A抑制。还可以通过免疫细胞化学或免疫组织化学方法评价PPM1A蛋白水平或指示PPM1A信号转导活性的另一蛋白的水平，在解离的细胞、未解离的组织、细胞外囊泡(例如，CSF外泌体)、血液、血清或粪便中进行。

[0633] PPM1A抑制也可以通过测量参数来间接评价，如自噬、内吞作用、蛋白聚集、TBK1表达、TBK1激酶活性、患者力量的变化、肌肉张力、肌肉痉挛的存在、增强的言语、行走、呼吸或记忆力，或其他与PPM1A活性变化相关的参数，包括TBK1靶磷酸化和TBK1信号转导激活的其他指标。例如，可以测量用公开的PPM1A抑制剂治疗的患者的细胞中活性TBK1磷酸化水平或活性(磷酸化)与非活性TBK1的比例，作为所述细胞中PPM1A活性的指示。还可以评价在血浆、脊髓液、脑脊液、细胞外囊泡(例如，CSF外泌体)、血液、尿液、淋巴液、粪便或组织中有用的生物标志物(例如，轻神经丝(NEFL)、重神经丝(NEFH)、TDP-43或$p75^{ECD}$)的存在或表达水平，以评价PPM1A抑制的有效性。其他测量可以包括强度持续时间常数(SDTC)、短间隔皮质抑制(SICI)、测力计、肢体等长肌力准确测试(ATLIS)、复合肌肉动作电位和ALSFRS-R。在某些实施方式中，尿神经营养因子受体p75胞外域($p75^{ECD}$)是肌萎缩侧索硬化症(ALS)的疾病进展和预后生物标志物。脑脊液(CSF)中的磷酸化神经丝重链(pNFH)可预测c9ALS患者的疾病状态和存活率。CSF pNFH可以作为临床试验的预后生物标志物，这将增加成功开发c9ALS治疗方法的可能性。

[0634] 本文公开的治疗方法包括增加或恢复细胞自噬的方法。“自噬”是指细胞分解不必要或功能失调的组分的自然、受调控的机制，使细胞组分有序降解和循环利用。自噬通常负责降解相对长寿命的细胞质蛋白、可溶性和不可溶性错误折叠蛋白，以及整个细胞器。认为自噬机制的失败有助于运动神经元中有毒蛋白聚集体的形成(参见Ramesh和Pandley，(2017)“Autophagy Dysregulation in ALS:When Protein Aggregates Get Out of Hand”Front Mol Neurosci.10(Article 263))。自噬和蛋白聚集的失调以及错误定位与包括ALS在内的神经疾病有关。增加或恢复自噬的方法包括降低患有神经疾病的患者中PPM1A的表达水平的方法。增加或恢复自噬的方法还包括增加患有神经疾病的患者细胞中的TBK1活性或表达或TBK1磷酸化(例如，TBK1 ser172磷酸化)的方法。

[0635] 本公开内容还包括在患有神经疾病的患者的细胞中抑制PPM1A的方法。PPM1A可在具有PPM1A表达或活性的任何细胞中受到抑制，包括神经细胞(包括中枢神经系统、周围神经系统、运动神经元、大脑、脑干、额叶、颞叶、脊髓)、肌肉骨骼系统、脊髓液和脑脊液。肌肉骨骼系统的细胞包括骨骼肌细胞(例如，肌细胞)。运动神经元包括上运动神经元和下运动神经元。

[0636] 药物组合物和施用途径

[0637] 本公开内容还提供了通过施用包含公开的PPM1A抑制剂的药物组合物来治疗神经疾病的方法。在另一个方面中，本公开内容提供了一种用于治疗神经疾病的药物组合物。药物组合物可以包含靶向PPM1A的公开的反义寡核苷酸和药学上可接受的载体。如本文所用，术语“药物组合物”是指，例如，在药学上可接受的载体中含有特定量的治疗性化合物，例如，治疗有效量的治疗性化合物的混合物，用于施用于哺乳动物，例如人，以治疗神经疾病。在一些实施方式中，本文涉及药物组合物，其包含公开的PPM1A抑制剂和药学上可接受的载体。在另一个方面中，本公开内容提供了公开的PPM1A抑制剂在制备用于治疗神经疾病的药物中的用途。如本文所用，“药物”与术语“药物组合物”具有基本相同的含义。

[0638] 如本文所用，“药学上可接受的载体”是指适用于与人类和动物组织接触的缓冲剂、载体和赋形剂，没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，与合理的获益/风险比相称。载体在与制剂的其他成分相容且对接受者无害的意义上应该是“可接受的”。药学上可接受的载体包括施用与药物相容的缓冲剂、溶剂、分散介质、涂层、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域中是公知的。在一个实施方式中，药物组合物口服施用，并且包含适于调控包封物质在消化系统或肠道内的吸收位置的肠溶衣。例如，肠溶衣可以包含丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物。

[0639] 在一些实施方式中，本公开内容的PPM1A抑制剂(例如，PPM1A反义寡核苷酸)是药学上可接受的盐形式。本文所述的酸性PPM1A抑制剂能够与各种药学上可接受的阳离子形成碱盐。这种盐的实例包括碱金属或碱土金属盐，特别是钙、镁、钠、锂、锌、钾和铁盐。本公开内容的药学上可接受的盐包括例如SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸的药学上可接受的盐。

[0640] 本文还描述了药物组合物，其包含PPM1A抑制剂和药学上可接受的赋形剂。例如，本文所述的药物组合物可以包含PPM1A反义寡核苷酸，例如，SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个的PPM1A反义寡核苷酸，以及药学上可接受的赋形剂。

[0641] 在一些实施方式中，PPM1A抑制剂(例如，PPM1A AON)可以包封在纳米颗粒包衣中。据信，纳米颗粒包封可防止AON降解并增强细胞摄取。例如，在一些实施方式中，PPM1A抑制剂包封在阳离子聚合物包衣中，例如，核磁聚合物(例如，聚-L-赖氨酸、聚酰胺胺、聚(β-氨基酯)和聚乙烯亚胺)或天然存在的聚合物(例如，壳聚糖和鱼精蛋白)。在一些实施方式中，PPM1A抑制剂包封在脂质或脂质样物质中，例如，阳离子脂质、阳离子脂质样物质或仅在酸性pH条件下带正电的可电离脂质。例如，在一些实施方式中，PPM1A抑制剂包封在脂质纳米颗粒中，所述脂质纳米颗粒包含疏水部分，例如，胆固醇和/或聚乙二醇(PEG)脂质。

[0642] 在一些实施方式中，PPM1A抑制剂(例如，a PPM1A AON)与生物活性配体缀合。例

如,在本文所述的一些实施方式中,PPM1A抑制剂如PPM1A AON与肽、脂质、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、胆固醇、维生素E、抗体或细胞穿透肽(例如,转录反式激活因子(TAT)和渗透素)缀合。

[0643] 含有公开的PPM1A抑制剂(如本文公开的那些)的药物组合物可以以剂量单位形式存在并且可以通过任何适宜的方法制备。药物组合物应配制成与其预期的施用途径相容。可以用过制剂领域熟知的方法制备有用的制剂。例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences,18th ed.(Mack Publishing Company,1990)。

[0644] 例如,药物制剂是无菌的。灭菌可以例如通过无菌过滤膜过滤来完成。在将组合物冻干的情况下,可以在冻干和重构之间或之后进行过滤灭菌。

[0645] 在一个实施方式中,公开的PPM1A抑制剂及其任何药物组合物可以通过一种或多种途径施用,包括局部、鞘内、胃肠外、口服、直肠、口腔、舌下、阴道、肺部、气管内、脑池内、鼻内、经皮或十二指肠内。如本文所用,术语胃肠外包括皮下注射、胰内施用、静脉内、脑池内、鞘内、肌肉内、腹膜内、胸骨内注射或输注技术。例如,公开的PPM1A抑制剂可以通过皮下向受试者施用。在另一个实例中,公开的PPM1A抑制剂可以通过口服向受试者施用。在另一个实例中,公开的PPM1A抑制剂可通过胃肠外施用直接施用至神经系统或神经系统的特定区域或细胞(例如,脑、脑干、下运动神经元、脊髓、上运动神经元),例如,PPM1A抑制剂可以鞘内或脑池内施用。

[0646] 将意识到的是,PPM1A抑制剂(例如PPM1A反义寡核苷酸)在本文所述的方法中施用于患有神经疾病或有神经疾病风险的患者,可以通过各种施用途径施用。在各种实施方式中,PPM1A抑制剂可以通过一种或几种途径施用,包括口服(例如,通过吸入喷雾)、局部、阴道、直肠、鞘内、脑池内、口腔、舌下、胃肠外,例如,通过皮下注射。如本文所用,术语胃肠外包括皮下注射、胰内施用和静脉内、鞘内、脑池内、肌肉内、腹膜内和胸骨内注射或输注技术。

[0647] 胃肠外施用

[0648] 本公开内容的药物组合物可以配制用于胃肠外施用,例如,配制用于通过静脉内、脑池内、肌内、皮下、鞘内、病灶内或腹膜内途径注射。根据本公开内容,本领域技术人员将知晓水性组合物的制备,如含有所公开的PPM1A抑制剂的水性药物组合物。通常,此类组合物可以制备为可注射剂,或者作为液体溶液或混悬液;也可以制备适用于在注射前加入液体后制备溶液或混悬液的固体形式;还可以将制剂乳化。

[0649] 适合注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散液;配方包含芝麻油、花生油或丙二醇水溶液;用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。在所有情况下,该形式必须是无菌的,并且必需是达到易于注射程度的流体。其必须在制造和储存条件下保持稳定,并且必须防止细菌和真菌等微生物的污染作用。

[0650] 作为游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以在与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合的水中制备。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备分散剂。此外,无菌的不会发油可用作溶剂或混悬介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。无菌可注射制剂也可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬液或乳液,例如,如在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的载体和溶剂包括水、林格氏溶

液U.S.P.和等渗氯化钠溶液。在一个实施方式中，公开的PPM1A反义寡核苷酸可混悬在包含1％(w/v)羧甲基纤维素钠和0.1％(v/v)TWEEN™80的载液中。在一般储存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0651] 可根据公知技术使用合适的分散剂或润湿剂和混悬剂配制可注射制剂，例如，无菌可注射水性或油质混悬剂。在通常情况下，通过将各种已灭菌的活性成分掺入无菌载体中来制备分散剂，所述载体含有基本分散介质和上述列举的那些所需的其他成分。本公开内容的无菌可注射溶液可以通过将公开的PPM1A反义寡核苷酸掺入所需量的适当溶剂中以及根据需要与上面列举的各种其他成分一起制备，然后过滤灭菌。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，其从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。可注射制剂可以例如通过细菌截留过滤器过滤来灭菌。

[0652] 还考虑制备更多或高度浓缩的肌肉注射溶液。在这方面，优选使用DMSO作为溶剂，因为这将导致极快的渗透，将高浓度所公开的PPM1A抑制剂递送到小区域。

[0653] 用于这种溶液的适宜防腐剂包括苯扎氯铵、苄索氯铵、氯丁醇、硫柳汞等。适宜的缓冲剂包括硼酸、碳酸氢钠和碳酸氢钾、硼酸钠和硼酸钾、碳酸钠和碳酸钾、乙酸钠、磷酸氢钠等，其量足以将pH值保持在约pH 6至pH 8之间，以及例如约pH 7至pH 7.5之间。适宜的张度剂是葡聚糖40、葡聚糖70、右旋糖、甘油、氯化钾、丙二醇、氯化钠等，使得溶液的氯化钠当量在0.9正负0.2％的范围内。适宜的抗氧化剂和稳定剂包括亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代亚硫酸钠、硫脲等。适宜的润湿剂和澄清剂包括聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、泊洛沙姆282和泰洛沙泊。适宜的增粘剂包括葡聚糖40、葡聚糖70、明胶、甘油、羟乙基纤维素、羟甲基丙基纤维素、羊毛脂、甲基纤维素、凡士林、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素等。

[0654] 鞘内施用

[0655] 在一些实施方式中，PPM1A抑制剂或包含PPM1A抑制剂的本发明药物组合物据信通过鞘内施用递送至CNS，从而确保递送至需要治疗的患者的脑脊液(CSF)中。在各种实施方式中，鞘内施用(也称为鞘内注射)是指注射到椎管(围绕脊髓的鞘内空间)。可以使用各种技术，包括但不限于通过钻孔或脑池或腰椎穿刺等的侧脑室注射。在一些实施方式中，根据本发明的“鞘内施用”或“鞘内递送”是指通过腰部区域或区进行的IT施用或递送，例如，腰部IT施用或递送。如本文所用，术语“腰椎区”或“腰椎区域”是指第三和第四腰椎(下背部)椎骨之间的区域，更包括脊柱的L2-S1区。

[0656] 在各种实施方式中，包含公开的PPM1A抑制剂的组合物可以适合于鞘内递送。例如，适用于鞘内递送的组合物可包含PPM1A抑制剂和脑脊液、人工脑脊液、磷酸盐缓冲盐水(PBS)或盐缓冲液中的任一种。

[0657] 口服施用

[0658] 在一些实施方式中，本文涉及适合于口服递送所公开的PPM1A抑制剂的组合物，例如，包括肠溶衣例如耐胃包衣的片剂，使得所述组合物可以递送PPM1A抑制剂至例如患者的胃肠道。

[0659] 例如，提供了用于口服施用的片剂，其包含颗粒(例如，至少部分由颗粒形成)，所述颗粒包含公开的PPM1A抑制剂，例如，PPM1A反义寡核苷酸，例如，由SEQ ID NO:2-955、SEQ

ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个表示的PPM1A反义寡核苷酸，以及药学上可接受的赋形剂。此类片剂可以用肠溶衣包衣。所涉及的片剂可以包含药学上可接受的赋形剂，如填充剂、粘合剂、崩解剂和/或润滑剂，以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂，如冬青、橙、木糖醇、山梨糖醇、果糖和麦芽糖糊精，和加香剂、防腐剂和/或抗氧化剂。

[0660] 在一些实施方式中，所涉及的药物制剂包含颗粒内相，其包含所公开的PPM1A抑制剂，例如，PPM1A反义寡核苷酸，例如，由SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个表示的PPM1A反义寡核苷酸，以及药学上可接受的盐，例如，PPM1A反义寡核苷酸，例如，由SEQ ID NO:2-955、SEQ ID NO:1910-2863、SEQ ID NO:2868-2913和SEQ ID NO:2914-2959的任一个表示的反义寡核苷酸，以及药学上可接受的填充剂。例如，所公开的PPM1A抑制剂和填充剂可以任选地与其他赋形剂混合在一起，并形成颗粒。在一些实施方式中，颗粒内相可以使用湿法制粒形成，例如，将液体(例如，水)添加到混合的PPM1A抑制剂化合物和填充剂中，然后将混合物干燥、研磨和/或筛分以生产颗粒。本领域技术人员将理解，可以使用其他方法来实现颗粒内相。

[0661] 在一些实施方式中，涉及的制剂包含颗粒外相，其可以包含一种或多种药学上可接受的赋形剂，并且可以与颗粒内相混合以形成公开的制剂。

[0662] 公开的制剂可以包含含有填充剂的颗粒内相。示例性填充剂包括但不限于纤维素、明胶、磷酸钙、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇、微晶纤维素、果胶、聚丙烯酸酯、右旋糖、醋酸纤维素、羟丙基甲基纤维素、部分预糊化淀粉、碳酸钙，以及其他，包括其组合。

[0663] 在一些实施方式中，所公开的制剂可以包含含有粘合剂的颗粒内相和/或颗粒外相，粘合剂通常可以起到将药物制剂的成分保持在一起的作用。本公开内容的示例性粘合剂可包括但不限于以下:淀粉、糖、纤维素或改性纤维素例如羟丙基纤维素、乳糖、预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、低取代羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、糖醇以及其他，包括其组合。

[0664] 涉及的制剂，例如，包含颗粒内相和/或颗粒外相，可以包含崩解剂，例如但不限于淀粉、纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、羟基乙酸淀粉钠、羧甲基纤维素钠、藻酸盐、玉米淀粉、交联纤维素钠、交联羧甲基纤维素、低取代羟丙基纤维素、阿拉伯胶以及其他，包括其组合。例如，颗粒内相和/或颗粒外相可以包含崩解剂。

[0665] 在一些实施方式中，涉及的制剂包含含有公开的PPM1A抑制剂和选自以下赋形剂的颗粒内相:甘露醇、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素和羟基乙酸淀粉钠或其组合，以及包含以下一种或多种的颗粒外相:微晶纤维素、羟基乙酸淀粉钠和硬脂酸镁或其混合物。

[0666] 在一些实施方式中，涉及的制剂可以包含润滑剂，例如，颗粒外相可以含有润滑剂。润滑剂包括但不限于滑石、二氧化硅、脂肪、硬脂、硬脂酸镁、磷酸钙、二氧化硅、硅酸钙、磷酸钙、胶体二氧化硅、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、苯甲酸钠、聚乙二醇、乙酸钠、硬脂酸钙、月桂基硫酸钠、氯化钠、月桂基硫酸镁、滑石粉和硬脂酸。

[0667] 在一些实施方式中，药物制剂包含肠溶衣。在通常情况下，肠溶衣为口服药物形成屏障，控制药物沿消化道吸收的位置。肠溶衣可包含根据pH以不同速率崩解的聚合物。肠溶包衣可以包含例如醋酸邻苯二甲酸纤维素、丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、醋酸琥珀酸纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、丙烯酸乙酯-甲

基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸共聚物C型、聚醋酸乙烯酯-邻苯二甲酸酯和醋酸邻苯二甲酸纤维素。

[0668] 示例性肠溶衣包括Opadry®AMB、Acryl-EZE®、Eudragit®等级。在一些实施方式中，肠溶衣可以包含预期片剂重量的约5％至约10％、约5％至约20％、8至约15％、约8％至约20％、约10％至约20％、或约12至约20％、或约18％。例如，肠溶衣可以包含丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物。

[0669] 例如，在所涉及的实施方式中，提供的片剂包含或基本上由以重量计约0.5％至约70％，例如，约0.5％至约10％或约1％至约20％的所公开的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐组成。此类片剂可以包含例如以重量计约0.5％至约60％甘露醇，例如以重量计约30％至约50％甘露醇，例如以重量计约40％甘露醇；和/或以重量计约20％至约40％微晶纤维素，或以重量计约10％至约30％微晶纤维素。例如，所公开的片剂可以包含颗粒内相，其包含以重量计约30％至约60％，例如，约45％至约65％，或者替代地，以重量计约5至约10％所公开的PPM1A反义寡核苷酸，以重量计约30％至约50％，或者替代地约5％至约15％甘露醇，约5％至约15％微晶纤维素，约0％至约4％或约1％至约7％羟丙甲纤维素，和以重量计约0％至约4％，例如，约2％至约4％羟基乙酸淀粉钠。

[0670] 在另一个所涉及的实施方式中，用于口服施用所公开的PPM1A抑制剂的药物片剂制剂包含颗粒内相，其中颗粒内相包含公开的PPM1A AON或其药学上可接受的盐(如钠盐)和药学上可接受的填充剂，并且其还可以包含颗粒外相，其可以包含药学上可接受的赋形剂，如崩解剂。颗粒外相可以包含选自微晶纤维素、硬脂酸镁及其混合物的组分。药物组合物还包含肠溶衣，其占片剂重量的约12％至20％。例如，用于口服的药学上可接受的片剂可包含以重量计约0.5％至10％的公开的PPM1A AON，例如，公开的PPM1A AON或其药学上可接受的盐、以重量计约30％至50％的甘露醇、以重量计约10％至30％的微晶纤维素，以及包含丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物的肠溶衣。

[0671] 在另一个实例中，用于口服使用的药学上可接受的片剂可以包含颗粒内相，其包含以重量计约5至约10％的公开的PPM1A AON，例如，公开的PPM1A AON或其药学上可接受的盐，以重量计约40％甘露醇，以重量计约8％微晶纤维素，以重量计约5％羟丙甲纤维素和以重量计约2％羟基乙酸淀粉钠；包含颗粒外相，其包含以重量计约17％微晶纤维素，以重量计约2％羟基乙酸淀粉钠，以重量计约0.4％硬脂酸镁；和片剂上的肠溶衣，其包含丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸共聚物。

[0672] 在一些实施方式中，药物组合物可以包含肠溶衣，其包含以重量计约13％或约15％、16％、17％或18％，例如，AcyrlEZE®(参见，例如，PCT公开号WO 2010/054826，其全部内容通过引用并入本文)。

[0673] 包衣溶解和活性成分释放的速率是其溶出速率。在一个实施方式中，所涉及的片剂可以具有溶出曲线，例如，当在pH为7.2的磷酸盐缓冲液中以100rpm和37℃在USP/EP 2型设备(桨)中进行测试时，约50％至约100％的PPM1A抑制剂在约120分钟至约240分钟后释放，例如，180分钟后。在另一个实施方式中，所涉及的片剂可以具有溶出曲线，例如，当在pH为1.0的稀盐酸中以100rpm和37℃在USP/EP 2型设备(桨)中进行测试时，基本上无PPM1A抑制剂在120分钟后释放。在另一个实施方式中，所涉及的片剂可以具有溶出曲线，例如，当在pH为6.6的磷酸盐缓冲液中以100rpm和37℃在USP/EP 2型设备(桨)中进行测试时，约10％

至约30％或者不超哥约50％的PPM1A抑制剂在30分钟后释放。

[0674] 在一些实施方式中，本文提供的方法还可以包括施用至少一种其他药剂，所述药剂涉及治疗本文公开的疾病和病症。在一个实施方式中，所涉及的其他药剂可以共同施用(例如，顺序或同时)。

[0675] 施用剂量和频率

[0676] 示例性制剂包含剂型，其包含或基本上由约35mg至约500mg所公开的PPM1A抑制剂(例如，PPM1AAON)组成。例如，本文涉及包含约35mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、110mg、120mg、130mg、140mg、150mg、160mg、170mg、180mg、190mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg、1g、1.5g、2.0g、2.5g、3.0g、3.5g、4.0g、4.5g或5.0g公开的PPM1A抑制剂的制剂。在一个实施方式中，制剂可以包含约40mg、80mg或160mg公开的PPM1A抑制剂。在一些实施方式中，制剂可以包含至少100μg公开的PPM1A抑制剂。例如，制剂可以包含约0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、1mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg或30mg公开的PPM1A抑制剂。

[0677] 在一些实施方式中，本文所述的方法包括施用至少1μg、至少5μg、至少10μg、至少20μg、至少30μg、至少40μg、至少50μg、至少60μg、至少70μg、至少80μg、至少90μg或至少100μg PPM1A抑制剂，例如PPM1A抑制剂。在一些实施方式中，本发明的方法包括施用35mg至500mg、1mg至10mg、10mg至20mg、20mg至30mg、30mg至40mg、40mg至50mg、50mg至60mg、60mg至70mg、70mg至80mg、80mg至90mg、90mg至100mg、100mg至150mg、150mg至200mg、200mg至250mg、250mg至300mg、300mg至350mg、350mg至400mg、400mg至450mg、450mg至500mg、500mg至600mg、600mg至700mg、700mg至800mg、800mg至900mg、900mg至1g、1mg至50mg、20mg至40mg或1mg至500mg PPM1A抑制剂。

[0678] 所施用的量将取决于变量，如疾病的类型和程度或要治疗的适应症、患者的整体健康状况和体型、PPM1A抑制剂的体内效力、药物制剂和施用途径。初始剂量可以增加超过上限，以快速达到所需的血液水平或组织水平。或者，初始剂量可以小于最佳剂量，并且可以在治疗过程中逐渐增加剂量。可以优化人体剂量，例如，在常规的I期剂量递增研究中。给药频率可以变化，这取决于诸如施用途径、剂量和所治疗的疾病等因素。示例性给药频率是每天一次、每周一次和每两周一次。在一些实施方式中，给药为每天一次，持续7天。在一些实施方式中，给药为每月一次。在一些实施方式中，给药为每3个月一次。

[0679] 组合疗法

[0680] 在各种实施方式中，本文公开的PPM1A AON可以与一种或多种其他疗法组合施用。在一些实施方式中，所公开的寡核苷酸和一种或多种其他疗法的组合疗法可以协同治疗以下任何：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、伴FTD的ALS、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、臂丛神经损伤、周围神经损伤、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤、皮质基底节变性(CBD)和/或神经病，如化疗引起的神经病、脊髓小脑性共济失调(SCA)、C型尼曼-皮克病(NPC)、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)、II型粘多糖贮积症(MPSIIA)、粘脂贮积症IV、GM1神经节苷脂贮积症、散发性包涵体肌炎(sIBM)、亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)或戈谢氏病。

[0681] 用于治疗肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)或伴有FTD的ALS的示例性其他疗法包括以下任何：利鲁唑(Rilutek)、曲鲁唑、依达拉奉(Radicava)、卡巴拉汀、多奈哌齐、

加兰他敏、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、抗精神病药、胆碱酯酶抑制剂、美金刚、苯二氮卓类抗焦虑药、AMX0035(ELYBRIO®)、ZILUCOPLAN(RA101495)、双AON鞘内施用(例如,BIIB067、BIIB078)、BIIB100、左旋多巴/卡比多巴、多巴胺能药物(例如,罗匹尼罗、普拉克索、罗替戈汀)、甲羟孕酮、KCNQ2/KCNQ3开放剂、普多匹定、PrimeC(环丙沙星和西乐葆的组合)、锂或抗惊厥药和神经兴奋剂。其他疗法可以进一步包括呼吸护理、物理疗法、职业疗法、言语疗法和营养支持。在各种实施方式中,其他疗法可以是第二反义寡核苷酸。例如,第二反义寡核苷酸可以是靶向PPM1A转录物的第二PPM1A AON。

[0682] 可以根据所治疗的疾病选择组合疗法(例如,与PPM1A AON组合)。例如,对于治疗阿尔茨海默氏病,可以选择美金刚、卡巴拉汀、加兰他敏、多奈哌齐Aricept®、Exelon®(卡巴拉汀)、Razadyne®、Aducanumab、BAN2401、BIIB091(gosuranemab)、BIIB076、BIIB080(IONIS-MAPTRx)、Elayta(CT1812)、MK1942、同种异体hMSC、尼洛替尼、ABT-957、阿维a、ABT-354、GV1001、利鲁唑、CAD106、CNP520、AD-35、瑞拉帕地、DHP1401、T-817MA、TC-5619、TPI-287、RVT-101、LY450139、JNJ-54861911、达格列净、GSK239512、PF-04360365、ASP0777、SB-742457(5-HT6受体拮抗剂)、PF-03654746(H3受体拮抗剂)、GSK933776(Fc-失活的抗β淀粉样蛋白(Aβ)单克隆抗体(mAb))、Posiphen((+)-酒石酸苯羟基丙氨酸)、AMX0035(ELYBRIO®)、辅酶Q10或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0683] 例如,对于治疗帕金森氏病,可以选择左旋多巴、卡比多巴-左旋多巴、普拉克索、罗匹尼罗、罗替戈汀、阿扑吗啡、司来吉兰、雷沙吉兰、恩他卡朋、托卡朋、金刚烷胺、苯海索、BIIB054(辛帕奈单抗)、BIIB094、BIIB118、ABBV-0805、唑尼沙胺、脑深部刺激、脑源性神经营养因子、干细胞移植、烟酸、脑干刺激、尼古丁、大麻隆、PF-06649751、DNL201、LRRK2抑制剂、CK1抑制剂、依拉地平、CLR4001、IRX4204、育亨宾、辅酶Q10、OXB-102、度洛西汀、吡格列酮、preladenant或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0684] 例如,对于治疗进行性核上性麻痹(PSP),可以选择UCB0107、ABBV-8E12、F-18AV1451、BIIB092、C2N-8E12、tideglusib、深经颅磁刺激、硫辛酸、托芬那酸、锂、AZP2006、胶质细胞系衍生神经营养因子、NBMI、suvorxant、唑吡坦、TPI 287、达夫奈肽、匹莫范色林、左旋多巴、卡比多巴-左旋多巴、普拉克索、罗匹尼罗、罗替戈汀、阿扑吗啡、司来吉兰、雷沙吉兰、恩他卡朋、托卡朋、金刚烷胺、苯海索、BIIB054(辛帕奈单抗)、BIIB094、BIIB118、ABBV-0805、唑尼沙胺、脑深部刺激、脑源性神经营养因子、干细胞移植、烟酸、脑干刺激、尼古丁、大麻隆、PF-06649751、DNL201、LRRK2抑制剂、CK1抑制剂、依拉地平、CLR4001、IRX4204、育亨宾、辅酶Q10、OXB-102、度洛西汀、吡格列酮、preladenant或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0685] 例如,对于治疗亨廷顿氏病,可以选择特苯那嗪、氘代丁苯那嗪、物理疗法、利培酮、氟哌啶醇、氯丙嗪、氯硝西泮、地西泮、苯二氮卓类、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、喹硫平、卡巴醇、丙戊酸盐、拉莫三嗪、普利多匹定、δ-9-四氢大麻酚、大麻二酚、干细胞疗法、ISIS-443139、尼洛替尼、白藜芦醇、neflamapimod、非诺贝特、肌酸、RO7234292、SAGE-718、WVE-120102、WVE-120101、dimebon、米诺环素、脑深部刺激、熊二醇、辅酶Q10、OMS643762、VX15/2503、PF-02545920、BN82451B、SEN0014196、奥氮平、泰必利(tiapride)或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0686] 例如，对于治疗脑外伤，可以选择抗凝剂、抗抑郁剂、肌肉松弛剂、兴奋剂、抗惊厥剂、抗焦虑药、促红细胞生成素、高压治疗、康复疗法(例如，身体、职业、言语、心理或职业咨询)或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0687] 例如，对于治疗脊髓损伤，可以选择AXER-204、格列本脲、5-羟基色氨酸(5-HTP)、L-3,4-二羟苯丙氨酸(L-DOPA)或康复疗法(例如，物理疗法、职业疗法、娱乐疗法、使用辅助设备、改进的运动和健康饮食策略)或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0688] 例如，对于治疗皮质基底节变性，可以选择TPI-287、锂、职业疗法、物理疗法和言语疗法或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0689] 例如，对于治疗神经病，如化疗诱发的神经病，可以选择加巴喷丁、普瑞巴林、拉莫三嗪、卡马西平、度洛西汀、加巴喷丁类、三环类抗抑郁药、5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂、阿片类、神经毒素、右美沙芬、烟酰胺核苷、靶向神经元抗原的自身抗体(TS-HDS和FGFR3)或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0690] 例如，对于治疗脊髓小脑性共济失调，可以选择曲鲁唑、BHV-4157或其组合的任一个作为其他疗法。

[0691] 例如，对于治疗C型尼曼-皮克病，可以选择抗癫痫药物、言语疗法、物理疗法、职业疗法、Adrabetadex、Arimoclomol、N-乙酰基-L-亮氨酸或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0692] 例如，对于治疗夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disease)(CMT)，可以选择物理和职业疗法、骨科手术、骨科设备、PXT3003或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0693] 例如，对于治疗II型粘多糖贮积症(MPSIIA)，可以选择酶替代疗法：艾杜硫酶(Elaprase)、手术干预(扁桃体切除术和/或腺样体切除术)、RGX-121基因疗法、阿达木单抗、MT2013-31或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0694] 例如，对于治疗粘脂贮积症IV，可以选择物理、职业和言语疗法、隐形眼镜和人工泪液、遗传咨询或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0695] 例如，对于治疗GM1神经节苷脂贮积症，可以选择抗惊厥药、物理和职业疗法、半乳糖苷酶、半乳糖苷酶的基因递送、LYS-GM101基因疗法或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0696] 例如，对于治疗散发性包涵体肌炎(sIBM)，可以选择物理和职业疗法、使用设备如支架、助行器、轮椅、免疫抑制剂、BYM338或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0697] 例如，对于治疗亨诺-许兰氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP)，可以选择皮质类固醇、秋水仙碱、氨苯砜、硫唑嘌呤或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0698] 例如，对于治疗戈谢氏病，可以选择酶替代疗法、底物还原疗法、N-乙酰半胱氨酸、GZ/SAR402671、伊米苷酶或其任何组合的任一个作为其他疗法。

[0699] 在各种实施方式中，公开的寡核苷酸和一种或多种其他疗法可以彼此之间缀合并以缀合形式提供。下文描述了关于涉及所公开寡核苷酸的缀合物的进一步描述。当向有需要此类施用的患者施用组合疗法时，组合中的治疗剂或包含治疗剂的一种或多种药物组合物可以以任何顺序施用，例如，顺序、同步(concurrently)、一起，同时(simultaneously)等。在各种实施方式中，同步提供所公开的寡核苷酸和一种或多种其他疗法。在各种实施方式中，同时提供所公开的寡核苷酸和一种或多种其他疗法。在各种实施方式中，顺序提供所

公开的寡核苷酸和一种或多种其他疗法。

[0700] 缀合物

[0701] 在某些实施方式中，本文提供了寡聚化合物，其包含寡核苷酸(例如，PPM1A AON)和任选地一个或多个缀合物基团和/或末端基团。缀合物基团包含一个或多个缀合物部分和将缀合物部分与寡核苷酸连接的缀合物接头。缀合物基团可以附接到寡核苷酸的任一端或两端和/或任何内部位置。在某些实施方式中，缀合物基团可以附接至修饰的寡核苷酸的核苷的2'位置。在某些实施方式中，附接到寡核苷酸的一端或两端的缀合物基团是末端基团。在某些此类实施方式中，缀合物基团或末端基团附接在寡核苷酸的3'和/或5'末端。在某些此类实施方式中，缀合物基团(或末端基团)附接在寡核苷酸的3'末端。在某些实施方式中，缀合物基团附接在寡核苷酸3'末端附近。在某些实施方式中，缀合物基团(或末端基团)附接在寡核苷酸的5'末端。在某些实施方式中，缀合物基团附接在寡核苷酸5'末端附近。

[0702] 末端基团的实例包括但不限于缀合物基团、封端基团、磷酸酯部分、保护基团、修饰的或未修饰的核苷以及独立的修饰或未修饰的两个或更多个核苷。

[0703] 缀合物基团

[0704] 在某些实施方式中，PPM1A AON共价附接至一个或多个缀合物基团。在某些实施方式中，缀合物基团改变附接寡核苷酸的一个或多个性质，包括但不限于药效学、药代动力学、稳定性、结合、吸收、组织分布、细胞分布、细胞摄取、电荷和清除。在特定实施方式中，缀合物基团改变寡核苷酸在血流中的循环时间(例如，增加)，从而增加递送至脑的寡核苷酸的浓度。在特定实施方式中，缀合物基团改变寡核苷酸在靶器官(例如，脑)中的停留时间(例如，增加停留时间)，从而增加寡核苷酸的停留时间来改善其性质(例如，有效性)。在特定实施方式中，缀合物基团增加寡核苷酸通过血脑屏障和/或脑实质(例如，通过受体介导的胞吞作用)向脑的递送。在特定实施方式中，缀合物基团使寡核苷酸能够靶向特定器官(例如，脑)。在某些实施方式中，缀合物基团赋予连接的寡核苷酸新的性质，例如，能够检测寡核苷酸的荧光团或报告基团。此前已经描述了某些缀合物基团和缀合物部分，例如：胆固醇部分(Letsinger等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86,6553-6556)，胆酸(Manoharan等，Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4,1053-1060)，硫醚，例如，己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等，Ann.NY.Acad.Sci.,1992,660,306-309；Manoharan等，Bioorg.Med.Chem.Lett.,1993,3,2765-2770)，硫代胆固醇(Oberhauser等，Nucl.Acids Res.,1992,20,533-538)，脂肪链，例如，十二烷基二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等，EMBO J,1991,10,1111-1118;Kabanov等，FEBS Lett.,1990,259,327-330;Svinarchuk等，Biochimie,1993,75,49-54)，磷脂，例如，二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基-铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-膦酸酯(Manoharan等，Tetrahedron Lett.,1995,36,3651-3654；Shea等，Nucl.Acids Res.,1990,18,3777-3783)，多胺或聚乙二醇链(Manoharan等，Nucleosides&Nucleotides,1995,14,969-973)或奥金刚烷乙酸棕榈基部分(Mishra等，Biochim.Biophys.Acta,1995,1264,229-237)，十八胺或己氨基-羰基-氧基胆固醇部分(Crooke等，J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277,923-937)，生育酚基团(Nishina等，Molecular Therapy Nucleic Acids,2015,4,e220；和Nishina等，Molecular Therapy,2008,16,734-740)或GalNAc簇(例如，WO2014/179620)。

[0705] 缀合物部分

[0706] 缀合物部分包括但不限于嵌入剂、报告分子、多胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、维生素部分、聚乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫代胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、蒽醌、金刚烷、吖啶、荧光素、罗丹明、香豆素、荧光团和染料。在特定实施方式中，缀合物部分选自肽、脂质、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、胆固醇、维生素E、硫辛酸、泛酸、聚乙二醇、抗体(例如，用于穿过血脑屏障的抗体，如抗转铁蛋白受体抗体)，或细胞穿透肽(例如，转录反式激活因子(TAT)和渗透剂)。

[0707] 在某些实施方式中，缀合物部分包含活性原料药，例如，阿司匹林、华法林、保泰松、布洛芬、舒洛芬、芬布芬、酮洛芬、(S)-(+)-普拉洛芬、卡洛芬、丹磺酰肌氨酸、2,3,5-三碘苯甲酸、芬戈莫德、氟芬那酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮杂卓、吲哚美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺药、抗糖尿病药、抗菌药或抗生素。

[0708] 缀合物接头

[0709] 缀合物部分通过缀合物接头附接到PPM1A AON上。在某些寡聚化合物中，缀合物接头是单个化学键(例如，缀合物部分通过单键直接连接到寡核苷酸)。在某些实施方式中，缀合物接头包含链结构、重复单元如乙二醇、核苷或氨基酸单元的寡聚物。

[0710] 在某些实施方式中，缀合物接头包含一个或多个选自以下的基团：烷基、氨基、氧代、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫醚和羟氨基。在某些其他实施方式中，缀合物接头包含选自以下的基团：烷基、氨基、氧代、酰胺和醚基团。在某些实施方式中，缀合物接头包含选自以下的基团：烷基和酰胺基团。在某些实施方式中，缀合物接头包含选自以下的基团：烷基和醚基团。在某些实施方式中，缀合物接头包含至少一个磷部分。在某些实施方式中，缀合物接头包含至少一个磷酸酯基团。在某些实施方式中，缀合物接头包含至少一个中性连接基团。

[0711] 在某些实施方式中，缀合物接头，包括上述缀合物接头，是双功能连接部分，例如，本领域公知可用于将缀合物基团连接至母体化合物(如本文提供的寡核苷酸)的那些。在通常情况下，双功能连接部分包含至少两个官能团。选择其中一个官能团与母体化合物上的特定位点结合，选择另一个官能团与缀合物基团结合。在双功能连接部分中使用的官能团的实例包括但不限于用于与亲核基团反应的亲电试剂和用于与亲电基团反应的亲核试剂。在某些实施方式中，双功能连接部分包含一个或多个选自以下的基团：氨基、羟基、羧酸、硫醇、烷基、烯基和炔基。

[0712] 缀合物接头的实例包括但不限于吡咯烷、8-氨基-3,6-二氧辛酸(ADO)、琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)和6-氨基己酸(AHEX或AHA)。其他缀合物接头包括但不限于取代或未取代的C_1-C_{10}烷基、取代或未取代的C_2-C_{10}烯基或者取代或未取代的C_2-C_{10}炔基、其中优选取代基的非限制性列表包括羟基、氨基、烷氧基、羧基、苄基、苯基、硝基、硫醇、硫代烷氧基、卤素、烷基、芳基、烯基和炔基。

[0713] 在某些实施方式中，缀合物接头包含1-10个接头-核苷。在某些实施方式中，缀合物接头包含2-5个接头-核苷。在某些实施方式中，缀合物接头包含3个接头-核苷。

[0714] 在某些实施方式中，此类接头-核苷是修饰的核苷。在某些实施方式中，此类接头-核苷包含修饰的糖部分。在某些实施方式中，接头-核苷是未修饰的。在某些实施方式中，接头-核苷包含任选保护的杂环碱基，其选自嘌呤、取代的嘌呤、嘧啶或取代的嘧啶。在某些实

施方式中，可切割的部分是选自以下的核苷：尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、4-N-苯甲酰胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、4-N-苯甲酰基-5-甲基胞嘧啶、腺嘌呤、6-N-苯甲酰基腺嘌呤、鸟嘌呤和2-N-异丁酰基鸟嘌呤。通常希望接头-核苷在其到达靶组织后从寡聚化合物上切割下来。因此，接头-核苷通常彼此连接并且通过可切割的键与寡聚化合物的其余部分连接。在某些实施方式中，此类可切割的键是磷酸二酯键。

[0715] 在此，不认为接头-核苷是寡核苷酸的一部分。因此，在实施方式中，其中寡聚化合物包含由特定数量或范围的连接核苷和/或与参考核酸的特定互补百分比组成的寡核苷酸，并且寡聚化合物还包含含有缀合物接头的缀合物基团，所述缀合物接头包含接头-核苷，那些接头-核苷不计入寡核苷酸的长度并且不用于确定寡核苷酸与参考核酸的互补性百分比。

[0716] 在某些实施方式中，缀合物基团最好从PPM1A AON上切割下来。例如，在某些情况下，包含特定缀合物部分的寡聚化合物更好地被特定细胞类型吸收，但是一旦寡聚化合物被吸收，则希望缀合物基团被切割以释放未缀合的或母体寡核苷酸。因此，某些缀合物接头可以包含一个或多个可切割部分。在某些实施方式中，可切割部分是可切割的键。在某些实施方式中，可切割部分是包含至少一个可切割键的一组原子。在某些实施方式中，可切割部分包含一组具有一个、两个、三个、四个或多于四个可切割键的原子。在某些实施方式中，可切割部分在细胞或亚细胞区室(如溶酶体)内被选择性切割。在某些实施方式中，可切割部分被内源性酶如核酸酶选择性切割。

[0717] 在某些实施方式中，可切割的键选自：酰胺、酯、醚、磷酸二酯的一个或两个酯键、磷酸酯、氨基甲酸酯或二硫键。在某些实施方式中，可切割的键是磷酸二酯的一个或两个酯。在某些实施方式中，可切割部分包含磷酸酯或磷酸二酯。在某些实施方式中，可切割部分是在寡核苷酸和缀合物部分或缀合物基团之间的磷酸酯键。

[0718] 在某些实施方式中，可切割部分包含或由一个或多个接头-核苷组成。在某些其他实施方式中，一个或多个接头-核苷通过可切割键彼此连接和/或与寡聚化合物的其余部分连接。在某些实施方式中，此类可切割键是未修饰的磷酸二酯键。在某些实施方式中，可切割部分是2'-脱氧核苷，其通过磷酸核苷间键连接到寡核苷酸的3'或5'-末端核苷，并通过磷酸酯或硫代磷酸酯键共价连接到缀合物接头或缀合物部分的其余部分。在某些其他实施方式中，可切割部分是2'-脱氧腺苷。

[0719] 末端基团

[0720] 在某些实施方式中，寡聚化合物包含一个或多个末端基团。在某些其他实施方式中，寡聚化合物包含稳定的5'-磷酸酯。稳定的5'-磷酸酯包括但不限于5'-膦酸酯，包括但不限于5'-乙烯基膦酸酯。在某些实施方式中，末端基团包含一个或多个脱碱基核苷和/或倒置核苷。在某些实施方式中，末端基团包含一个或多个2'-连接的核苷。在某些其他实施方式中，2'-连接的核苷是脱碱基核苷。

[0721] 诊断方法

[0722] 本公开内容还提供了一种诊断患有神经疾病的患者的方法，所述方法依赖于检测患者的一个或多个生物样品中PPM1A表达信号的水平。如本文所用，术语“PPM1A表达信号”可以指PPM1A基因表达或者基因或基因产物活性的任何指示。PPM1A基因产物包括RNA(例如，mRNA)、肽和蛋白。可评估的PPM1A基因表达指标包括但不限于PPM1A基因或染色质状态、

PPM1A基因与调节基因表达的细胞成分的相互作用、PPM1A基因产物表达水平(例如,PPM1A RNA表达水平、PPM1A蛋白表达水平),或PPM1A RNA或蛋白质与转录、翻译或翻译后加工机制的相互作用。PPM1A基因产物活性的指标包括但不限于PPM1A信号转导活性的评估(例如,TBK1活化或磷酸化的评估)。

[0723] PPM1A表达信号的检测可以通过体内、体外或离体方法完成。在一个优选实施方式中,本公开内容的方法可以在体外进行。检测方法可涉及在患者的血液、血清、粪便、组织、脑脊液、脊髓液、细胞外囊泡(例如,CSF外泌体)或细胞中进行检测。可以通过测量整个组织、组织外植体、细胞培养物、解离的细胞、细胞提取物、细胞外囊泡(例如,CSF外泌体)或体液(包括血液、脊髓液、脑脊液、尿液、淋巴液或血清)中的PPM1A表达信号来实现检测。检查蛋白或RNA表达的生化测定可用于检测。例如,可以通过免疫细胞化学、免疫组织化学、Western印迹或Northern印迹方法或用于评价RNA水平的有用方法,如定量或半定量聚合酶链(例如,数字PCR(DigitalPCR、dPCR或dePCR)、qPCR等)反应评价解离细胞或未解离组织中指示神经系统疾病的蛋白水平(例如,TBK1或另一蛋白或基因产物的水平)。

[0724] 还可以评价在脊髓液、脑脊液、血浆、细胞外囊泡(例如,外泌体样脑脊液细胞外囊泡("CSF外泌体"),如在Welton等,(2017)"Cerebrospinal fluid extracellular vesicle enrichment for protein biomarker discovery in neurological disease;multiple sclerosis"J Extracell Vesicles.,6(1):1-10;和Street等,(2012)"Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid"J Transl.Med.,10:5中描述的那些)、尿液、粪便、淋巴液、血液、血浆或血清中存在的有用生物标志物(例如,轻神经丝(NEFL)、重神经丝(NEFH)、TDP-43或p75胞外域($p75^{ECD}$))的存在或表达水平以评价疾病状态。其他测量可以包括力量持续时间常数(SDTC)、短间隔皮层抑制(SICI)、测力计、肢体等长肌力准确测试(ATLIS)、复合肌肉动作电位(bio)和ALSFRS-R。在某些实施方式中,尿神经营养因子受体p75胞外域($p75^{ECD}$)是肌萎缩侧索硬化症(ALS)的疾病进展和预后生物标志物。脑脊液(CSF)中的磷酸化神经丝重链(pNFH)可预测C9ORF72相关肌萎缩侧索硬化症(c9ALS)患者的疾病状态和存活率。CSF pNFH可以作为临床试验的预后生物标志物,这将增加成功开发c9ALS治疗方法的可能性。

[0725] 在一些实施方式中,诊断患有阿尔茨海默氏病等神经系统疾病的患者可能需要评价患者的心理表现。心理表现的评价可能涉及简化精神状态检查(MMSE)。测量心理表现的其他实例包括功能评估分期测试(FAST)、运动筛选任务、配对学习、空间工作记忆、反应时间、快速视觉信息处理、延迟匹配样本和模式识别记忆。在一些实施方式中,诊断患有神经疾病(如帕金森氏病)的患者需要进行统一帕金森氏病评定量表(UPDRS)作为性能衡量指标。用于量化UPDRS未测量的功能性能方面的其他指标可以包括Berg平衡量表(BBS)、前向功能范围测试(FFR)、后向功能范围测试(BFR)、定时"Up&Go"测试(TUG)和步态速度。

[0726] 其他实施方式

[0727] 本文公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其包含与

[0728] PPM1A基因序列(SEQ ID NO:1)的核苷酸41,932至核苷酸42,787和核苷酸44,871至核苷酸44,990的核苷酸序列互补的核苷酸序列或其部分。本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2895的核苷酸序列(5'XYYZYTTGAGTCTCCXYXWZ3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙

基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2900的核苷酸序列(5'ZYZYYAGCGGATTACZZWWZ 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2905的核苷酸序列(5'XWYYXGAGAGCCATTYXYXY 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤和Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)胞嘧啶。本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2907的核苷酸序列(5'WYYYZCGATACAGCCXWXWX 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2911的核苷酸序列(5'YYZZYTTCACTGCTTYZWWY 3'),或其药学上可接受的盐,其中W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:2893的核苷酸序列(5'ZYZYYACAGTTAATGXXXZX 3'),或其药学上可接受的盐,其中Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)胞嘧啶,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。

[0729] 在一些实施方式中,核苷酸序列的至少一个核苷键选自以下:硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、硫代磷酸三酯键、硫代磷酸烷基酯键、亚烷基磷酸三酯键、亚膦酸酯键、氨基磷酸酯键、烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基磷酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键。在一些实施方式中,核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,核苷酸序列的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

[0730] 本文还公开了一种药物组合物,其包含上文所述的反义寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,和药学上可接受的赋形剂。

[0731] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用PPM1A抑制剂。在各种实施方式中,所述神经疾病选自以下:肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤和皮质基底节变性(CBD)。

[0732] 本文还公开了一种在细胞中恢复自噬的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。本文还公开了一种在细胞中增加TBK1 ser172磷酸化的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。本文还公开了一种在细胞中增加TBK1功能的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。本文还公开了一种在细胞中抑制PPM1A的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于PPM1A抑制剂。

[0733] 在各种实施方式中,所述细胞是需要治疗神经疾病的患者的细胞。在各种实施方式中,所述神经疾病选自以下:肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤和皮质基底节变性(CBD)。

[0734] 在各种实施方式中,暴露在体内或离体进行。在各种实施方式中,暴露包括向有需要的患者施用PPM1A抑制剂。在各种实施方式中,PPM1A抑制剂通过局部、胃肠外、鞘内、脑池

内、口服、直肠、口腔、舌下、阴道、肺部、气管内、鼻内、经皮或十二指肠内施用。在各种实施方式中，PPM1A抑制剂通过口服施用。

[0735] 在各种实施方式中，施用治疗有效量的PPM1A抑制剂。在各种实施方式中，患者是人。在各种实施方式中，PPM1A抑制剂包含上文所述的PPM1A反义寡核苷酸或药学上可接受的盐。

[0736] 在各种实施方式中，PPM1A抑制剂选自以下：PPM1A小发夹RNA(shRNA)、PPM1A小干扰RNA(siRNA)、PPM1A肽核酸(PNA)、PPM1A锁定核酸(LNA)和PPM1A吗啉代寡聚物。在各种实施方式中，药物组合物适用于局部、鞘内、胃肠外、口服、肺部、气管内、鼻内、经皮、直肠、口腔、舌下、阴道或十二指肠内施用。

[0737] 本文还公开了PPM1A抑制剂在制备用于治疗神经疾病的药物中的用途。在各种实施方式中，所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤和皮质基底节变性(CBD)。在各种实施方式中，PPM1A抑制剂是上文所述的PPM1A反义寡核苷酸。

[0738] 本文还公开了一种在有需要的患者中治疗神经疾病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物，所述药物组合物包含PPM1A抑制剂和药学上可接受的赋形剂。在各种实施方式中，所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤和皮质基底节变性(CBD)。在各种实施方式中，PPM1A抑制剂是权利要求1-10中任一项所述的PPM1A反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐。在各种实施方式中，PPM1A抑制剂选自以下：PPM1A小发夹RNA(shRNA)、PPM1A小干扰RNA(siRNA)、PPM1A肽核酸(PNA)、PPM1A锁定核酸(LNA)和PPM1A吗啉代寡聚物。

[0739] 在各种实施方式中，药物组合物通过局部、胃肠外、口服、肺部、直肠、颊、舌下、阴道、气管内、鼻内、鞘内、脑池内、经皮或十二指肠内施用。在各种实施方式中，药物组合物通过口服施用。在各种实施方式中，患者是人。

[0740] 本文还公开了一种上文所述的PPM1A反义寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，其用作药物。本文还公开了一种上文所述的PPM1A反义寡核苷酸，或其药学上可接受的盐，其用于治疗神经疾病。在各种实施方式中，所述神经疾病选自以下：肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤和皮质基底节变性(CBD)。

[0741] 本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸，其选自以下：PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:450的核苷酸序列(5’ACCTCTTGAGTCTCCACAGT 3’)，PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:517的核苷酸序列(5’TCTCCAGCGGATTACTTGGT 3’)，PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:579的核苷酸序列(5’AGCCAGAGAGCCATTCACAC 3’)，PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:590的核苷酸序列(5’GCCCTCGATACAGCCAGAGA 3’)，PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:916的核苷酸序列(5’CCTTCTTCACTGCTTCTGGC 3’)，或其药学上可接受的盐；和PPM1A反义寡核苷酸，其包含SEQ ID NO:440的核苷酸序列(5’TCTCCACAGTTAATGAAATA 3’)，或其药学上可接受的盐；其中核苷酸序列的至少一个核苷键选自以下：硫代磷酸酯键、磷酸二酯键、磷酸三酯键、烷基磷酸酯键、磷酸甲酯键、磷酸二甲

酯键、氨基烷基磷酸三酯键、膦酸亚烷基酯键、亚膦酸酯键、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键;和/或其中至少一个核苷被选自以下的组分取代:2'-O-(2-甲氧基乙基)核苷、2'-O-甲基核苷、2'-脱氧-2'-氟代核苷、2'-氟代-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。

[0742] 在各种实施方式中,核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,核苷酸序列的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

[0743] 本文还公开了一种药物组合物,其包含上文所述的反义寡核苷酸,或其药学上可接受的盐,和药学上可接受的赋形剂。本文还公开了一种蛋白磷酸酶1A(PPM1A)反义寡核苷酸,其包含与SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863的连续10个核碱基序列具有至少90%同一性的核酸序列。在各种实施方式中,核酸序列与SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863的连续11、12、13、14、15、16或17个核碱基序列具有至少90%同一性。

[0744] 本文还公开了SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863的任一个的PPM1A反义寡核苷酸。本文还公开了一种药物组合物,其包含SEQ ID NO:2-955或SEQ ID NO:1910-2863的任一个的PPM1A反义寡核苷酸和药学上可接受的赋形剂。

[0745] 在各种实施方式中,反义寡核苷酸的至少一个核苷键选自以下:硫代磷酸酯键、磷酸二酯键、磷酸三酯键、烷基磷酸酯键、磷酸甲酯键、磷酸二甲酯键、氨基烷基磷酸三酯键、膦酸亚烷基酯键、亚膦酸酯键、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯键、氨基烷基氨基磷酸酯键、硫代氨基磷酸酯键、硫代烷基膦酸酯键、硫代烷基磷酸三酯键、硫代磷酸键、硒磷酸键和硼磷酸键;和/或其中至少一个核苷被选自以下的组分取代:2'-O-(2-甲氧基乙基)核苷、2'-O-甲基核苷、2'-脱氧-2'-氟代核苷、2'-氟代-β-D-阿拉伯糖核苷、锁定核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。在各种实施方式中,核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。在各种实施方式中,核苷酸序列的所有核苷间键是硫代磷酸酯键。

[0746] 本文还公开了一种PPM1A反义寡核苷酸或药物组合物,其用于治疗神经疾病。在各种实施方式中,所述神经疾病选自以下:肌萎缩侧索硬化症(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、亨廷顿氏病、进行性核上性麻痹(PSP)、脑外伤、脊髓损伤和皮质基底节变性(CBD)。

[0747] 实施例

[0748] 本发明通过以下实施例进一步说明。提供这些实例仅用于说明目的,并且不应被解释为以任何方式限制本公开内容的范围或内容。

[0749] 实施例1:PPM1A反义寡核苷酸的设计和选择

[0750] 人PPM1A mRNA序列(NCBI参考序列:NM_021003.5;SEQ ID NO:2864)分析显示了7,776个潜在PPM1A AON候选序列。然而,由于不同PPM1A剪接变体的5'UTR和3'UTR序列的变异性,大多数候选物没有达到候选物过滤阈值。已将跨NM_021003.5的核苷酸457至1410的区域鉴定为所有已知PPM1A剪接变体共有的区域。已将PPM1A AON候选物鉴定为满足上述过滤标准并以该区域为目标。

[0751] 如在后续实施例、说明书和相应附图中所施用的,每个PPM1A AON都使用"Legacy ID"标识。PPM1AAON的Legacy ID包括"QPA-"符号,附带PPM1A AON与之互补的PPM1A转录物(特别是SEQ ID NO:2864的PPM1A转录物)的起始位置。例如,SEQ ID NO:2868的PPM1A AON

的核苷酸序列(5’WYZWYTTAGCCCATAZYWYX 3’)与SEQ ID NO:2864的PPM1A转录物的位置542-561互补,其中位置542是起始位置。因此,SEQ ID NO:2868的PPM1A AON在下文称为QPA-542。

[0752] 下面的表5记录了PPM1A AON候选物,对其进行设计并且随后评价了敲低PPM1A表达的能力。其他开发涉及产生PPM1A AON候选物,其胆固醇缀合物基团位于PPM1A AON的3’末端。具有胆固醇缀合物基团的PPM1A AON候选物如下表6所示。

[0753] 表5:评价的PPM1A AON

[0754]

SEQ ID NO:	Legacy ID	寡核苷酸序列(5'-3')*#
2868	QPA-542	WYZWYTTAGCCCATAZYWYX
2869	QPA-555	WYYXWCCTTGCATGCZWYZZ
2870	QPA-559	XYXYWCCAGCCTTGCXZWYZ
2871	QPA-599	ZWWYXAACCGATCACXWYYW

[0755]

2872	QPA-602	XYZZWGCAAACCGATYXYXW
2873	QPA-603	YXYZZGGCAAACCGAZYXYX
2874	QPA-604	YYXYZTGGCAAACCGXZYXY
2875	QPA-605	ZYYXYTTGGCAAACCWXZYX
2876	QPA-606	WZYYXCTTGGCAAACYWXZY
2877	QPA-607	XWZYYACTTGGCAAAYYWXZ
2878	QPA-608	XXWZYCACTTGGCAAXYYWX
2879	QPA-609	YXXWZCCACTTGGCAXXYYW
2880	QPA-625	XXWXXTGACCACGATZYXXW
2881	QPA-642	WYYYXTCATACACAGYXXXW
2882	QPA-644	XZWYYCATCATACACXWYXX
2883	QPA-646	WYXZWCCCATCATACXYXWY
2884	QPA-648	YXWYXTGCCCATCATXYXYX
2885	QPA-650	XYYXWCATGCCCATCXZXYX
2886	QPA-652	WXXYYAGCATGCCCAZYXZX
2887	QPA-655	ZWXWXACCAGCATGCYYXZY
2888	QPA-656	YZWXWAACCAGCATGYYYXZ
2889	QPA-708	YYZWWTTATTGGTGAZWZWX
2890	QPA-709	ZYYZWGTTATTGGTGXZWZW
2891	QPA-794	YXZWZGTTCATCAATYZYYX
2892	QPA-795	ZYXZWTGTTCATCAAZYZYY
2893	QPA-895	ZYZYYACAGTTAATGXXXZX
2894	QPA-900	ZZWXWTCTCCACAGTZXXZW
2895	QPA-905	XYYZYTTGAGTCTCCXYXWZ
2896	QPA-910	XWZXXACCTCTTGAGZYZYY
2897	QPA-915	ZXYXXAGTAAACCTCZZWXW
2898	QPA-962	XZZXYTTGGTTTGTGXZYZZ
2899	QPA-967	XWYWWATTACTTGGTZZWZW
2900	QPA-972	ZYZYYAGCGGATTACZZWWZ
2901	QPA-977	ZZYZZTCTCCAGCGGXZZXY
2902	QPA-987	ZYZWXATTCGTTCTTZYZYY
2903	QPA-1025	WYYXZTCACACGCTGXXZYX
2904	QPA-1030	XWXWXGCCATTCACAYWYZW
2905	QPA-1034	XWYYXGAGAGCCATTYXYXY
2906	QPA-1040	YWXZXCAGCCAGAGAWYYXZ
2907	QPA-1045	WYYYZCGATACAGCCXWXWX
2908	QPA-1098	WYZWYTCAGTAGGACYZZZZ
2909	QPA-1361	ZWYZZCTGGCGATACZZZWW
2910	QPA-1366	ZZYXYTGCTTCTGGCWXZXY
2911	QPA-1371	YYZZYTTCACTGCTTYZWWY
2912	QPA-1378	ZYZWYCTCCTTCTTCXYZWY
2913	QPA-1386	ZWZYYAACTCTGCCTYYZZY

[0756] *在表5中包括的每个寡核苷酸序列中，单个核苷如下所示：A是腺嘌呤，G是鸟嘌呤，C是胞嘧啶，T是胸腺嘧啶，W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤，X是2'-O-(2-甲氧基乙基)

腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。

[0757] #在表5中包括的每个寡核苷酸序列中,单个核苷各自通过硫代磷酸酯键连接。

[0758] 表6:在AON的3'末端上具有胆固醇缀合物基团的其他评价的PPM1A AON

[0759]

SEQ ID NO:	Legacy ID	寡核苷酸序列(5'-3')*#^
2876	QPA-606-C	WZYYXCTTGGCAAACYWXZY
2881	QPA-642-C	WYYYXTCATACACAGYXXXW
2882	QPA-644-C	XZWYYCATCATACACXWYXX

[0760] *在表6中包括的每个寡核苷酸序列中,单个核苷如下所示:A是腺嘌呤,G是鸟嘌呤,C是胞嘧啶,T是胸腺嘧啶,W是2'-O-(2-甲氧基乙基)鸟嘌呤,X是2'-O-(2-甲氧基乙基)腺嘌呤,Y是2'-O-(2-甲氧基乙基)-5-甲基胞嘧啶和Z是2'-O-(2-甲氧基乙基)胸腺嘧啶。

[0761] #在表6中包括的每个寡核苷酸序列中,单个核苷各自通过硫代磷酸酯键连接。^在表6中包括的每个寡核苷酸序列中,胆固醇缀合物基团位于寡核苷酸的3'末端。

[0762] 实施例2:PPM1A AON敲低效率分析

[0763] 通过使用逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)分析筛选PPM1A mRNA敲低对上表5和表6中显示的一组PPM1A AON(特别是QPA-905、QPA-972、QPA-1034、QPA-1045和QPA-1371)进行评价。为分析PPM1A AON的敲低效率,将来自淋巴母细胞系BP6074的细胞单独用Lipofectamine 3000转染试剂(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)转染,或者用Lipofectamine 3000和各种量(5nM、20nM、50nM、200nM或500nM)的表5或表6中列出的PPM1A AON之一转染。

[0764] BP6074细胞系来源于一名48岁男性ALS患者,具有导致移码和TBK1蛋白表达降低的TBK1蛋白截短突变(C992+1G>A)(参见van der Zee等,(2017)"TBK1 Mutation Spectrum in an Extended European Patient Cohort with Frontotemporal Dementia and Amyotrophic Lateral Sclerosis"Hum Mutat.38(3):297-309)。将细胞单独转染或暴露于转染试剂,72小时后通过qPCR 72评价PPM1A表达水平。所有实验重复三次进行(图1)。如图1中所示,所有候选PPM1A AON均显示出降低PPM1A mRNA转录物表达水平的功效,尤其是在测试的较高浓度下。这些结果表明,在转染72小时后,相对于对照水平,QPA-905、QPA-972、QPA-1034、QPA-1045和QPA-1371均能够降低ALS患者细胞系中PPM1A mRNA的水平。PPM1A mRNA转录物表达的敲低结果见表7。

[0765] 表7:与对照(仅lipofectamine 3000)相比PPM1A转录物的敲低。平均值+/-标准差

[0766]

	对照	5 nM	20 nM	50 nM	200 nM	500 nM
仅 Lipofectamine 3000	1.00±0.05					
QPA-905		0.85±0.04	0.86±0.11	0.85±0.07	0.83±0.06	0.64±0.04
QPA-972		4.58±4.30	0.74±0.07	0.84±0.05	0.79±0.28	0.44±0.06
QPA-1034		0.81±0.08	0.91±0.23	0.69±0.04	0.69±0.06	6.4±3.5
QPA-1045		1.06±0.12	0.68±0.03	0.84±0.09	0.65±0.05	0.34±0.12
QPA-1371		0.88±0.07	0.82±0.07	0.76±0.09	0.68±0.07	0.57±0.15

[0767] 还在人神经母细胞瘤细胞系SY5Y中评价了PPM1AAON候选物的敲低效率。以5,000个细胞/孔的浓度将SY5Y细胞接种在96孔板中,并在包含以下的培养基中培养:最低必需培养基eagle(目录号M2279,Sigma,St.Louis,MO,USA)、营养混合物F-12Ham(目录号N4888,

Sigma,St.Louis,MO,USA)、100％胎牛血清(目录号16140071,Life technologies,Carlsbad,CA,USA)、Glutamax 100x(目录号35050-061,Gibco)、NEAA(目录号11140-050,Gibco)和青霉素-链霉素(目录号30-001-Cl,Corning)。细胞未经处理,仅使用Lipofectamine 3000处理,或者使用不同浓度(5nM、20nM、50nM、200nM或500nM)PPM1A AON和Lipofectamine 3000转染。将细胞分别用50nM对照siRNA(siControl,ON-TARGET加非靶向Pool human,Dharmacon D-001810-10)或PPM1A siRNA(siPPM1A,ON-TARGET加PPM1A,Dharmacon L-009574-00-0005)转染,以分别提供另外的阴性和阳性对照。转染48小时后,分离RNA,产生cDNA并使用针对PPM1A(Hs06637123_g1,Thermofisher 4351370)和参考GAPDH(Hs03929097_g1,Thermofisher 4448490)量化的taqman探针进行多路复用RT-qPCR测定。

[0768] 将PPM1A信号(Ct)归一化至GAPDH(ΔCt)。为了将定量变化可视化(例如,PPM1A转录物减少％),将归一化的PPM1A信号进一步归一化至载剂(仅使用转染试剂处理,ΔΔCt)。使用方程RQ＝$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算转录水平的相对量,并用于描述与正常、健康水平(1.0)相比的处理条件。

[0769] 用PPM1A AON QPA-1371转染SY5Y细胞导致PPM1A表达的剂量依赖性降低,这与转染的PPM1A AON量的增加成反比(图2A,表8)。

[0770] 表8:响应于QPA-1371的PPM1A表达的敲低。平均值+/-标准差

[0771]

	对照	5 nM	20 nM	50 nM	200 nM	500 nM
未处理	1.00±0.08					
siControl (50nM)	1.16±0.05					
siPPM1A (50 nM)	0.32±0.02					
仅 Lipofectamine 3000	1.00±0.09					
QPA-1371		1.12±0.12	0.99 ± 0.09	0.89±0.11	0.79 ± 0.14	0.56±0.02

[0772] 类似地,在第二项实验中,用PPM1A AON QPA-905、QPA-1371、QPA-972、QPA-1034、QPA-1045或QPA-895转染SY5Y细胞(使用Endo-Porter递送试剂作为转染试剂,Gene Tools,Inc.,Oregon,USA)导致PPM1A表达的剂量依赖性降低,其与转染的PPM1A AON量的增加成反比(图2B,表9)。星号表示与单独的endoporter相比$p<0.05$,单因素ANOVA。双星号表示与siControl相比$p<0.05$,t检验。这些结果表明PPM1A AON在多种细胞系中能够抑制PPM1A转录物表达。

[0773] 表9:响应于各种PPM1A AON的PPM1A表达的敲低。平均值+/-标准差

[0774]

	对照	5 nM	20 nM	50 nM	200 nM	500 nM
siControl (50nM)	1.16 ± 0.05					
siPPM1A (50 nM)	0.32 ± 0.02					
Endoporter	1.00 ± 0.09					
QPA-905			0.97 ± 0.02	0.82 ± 0.05	0.49 ± 0.02	0.37 ± 0.03
QPA-972		0.97 ± 0.04	0.97 ± 0.07	0.83 ± 0.07	0.61 ± 0.08	0.35 ± 0.2
QPA-1034		1.06 ± 0.02	1.04 ± 0.20	0.79 ± 0.01	0.61 ± 0.05	0.42 ± 0.02
QPA-1045		1.22 ± 0.37	0.91 ± 0.04	0.92 ± 0.01	0.61 ± 0.4	0.44 ± 0.03
QPA-1371		0.99 ± 0.14	1.12 ± 0.09	0.86 ± 0.04	0.64 ± 0.07	0.37 ± 0.03
QPA-895		1.03 ± 0.02	1.11 ± 0.02	0.84 ± 0.09	0.59 ± 0.06	0.51 ± 0.03

[0775] 为了进一步评价PPM1AAON候选物抑制PPM1A表达的能力，进行了Western印迹实验。具体来说，选择2个PPM1A AON候选物QPA-1045和QPA-1371，来评价PPM1A AON转染对PPM1A蛋白水平以及活性TBK1与总TBK1的比值的影响。将来自健康个体(“健康细胞”)或携带TBK1突变的ALS患者(“患者细胞”)的淋巴母细胞样细胞仅使用RNAiMax转染试剂(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)转染，或使用5μM PPM1A AON和RNAiMax转染试剂转染。转染后24小时，更换细胞培养基以除去转染试剂。然后将细胞再孵育48小时，然后从细胞中提取蛋白用于分析。使用能够检测以下的抗体通过Western印迹分析检测蛋白提取物：GAPDH(目录号ab181602;Abcam,Cambridge,MA,USA)，总TBK1(目录号ab40676;Abcam,Cambridge,MA,USA)，磷酸化TBK1(目录号5483s;Cell Signaling Technologies,Danvers,MA,USA)和PPM1A(目录号ab14824;Abcam,Cambridge,MA,USA)。所使用的二抗包括抗家兔IgG,HRP连接的(目录号7074;Cell Signaling Technologies,Danvers,MA,USA)和抗小鼠IgG,HRP连接的(目录号7076;Cell Signaling Technologies,Danvers,MA,USA)。所有实验重复进行三次。

[0776] 评价磷酸化TBK1与总TBK1的比例，使用GAPDH作为对照以归一化磷酸化TBK1和总TBK1的水平。与不携带BP6074细胞系TBK1蛋白截短突变的淋巴母细胞样细胞(“健康细胞”)相比，BP6074细胞(“患者细胞”)显示磷酸化TBK1与总TBK1的比例显着降低(图3A，健康细胞对比患者细胞，$p<0.05$)。

[0777] 此外，用PPM1A AON QPA-1045和QPA-1371转染BP6074细胞导致磷酸化TBK1与总TBK1的比例显着增加，甚至超过健康细胞(图3A，健康细胞对比患者细胞+QPA-1045，健康细胞对比患者细胞+QPA-1371，$p<0.01$;与未转染的患者细胞相比增加约8.5倍)。结果如下表10所示。

[0778] 表10:PPM1A AON对TBK1水平的影响。平均值+/-标准差

[0779]

	PTBK1/TBK1健康细胞%	PPM1A/GAPDH
患者细胞	25.98±2.94	0.99±0.07
患者细胞+QPA-1045	173.6±46.18	0.88±0.08
患者细胞+QPA-1371	223.4±22.99	0.72±0.02
健康细胞	100±8.59	

[0780] 此外，使用上述相同的转染方案，在单独暴露于转染试剂或用PPM1A AONs QPA-1045和QPA-1371转染的BP6074细胞中评价PPM1A水平。将PPM1A水平归一化至GAPDH蛋白水

平。与仅暴露于转染试剂的BP6074细胞相比，用PPM1A AON QPA-1045或QPA-1371转染的BP6074细胞显示PPM1A蛋白水平降低约10-25％。QPA-1371转染显示PPM1A水平显着降低(图3B，患者细胞对比患者细胞+QPA-1371，$p<0.01$)。

[0781] 这些结果表明PPM1A AON能够降低ALS患者细胞系中PPM1A的水平。

[0782] 这些结果还表明，在ALS患者细胞系中转染PPM1A AON显着增加了患者细胞系中活性(磷酸化)TBK1与总TBK1的比例，甚至超过在健康细胞中发现的活性(磷酸化)TBK1与总TBK1的比例。因此，这些结果表明本文鉴定的PPM1A AON能够抑制PPM1A表达并增加ALS患者细胞中活性TBK1的比例。

[0783] SY5Y细胞中的RNA敲低效力通过用endoporter转染的几个示例性PPM1A AON评价，并在48小时测试敲低。图4A-图4Y是各种候选反义寡核苷酸的RNA敲低效率的线图，量化了PM1A RNA随着AON浓度的增加而减少。使用Graphpad Prism软件(San Diego,CA)拟合并绘制非线性回归四参数曲线，曲线底部固定为0。图4A代表SEQ ID NO:2898(QPA-962)的RNA敲低效率；图4B代表SEQ ID NO:2899(QPA-967)的RNA敲低效率；图4C代表SEQ ID NO:2900(QPA-972)的RNA敲低效率；图4D代表SEQ ID NO:2901(QPA-977)的RNA敲低效率；图4E代表SEQ ID NO:2902(QPA-987)的RNA敲低效率；图4F代表SEQ ID NO:2903(QPA-1025)的RNA敲低效率；图4G代表SEQ ID NO:2904(QPA-1030)的RNA敲低效率；图4H代表SEQ ID NO:2905(QPA-1034)的RNA敲低效率；图4I代表SEQ ID NO:2906(QPA-1040)的RNA敲低效率；图4J代表SEQ ID NO:2907(QPA-1045)的RNA敲低效率；图4K代表SEQ ID NO:2909(QPA-1361)的RNA敲低效率；图4L代表SEQ ID NO:2910(QPA-1366)的RNA敲低效率；图4M代表SEQ ID NO:2911(QPA-1371)的RNA敲低效率；图4N代表SEQ ID NO:2912(QPA-1378)的RNA敲低效率；图4O代表SEQ ID NO:2913(QPA-1386)的RNA敲低效率；图4P代表SEQ ID NO:2868(QPA-542)的RNA敲低效率；图4Q代表SEQ ID NO:2869(QPA-555)的RNA敲低效率；图4R代表SEQ ID NO:2883(QPA-646)的RNA敲低效率；图4S代表SEQ ID NO:2870(QPA-559)的RNA敲低效率；图4T代表SEQ ID NO:2908(QPA-1098)的RNA敲低效率；图4U代表SEQ ID NO:2893(QPA-895)的RNA敲低效率；图4V代表SEQ ID NO:2894(QPA-900)的RNA敲低效率；图4W代表SEQ ID NO:2895(QPA-905)的RNA敲低效率；图4X代表SEQ ID NO:2896(QPA-910)的RNA敲低效率；和图4Y代表SEQ ID NO:2897(QPA-915)的RNA敲低效率。从拟合的非线性回归曲线计算的IC50列于表11中。

[0784] 表11:图4A-4Y中所示的PPM1A AON的IC50值

[0785]

AON	IC50(nM)
QPA-915	387.1
QPA-1040	568.5
QPA-977	291.9
QPA-555	345.2
QPA-1025	370.3
QPA-1030	405.8
QPA-967	419
QPA-910	169.7
QPA-1098	610.3

QPA-962	362.5
QPA-1386	667.5
QPA-900	395.1
QPA-1366	615.4
QPA-1378	460.5
QPA-987	280
QPA-646	120.8
QPA-542	411.4
QPA-559	338.5
QPA-1361	662.1
QPA-905	207.9
QPA-972	281.1
QPA-1034	272
QPA-1045	275.8
QPA-1371	295.1
QPA-895	349.8

[0786] 还检测了PPM1A AON降低人运动神经元中PPM1A转录物的潜力。以10,000个细胞/孔的密度将iCELL MN(Cellular Dynamics Internation Fujifilm C1050)接种在96孔板上(0.32cm^2/孔)。按照CDI指南说明保持细胞,并进行了一些修改。将细胞复苏,并在补充有10uM Y-27632二盐酸盐(Tocris 1254)的完全iCELL神经元培养基(CDI R1051)中过夜。次日将换成使细胞接受完全培养基。将细胞铺板后3天,将培养基换成由50％iCELL MN神经元培养基和50％完全神经元成熟培养基(Neurobasal-Thermofisher 21103049,1x Glutamax-Thermofisher 35050061,1x NEAA-Thermofisher 11140050,1x B-27加补充剂-Thermofisher A3582801,1x N2补充剂-Thermofisher 17502048,0.2ug/mL抗坏血酸-补充了生长因子BDNF、CNTF和GDNF(10ng/mL BDNF-R&D Systems 248-BDB、10ng/mL CNTF R&D 257-N和10ng/mL GDNF-R&D Systems 212-GD)的Sigma A4403)组成的培养基。细胞在完全神经元成熟培养基中接种后5天转染。使用6uM Endoporter(Gene Tool Endo-Porter-PEG-1mL)进行AON转染。对照条件的转染使用Lipofectamine RNAiMAX(Thermofisher 13778150)。阴性对照(siCtrol)由50nM ON-TARGETplus非靶向Pool human(Dharmacon D-001810-10)组成和阳性对照(siPPM1A)由50nM ON-TARGETplus PPM1A(Dharmacon L-009574-00-0005)组成。转染后48小时,用siRNA冲洗细胞以去除RNAimax。转染后72小时,从所有处理条件中分离RNA,生成cDNA,并使用针对PPM1A(Hs06637123_g1,Thermofisher 4351370)和参考GAPDH(Hs03929097_g1,Thermofisher 4448490)的taqman探针进行多路复用RT-qPCR测定。使用TaqMan Fast Advanced Cells-to-CT试剂盒(Thermofisher A35378)和TaqMan Fast Advanced Master Mix(Thermofisher 4444557)按照生产厂商的方案进行RT-qPCR,并在Applied Biosystems QuantStudio 6pro/7pro实时PCR系统上运行。在50℃的温度下进行5min的一个逆转录循环。一个循环的RT灭活/初始变性在95℃的温度下进行20秒。在95℃的温度下1秒随后60℃持续20秒进行四个循环的扩增。针对SY5Y如所述的计算相对量。在图5A-5T中显示了实例PPM1A AON的敲低效率,图6A-6K,其是各种候选反义寡核

苷酸的RNA敲低效率的线图，量化了PPM1A RNA随着AON浓度的增加而减少。使用Graphpad Prism软件(San Diego,CA)拟合并绘制非线性回归四参数曲线，曲线底部固定为0。图5A代表SEQ ID NO:2883(QPA-646)的RNA敲低效率；图5B代表SEQ ID NO:2893(QPA-895)的RNA敲低效率；图5C代表SEQ ID NO:2895(QPA-905)的RNA敲低效率；图5D代表SEQ ID NO:2911(QPA-1371)的RNA敲低效率；图5E代表SEQ ID NO:2896(QPA-910)的RNA敲低效率；图5F代表SEQ ID NO:2897(QPA-915)的RNA敲低效率；图5G代表SEQ ID NO:2900(QPA-972)的RNA敲低效率；图5H代表SEQ ID NO:2905(QPA-1034)的RNA敲低效率；图5I代表SEQ ID NO:2906(QPA-1040)的RNA敲低效率；图5J代表SEQ ID NO:2907(QPA-1045)的RNA敲低效率；图5K代表SEQ ID NO:2871(QPA-599)的RNA敲低效率；图5L代表SEQ ID NO:2876(QPA-606)的RNA敲低效率；图5M代表SEQ ID NO:2880(QPA-625)的RNA敲低效率；图5N代表SEQ ID NO:2881(QPA-642)的RNA敲低效率；图5O代表SEQ ID NO:2882(QPA-644)的RNA敲低效率；图5P代表SEQ ID NO:2884(QPA-648)的RNA敲低效率；图5Q代表SEQ ID NO:2885(QPA-650)的RNA敲低效率；图5R代表SEQ ID NO:2886(QPA-652)的RNA敲低效率；图5S代表SEQ ID NO:2887(QPA-655)的RNA敲低效率；图5T代表SEQ ID NO:2888(QPA-656)的RNA敲低效率；图6A代表SEQ ID NO:2872(QPA-602)的RNA敲低效率；图6B代表SEQ ID NO:2873(QPA-603)的RNA敲低效率；图6C代表SEQ ID NO:2874(QPA-604)的RNA敲低效率；图6D代表SEQ ID NO:2875(QPA-605)的RNA敲低效率；图6E代表SEQ ID NO:2877(QPA-607)的RNA敲低效率；图6F代表SEQ ID NO:2878(QPA-608)的RNA敲低效率；图6G代表SEQ ID NO:2879(QPA-609)的RNA敲低效率；图6H代表SEQ ID NO:2889(QPA-708)的RNA敲低效率；图6I代表SEQ ID NO:2890(QPA-709)的RNA敲低效率；图6J代表SEQ ID NO:2891(QPA-794)的RNA敲低效率；和图6K代表SEQ ID NO:2892(QPA-795)的RNA敲低效率。从拟合的非线性回归曲线计算的IC50列于表12中。

[0787] 表12：在图5A-5T和图6A-6K中显示的PPM1A AON的IC50值

[0788]

AON	IC50 (nM)
QPA-646	23.99
QPA-895	436.9
QPA-905	167.6
QPA-1371	220.4
QPA-910	105.5
QPA-915	50.11
QPA-972	32.17
QPA-1034	136.9
QPA-1040	177.1
QPA-1045	64.98
QPA-599	164
QPA-606	65.45
QPA-625	393.6
QPA-642	53.55
QPA-644	65.81
QPA-648	77.34
QPA-650	80.25
QPA-652	89.47
QPA-655	102.9
QPA-656	101
QPA-602	136.6
QPA-603	99.34
QPA-604	39.32
QPA-605	93.72
QPA-607	67.92
QPA-608	157.6

[0789]

QPA-609	135.1
QPA-708	167.5
QPA-709	212.7
QPA-794	1116
QPA-795	164.6

[0790] 为了确定AON降低ALS运动神经元中PPM1A的表达,在源自2个ALS iPSC系的人类运动神经元的4个剂量点测试了5个PPM1A AON。一个细胞系在TBK1基因c.992+1G>A中携带突变,第二个细胞系在C9orf72中携带6核苷酸重复。用于产生脊髓运动神经元的方案是Du等,Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells,Nat.Commun 6,6626(2015)中公开的方案的修订版本。将iPSC解离成单细胞,并接种在板上包被的Matrigel(Corning目录号#354277,根据供应商针对lot#9280004和9273009的说明书进行稀释)上。24小时后,添加神经元诱导培养基(1:1DMEM/F12-Thermofisher 11330057和Neurobasal-Thermofisher 21103049,1x Glutamax-Thermofisher 35050061,1x NEAA-Thermofisher 11140050,1x青霉素-链霉素-Thermofisher 15140122,0.1mMβ巯基乙醇-Thermofisher 21985023,1x B-27补充剂-Thermofisher A35828-01,1x N2补充剂-Thermofisher 17502048,0.2ug/mL抗坏血酸-

SIGMA A4403)，并且补充有GSK3B抑制剂CHIR99021(从第1天至第6天3uM，然后第7天至第12天1uM，R&D systems 4423)以及双重SMAD抑制剂SB431542(从第1天至第12天10uM，R&D Systems1614)和LDN193189(从第1天至第12天100nM，REPROCELL 04007402)，其驱动iPSC向神经上皮祖细胞(NEP)发育。通过添加视黄酸(从第7天至第21天1uM，Sigma R2625)和平滑激动剂SAG(从第7天至第21天1uM，Millipore 566660)，这些NEP向运动神经元祖细胞分化。这些小分子分别驱动吻尾轴和腹侧鉴定。在分化的最后6天添加γ分泌酶抑制剂DAPT(从第16天至第21天10uM，R&D Systems 2634)有助于有丝分裂后运动神经元的规范，增加ISL1阳性细胞的表达。将培养中的脊髓运动神经元维持在神经元成熟培养基中(Neurobasal-Thermofisher 21103049，1x Glutamax-Thermofisher 35050061，1x NEAA-Thermofisher 11140050，1x B-27添加补充剂-Thermofisher A3582801，1x N2补充剂-Thermofisher 17502048，0.2ug/mL抗坏血酸-SIGMA A4403)，其中含有生长因子BDNF、CNTF和GDNF(10ng/mL BDNF-R&D Systems 248-BDB、10ng/mL CNTF R&D 257-N和10ng/mL GDNF-R&D Systems212-GD)。以10,000个细胞/孔的密度将患者iPSC来源的运动神经元接种在96孔板(0.32cm^2/孔)上。将运动神经元维持在神经元成熟培养基中。PPM1A敲低是通过在4个剂量点(5、20、50、200nM)与6uM endoporter递送一起用实例AON转染患者运动神经元来建立的。仅用6uM endoporter处理细胞用于转染对照。将在RNAiMax中转染的siControl和siPPM1A作为阴性和阳性对照。处理条件在三复孔中进行。在转染后48小时洗去siRNA。转染后72小时，如上所述，通过qRT-PCR测定对所有处理条件的PPM1A RNA水平进行量化。计算每个AON与单独的endoporter(RQ＝1.0)相比的相对量。

[0791] 图7A和图7B显示了在使用PPM1A AON(QPA-895、QPA-905、QPA-915、QPA-1045、QPA-1371、AND QPA-646)处理后，在两个ALS iPSC细胞系(TBK1和C9orf72)中PPM1A表达的降低情况。在TBK1患者运动神经元中，PPM1A AON以剂量依赖性方式减少PPM1A RNA(图7A，表13)。200nM QPA-895(SEQ ID NO:2893)降低PPM1A RNA至0.12，200nM QPA-905(SEQ ID NO:2895)降低PPM1A RNA至0.038，200nM QPA-915(SE ID NO:2897)降低PPM1A RNA至0.048，200nM QPA-1045(SEQ ID NO:2907)降低PPM1A RNA至0.045，200nM QPA-1371(SEQ ID NO:2911)降低PPM1A RNA至0.057和200nM QPA-646(SEQ ID NO:2883)降低PPM1A RNA至0.022。

[0792] 表13:在TBK1患者运动神经元中响应于PPM1A AON的相对PPM1A量。

[0793] 平均值+/-标准差

[0794]

	对照	5 nM	20 nM	50 nM	200 nM
siControl	1.00 ± 0.10				
siPPM1a	0.20 ± 0.07				
endoporter	1.01 ± 0.14				
QPA-895		0.71 ± 0.04	0.42 ± 0.07	0.28 ± 0.04	0.12 ± 0.03
QPA-905		0.16 ± 0.034	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
QPA-915		0.54 ± 0.10	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.01
QPA-1045		0.49 ± 0.12	0.21 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.04 ± 0.01
QPA-1371		0.50 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02
QPA-646		0.12 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.11 ± 0.05	0.02 ± 0.01

[0795] 在C9orf72患者运动神经元中，PPM1A AON以剂量依赖性方式减少PPM1A RNA(图7B，表14)。200nM QPA-895(SEQ ID NO:2893)降低PPM1A RNA至0.18，200nM QPA-905(SEQ

ID NO:2895)降低PPM1A RNA至0.12,200nM QPA-915(SEQ ID NO:2897)降低PPM1A RNA至0.15,200nM QPA-1045(SEQ ID NO:2907)降低PPM1A RNA至0.11,200nM QPA-1371(SEQ ID NO:2911)降低PPM1A RNA至0.12和200nM QPA-646(SEQ ID NO:2883)降低PPM1A RNA至0.063。这些结果显示了实例PPM1A AON功能可减少ALS患者运动神经元中的PPM1A转录物。

[0796] 表14:在C9orf72患者运动神经元中响应于PPM1A AON的相对PPM1A量。

[0797] 平均值+/-标准差

[0798]

	对照	5nM	20nM	50nM	200nM
siControl	1.00±0.06				
siPPM1a	0.11±0.03				
endoporter	1.01±.014				
QPA-895		0.57±0.06	0.51±0.02	0.40±0.02	0.18±0.02
QPA-905		0.19±0.03	0.22±0.02	0.20±0.03	0.12±0.01
QPA-915		0.51±0.05	0.38±0.02	0.28±0.01	0.15±0.03
QPA-1045		0.52±0.02	0.37±0.04	0.25±0.02	0.11±0.01
QPA-1371		0.42±0.06	0.33±0.06	0.22±0.02	0.12±0.003
QPA-646		0.25±0.04	0.20±0.10	0.12±0.02	0.06±0.003

[0799] 合成具有缀合至3'末端的胆固醇的三个PPM1A AON,并在PPM1A qRT-PCR测定中使用iCell人运动神经元在三复孔中测试功能。具有胆固醇缀合物基团的三个PPM1A AON如上表6中所示。转染后72小时,通过qRT-PCR量化PPM1A和GAPDH RNA水平。图8显示了响应于使用具有胆固醇缀合物基团的PPM1A AON(QPA-606-C、QPA-642-C、QPA-644-C)处理,在人运动神经元中PPM1A的相对量减少。结果进一步显示在表15中。与单独的endoporter相比(RQ=1.0),500nM QPA-606-C(SEQ ID NO:2876)降低PPM1A RNA至0.16,500nM QPA-642-C(SEQ ID NO:2881)降低PPM1A RNA至0.15和500nM QPA-644-C(SEQ ID NO:2882)降低PPM1A RNA至0.12。因此,PPM1A AON序列的胆固醇缀合物显著降低PPM1A RNA。

[0800] 表15:响应于具有胆固醇缀合物基团的PPM1A AON的相对PPM1A量。平均值+/-标准差

[0801]

	PPM1A相对量
endoporter	1.00±0.14
500nM QPA-606-C	0.16±0.06
500nM QPA-642-C	0.15±0.03
500nM QPA-644-C	0.12±0.05

[0802] 为了进一步检测PPM1A AON抑制PPM1A表达的能力,在人运动神经元的AON转染后定量PPM1A和下游靶蛋白水平(图9-12)。通过western印迹并使用如下方法定量蛋白水平。分别以750,000个细胞/孔和400,000个细胞/孔的密度将野生型来源的运动神经元或疾病iPSC来源的运动神经元接种在6孔板(9.6cm^2)或12孔板(3.5cm^2)上。将运动神经元维持在神经元成熟培养基中(Neurobasal-Thermofisher 21103049,1x Glutamax-Thermofisher 35050061,1x NEAA-Thermofisher 11140050,1x B-27添加补充剂-Thermofisher A3582801,1x N2补充剂-Thermofisher 17502048,0.2ug/mL抗坏血酸-SIGMA A4403),其中含有生长因子BDNF、CNTF和GDNF(10ng/mL BDNF-R&D Systems 248-BDB、10ng/mL CNTF R&D

257-N和10ng/mL GDNF-R&D Systems 212-GD)。

[0803] 运动神经元在完全神经元成熟培养基中接种后5天转染。使用Endoporter,以6μM终浓度进行AON转染。将细胞孵育72小时,然后收集用于western印迹。细胞裂解缓冲液2%SDS(50mM Tris pH7、10%甘油、2%SDS)补充有1x Halt蛋白酶抑制剂混合物(Thermofisher 78425)和1x Halt磷酸酶抑制剂混合物(Thermofisher 78428)。使用2%SDS收集的样品在收集后立即在95℃下加热封闭10分钟,然后短暂旋转以收集盖上积聚的任何蒸发物。使用Pierce BCA蛋白测定试剂盒(Thermofisher 23227)根据生产厂商的说明书进行蛋白定量。施用来自Molecular Devices的SpectraMax i3x进行读板,并使用SoftMax pro收集数据。使用4-20%Criterion™TGX Stain-Free™蛋白凝胶(Biorad)跑胶。跑胶后,使用Iblot2转移系统转移膜。将膜在5%BSA(针对磷酸化的蛋白)或5%牛奶中封闭40分钟。使用一抗将膜在4℃下孵育过夜。使用了下述抗体LC3B(Cell Signaling CST2775);PPM1A(Abcam ab14824);NAK/TBK1(Abcam ab40676);磷酸化-TBK1/NAK(Cell Signaling 5483);GAPDH(Proteintech 60004和Abcam ab181602)。使用了下述二抗抗rb家兔IgG,HRP连接的(Cell Signaling 7074)和抗msIgG,HRP连接的(Cell Signaling 7076)。使用Li-Cor Fc成像系统获得图像,用于量化的软件是Image Studio Lite。

[0804] 首先,考察PPM1A AON降低TBK1突变ALS患者iPSC来源运动神经元中PPM1A蛋白水平的能力。PPM1A AON用endoporter以500nM转染,对照孔仅用endoporter处理。此外,将siControl(siCtrol)和siPPM1A用RNAiMax转染,用在48小时后洗去。转染后72小时,收集所有处理组用于PPM1A蛋白水平的western印迹分析。对PPM1A条带强度进行量化并归一化至GAPDH。通过将PPM1A/GAPDH值除以对照并乘以100来计算PPM1A的表达百分比(SiPPM1A对比siCtrol;PPM1A AON对比endoporter)。

[0805] 图9和表16显示了PPM1A蛋白响应于使用PPM1A AON(QPA-646和QPA-915)的处理而减少。500nM QPA-646(SEQ ID NO:2883)降低PPM1A蛋白至正常的40%和QPA-915(SEQ ID NO:2897)降低PPM1A蛋白至正常的48%。因此,PPM1A AON减少PPM1A转录物,导致蛋白表达减少。

[0806] 表16:响应于PPM1A AON的归一化至对照(endoporter)的相对PPM1A量

[0807]

	相对于对照的PPM1A%
siCtrol	100
siPPM1A	63.463
endoporter	100
endo+CL	69.4383
QPA-646:500nM	39.8165
QPA-915:500nM	48.4634

[0808] 接下来,考察PPM1A AON降低野生型iPSC来源运动神经元中PPM1A蛋白水平的能力。评价了下述PPM1A AON:QPA-642(SEQ ID NO:2881)、QPA-646(SEQ ID NO:2883)、QPA-1371(SEQ ID NO:2911)、QPA-905(SEQ ID NO:2895)和QPA-915(SEQ ID NO:2897)。以50、250和500nM使用endoporter转染PPM1A AON,并且仅使用endoporter处理对照孔。转染后72小时,收集所有处理组用于PPM1A蛋白水平的western印迹分析。对PPM1A条带强度进行量化并归一化至GAPDH。通过将PPM1A/GAPDH值除以对照并乘以100来计算PPM1A的表达百分比

(PPM1A AON对比endoporter对照)。

[0809] 图10显示了在野生型iPSC来源的运动神经元中PPM1A蛋白水平响应于使用PPM1A AON(QPA-642、QPA-646、QPA-1371、QPA-905和QPA-915)的治疗而降低。所有PPM1A AON在72小时内将PPM1A蛋白降低至正常水平的40-94％(表17)。因此,PPM1AAON减少PPM1A转录物,导致蛋白表达减少。

[0810] 表17:在72小时时PPM1A AON减少PPM1A蛋白水平

[0811]

AON	对照	50nM	250nM	500nM
仅 Endoporter	100			
QPA-642		58.9%	59.4%	73.5%
QPA-646		54.4%	70.5%	65.9%
QPA-1371		69.0%	93.8%	80.0%
QPA-905		43.4%	47.3%	39.8%

[0812]

QPA-915		60.3%	62.0%	57.5%

[0813] PPM1A起磷酸酶的作用,其去磷酸化的靶点之一是蛋白TBK1。因此,我们研究了PPM1A转录物和蛋白的减少是否具有增加TBK1的磷酸化的下游功能影响。已知TBK1在丝氨酸172处被磷酸化,去磷酸化受PPM1A活性控制(Xiang等,PPM1A silences cytosolic RNA sensing and antiviral defense through direct dephosphorylation of MAVS and TBK1,Science Advances,2(7),July 1,2016)。根据上文所述的方法,使用50nM QPA-646(SEQ ID NO:2883),50nM QPA-905(SEQ ID NO:2895)以endoporter转染或仅使用endoporter(对照)处理野生型iPSC来源的人运动神经元,进行western印迹测定。在72小时后,除去AON和endoporter,将神经元更换成新鲜培养基。在转染后第7天,运动神经元第二次用AON和endoporter或仅endoporter处理。在第14天时,将运动神经元裂解,通过western印迹分析PPM1A、磷酸化TBK1(pTBK1、丝氨酸172)、TBK1和GAPDH的蛋白水平。图11A-11C和表17显示了在使用PPM1A AON(QPA-646和QPA-905)处理的人运动神经元中的Western印迹分析的定性和定量结果。QPA-646(SEQ ID NO:2883)降低PPM1A蛋白至对照的17％和QPA-905(SEQ ID NO:2895)降低PPM1A蛋白至对照的14％。QPA-646(SEQ ID NO:2883)相对于TBK1将pTBK1增加至对照的223％,QPA-905(SEQ ID NO:2895)相对于TBK1将pTBK1增加至对照的555％。在AON处理2周后,两种AON均显示PPM1A在蛋白水平上的持续敲低,导致下游效应物pTBK1增加。

[0814] 表17:在72小时时PPM1A AON减少PPM1A蛋白水平和增加PTBK1/TBK1水平

[0815]

	占对照PPM1A/GAPDH％	占对照PTBK1/TBK1％
endoporter	100	100
QPA-646	17.2414	222.965
QPA-905	13.7931	554.865

[0816] 为了确定PPM1A AON是否可以影响其他下游途径,考察了通过LC3B诱导的自噬。根据上文所述的方法,使用50nM QPA-646(SEQ ID NO:2883)以endoporter转染或仅使用endoporter(对照)处理野生型iPSC来源的人运动神经元,进行western印迹测定。转染后72小时,裂解细胞并进行处理,用于蛋白水平的western印迹测定。图12A-12C和表18显示了在

使用PPM1A AON(QPA-646)处理的野生型iPSC来源的人运动神经元中的Western印迹分析的定性和定量结果。QPA-646(SEQ ID NO:2883)减少PPM1A蛋白(0.50endoporter对比0.37QPA-646),相对于TBK1增加pTBK1(0.0011endoporter对比0.0043QPA-646)和相对于LC3B I增加LC3B II(0.23endoporter对比0.88QPA-646)。随着更多含有脂化LC3B(II)的自噬体形成,LC3B II与I的比例随着自噬诱导而增加。因此,PPM1A AON增加下游通路活性,导致pTBK1和自噬增加。

[0817] 表18:在72小时时PPM1A AON减少PPM1A蛋白水平、增加PTBK1/TBK1水平和增加LC3B II/I

[0818]

	PPM1A/GAPDH	pTBK1/TBK1	LC3B II/I
endoporter	0.50	0.001	0.23
QPA-646:500nM	0.37	0.004	0.88

[0819] 蛋白酶体的抑制引起导致细胞死亡的蛋白毒性应激。作为蛋白应激和神经变性模型,我们考察了PPM1A AON是否在用MG132抑制蛋白酶体后挽救细胞存活。以5,000个细胞/孔的密度将SY5Y细胞接种在384孔板中,并培养24小时。然后,以200nM QPA-905(SEQ ID NO:2895)、QPA-1045(SEQ ID NO:2907)、QPA-895(SEQ ID NO:2893)使用AON转染SY5Y 72小时。用新鲜培养基对细胞进行24小时洗涤。将0.4uM MG132(目录号1748,Tocris)添加至施用AON处理的孔以及对照孔。根据生产厂商的说明书,通过CellTiter-Glo 2.0细胞活力测定(Promega,Madison,WI),在16小时后测量细胞存活。在GloMax Luminometer(Promega,Madison,WI)上对细胞裂解物的发光进行定量。所有处理条件均在7个复孔中进行。将发光数据归一化,使得未处理的条件等于100%应答,而MG132处理等于0%应答。针对AON和MG132组合治疗计算细胞存活的挽救百分比。

[0820] 图13和表19显示了响应于使用PPM1A AON(QPA-905、QPA-1045和QPA-895)处理在蛋白毒性应激神经变性模型中细胞存活的挽救百分比。QPA-905(SEQ ID NO:2895)挽救细胞存活69%,QPA-1045(SEQ ID NO:2907)挽救细胞存活56%和QPA-895(SEQ ID NO:2893)挽救细胞存活58%。QPA-905(SEQ ID NO:2895)、QPA-1045(SEQ ID NO:2907)和QPA-895(SEQ ID NO:2893)均显著增加细胞存活(***p<0.0001,单因素ANOVA结合Tukey多重比较检验,与仅MG132比较)。因此,降低PPM1A的AON会导致自噬能力增加,从而保护细胞免受神经变性。

[0821] 表19:在蛋白毒性应激神经退化模型中PPM1A AON处理导致挽救细胞存活。

[0822] 平均值+/-标准差

[0823]

	与对照相比细胞存活挽救%%
无Tx	100±18.72
MG132	0±19.13
QPA-905	68.7±22.62
QPA-1045	55.55±19.46
QPA-895	58.37±18.42

[0824] 通过引用并入

[0825] 出于所有目的本文引用的每篇专利文献和科学文章的全部公开内容通过引用并入本文。

[0826] 等效词

[0827] 本公开内容可以在不脱离其本质特征的情况下以其他任何特定形式体现。因此，认为前述实施方式是说明性的，而不是对本文描述的公开内容的限制。本公开内容的范围由所附权利要求而不是由前述说明书指示，并且所有落入权利要求的等同意义和范围内的变化都旨在包含在其中。

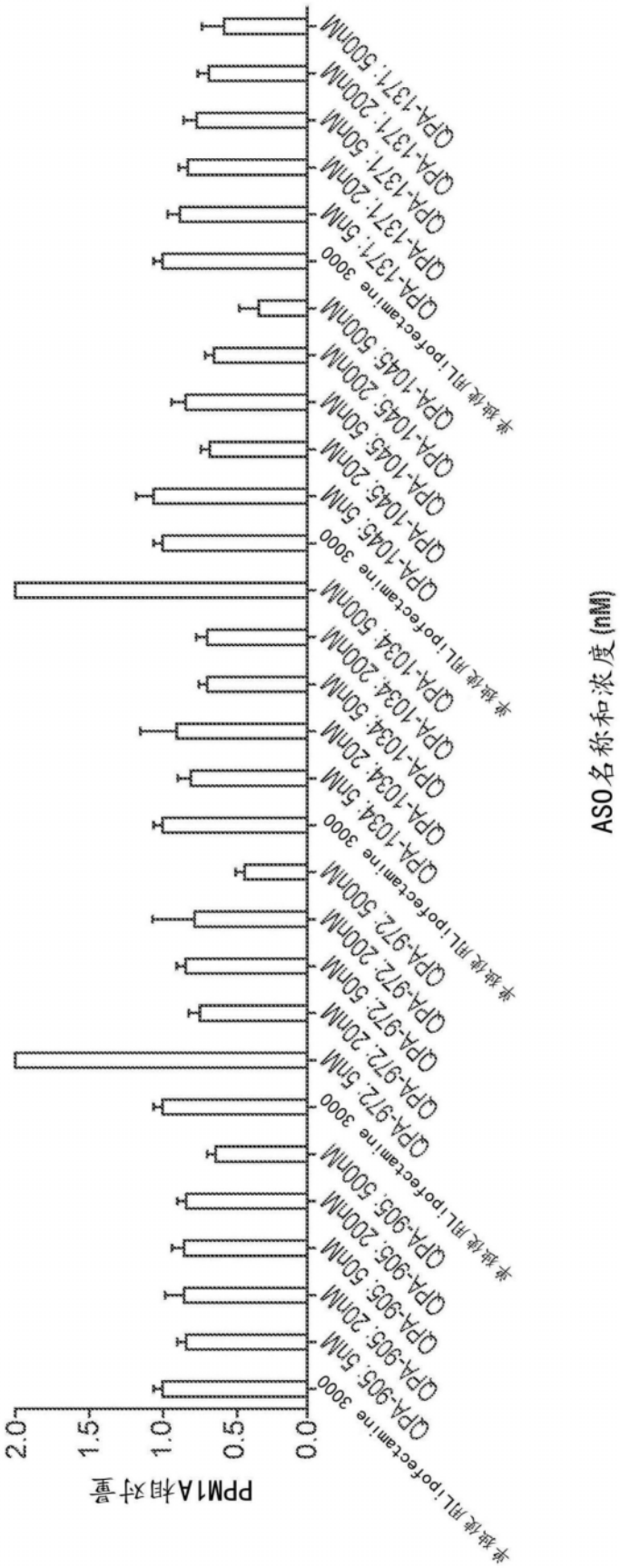

PPM1A相对量
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ASO名称和浓度(nM)
未处理
PLi pofectamine 3000
QPA-905: 5nM
QPA-905: 20nM
QPA-905: 50nM
QPA-905: 200nM
QPA-905: 500nM
未处理
PLi pofectamine 3000
QPA-972: 5nM
QPA-972: 20nM
QPA-972: 50nM
QPA-972: 200nM
QPA-972: 500nM
未处理
PLi pofectamine 3000
QPA-1034: 5nM
QPA-1034: 20nM
QPA-1034: 50nM
QPA-1034: 200nM
QPA-1034: 500nM
未处理
PLi pofectamine 3000
QPA-1045: 5nM
QPA-1045: 20nM
QPA-1045: 50nM
QPA-1045: 200nM
QPA-1045: 500nM
未处理
PLi pofectamine 3000
QPA-1371: 5nM
QPA-1371: 20nM
QPA-1371: 50nM
QPA-1371: 200nM
QPA-1371: 500nM

图1

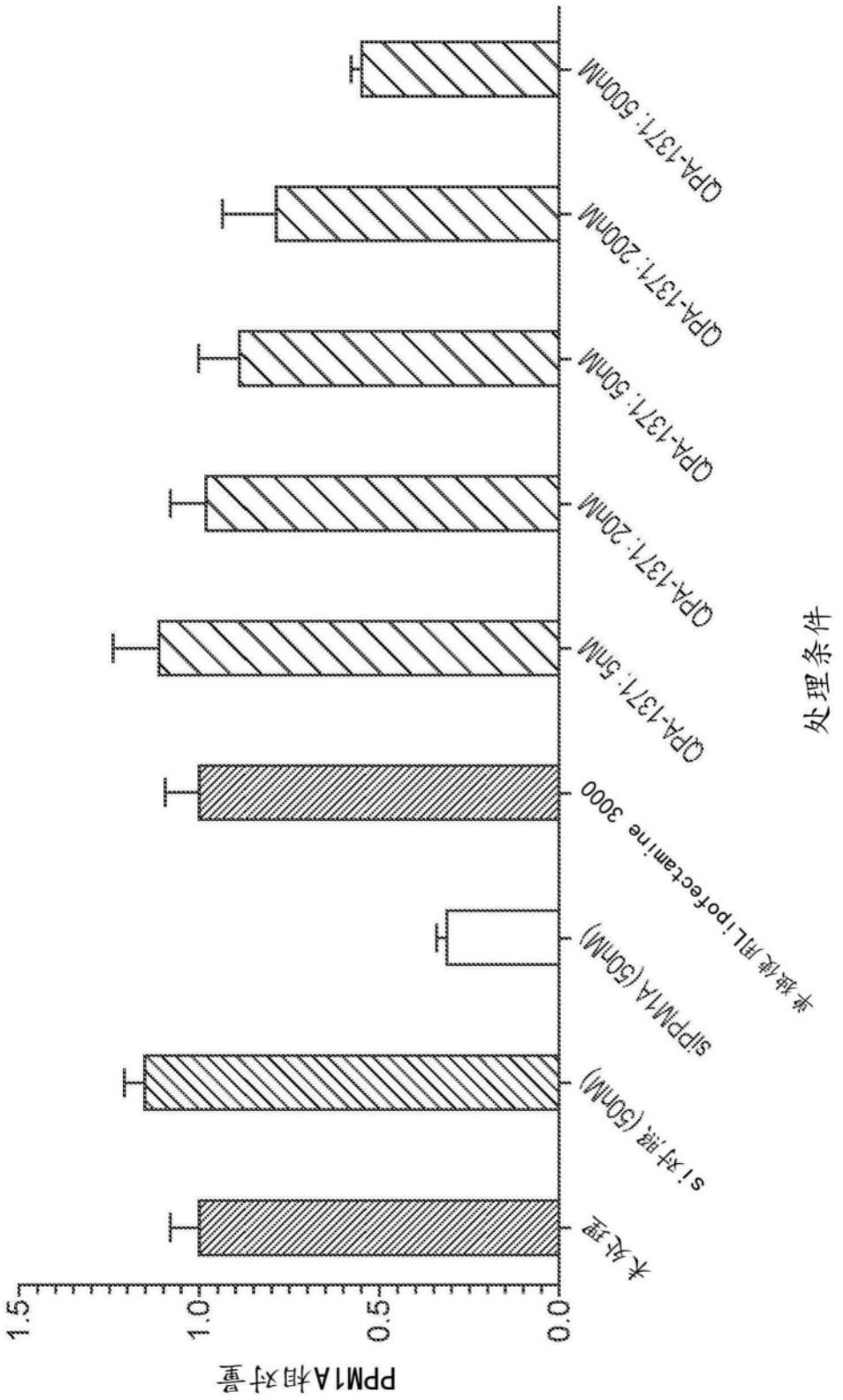

未处理
si:对照(50nM)
siPPM1A(50nM)
未处理 PBL:Dotecteamine 3000
QPA-1371:5nM
QPA-1371:20nM
QPA-1371:50nM
QPA-1371:200nM
QPA-1371:500nM
处理条件
PPM1A相对量
0.0
0.5
1.0
1.5

图2A

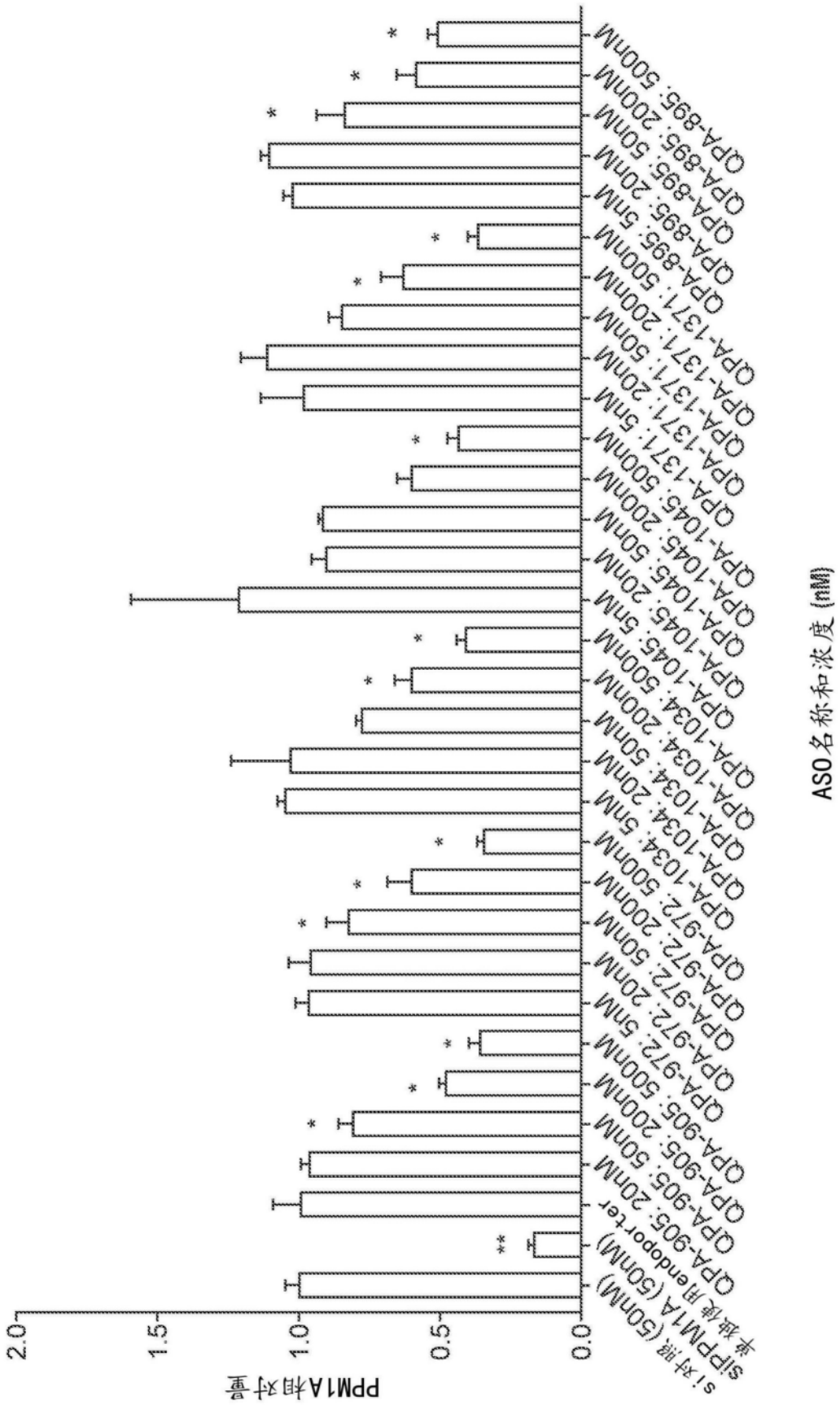

PPM1A相对量
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ASO名称和浓度 (nM)
si对照 (50nM)
未放体吊endoporter
GPA-905: 20nM
GPA-905: 50nM
GPA-905: 200nM
GPA-905: 500nM
GPA-972: 5nM
GPA-972: 20nM
GPA-972: 50nM
GPA-972: 200nM
GPA-972: 500nM
GPA-1034: 5nM
GPA-1034: 20nM
GPA-1034: 50nM
GPA-1034: 200nM
GPA-1034: 500nM
GPA-1045: 5nM
GPA-1045: 20nM
GPA-1045: 50nM
GPA-1045: 200nM
GPA-1045: 500nM
GPA-1371: 5nM
GPA-1371: 20nM
GPA-1371: 50nM
GPA-1371: 200nM
GPA-1371: 500nM
GPA-895: 5nM
GPA-895: 20nM
GPA-895: 50nM
GPA-895: 200nM
GPA-895: 500nM

图2B

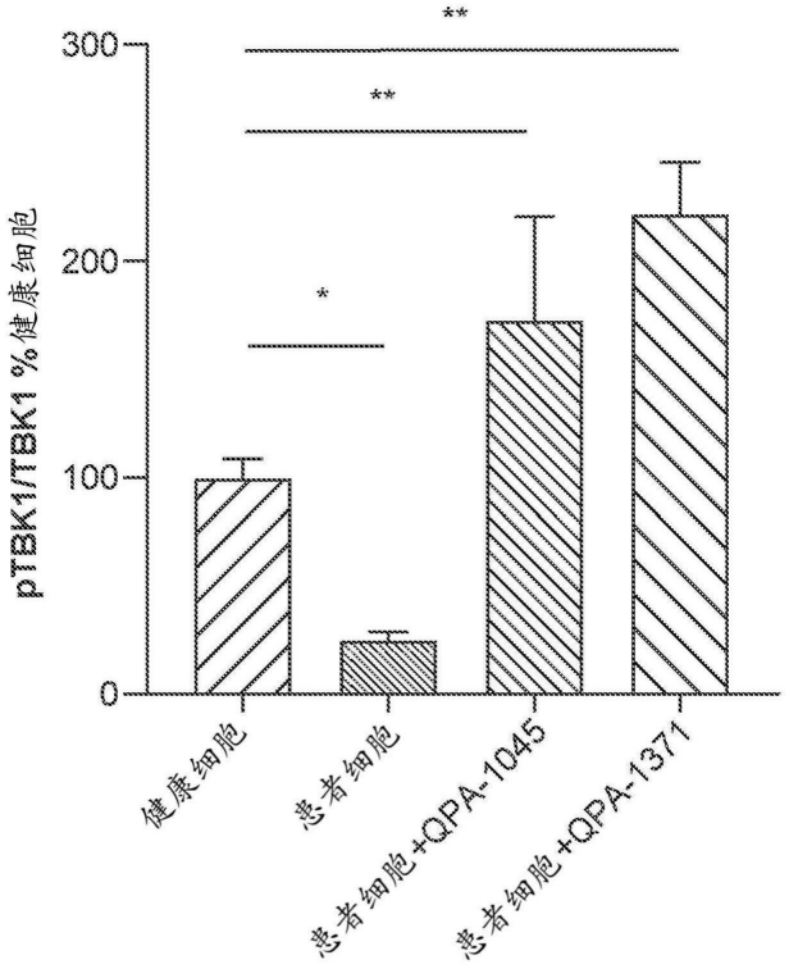

**
**
*
300
200
100
0
pTBK1/TBK1 %健康细胞
健康细胞
患者细胞
患者细胞+QPA-1045
患者细胞+QPA-1371

图3A

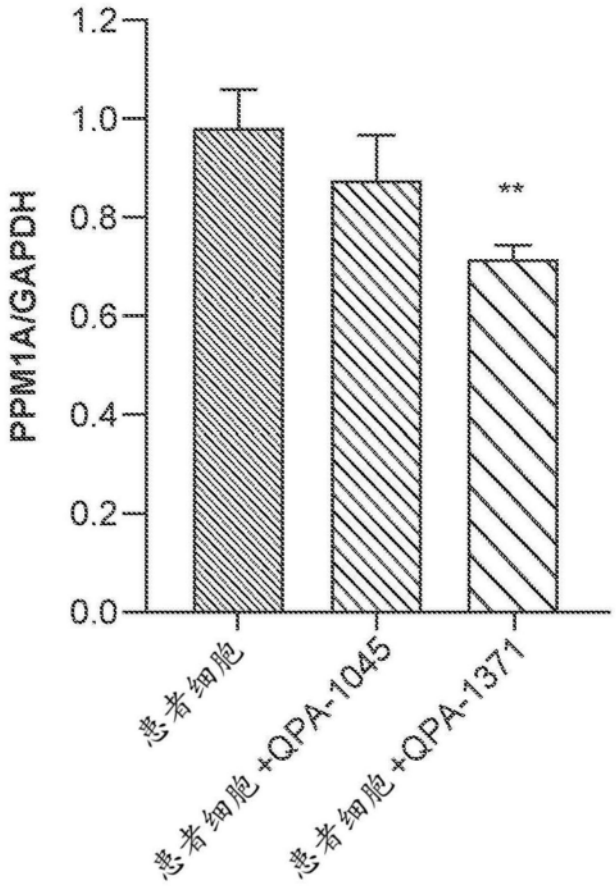

PPM1A/GAPDH
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
患者细胞
患者细胞+QPA-1045
患者细胞+QPA-1371

图3B

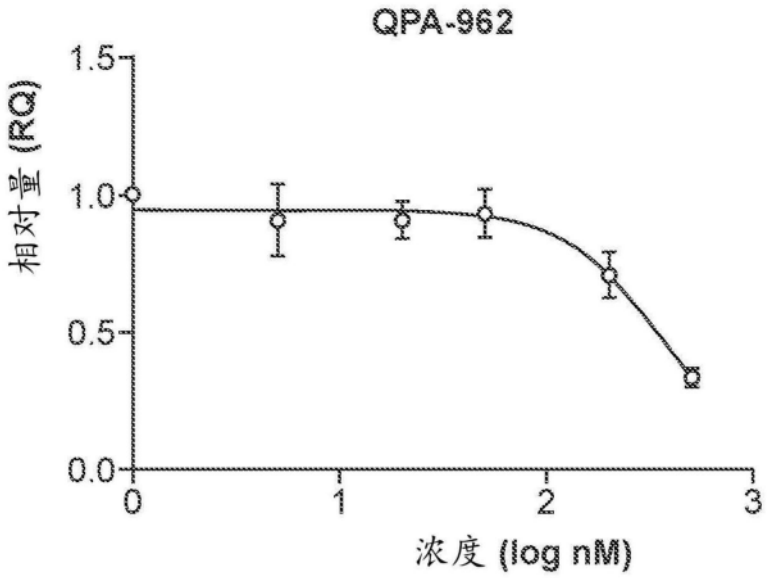

QPA-962
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4A

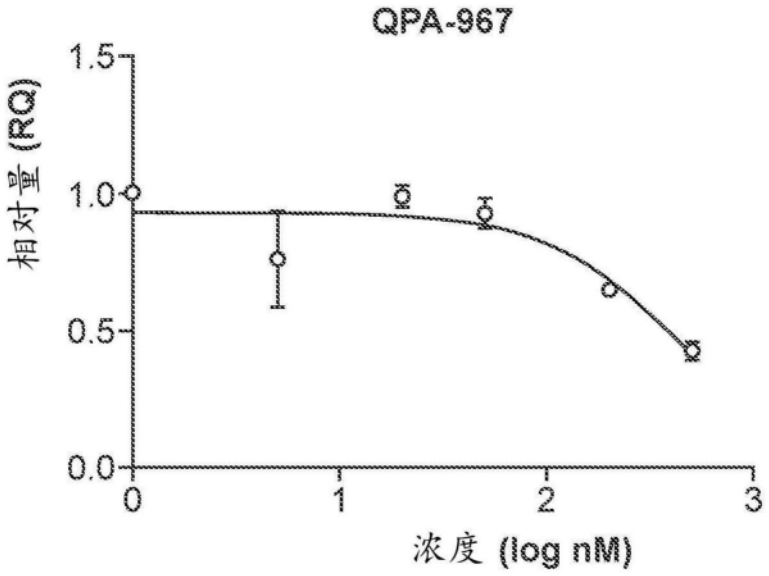

QPA-967
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4B

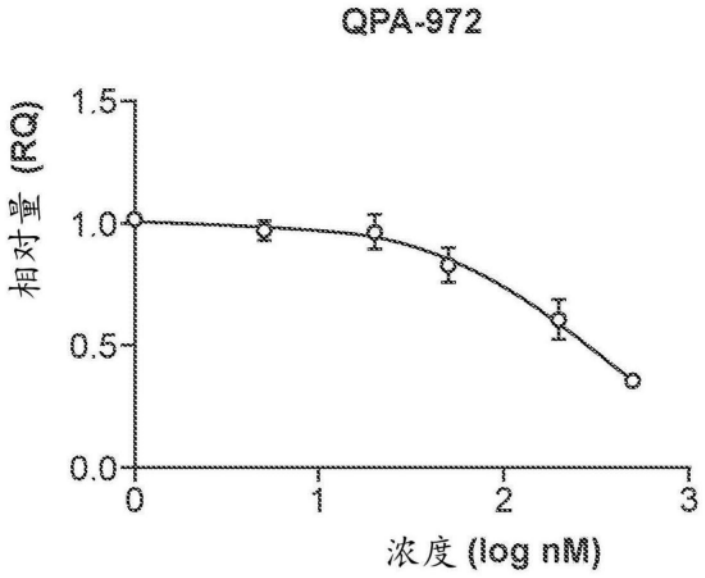

QPA-972
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4C

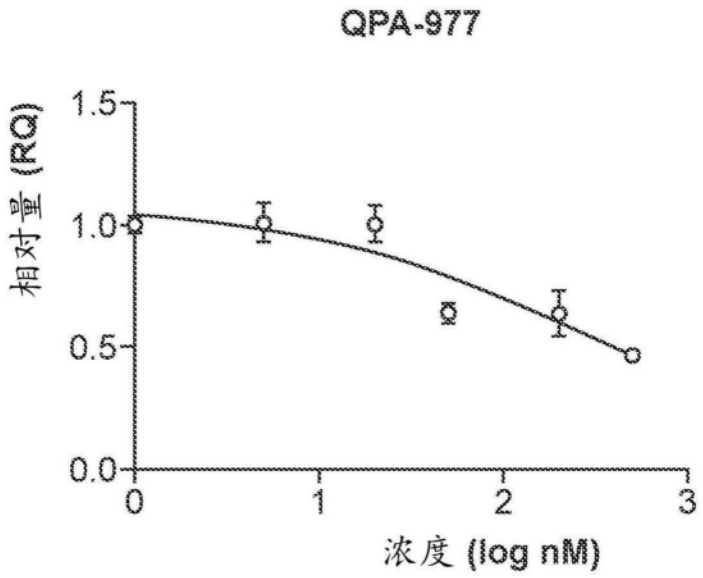

QPA-977
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4D

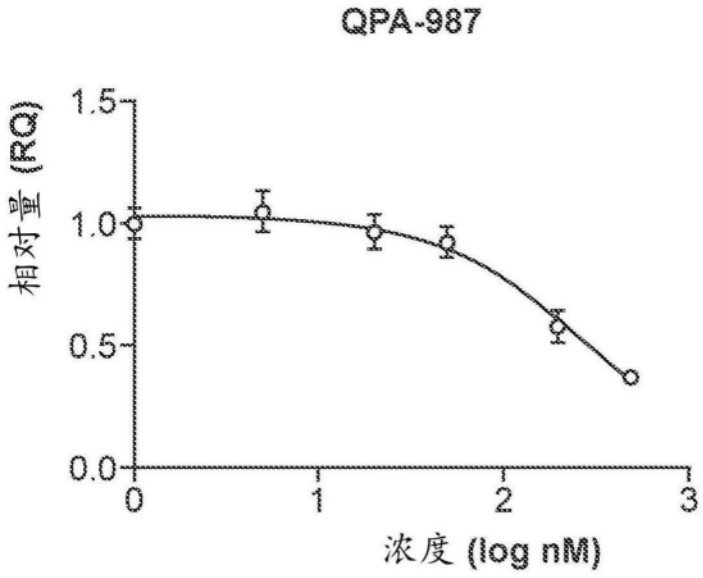

QPA-987
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4E

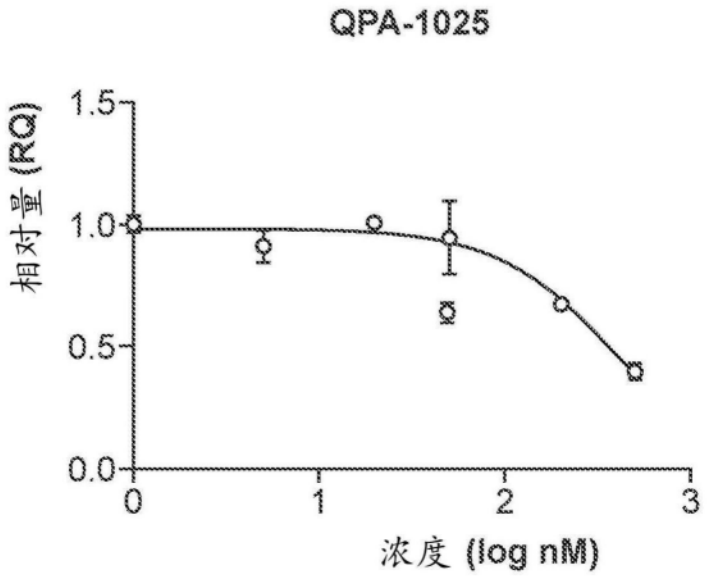

QPA-1025
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4F

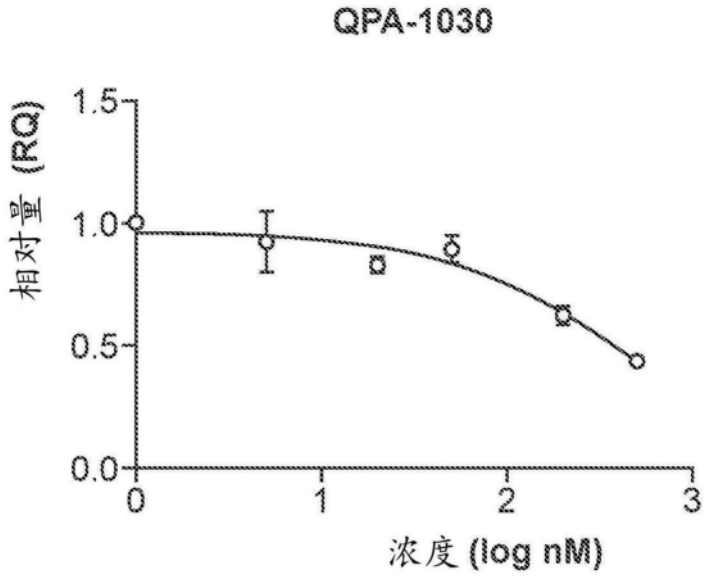

QPA-1030
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4G

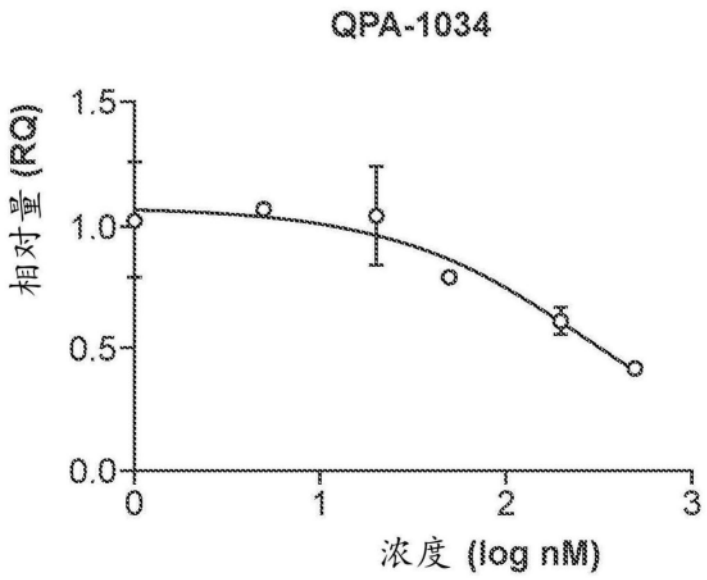

QPA-1034
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4H

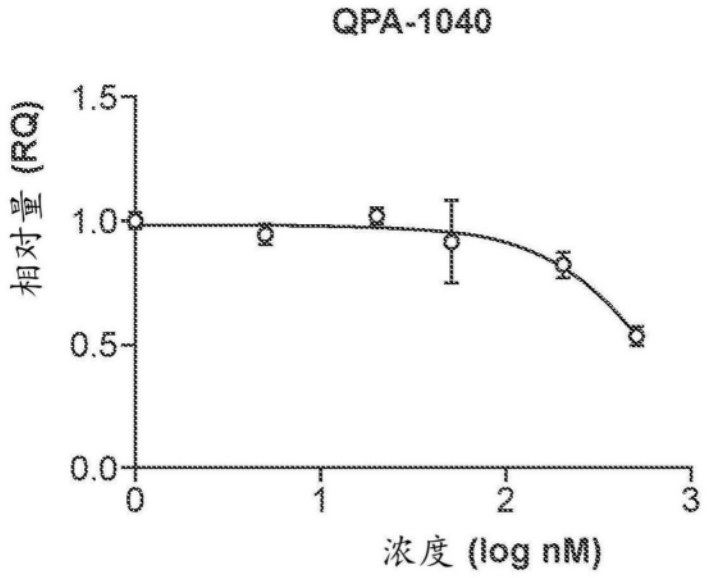

QPA-1040
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4I

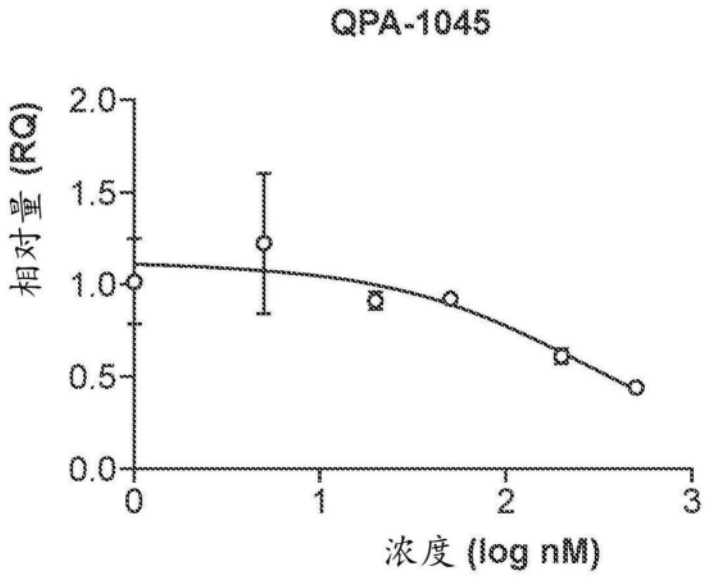

QPA-1045
相对量 (RQ)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4J

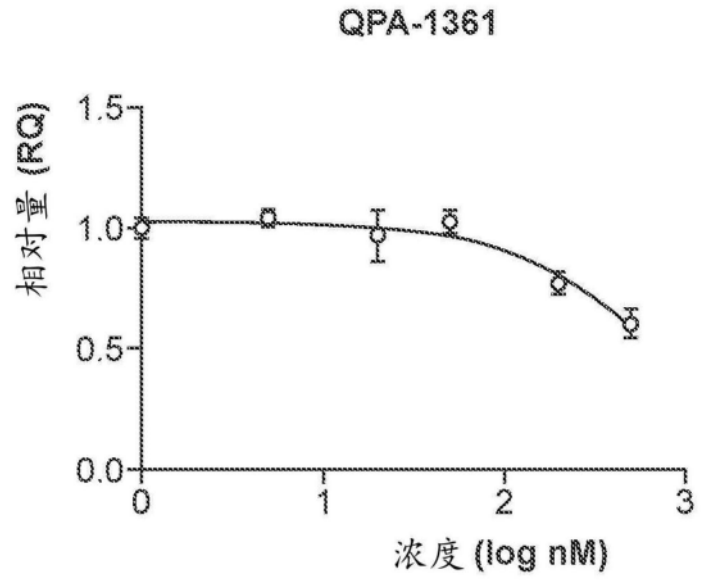

QPA-1361
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4K

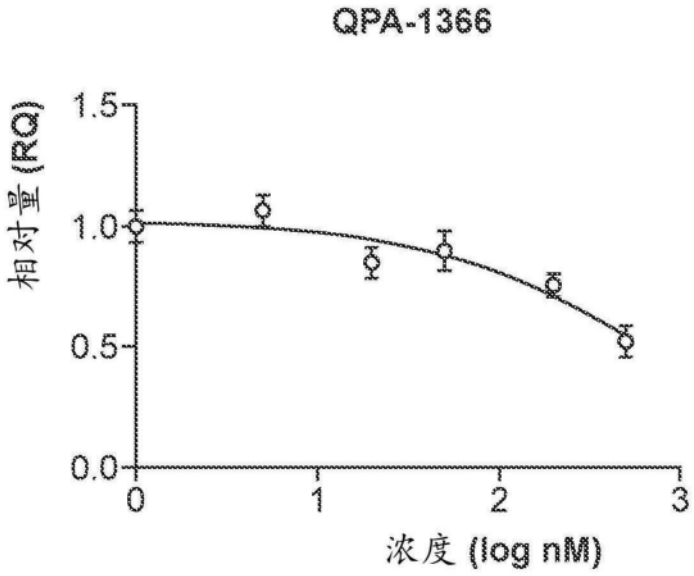

QPA-1366
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4L

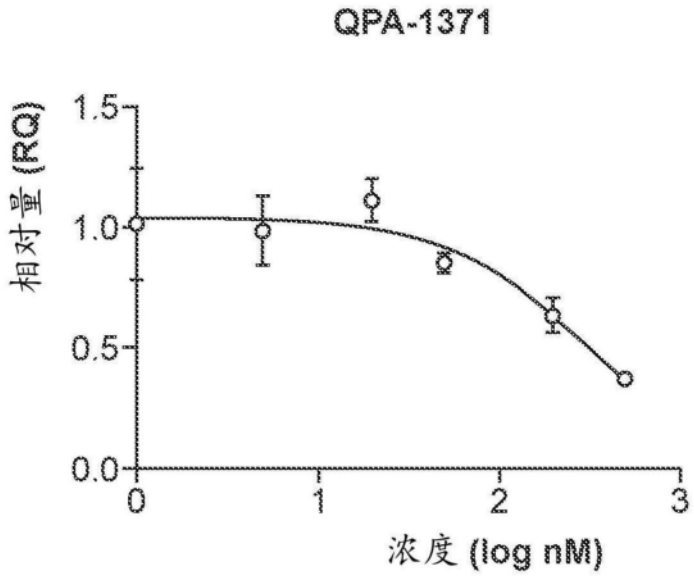

QPA-1371
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4M

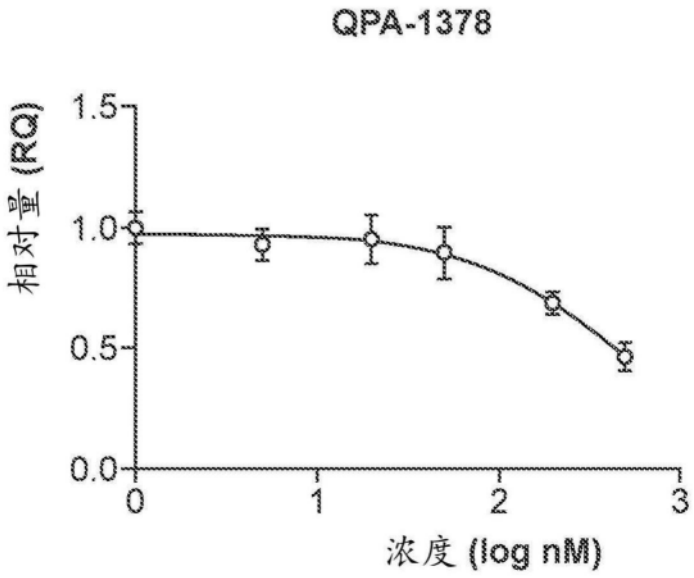

QPA-1378
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4N

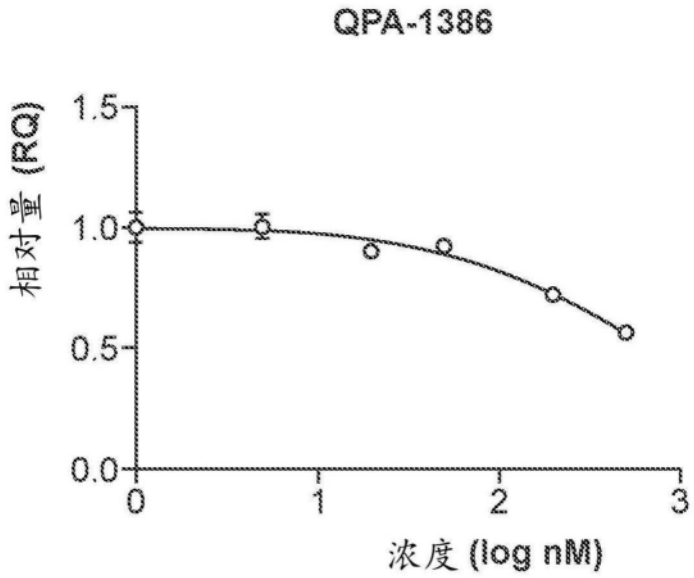

QPA-1386
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4O

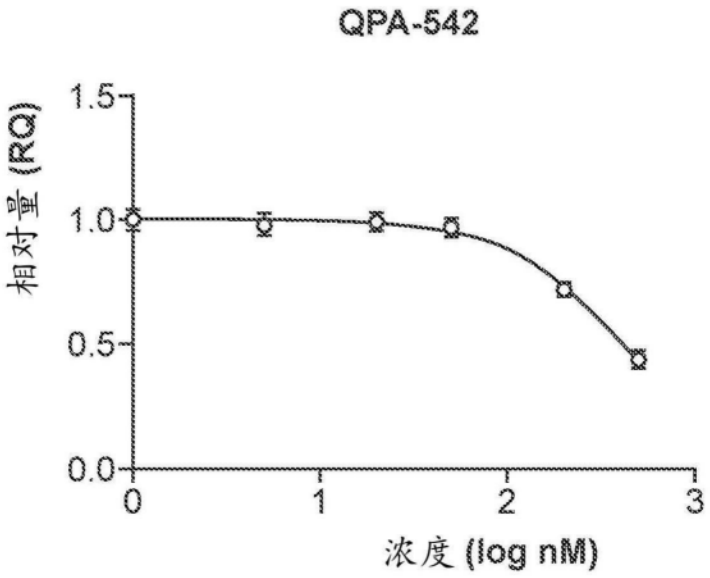

QPA-542
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4P

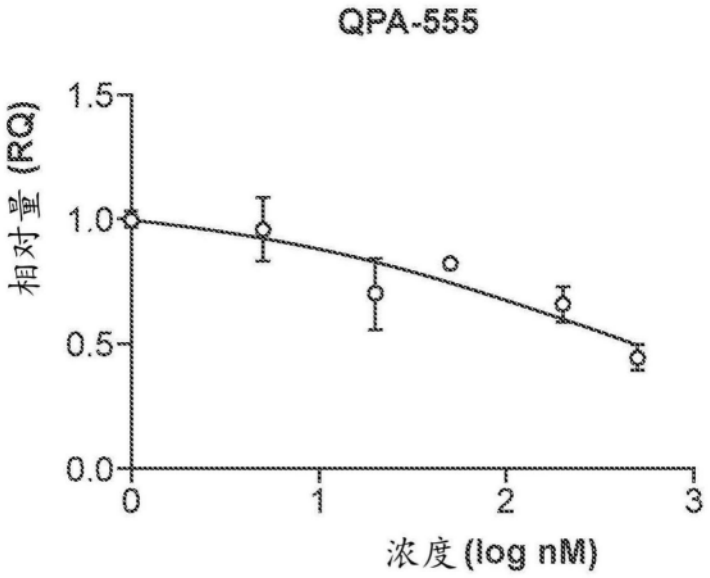

QPA-555
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4Q

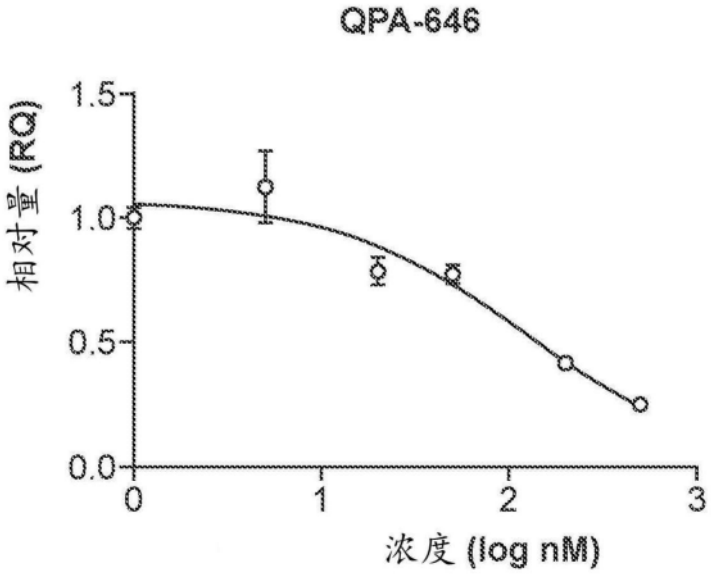

QPA-646
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4R

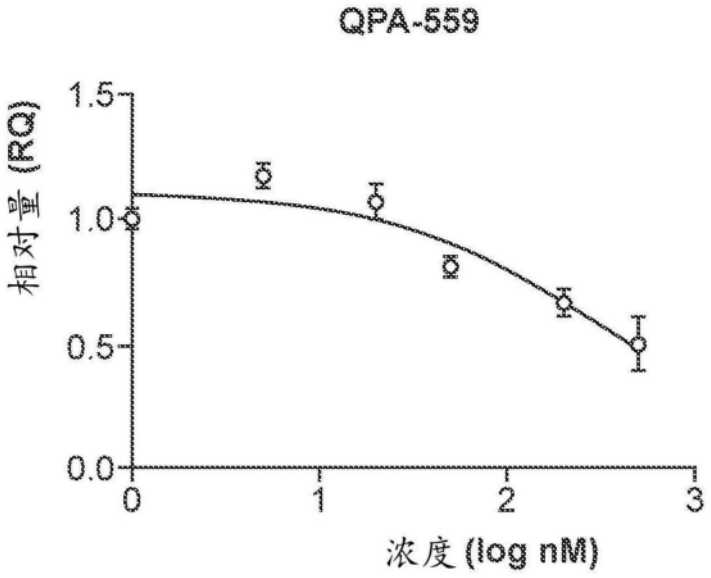

QPA-559
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4S

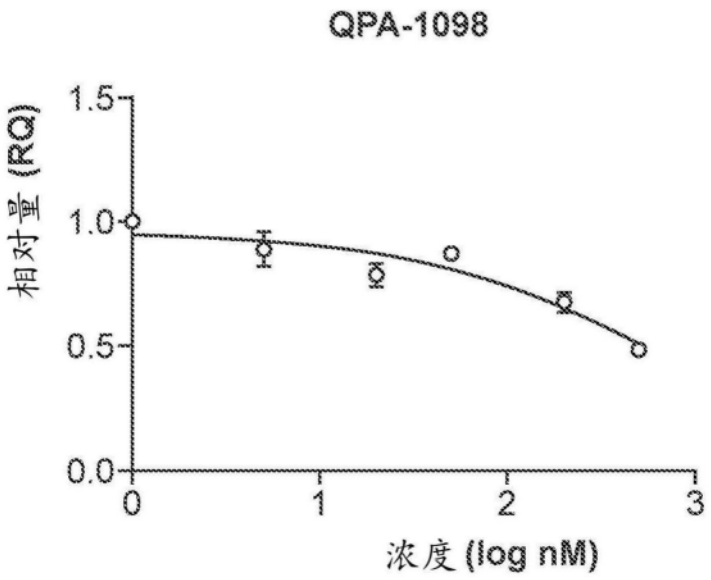

QPA-1098
相对量 (RQ)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
浓度 (log nM)

图4T

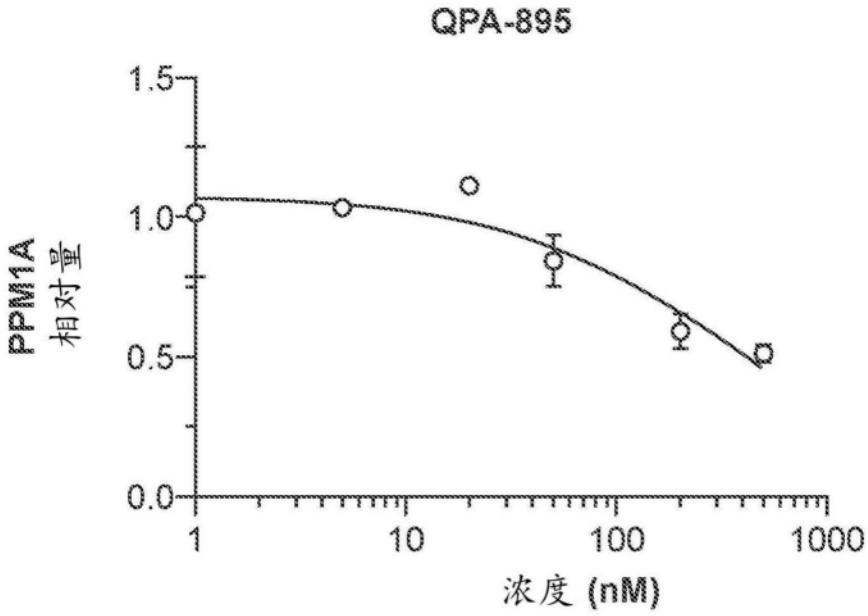

QPA-895
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图4U

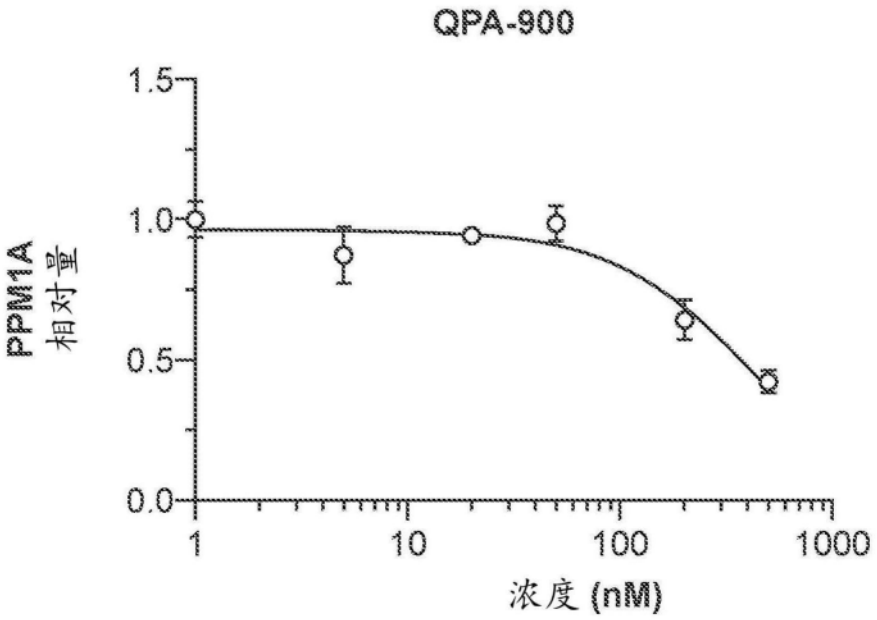

QPA-900
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图4V

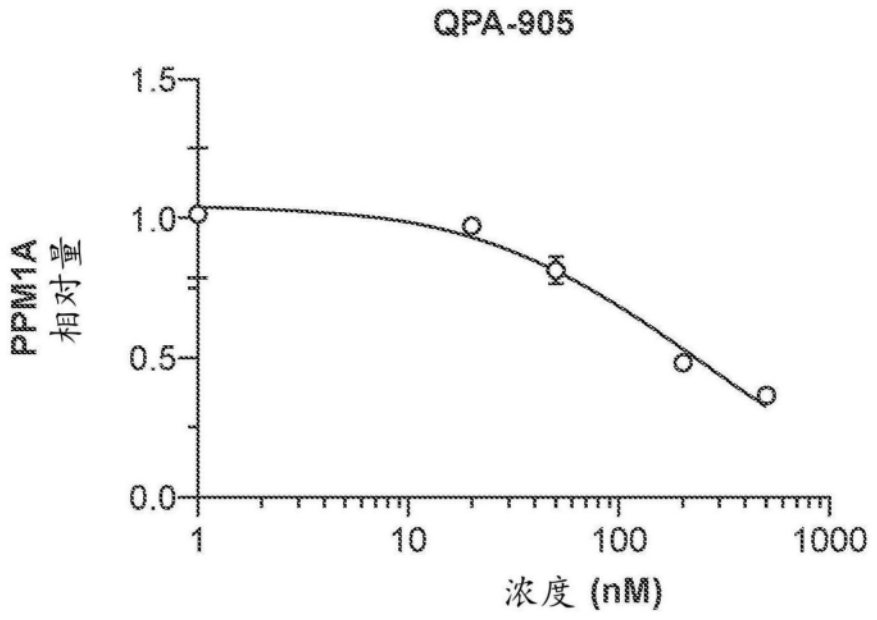

QPA-905
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图4W

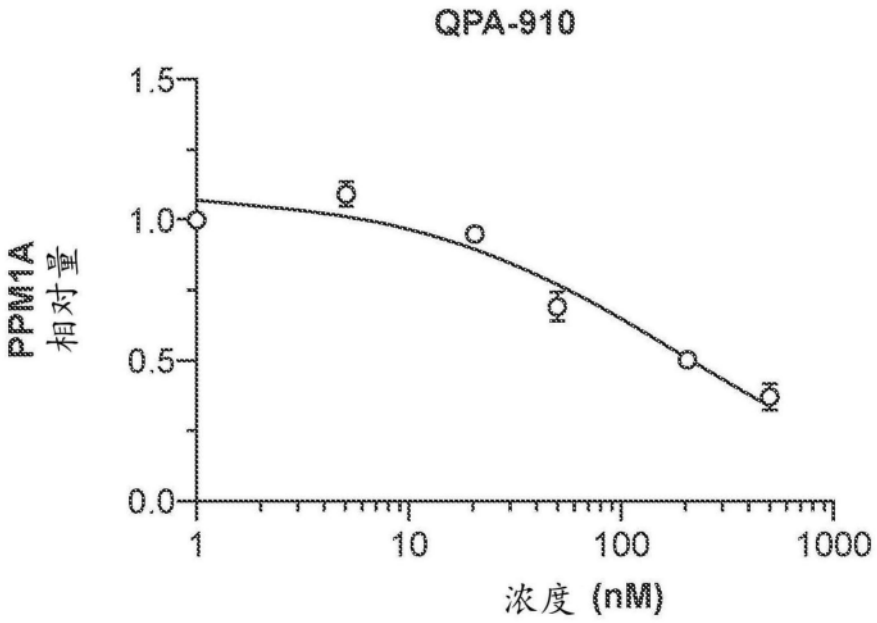

QPA-910
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图4X

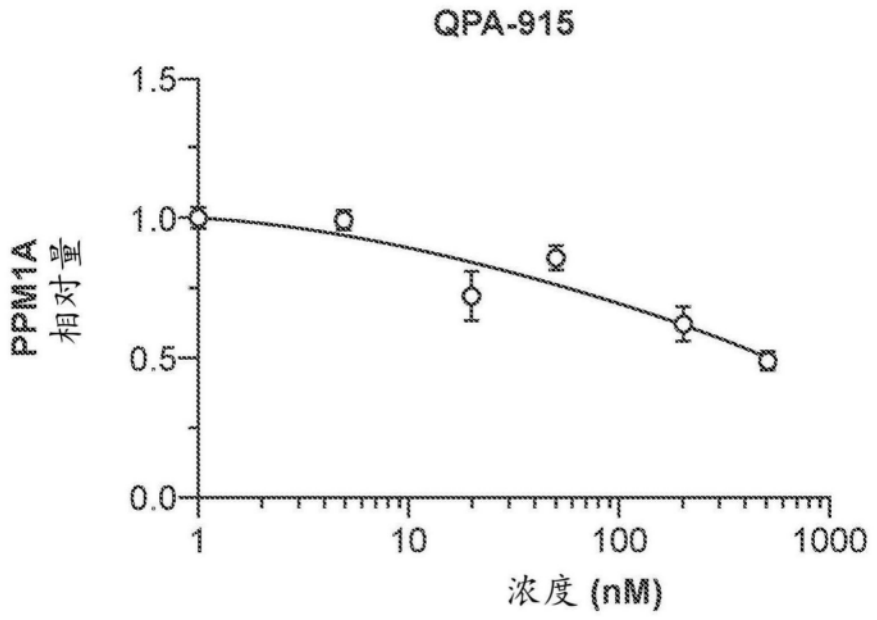

QPA-915
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图4Y

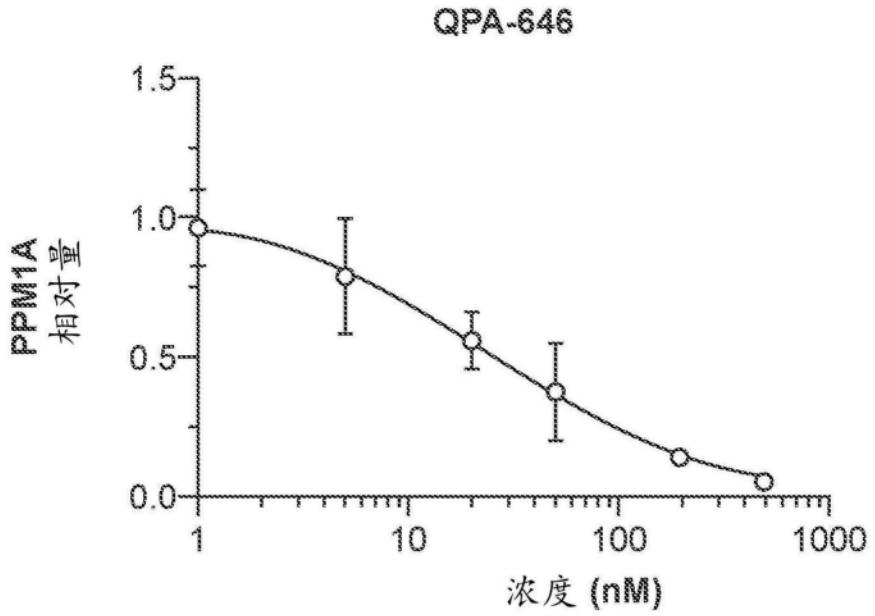

QPA-646
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5A

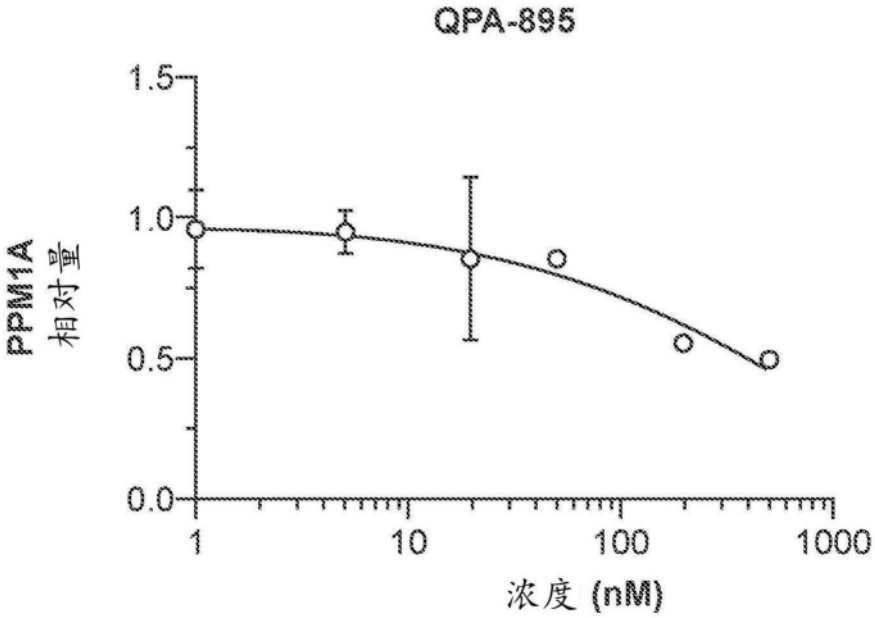

QPA-895
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5B

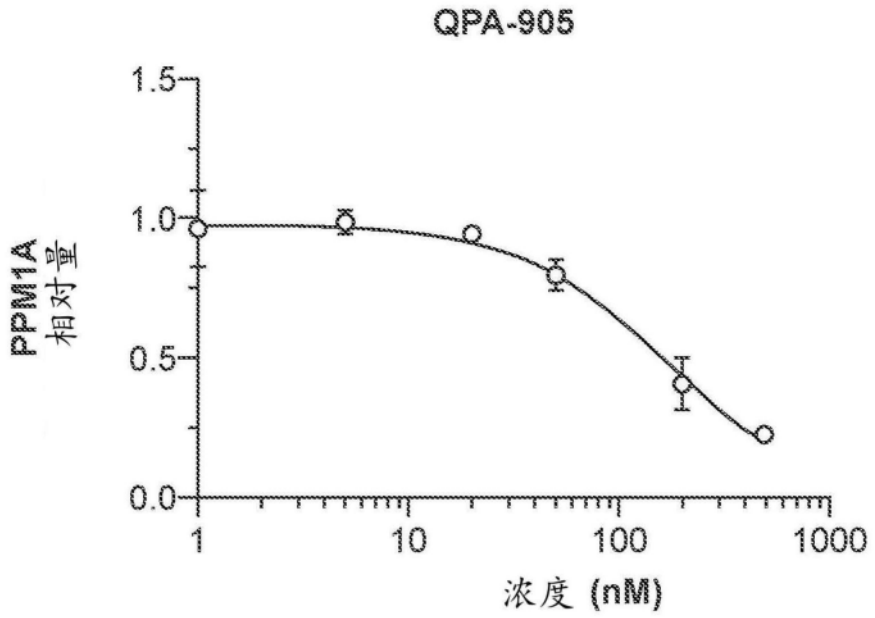

QPA-905
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5C

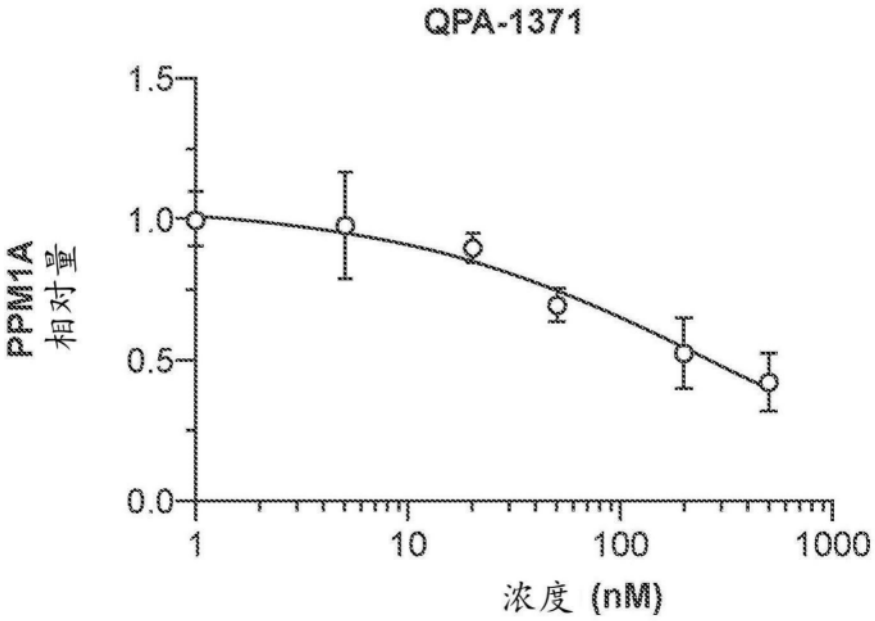

QPA-1371
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5D

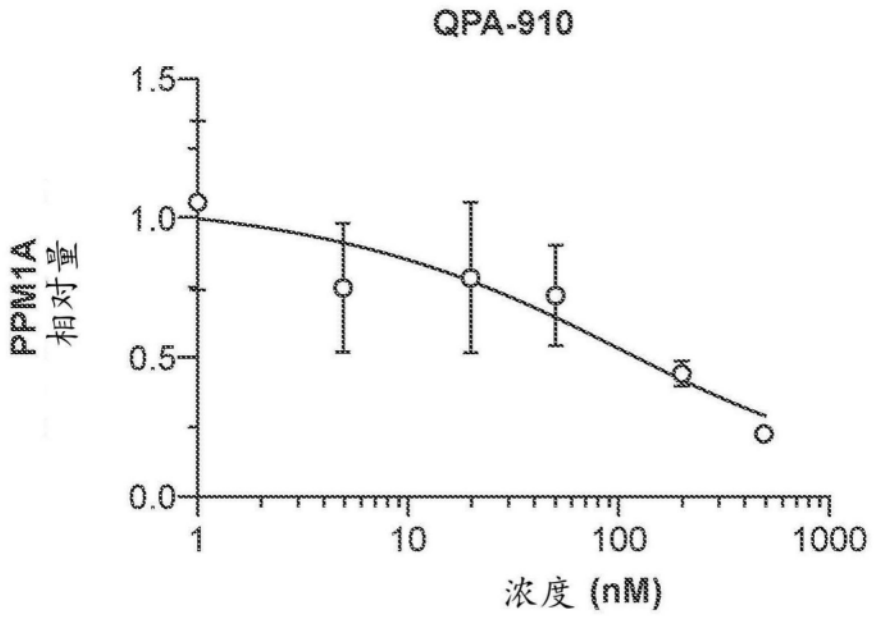

QPA-910
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5E

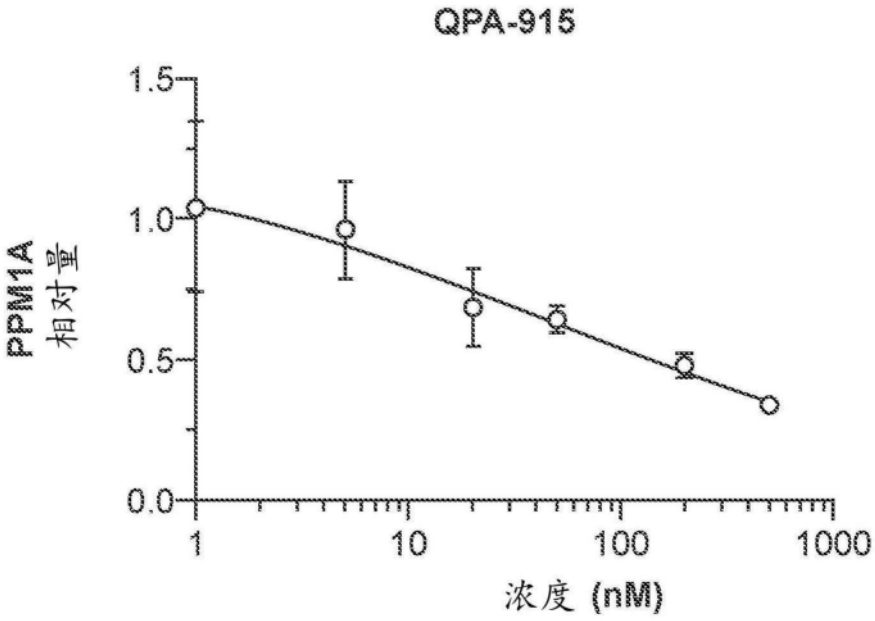

QPA-915
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5F

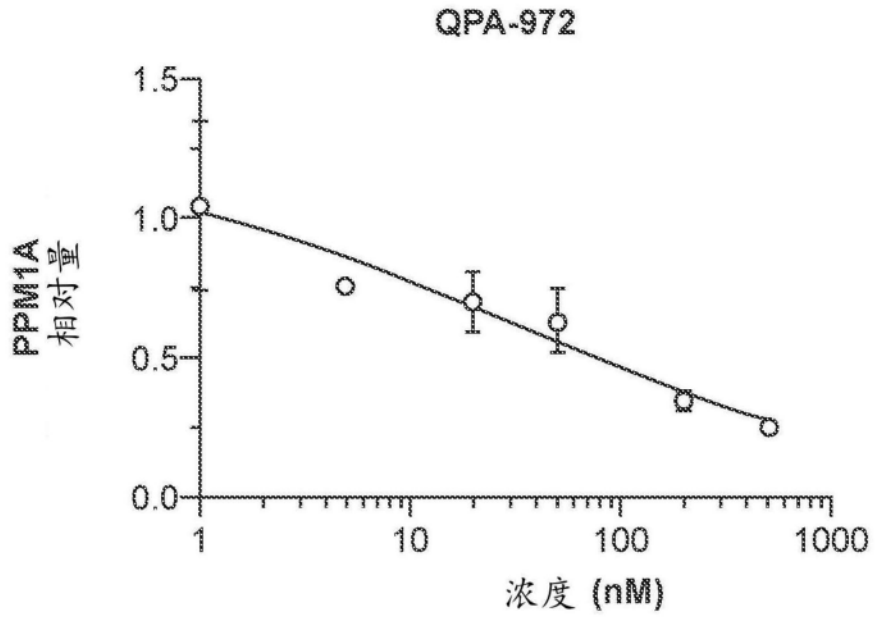

QPA-972
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5G

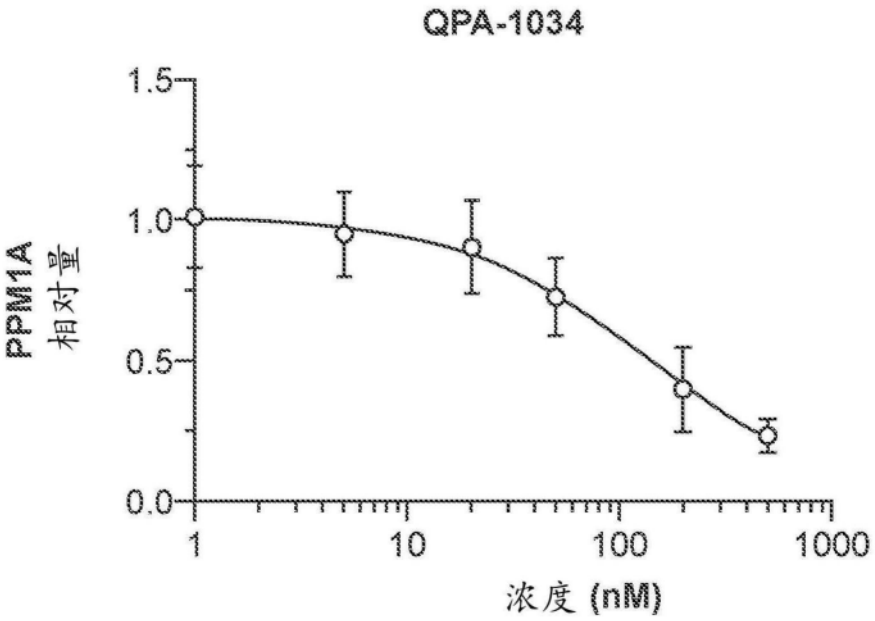

QPA-1034
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5H

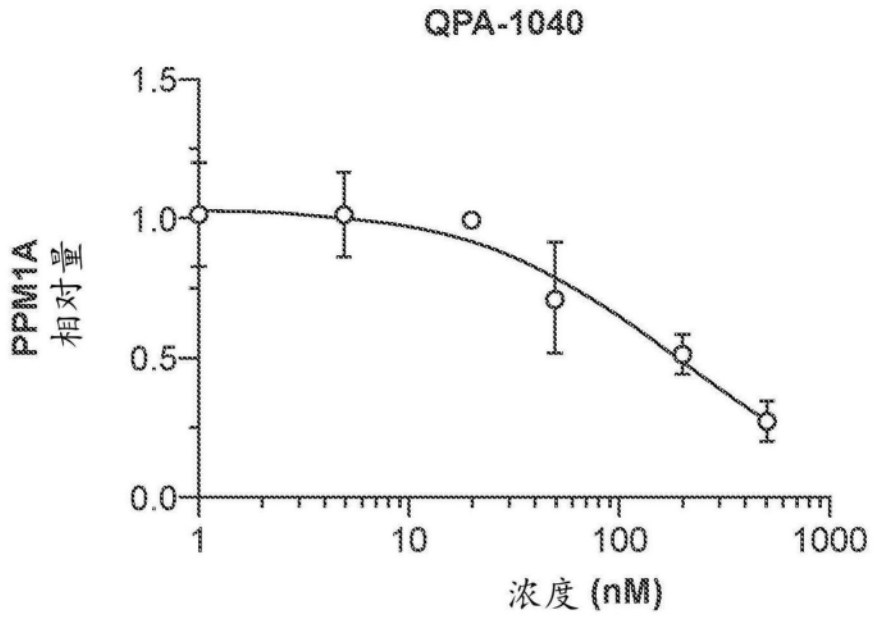

QPA-1040
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5I

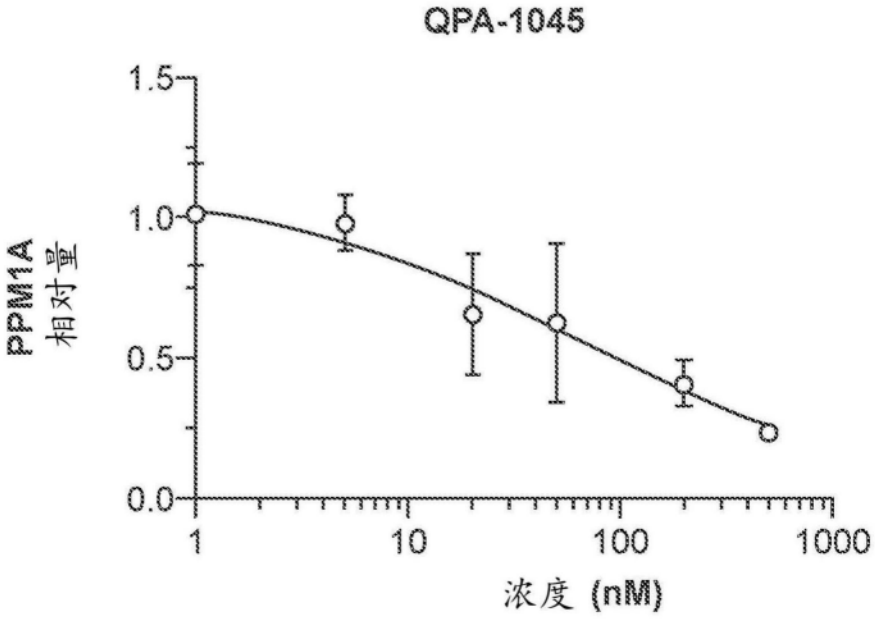

QPA-1045
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5J

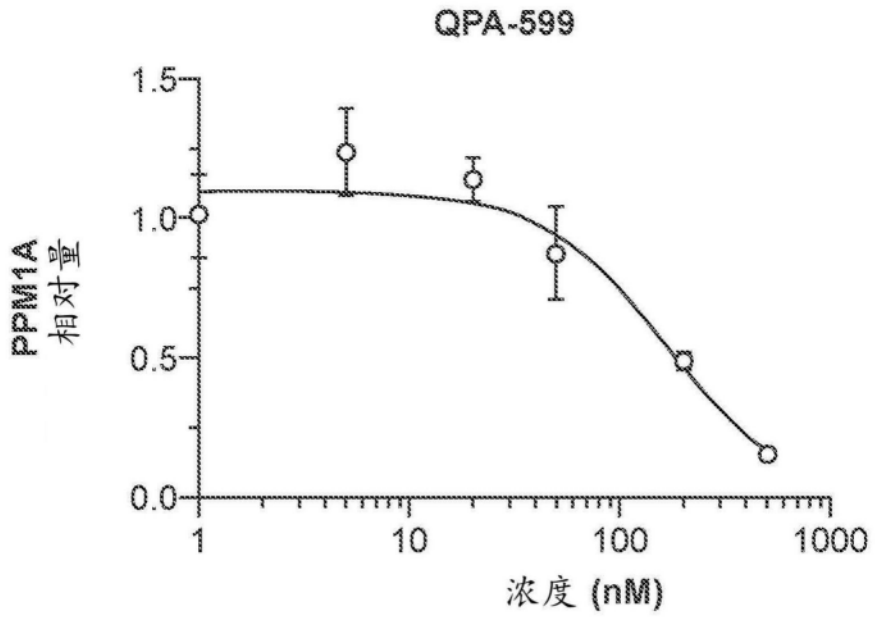

QPA-599
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5K

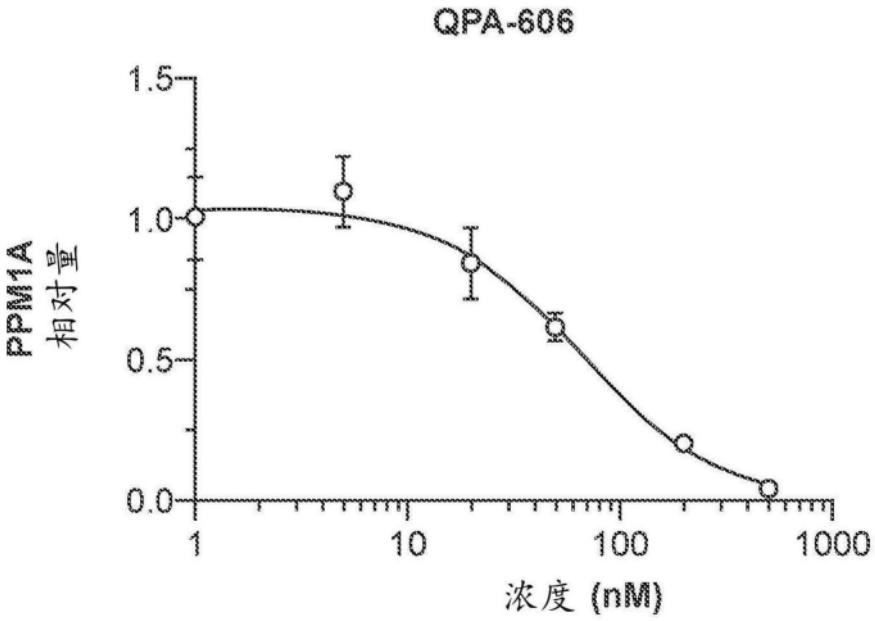

QPA-606
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5L

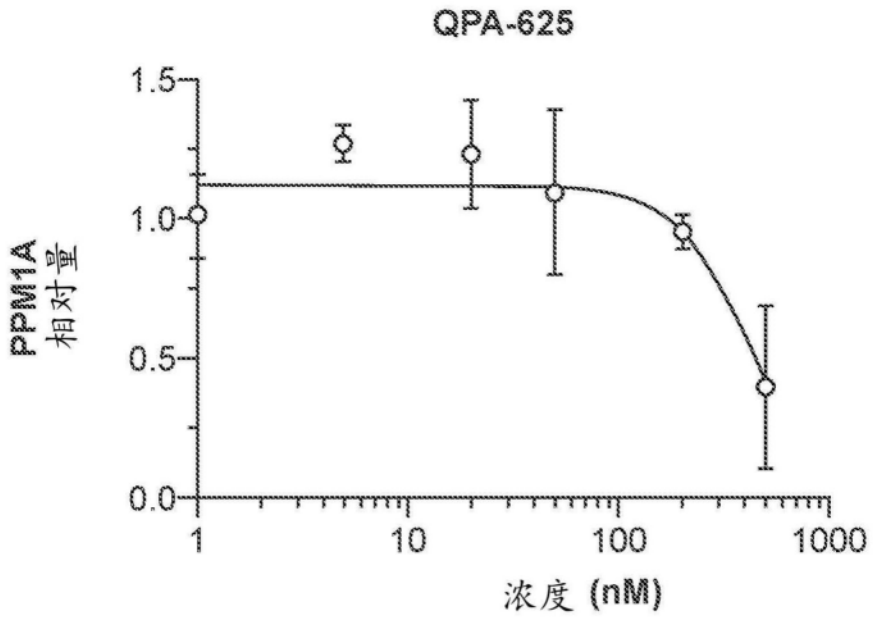

QPA-625
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5M

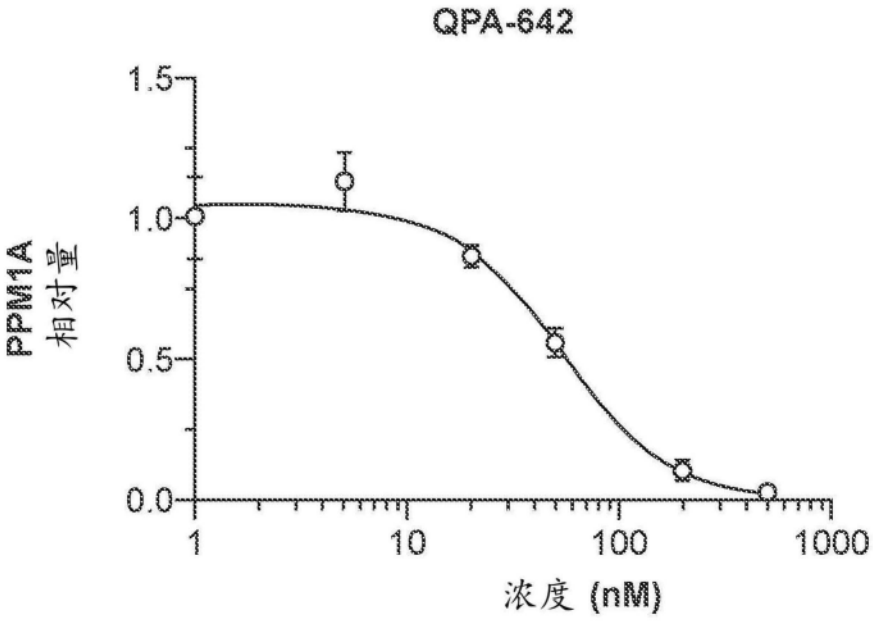

QPA-642
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5N

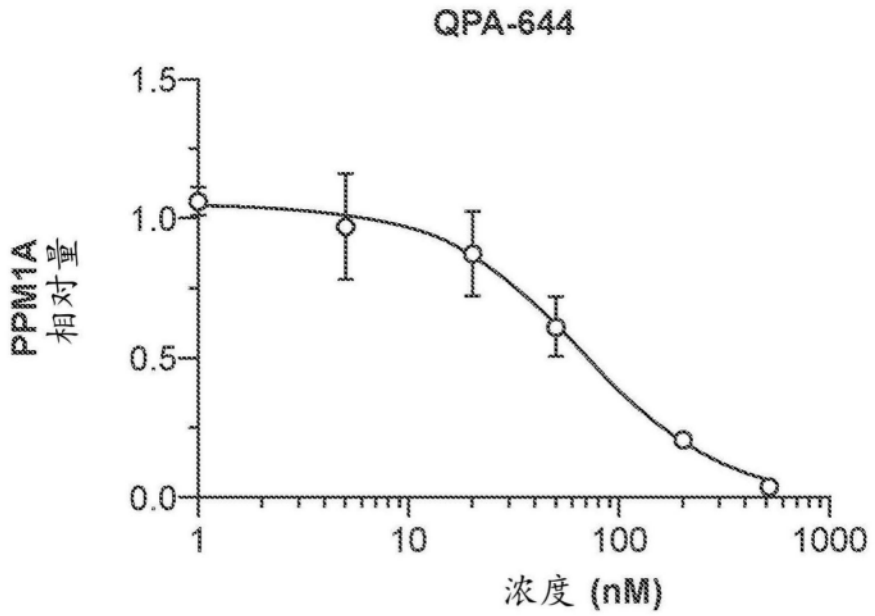

QPA-644
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图50

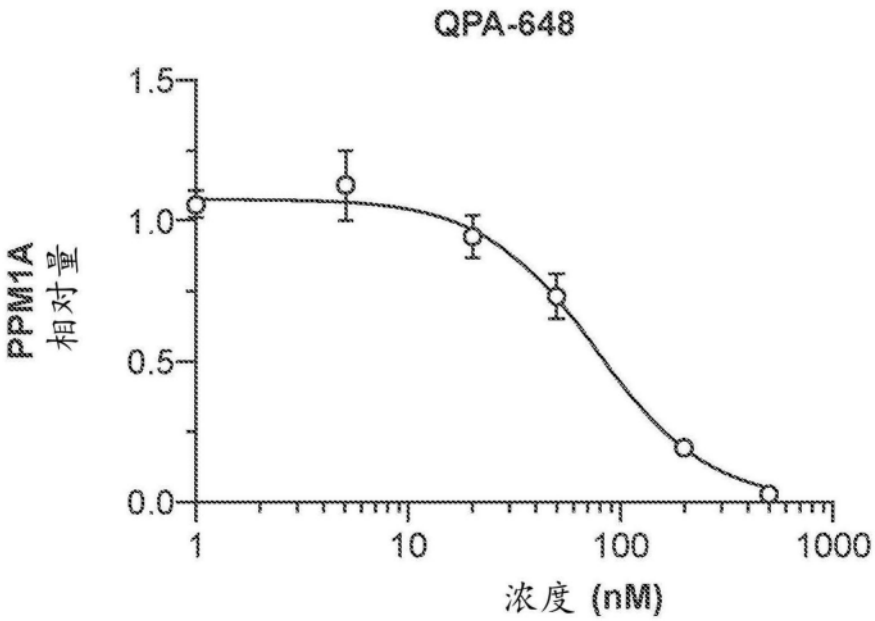

QPA-648
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5P

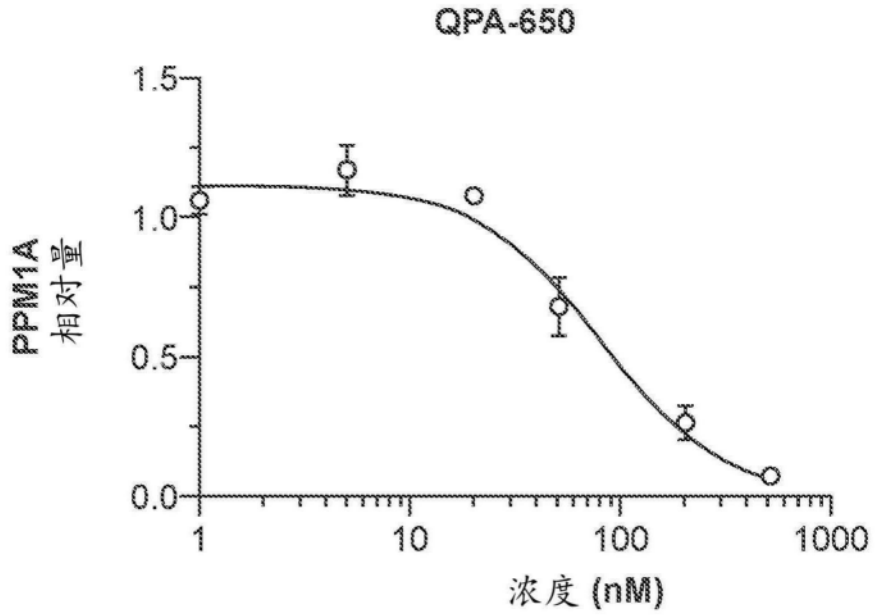

QPA-650
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5Q

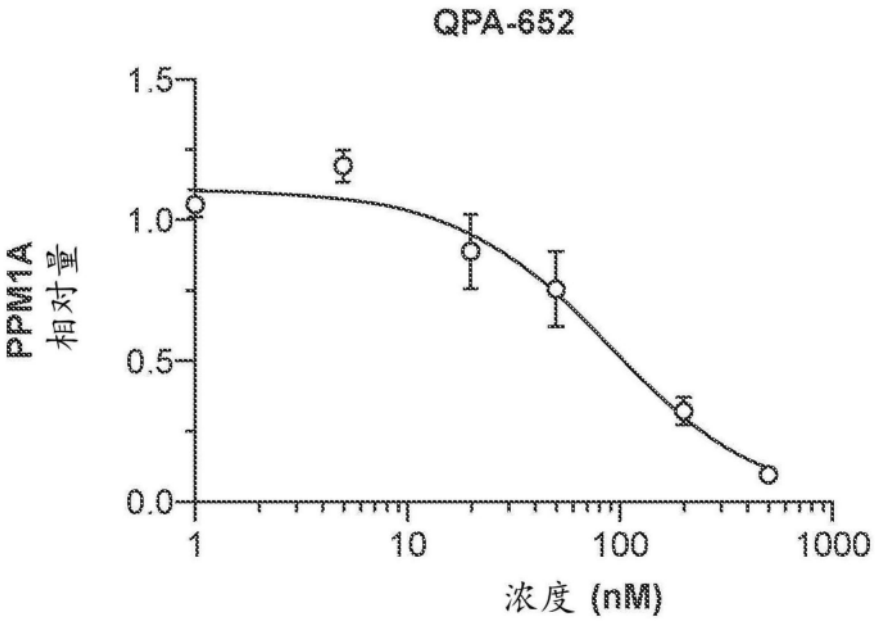

QPA-652
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5R

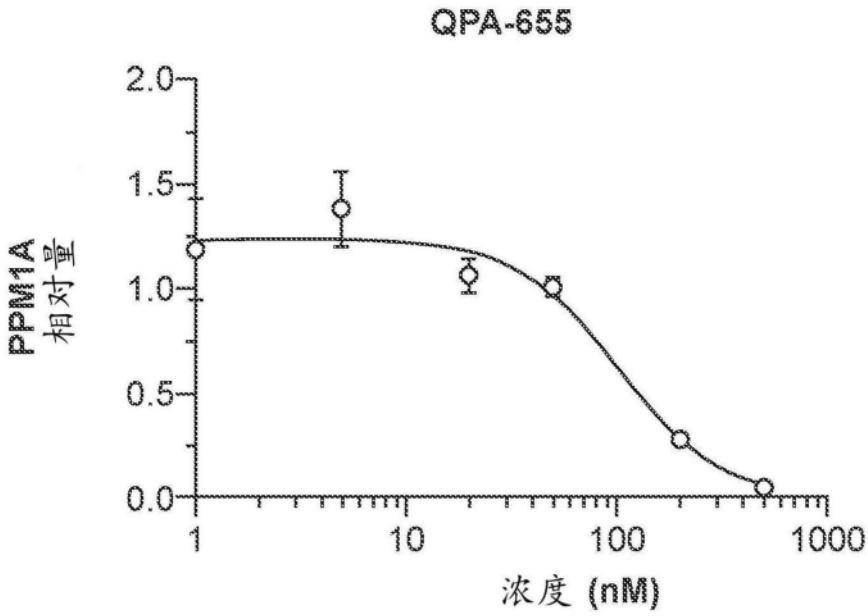

QPA-655
PPM1A
相对量
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5S

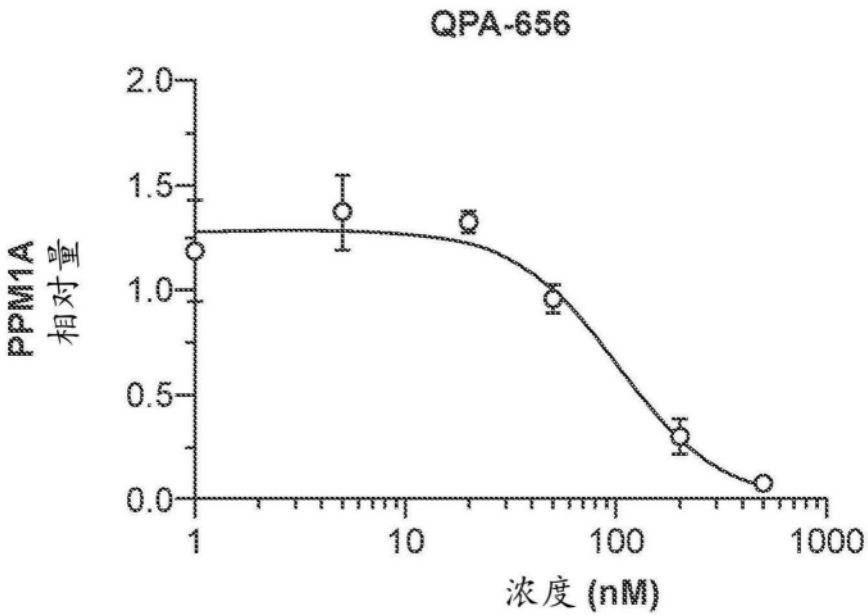

QPA-656
PPM1A
相对量
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5T

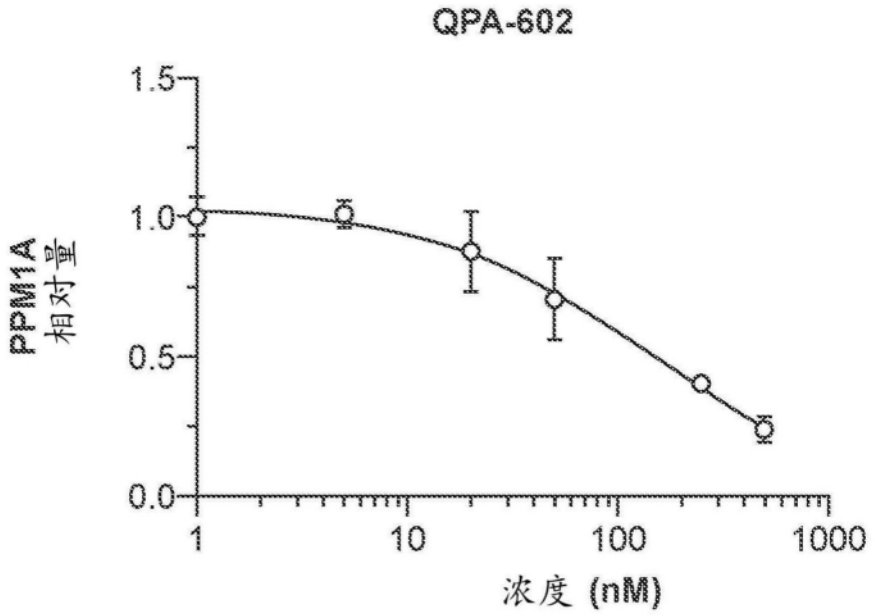

QPA-602
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6A

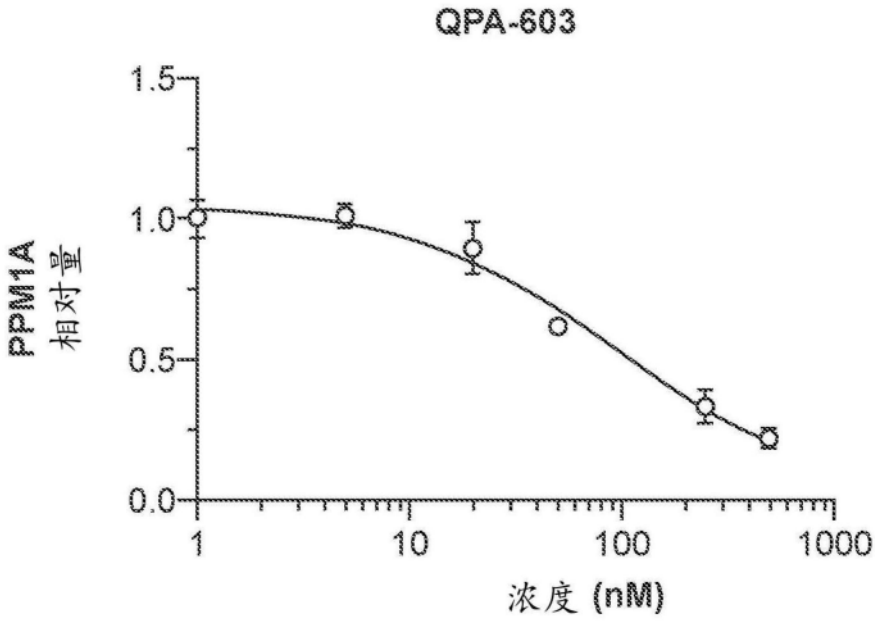

QPA-603
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6B

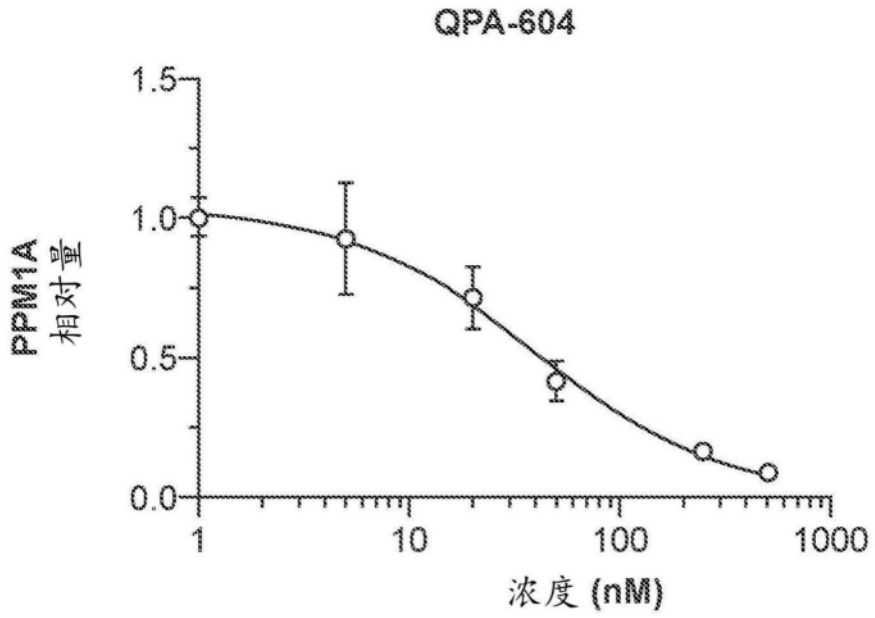

QPA-604
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6C

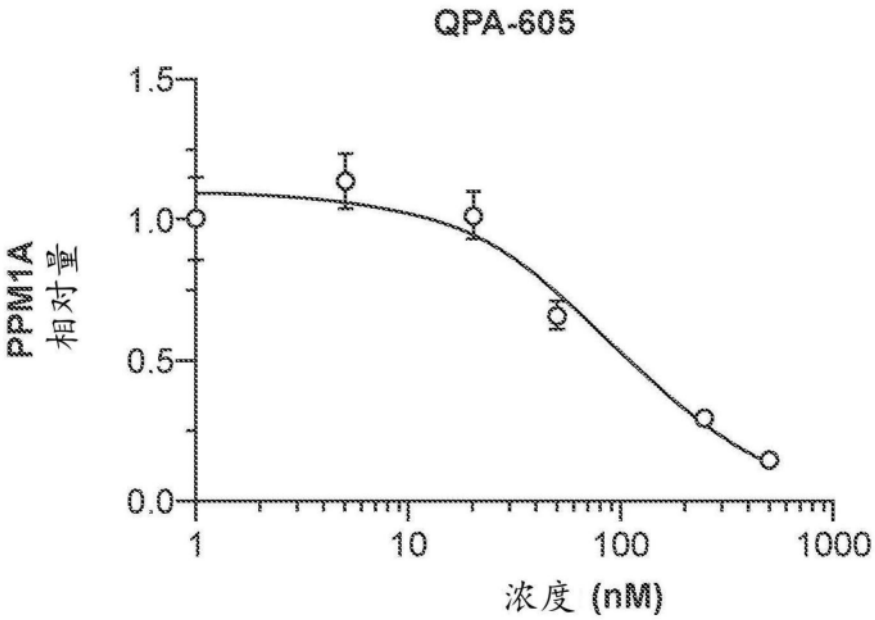

QPA-605
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6D

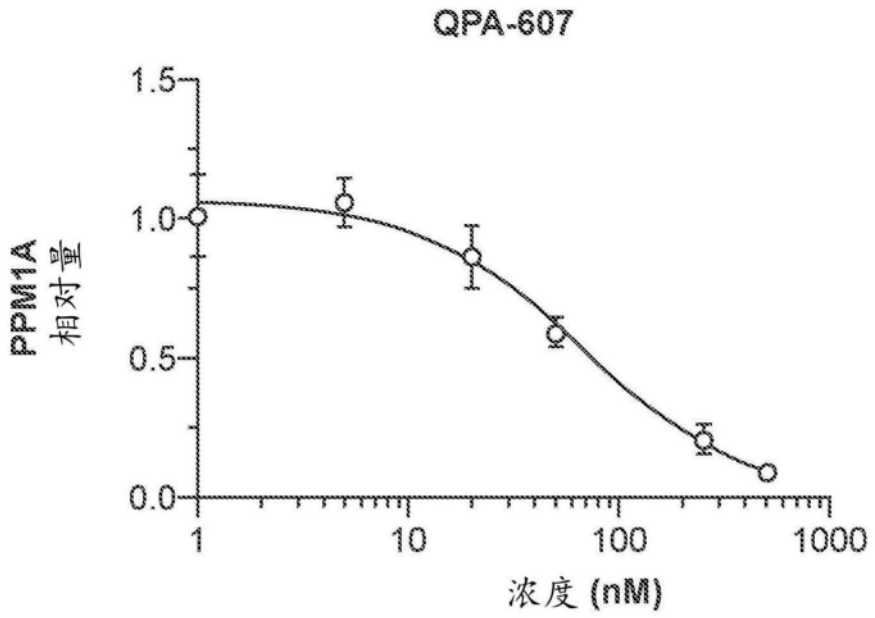

QPA-607
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6E

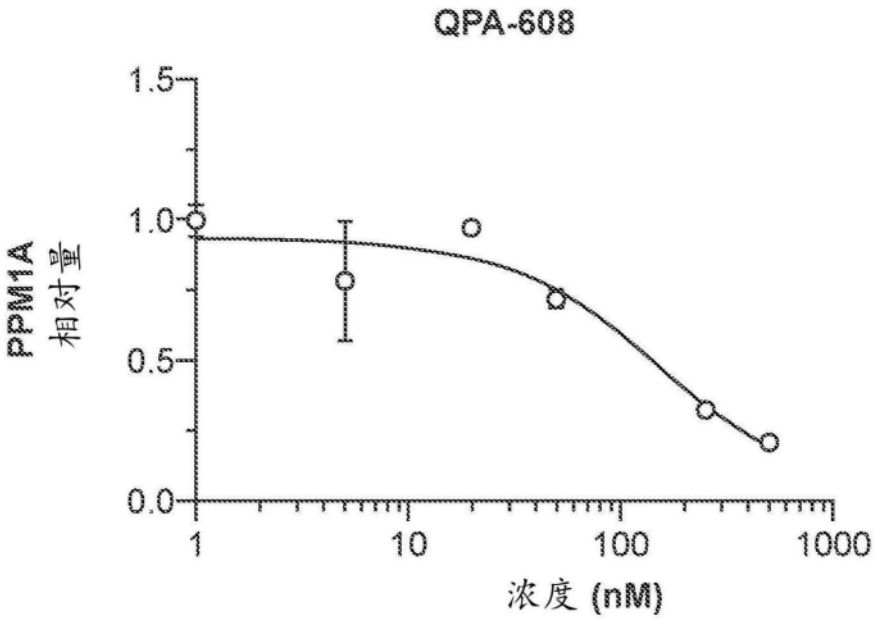

QPA-608
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6F

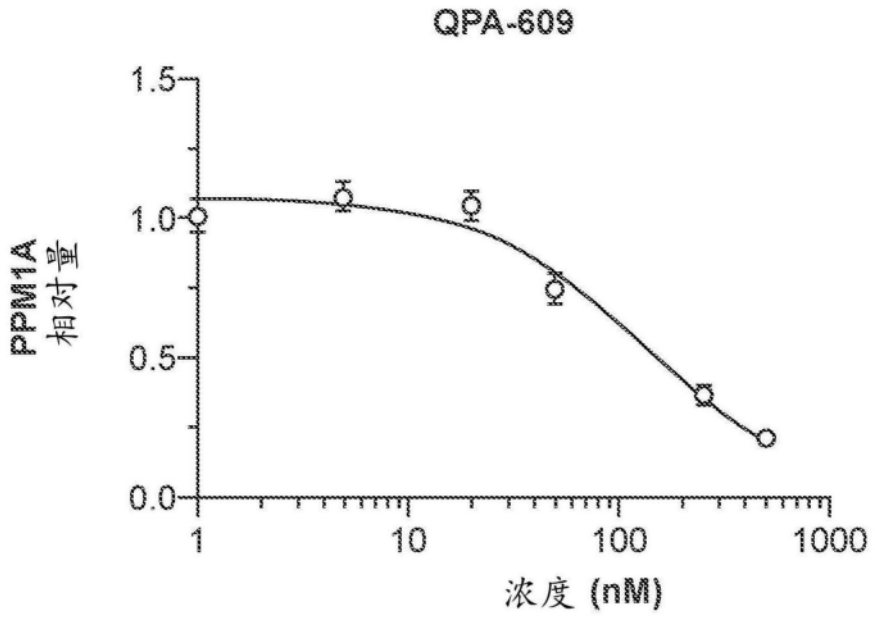

QPA-609
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6G

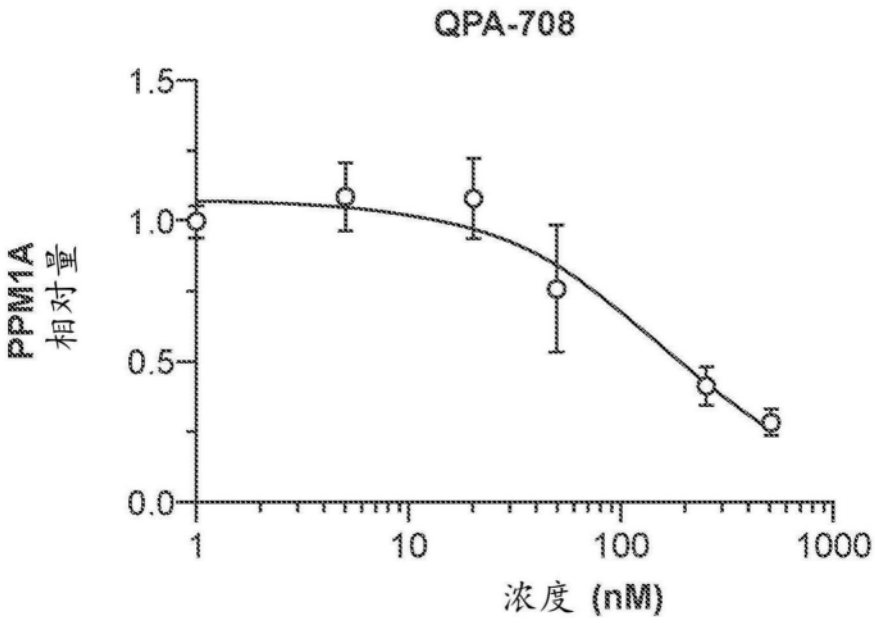

QPA-708
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6H

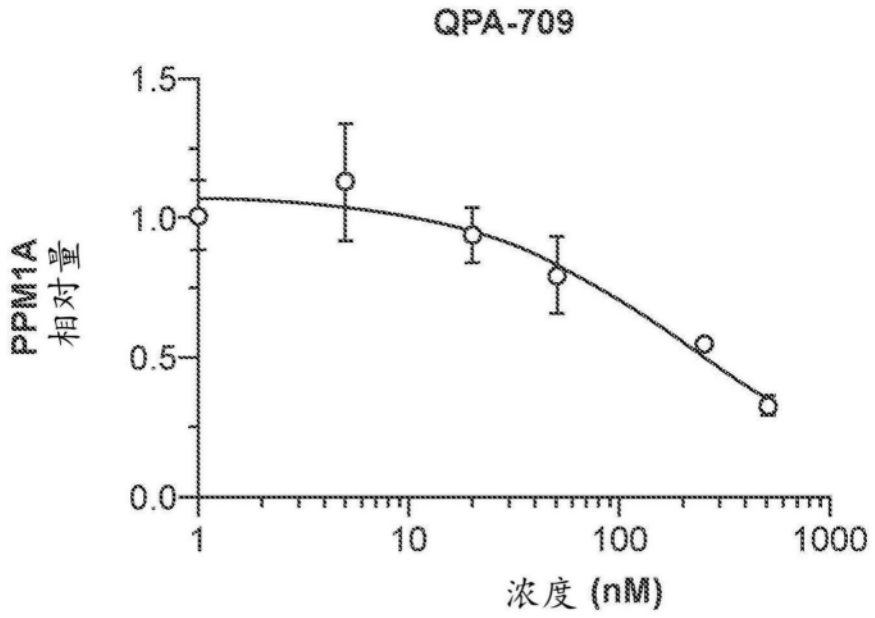

QPA-709
PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6I

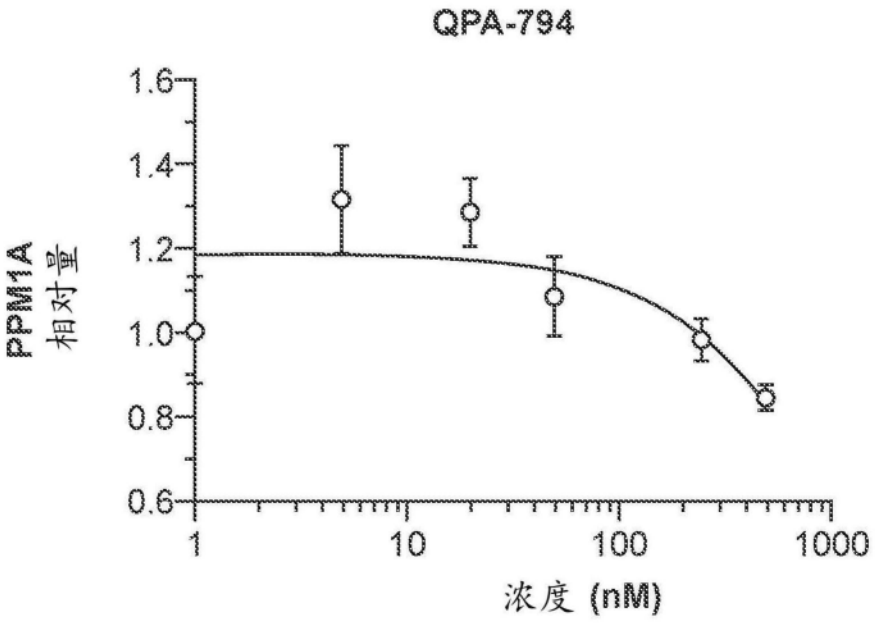

QPA-794
PPM1A
相对量
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6J

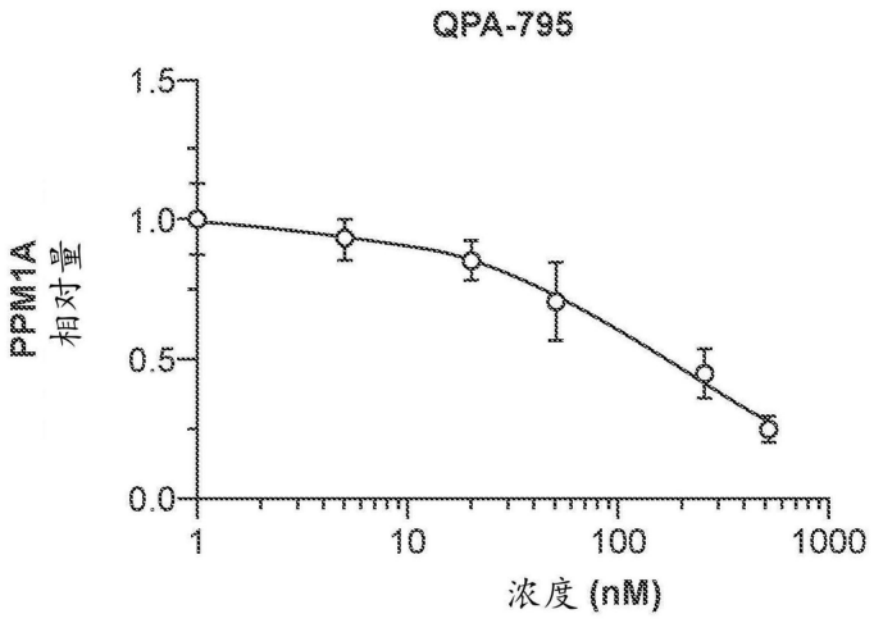


图6K

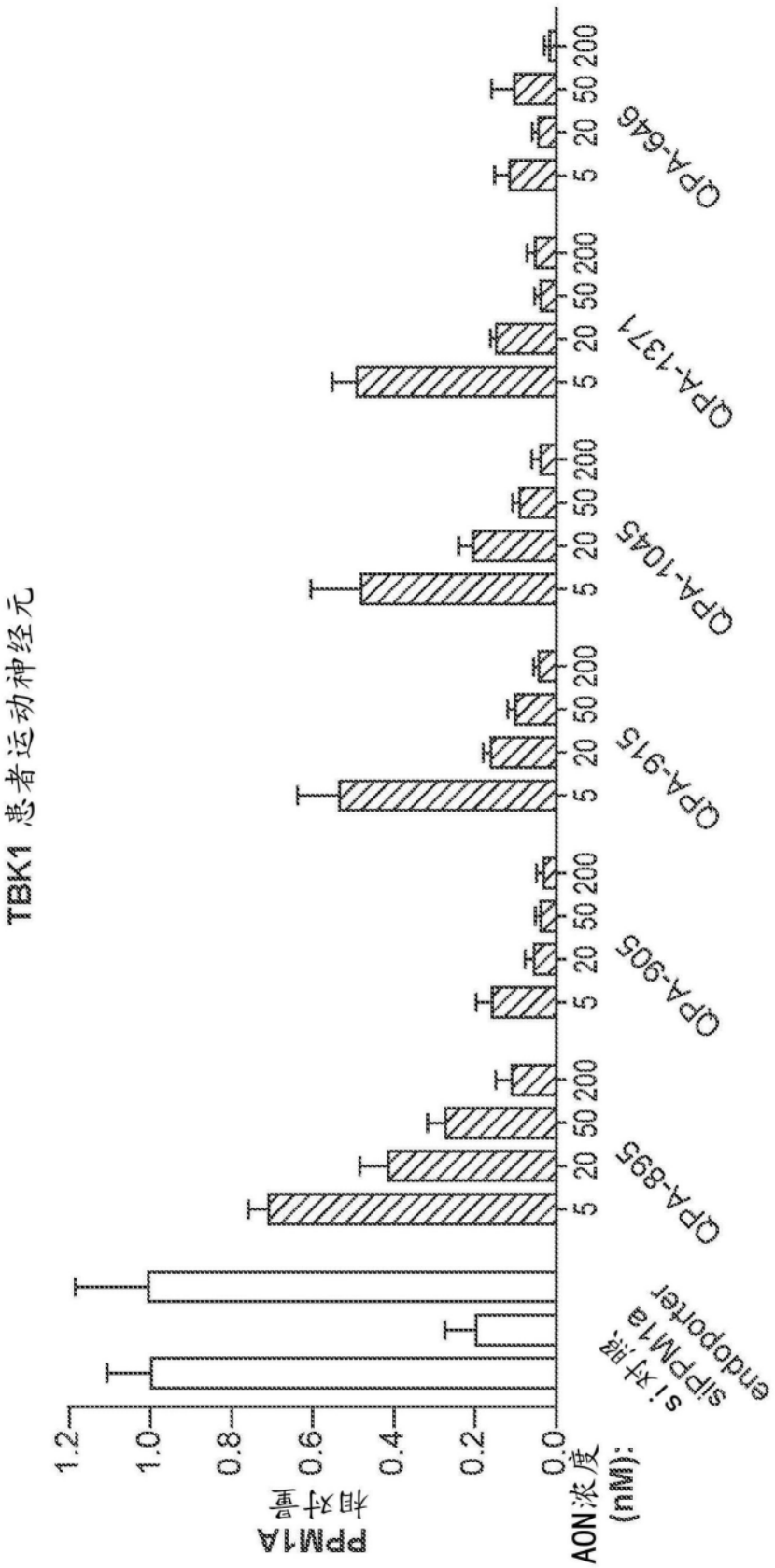

TBK1 患者运动神经元
PPM1A
相对量
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
AON浓度
(nM):
si对照
endoporter
5 20 50 200
OPA-895
OPA-905
OPA-915
OPA-1045
OPA-1371
OPA-646

图7A

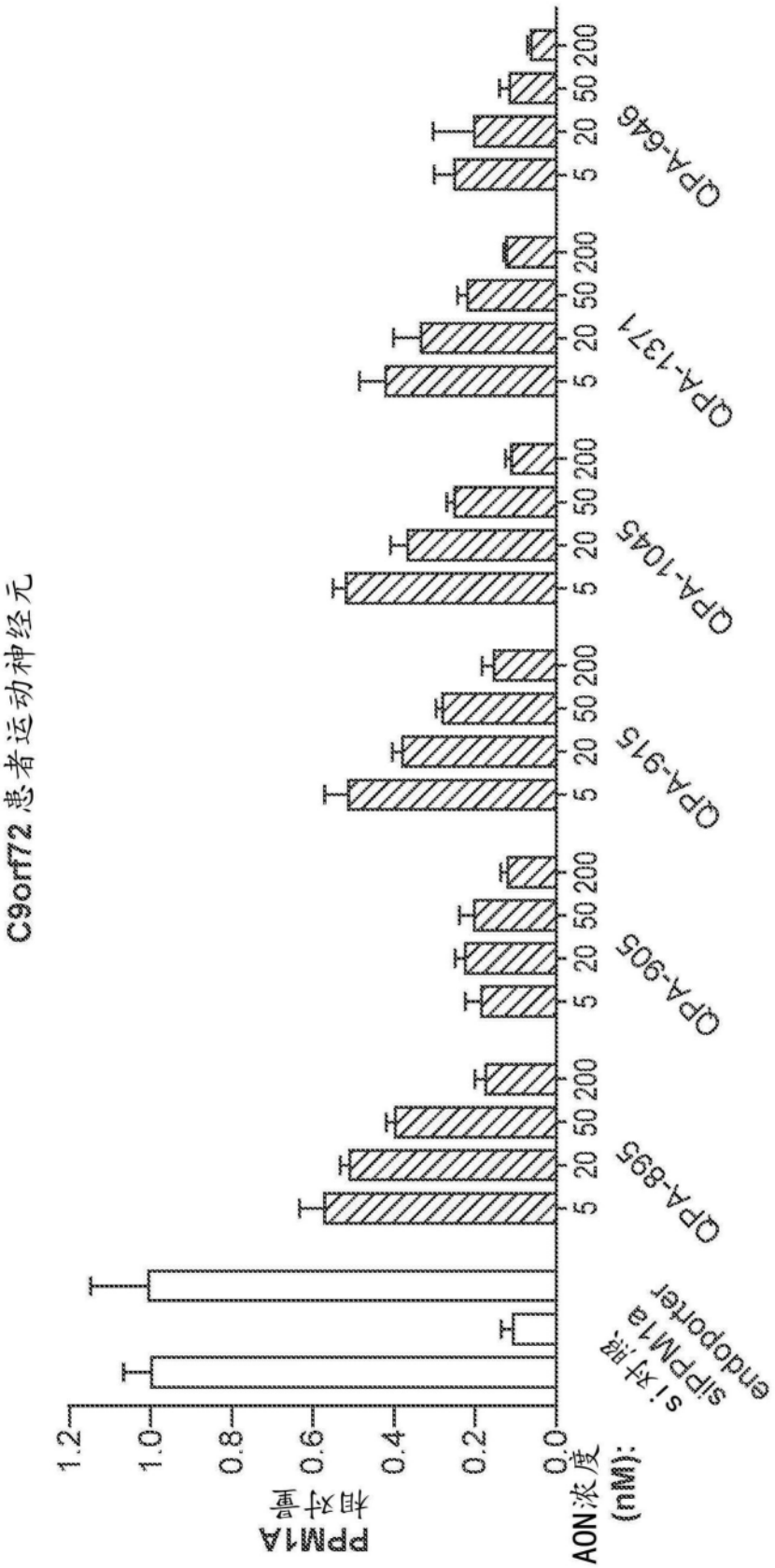

C9orf72 患者运动神经元
PPM1A
相对量
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
AON浓度
(nM):
s.t.对照
sIPPM1a
endoporter
5
20
50
200
QPA-895
QPA-905
QPA-915
QPA-1045
QPA-1371
QPA-646

图7B

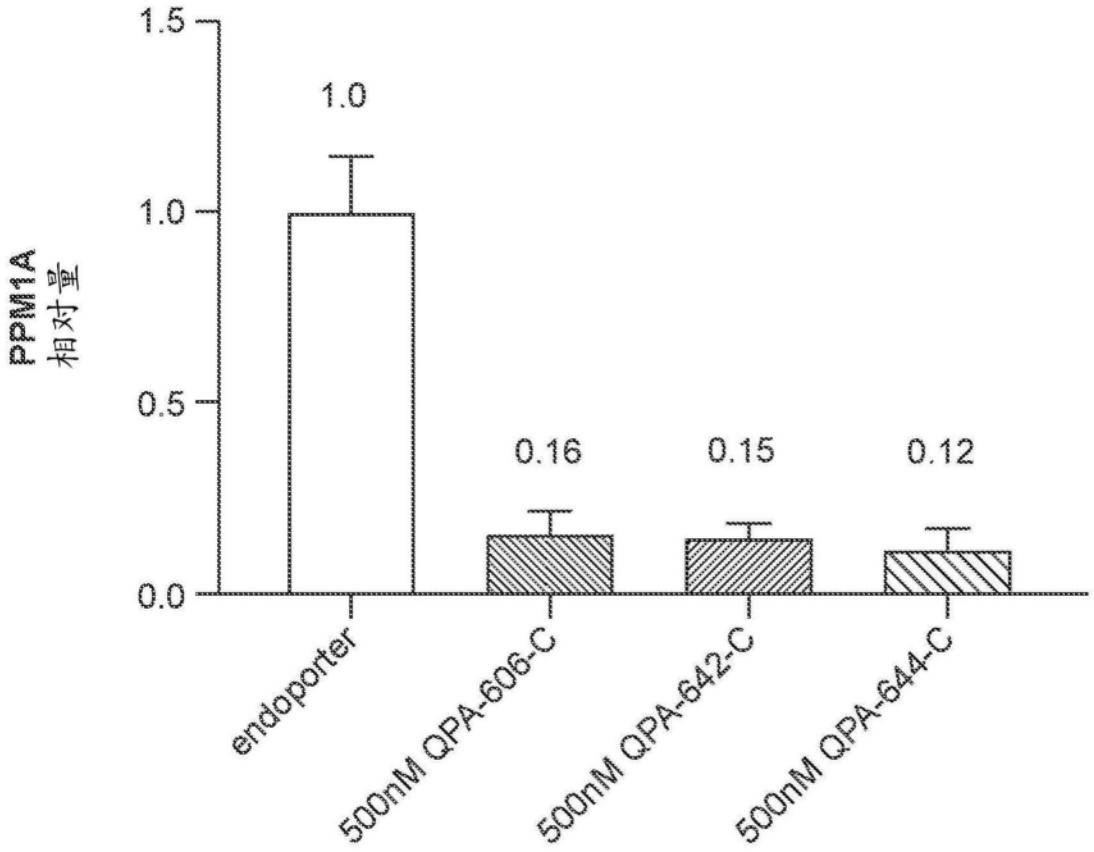

PPM1A
相对量
1.5
1.0
0.5
0.0
1.0
0.16
0.15
0.12
endoporter
500nM QPA-606-C
500nM QPA-642-C
500nM QPA-644-C

图8

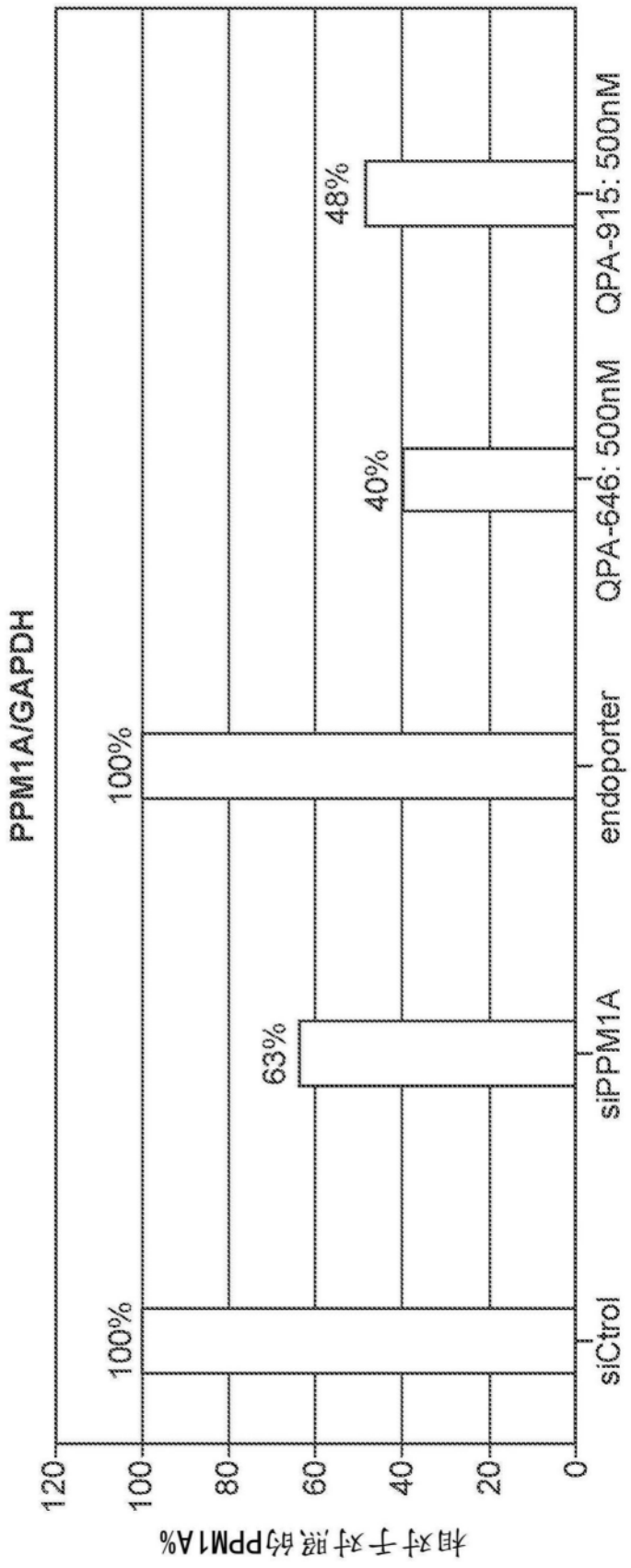

PPM1A/GAPDH
相对于对照的PPM1A%
120
100
80
60
40
20
0
100%
63%
100%
40%
48%
siCtrol
siPPM1A
endoporter
QPA-646: 500nM
QPA-915: 500nM

图9

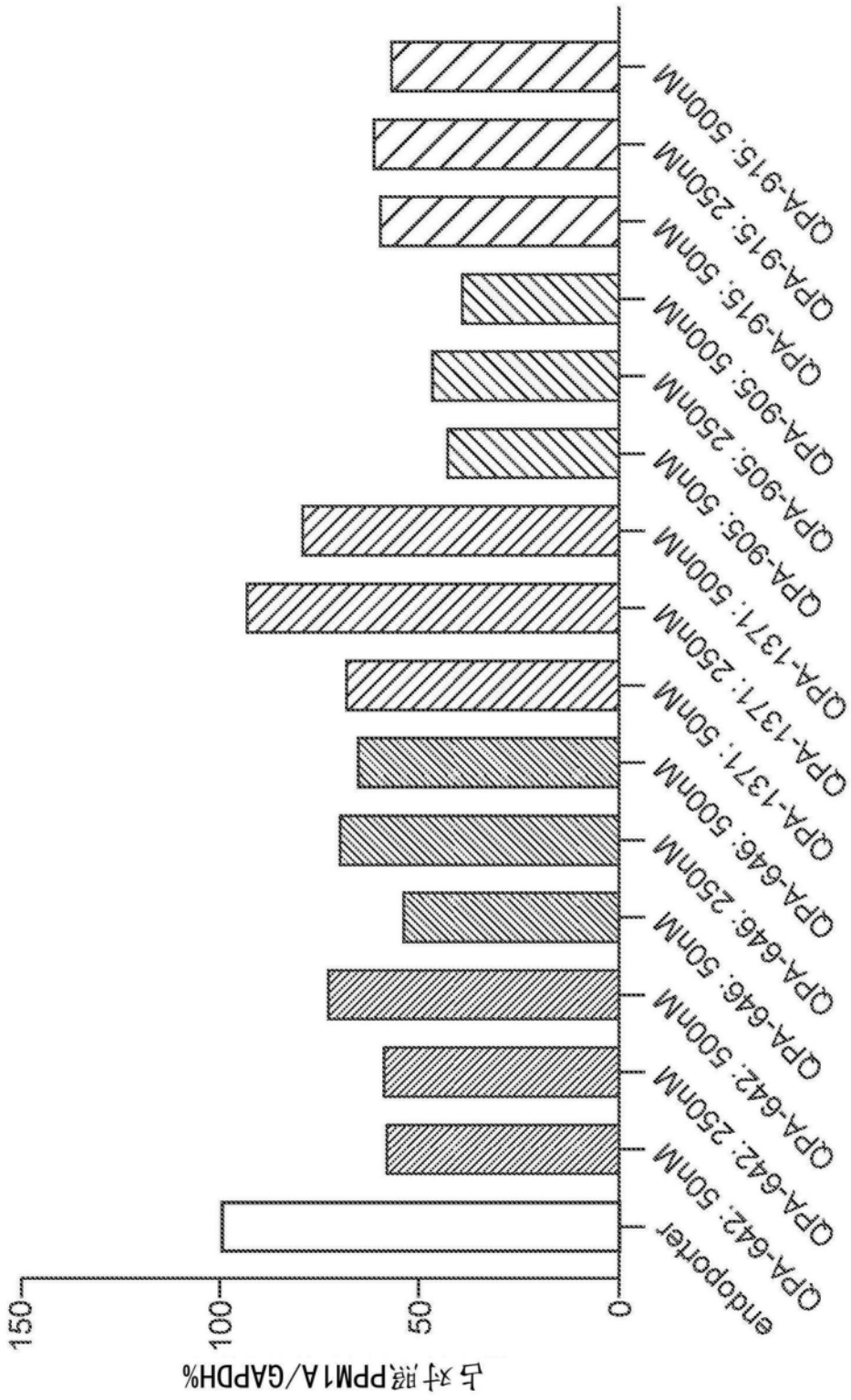

endoporter
QPA-642: 50nM
QPA-642: 250nM
QPA-642: 500nM
QPA-646: 50nM
QPA-646: 250nM
QPA-646: 500nM
QPA-1371: 50nM
QPA-1371: 250nM
QPA-1371: 500nM
QPA-905: 50nM
QPA-905: 250nM
QPA-905: 500nM
QPA-915: 50nM
QPA-915: 250nM
QPA-915: 500nM
0
50
100
150
占对照PPM1A/GAPDH%

图10

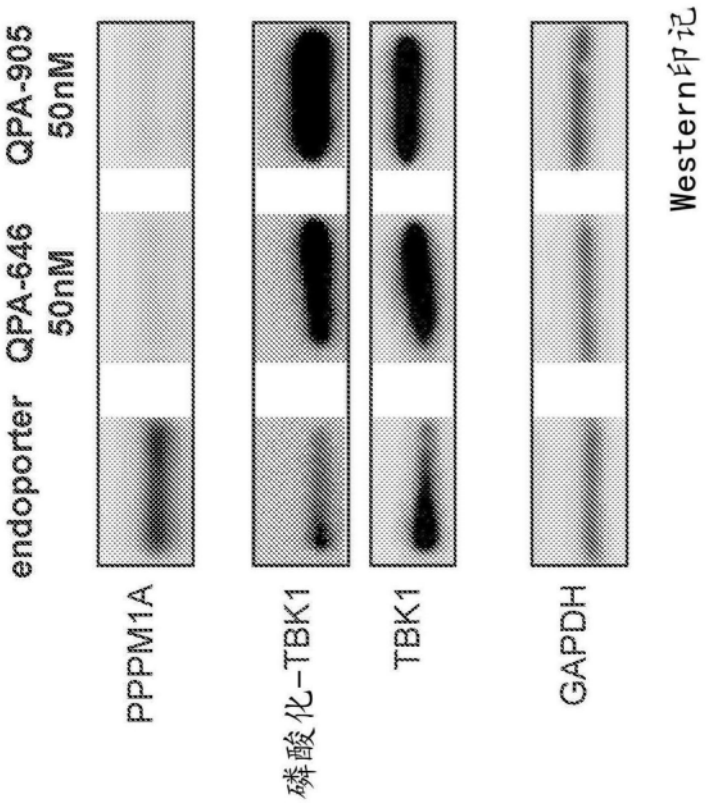

Western印记
endoporter
QPA-646 50nM
QPA-905 50nM
PPPM1A
磷酸化-TBK1
TBK1
GAPDH

图11A

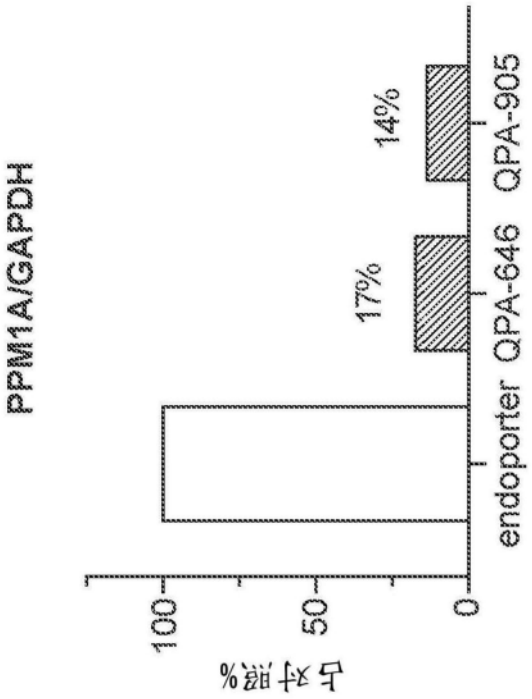

PPM1A/GAPDH
占对照%
100
50
0
17%
14%
endoporter
QPA-646
QPA-905

图11B

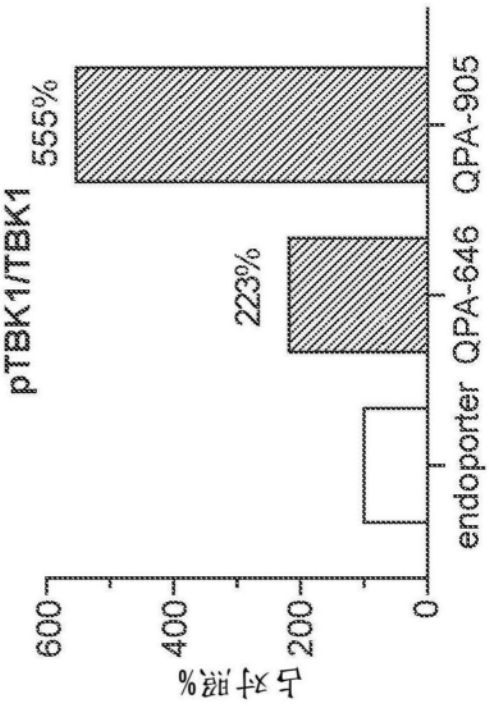

pTBK1/TBK1
555%
223%
600
400
200
0
占对照%
endoporter
QPA-646
QPA-905

图11C

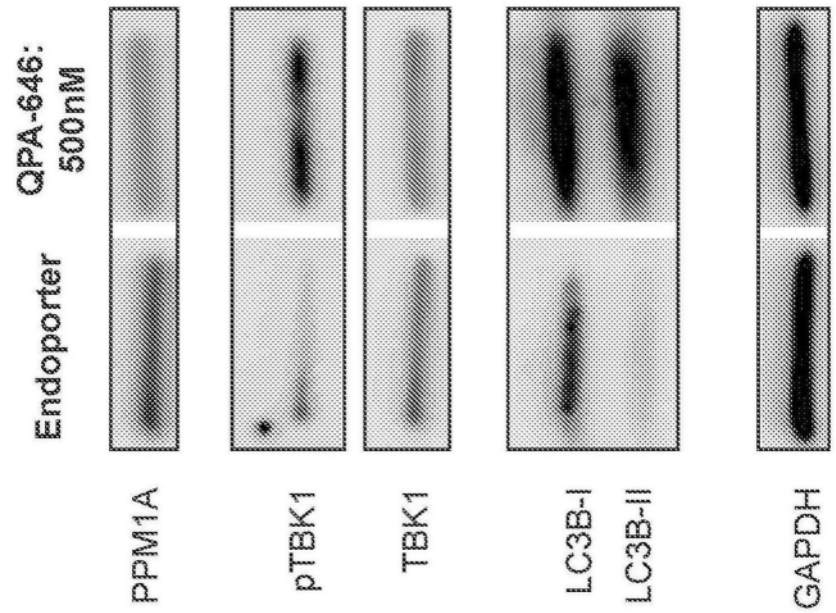

Endoporter
QPA-646: 500nM
PPM1A
pTBK1
TBK1
LC3B-I
LC3B-II
GAPDH

图12A

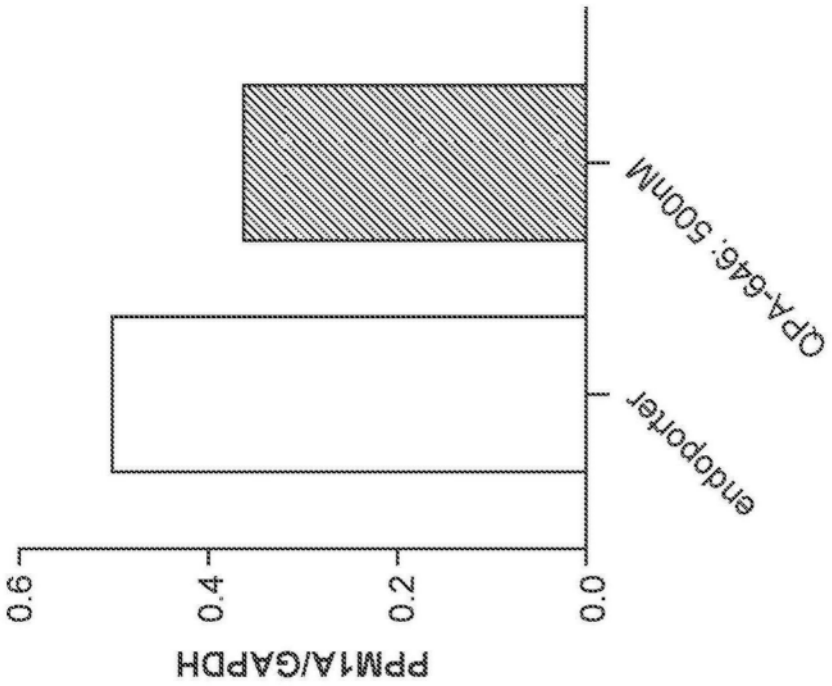

QPA-646: 500nM
endoporter
0.0
0.2
0.4
0.6
pPM1A/GAPDH

图12B

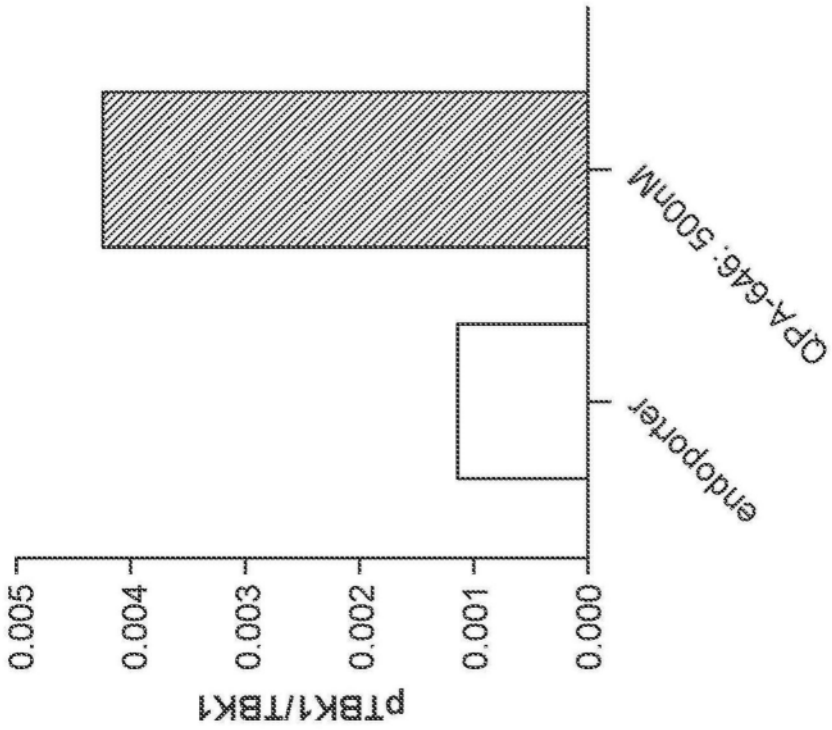

QPA-646: 500nM
endoporter
0.000
0.001
0.002
0.003
0.004
0.005
pTBK1/TBK1

图12C

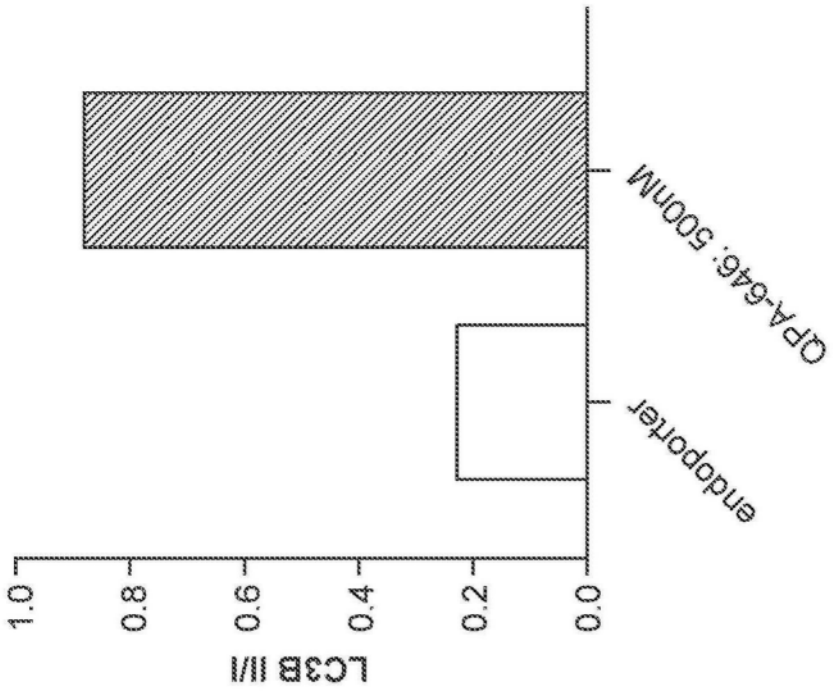


图12D

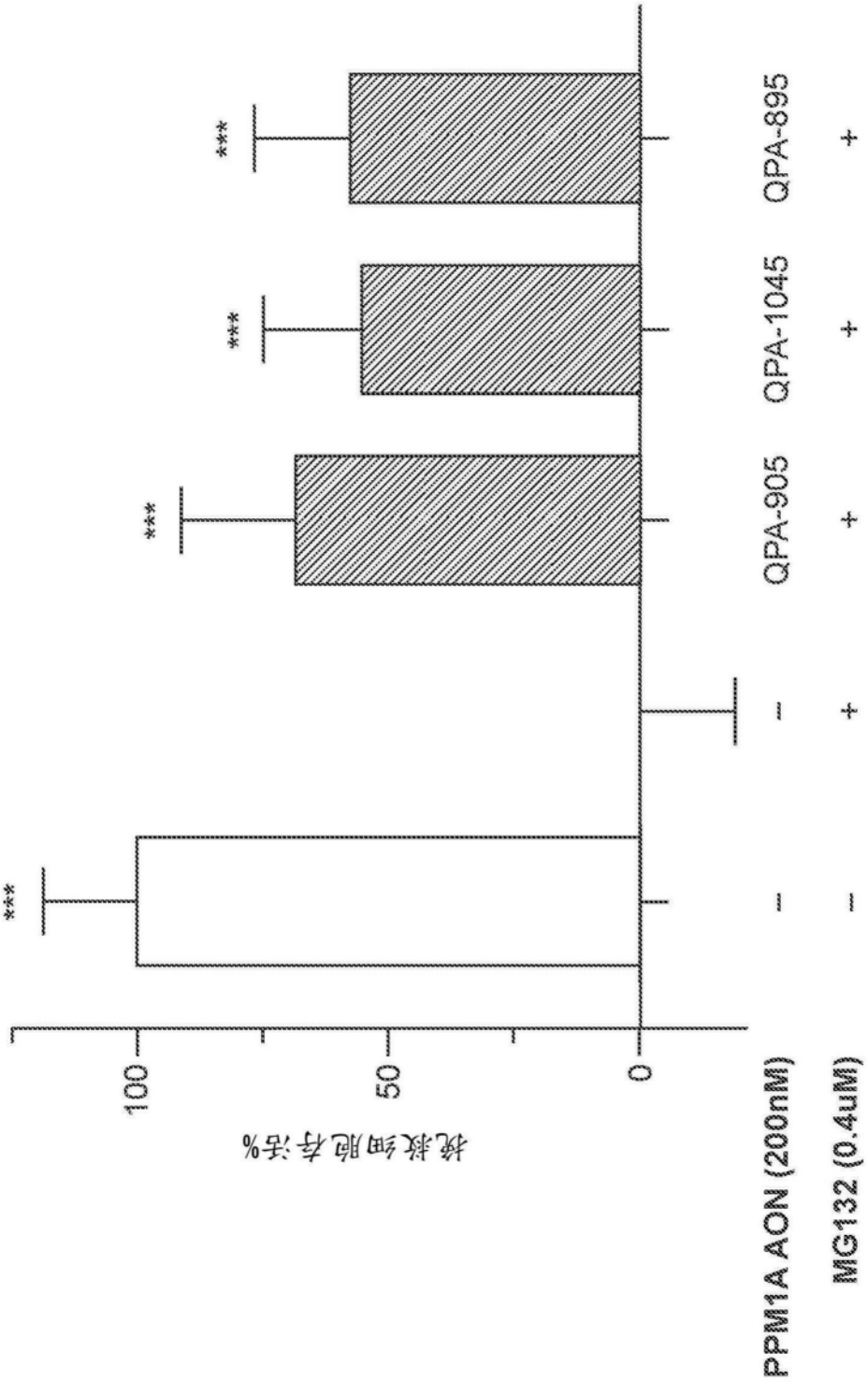

挽救细胞存活%
100
50
0
***
***
***
***
PPM1A AON (200nM)
MG132 (0.4uM)
-
+
-
+
-
+
-
+
QPA-905
QPA-1045
QPA-895
+
+
+

图13