



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115867290 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

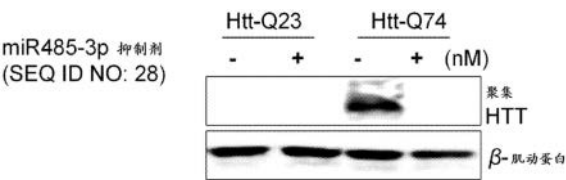
(21) 申请号 202180046108.2  
(22) 申请日 2021.07.01  
(30) 优先权数据  
63/047,090 2020.07.01 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.12.28  
(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/IB2021/055890 2021.07.01  
(87) PCT国际申请的公布数据  
W02022/003608 EN 2022.01.06  
(71) 申请人 生物欧赛加有限责任公司  
地址 韩国大田广域市  
(72) 发明人 柳金孝 赫韩硕 金大勋 闵贤洙  
林云娜

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263  
专利代理师 李献忠 张华  
(51) Int.Cl.  
A61K 31/7088 (2006.01)

权利要求书6页 说明书50页  
序列表42页 附图14页

(54) 发明名称  
用于亨廷顿病的MIRNA-485抑制剂

(57) 摘要  
本公开包括miRNA抑制剂用于治疗亨廷顿病的症状或病状的用途。可用于本公开的miRNA抑制剂能够抑制miR-485表达和/或活性,其进而可调节与亨廷顿病有关的蛋白质或基因表达的水平。



1. 一种治疗有需要的受试者的亨廷顿病的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(miRNA抑制剂)。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者在施用前表现出亨廷顿病的一种或多种特征,包括易怒、抑郁、不自主运动、协调性差、难以学习新信息或做出决定、不受控制的运动、情绪问题和思维能力(认知)的丧失。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述受试者在所述施用后表现出亨廷顿病的一种或多种特征的改善。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述改善是与所述施用前的所述特征相比至少约1.5倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍或至少约10倍。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述亨廷顿病与SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平降低相关。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂诱导自噬和/或治疗或预防炎症。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述亨廷顿病与CD36蛋白和/或CD36基因的水平降低相关。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与PGC-1 $\alpha$ 蛋白和/或PGC-1 $\alpha$ 基因的水平降低相关的疾病或疾患。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂诱导神经发生。

10. 如权利要求9所述的方法,其中诱导神经发生包括神经干细胞和/或祖细胞的增殖、分化、迁移和/或存活增加。

11. 如权利要求9或10所述的方法,其中诱导神经发生包括神经干细胞和/或祖细胞的数量增加。

12. 如权利要求9至11中任一项所述的方法,其中所述诱导神经发生包括轴突、树突和/或突触发育增加。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂诱导吞噬作用。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂抑制miR485-3p。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述miR485-3p包含5'-gucauacacggcucuccucucu-3' (SEQ ID NO:1)。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含5'-UGUAUGA-3' (SEQ ID NO:2),并且其中所述miRNA抑制剂包含约7至约30个核苷酸的长度。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂增加SIRT1基因的转录和/或SIRT1蛋白的表达。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂在所述核苷酸序列的5'包含至少1个核苷酸、至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的方法, 其中所述miRNA抑制剂在所述核苷酸序列的3'包含至少1个核苷酸、至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。

20. 如权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中所述miRNA抑制剂具有选自以下组成的组的序列: 5'-UGUAUGA-3' (SEQ ID NO:2)、5'-GUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:3)、5'-CGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:4)、5'-CCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:5)、5'-GCC GUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:6)、5'-AGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:7)、5'-GAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:8)、5'-AGA GCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:9)、5'-GAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:10)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:11)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:12)、5'-GAGG AGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:13)、5'-AGAGGAGAGCC GUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:14)、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUA UGA-3' (SEQ ID NO:15)、5'-UGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:16)、5'-GUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:17)、5'-CGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:18)、5'-CCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:19)、5'-GCCG UGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:20)、5'-AGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:21)、5'-GAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:22)、5'-AGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:23)、5'-GAGAGCCGUG UAUGAC-3' (SEQ ID NO:24)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:25)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:26)、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:27)、5'-AG AGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28) 和 5'-GAGAGGA GAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:29)。

21. 如权利要求1至15或17至18中任一项所述的方法, 其中所述miRNA抑制剂具有选自以下组成的组的序列: 5'-TGTATGA-3' (SEQ ID NO:62)、5'-GTGTATGA-3' (SEQ ID NO:63)、5'-CG TGTATGA-3' (SEQ ID NO:64)、5'-CCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:65)、5'-GCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:66)、5'-AGCCGTGT ATGA-3' (SEQ ID NO:67)、5'-GAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:68)、5'-AGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:69)、5'-GAGAG CCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:70)、5'-GGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:71)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:72)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:73)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:74)、5'-GAGAGGA GAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:75)、5'-TGTATGAC-3' (SEQ ID NO:76)、5'-GTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:77)、5'-CGTGTAT GAC-3' (SEQ ID NO:78)、5'-CCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:79)、5'-GCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:80)、5'-AGCCGTGTAT GAC-3' (SEQ ID NO:81)、5'-GAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:82)、5'-AGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:83)、5'-GAGA GCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:84)、5'-GGAGAGCCGTGTAT GAC-3' (SEQ ID NO:85)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:86)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:87)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:88) 和 5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:89)。

22. 如权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中所述miRNA抑制剂的序列与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28) 或 5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:88) 具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%序列同一性。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述miRNA抑制剂具有与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)具有至少90%相似性的序列。

24.如权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88),具有一个取代或两个取代。

25.如权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)。

26.如权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)。

27.如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含至少一种经修饰的核苷酸。

28.如权利要求27所述的方法,其中所述至少一种经修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)、阿拉伯核酸(ABA)、桥联核酸(BNA)和/或肽核酸(PNA)。

29.如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含主链修饰。

30.如权利要求29所述的方法,其中所述主链修饰是二氨基磷酸酯吗啉代低聚物(PMO)和/或硫代磷酸酯(PS)修饰。

31.如权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂在递送剂中递送。

32.如权利要求31所述的方法,其中所述递送剂是胶束、外泌体、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡或合成囊泡。

33.如权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂通过病毒载体递送。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述病毒载体是AAV、腺病毒、逆转录病毒或慢病毒。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述病毒载体是具有血清型AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或它们的任何组合的AAV。

36.如权利要求1至35中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂用递送剂递送。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述递送剂包括类脂质、脂质体、脂质复合物、脂质纳米颗粒、聚合化合物、肽、蛋白质、细胞、纳米颗粒模拟物、纳米管或缀合物。

38.如权利要求36或37所述的方法,其中所述递送剂包含阳离子载体单元,所述阳离子载体单元包含

[WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (式I)

或

[WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (式II)

其中

WP是水溶性生物聚合物部分;

CC是带正电荷的载体部分;

AM是佐剂部分;并且,

L1和L2独立地是任选的接头,并且

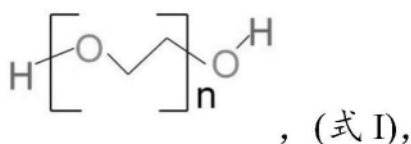
其中当以约1:1的离子比率与核酸混合时,所述阳离子载体单元形成胶束。

39.如权利要求38所述的方法,其中所述miRNA抑制剂通过离子键与所述阳离子载体单元相互作用。

40.如权利要求38或39所述的方法,其中所述水溶性生物聚合物包括聚(烷二醇)、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯炔醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚( $\alpha$ -羟基酸)、聚(乙醇醇)、聚甘油、聚磷腈、聚噁唑啉(“POZ”)聚(N-丙烯酰吗啉)或它们的任何组合。

41.如权利要求38至40所述的方法,其中所述水溶性生物聚合物包括聚乙二醇(“PEG”)、聚甘油或聚(丙二醇)(“PPG”)。

42.如权利要求38至41中任一项所述的方法,其中所述水溶性生物聚合物包含:



其中n是1-1000。

43.如权利要求42所述的方法,其中所述n是至少约110、至少约111、至少约112、至少约113、至少约114、至少约115、至少约116、至少约117、至少约118、至少约119、至少约120、至少约121、至少约122、至少约123、至少约124、至少约125、至少约126、至少约127、至少约128、至少约129、至少约130、至少约131、至少约132、至少约133、至少约134、至少约135、至少约136、至少约137、至少约138、至少约139、至少约140或至少约141。

44.如权利要求42所述的方法,其中所述n是约80至约90、约90至约100、约100至约110、约110至约120、约120至约130、约140至约150、或约150至约160。

45.如权利要求38至44中任一项所述的方法,其中所述水溶性生物聚合物是直链的、支链的或树枝状的。

46.如权利要求38至45中任一项所述的方法,其中所述阳离子载体部分包含一个或多个碱性氨基酸。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述阳离子载体部分包含至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个、至少31个、至少32个、至少33个、至少34个、至少35个、至少36个、至少37个、至少38个、至少39个、至少40个、至少41个、至少42个、至少43个、至少44个、至少45个、至少46个、至少47个、至少48个、至少49个或至少50个碱性氨基酸。

48.如权利要求47所述的方法,其中所述阳离子载体部分包含约30至约50个碱性氨基酸。

49.如权利要求47或权利要求48所述的方法,其中所述碱性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸或它们的任何组合。

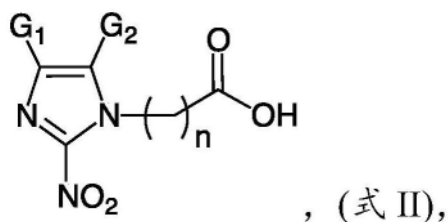
50.如权利要求38至49中任一项所述的方法,其中所述阳离子载体部分包含约40个赖氨酸单体。

51.如权利要求38至50中任一项所述的方法,其中所述佐剂部分能够调节免疫应答、炎

症应答和/或组织微环境。

52. 如权利要求38至51中任一项所述的方法, 其中所述佐剂部分包含咪唑衍生物、氨基酸、维生素或它们的任何组合。

53. 如权利要求52所述的组合物, 其中所述佐剂部分包含:



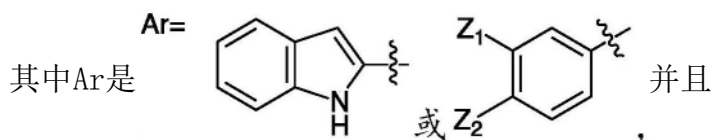
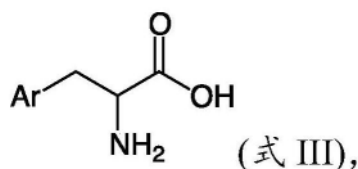
其中 $G_1$ 和 $G_2$ 各自是H、芳族环或1-10烷基, 或者 $G_1$ 和 $G_2$ 一起形成芳族环, 并且其中n是1-10。

54. 如权利要求52所述的方法, 其中所述佐剂部分包含硝基咪唑。

55. 如权利要求52所述的方法, 其中所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼、奥硝唑、美格唑、阿扎硝唑、苄硝唑或它们的任何组合。

56. 如权利要求38至52中任一项所述的方法, 其中所述佐剂部分包含氨基酸。

57. 如权利要求56所述的方法, 其中所述佐剂部分包含

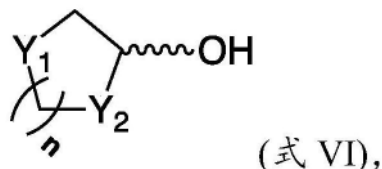


其中 $Z_1$ 和 $Z_2$ 各自是H或OH。

58. 如权利要求38至51中任一项所述的方法, 其中所述佐剂部分包含维生素。

59. 如权利要求58所述的方法, 其中所述维生素包含环状环或环状杂原子环和羧基或羟基。

60. 如权利要求58或权利要求59所述的方法, 其中所述维生素包含:



其中 $Y_1$ 和 $Y_2$ 各自是C、N、O或S, 并且其中n是1或2。

61. 如权利要求58至60中任一项所述的方法, 其中所述维生素选自由以下组成的组: 维生素A、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B6、维生素B7、维生素B9、维生素B12、维生素C、维生素D2、维生素D3、维生素E、维生素M、维生素H以及它们的任何组合。

62. 如权利要求58至61中任一项所述的方法, 其中所述维生素是维生素B3。

63. 如权利要求58至62中任一项所述的方法, 其中所述佐剂部分包含至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约6个、至少约7个、至少约8个、至少约9个、至少约10个、

至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个或至少约20个维生素B3单元。

64. 如权利要求63所述的方法,其中所述佐剂部分包含约10个维生素B3单元。

65. 如权利要求58至64中任一项所述的方法,其中所述递送剂约包含具有约120至约130个PEG单元的水溶性生物聚合物部分、包含具有约30至约40个赖氨酸的聚赖氨酸的阳离子载体部分和具有约5至约10个维生素B3单元的佐剂部分。

66. 如权利要求58至65中任一项所述的方法,其中所述递送剂与所述miRNA抑制剂缔合,从而形成胶束。

67. 如权利要求66所述的方法,其中所述缔合是共价键、非共价键或离子键。

68. 如权利要求66或权利要求67所述的方法,其中所述胶束中的所述阳离子载体单元和所述miRNA抑制剂在溶液中混合,使得所述阳离子载体单元的正电荷与所述miRNA抑制剂的负电荷的离子比率是约1:1。

69. 如权利要求66至68中任一项所述的方法,其中所述阳离子载体单元能够保护所述miRNA抑制剂免于酶促降解。

## 用于亨廷顿病的MIRNA-485抑制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年7月1日提交的美国临时申请号63/047,090的优先权,所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 对经由EFS-WEB以电子方式提交的序列表的引用

[0004] 与本申请一起提交的以ASCII文本文件(名称:4366\_031PC01\_Seqlisting\_ST25...txt;大小:77,432字节;以及创建日期:2021年6月29日)以电子方式提交的序列表的内容以引用的方式整体并入本文。

### 技术领域

[0005] 本公开提供了miR-485抑制剂(例如,编码包含至少一个miR-485结合位点的核苷酸分子的多核苷酸)用于治疗亨廷顿病的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 亨廷顿病是一种遗传性进行性神经变性病症。这种疾病由亨廷顿蛋白(huntingtin)基因中的重复CAG三联体系列的扩增引起,所述扩增导致具有异常长的聚谷氨酰胺序列的亨廷顿蛋白。亨廷顿病通常出现在一个人的三十岁或四十岁。在极少数情况下,亨廷顿病可能在童年或青春期出现。症状包括手臂、腿、头、面部和上半身不自主的抽动或抽搐(舞蹈病);记忆力、注意力、判断力以及计划和组织的能力下降;以及情绪变化,尤其是抑郁、焦虑和异常的愤怒和易怒。患有亨廷顿病的个体在症状出现后存活约15至20年。

[0008] 亨廷顿病无法治愈,并且无法减缓或阻止与所述疾病相关的脑细胞变性。因此,治疗集中于控制症状。心理疗法、言语疗法、物理疗法和职业疗法也可用于试图控制症状。然而,个体对不同治疗方法的反应是不可预测的,并且找到有效的治疗方案是困难且费时的。因此,需要用于亨廷顿病的有效治疗。

### 发明内容

[0009] 本公开提供了一种治疗有需要的受试者的亨廷顿病的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(miRNA抑制剂)。

[0010] 在一些方面,所述受试者在施用前表现出亨廷顿病的一种或多种特征,包括易怒、抑郁、不自主运动、协调性差、难以学习新信息或做出决定、不受控制的运动、情绪问题和思维能力(认知)的丧失。在一些方面,受试者在施用后表现出亨廷顿病的一种或多种特征的改善。在一些方面,所述改善是与施用前的特征相比至少约1.5倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍或至少约10倍。

[0011] 在一些方面,所述亨廷顿病与SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平降低相关。在一些方面,所述亨廷顿病与CD36蛋白和/或CD36基因的水平降低相关。在一些方面,所述受试者患有与PGC-1 $\alpha$ 蛋白和/或PGC-1 $\alpha$ 基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0012] 在一些方面,所述miRNA抑制剂诱导自噬和/或治疗或预防炎症。

[0013] 在一些方面,所述miRNA抑制剂诱导神经发生。在一些方面,诱导神经发生包括神

经干细胞和/或祖细胞的增殖、分化、迁移和/或存活增加。在一些方面,诱导神经发生包括神经干细胞和/或祖细胞的数量增加。在一些方面,诱导神经发生包括轴突、树突和/或突触发育增加。

[0014] 在一些方面,所述miRNA抑制剂诱导吞噬作用。

[0015] 在一些方面,所述miRNA抑制剂抑制miR485-3p。在一些方面,所述miR485-3p包含5'-gucauacacggcucuccucucu-3'(SEQ ID NO:1)。

[0016] 在一些方面,所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含5'-UGUAUGA-3'(SEQ ID NO:2),并且其中所述miRNA抑制剂包含约7至约30个核苷酸的长度。

[0017] 在一些方面,所述miRNA抑制剂增加SIRT1基因的转录和/或SIRT1蛋白的表达。

[0018] 在一些方面,所述miRNA抑制剂在所述核苷酸序列的5'包含至少1个核苷酸、至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。

[0019] 在一些方面,所述miRNA抑制剂在所述核苷酸序列的3'包含至少1个核苷酸、至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。

[0020] 在一些方面,所述miRNA抑制剂具有选自由以下组成的组的序列:5'-UGUAUGA-3'(SEQ ID NO:2)、5'-GUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:3)、5'-CGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:4)、5'-CCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:5)、5'-GCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:6)、5'-AGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:7)、5'-GAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:8)、5'-AGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:9)、5'-GAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:10)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:11)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:12)、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:13)、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:14)、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:15)、5'-UGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:16)、5'-GUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:17)、5'-CGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:18)、5'-CCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:19)、5'-GCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:20)、5'-AGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:21)、5'-GAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:22)、5'-AGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:23)、5'-GAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:24)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:25)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:26)、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:27)、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)和5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:29)。

[0021] 在一些方面,所述miRNA抑制剂具有选自由以下组成的组的序列:5'-TGTATGA-3'(SEQ ID NO:62)、5'-GTGTATGA-3'(SEQ ID NO:63)、5'-CGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:64)、5'-CCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:65)、5'-GCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:66)、5'-AGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:67)、5'-GAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:68)、5'-AGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:69)、5'-GAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:70)、5'-GGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:71)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:72)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID

NO:73)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:74)、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:75)、5'-TGTATGAC-3'(SEQ ID NO:76)、5'-GTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77)、5'-CGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:78)、5'-CCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:79)、5'-GCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:80)、5'-AGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:81)、5'-GAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:82)、5'-AGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:83)、5'-GAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:84)、5'-GGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:85)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:86)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:87)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)和5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:89)。

[0022] 在一些方面,所述miRNA抑制剂的序列与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%序列同一性。

[0023] 在一些方面,所述miRNA抑制剂具有与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)具有至少90%相似性的序列。

[0024] 在一些方面,所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88),具有一个取代或两个取代。

[0025] 在一些方面,miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)。

[0026] 在一些方面,miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)。

[0027] 在一些方面,所述miRNA抑制剂包含至少一种经修饰的核苷酸。

[0028] 在一些方面,所述至少一种经修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)、阿拉伯核酸(ABA)、桥联核酸(BNA)和/或肽核酸(PNA)。

[0029] 在一些方面,所述miRNA抑制剂包含主链修饰。

[0030] 在一些方面,所述主链修饰是二氨基磷酸酯吗啉代低聚物(PMO)和/或硫代磷酸酯(PS)修饰。

[0031] 在一些方面,所述miRNA抑制剂在递送剂中递送。

[0032] 在一些方面,所述递送剂是胶束、外泌体、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡或合成囊泡。

[0033] 在一些方面,所述miRNA抑制剂通过病毒载体递送。

[0034] 在一些方面,所述病毒载体是AAV、腺病毒、逆转录病毒或慢病毒。

[0035] 在一些方面,所述病毒载体是具有血清型AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或它们的任何组合的AAV。

[0036] 在一些方面,所述miRNA抑制剂与递送剂一起递送。

[0037] 在一些方面,所述递送剂包括类脂质、脂质体、脂质复合物、脂质纳米颗粒、聚合化合物、肽、蛋白质、细胞、纳米颗粒模拟物、纳米管或缀合物。

[0038] 在一些方面,所述递送剂包含阳离子载体单元,所述阳离子载体单元包含

[0039] [WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (式I)

[0040] 或

[0041] [WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (式II)

[0042] 其中

[0043] WP是水溶性生物聚合物部分；

[0044] CC是带正电荷的载体部分；

[0045] AM是佐剂部分；并且，

[0046] L1和L2独立地是任选的接头，并且

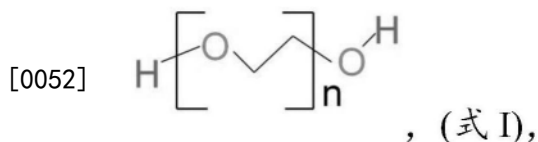
[0047] 其中当以约1:1的离子比率与核酸混合时，所述阳离子载体单元形成胶束。

[0048] 在一些方面，所述miRNA抑制剂通过离子键与所述阳离子载体单元相互作用。

[0049] 在一些方面，所述水溶性生物聚合物包括聚(烷二醇)、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯二醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚( $\alpha$ -羟基酸)、聚(乙醇醇)、聚甘油、聚磷脂、聚噁唑啉(“POZ”)聚(N-丙烯酰吗啉)或它们的任何组合。

[0050] 在一些方面，所述水溶性生物聚合物包括聚乙二醇(“PEG”)、聚甘油或聚(丙二醇)(“PPG”)。

[0051] 在一些方面，水溶性生物聚合物包含：



[0053] 其中n是1-1000。

[0054] 在一些方面，n是至少约110、至少约111、至少约112、至少约113、至少约114、至少约115、至少约116、至少约117、至少约118、至少约119、至少约120、至少约121、至少约122、至少约123、至少约124、至少约125、至少约126、至少约127、至少约128、至少约129、至少约130、至少约131、至少约132、至少约133、至少约134、至少约135、至少约136、至少约137、至少约138、至少约139、至少约140或至少约141。

[0055] 在一些方面，n是约80至约90、约90至约100、约100至约110、约110至约120、约120至约130、约140至约150、或约150至约160。

[0056] 在一些方面，所述水溶性生物聚合物是直链的、支链的或树枝状的。

[0057] 在一些方面，所述阳离子载体部分包含一个或多个碱性氨基酸。

[0058] 在一些方面，所述阳离子载体部分包含至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个、至少31个、至少32个、至少33个、至少34个、至少35个、至少36个、至少37个、至少38个、至少39个、至少40个、至少41个、至少42个、至少43个、至少44个、至少45个、至少46个、至少47个、至少48个、至少49个或至少50个碱性氨基酸。

[0059] 在一些方面，所述阳离子载体部分包含约30至约50个碱性氨基酸。

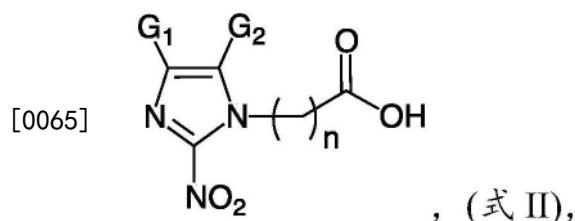
[0060] 在一些方面，所述碱性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸或它们的任何组合。

[0061] 在一些方面，所述阳离子载体部分包含约40个赖氨酸单体。

[0062] 在一些方面，所述佐剂部分能够调节免疫应答、炎症应答和/或组织微环境。

[0063] 在一些方面,所述佐剂部分包含咪唑衍生物、氨基酸、维生素或它们的任何组合。

[0064] 在一些方面,所述佐剂部分包含:



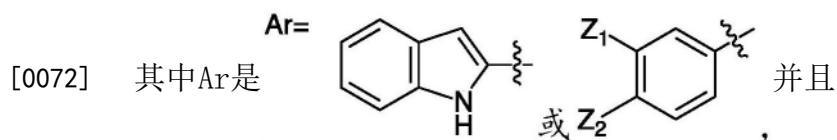
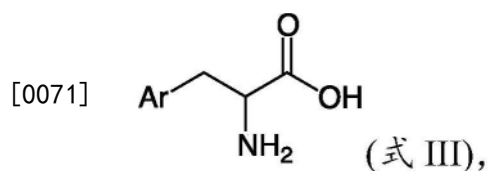
[0066] 其中G<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>各自是H、芳族环或1-10烷基,或者G<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>一起形成芳族环,并且其中n是1-10。

[0067] 在一些方面,所述佐剂部分包含硝基咪唑。

[0068] 在一些方面,所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼、奥硝唑、美格唑、阿扎硝唑、苄硝唑或它们的任何组合。

[0069] 在一些方面,所述佐剂部分包含氨基酸。

[0070] 在一些方面,所述佐剂部分包含

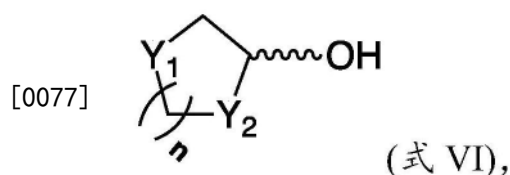


[0073] 其中Z<sub>1</sub>和Z<sub>2</sub>各自是H或OH。

[0074] 在一些方面,所述佐剂部分包含维生素。

[0075] 在一些方面,所述维生素包含环状环或环状杂原子环和羧基或羟基。

[0076] 在一些方面,所述维生素包含:



[0078] 其中Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>各自是C、N、O或S,并且其中n是1或2。

[0079] 在一些方面,所述维生素选自由以下组成的组:维生素A、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B6、维生素B7、维生素B9、维生素B12、维生素C、维生素D2、维生素D3、维生素E、维生素M、维生素H以及它们的任何组合。

[0080] 在一些方面,所述维生素是维生素B3。

[0081] 在一些方面,所述佐剂部分包含至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约6个、至少约7个、至少约8个、至少约9个、至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个或至少约20个维生素B3单元。

[0082] 在一些方面,所述佐剂部分包含约10个维生素B3单元。

[0083] 在一些方面,所述递送剂包含约具有约120至约130个PEG单元的水溶性生物聚合物部分、包含具有约30至约40个赖氨酸的聚赖氨酸的阳离子载体部分和具有约5至约10个维生素B3单元的佐剂部分。

[0084] 在一些方面,所述递送剂与所述miRNA抑制剂缔合,从而形成胶束。

[0085] 在一些方面,所述缔合是共价键、非共价键或离子键。

[0086] 在一些方面,所述胶束中的阳离子载体单元和miRNA抑制剂在溶液中混合,使得所述阳离子载体单元的正电荷与所述miRNA抑制剂的负电荷的离子比率是约1:1。

[0087] 在一些方面,所述阳离子载体单元能够保护所述miRNA抑制剂免于酶促降解。

## 附图说明

[0088] 图1示出本公开的载体单元的示例性架构。所呈现的实施例包括阳离子载体部分,所述阳离子载体部分可与阴离子有效载荷静电相互作用,所述阴离子有效载荷例如核酸,如靶向基因的反义寡核苷酸,例如,miRNA (反义微小RNA (antimir))。在一些方面,AM可位于WP与CC之间。为简单起见,CC和AM组分以线性排列方式描绘。然而,如本文所述,在一些方面,CC和AM可以支架方式排列。

[0089] 图2A示出用或不用miR485-3p抑制剂处理的NSC-34细胞中的聚集Htt分析的示意性概述。图2B提供蛋白质印迹分析,其显示在用miR-485-3p抑制剂处理的Q74-Htt转染的NSC-34细胞中不溶性聚集亨廷顿蛋白(Htt)的水平降低。用GFP标记的野生型(Q23)或突变体(Q74)Htt转染NSC-34细胞。

[0090] 图3A提供蛋白质印迹分析,其显示在用miR-485抑制剂处理的Q74-Htt转染的HEK293T细胞中不溶性聚集亨廷顿蛋白(Htt)的水平降低。图3B示出基于图3A的蛋白质印迹定量相对聚集htt表达水平的图。

[0091] 图4A提供蛋白质印迹分析,显示与Q-23-Htt转染的HEK293T细胞相比,用miR-485抑制剂处理的Q74-Htt转染的HEK293T细胞中自噬蛋白SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、p62和LC3-II的水平增加。图4B-4E分别示出如从图4A的蛋白质印迹所确定的定量SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、p62和LC3-II的相对水平的图。

[0092] 图5提供蛋白质印迹分析,其显示与Q23-Htt转染的PC12细胞相比,在用miR-485抑制剂处理的Q74-Htt转染的PC12细胞中不溶性聚集亨廷顿蛋白(Htt)的水平降低。

[0093] 图6提供蛋白质印迹分析,显示与Q23-Htt转染的PC12细胞相比,用miR-485-3p抑制剂处理的Q74-Htt转染的PC12细胞中自噬蛋白SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、p62和LC3-II的水平增加并且半胱天冬酶3的裂解减少。

[0094] 图7A-7E示出可视化用miR-485抑制剂处理的Q74-Htt转染的PC12细胞中GFP标记的htt(图7D和7E)和Q23-Htt转染的PC12细胞中GFP标记的Htt(图7B和7C)的分布和对照细胞(图7A)的图像。

[0095] 图8A-8D示出可视化用miR-485抑制剂处理的Q74-Htt转染的(图8C和8D)和Q23-Htt转染的(图8A和8B)原代皮层神经元中GFP标记的htt的分布的图像。左图示出对照处理,并且右图示出miR485-3p抑制剂处理。

[0096] 图9A-9R示出miR485-3p通过调控自噬增强Htt聚集体的降解。使用对照(顶行)、100nM(中间行)或300nM(底行)miR485-3p转染,分别Q23(图9A-9I)或Q74(图9J-9R)转染的

PC12细胞中Htt蛋白(左图)、LC3B(中图)和DAPI(右图)的免疫荧光标记(比例尺,20 $\mu$ m)。白色箭头显示Htt和LC3的共定位。

## 具体实施方式

[0097] 在更详细地描述本公开之前,应当理解,本公开不限于所描述的特定组合物或方法步骤,因此此类组合物或方法步骤当然可变化。本领域技术人员在阅读本公开时将显而易见的是,本文所描述且说明的各个个别方面具有离散的组分和特征,所述组分和特征可容易地与任何另外的若干方面的特征分离或组合而不偏离本公开的范围或精神。任何叙述的方法均可以叙述的事件的顺序或以在逻辑上可能的任何其它顺序进行。

[0098] 本文提供的标题并非是对本公开的各个方面的限制,所述各个方面可通过参考说明书整体来限定。还应理解,本文使用的术语仅出于描述特定方面的目的,并且并不意图是限制性的,因为本公开的范围将仅受所附权利要求限制。

### [0099] I. 术语

[0100] 为了能够更容易地理解本公开内容,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下文所述的含义。另外的定义在整个申请中阐述。

[0101] 应注意术语“一个(种)(a/an)”实体是指一个(种)或多个(种)所述实体;例如“一个(种)核苷酸序列”应理解为表示一个(种)或多个(种)核苷酸序列。因此,术语“一个(种)”、“一个(种)或多个(种)”和“至少一个(种)”在本文中可互换使用。还应注意,权利要求可以被草拟为排除任何任选的要素。因此,对于与叙述权利要求要素结合使用的像“单独”、“只”等这样的排他性术语或所使用的“否定性”限制,这份说明书仅意图充当一个先行基础。

[0102] 此外,当在本文中使用时,“和/或”应视为特定公开两个指定特征或组分中的每一者,伴有或不伴有另一者。因此,如本文中诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如在诸如“A、B和/或C”的短语中使用术语“和/或”意图包括以下方面的每一方面:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独的);B(单独的);和C(单独的)。

[0103] 应当理解,本文无论在何处用措辞“包含/包括(comprising)”来描述方面,都还提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其它类似方面。

[0104] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本公开所相关领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。举例来说,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press; 以及 Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修订版, 2000, Oxford University Press 对技术人员提供本公开中使用的许多术语的综合词典。

[0105] 单位、前缀和符号以它们的国际单位制(SI)接受形式表示。数值范围包括界定范围的数值。在列举值的范围的情况下,应理解的是,还具体公开了在该范围的所列举的上限与下限之间的每个居间整数及其每个分数,以及在此类值之间的每个子范围。任何范围的上限和下限都可以独立地包括在该范围内或从该范围中排除,并且其中包括任一个限

值、两个限值都不包括或包括两个限值的每个范围也涵盖于本公开中。因此,本文所列举的范围应理解为所述范围内所有值(包括所列举端点)的简写。例如,1至10的范围被理解为包括来自由1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组中的任何数值、数值组合或子范围。

[0106] 在明确列举值的情况下,应当理解,与所列举的值大致相同的数量或量的值也在本公开的范围。在公开组合的情况下,还具体公开了该组合的元素的每个子组合,并且所述子组合在本公开的范围。相反,在分别公开不同元素或元素组的情况下,也公开了其组合。在本公开的任何要素被公开为具有多个替代方案的情况下,特此还公开了其中每个替代方案单独地或与其它替代方案组合被排除在外的本公开的实施例;本公开的多于一个要素可具有此类排除,并且特此公开了具有此类排除的要素的所有组合。

[0107] 核苷酸可由其普遍接受的单字母码表示。除非另外指示,否则核苷酸序列以5'至3'定向从左至右书写。核苷酸在本文中以其由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的众所周知的单字母符号提及。因此,'a'代表腺嘌呤,'c'代表胞嘧啶,'g'代表鸟嘌呤,'t'代表胸腺嘧啶,并且'u'代表尿嘧啶。

[0108] 氨基酸序列从左至右以氨基至羧基的取向书写。氨基酸可以在本文中由其通常已知的由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的三字母符号或单字母符号来表示。

[0109] 术语“约”在本文中用于意指近似、大致、约或在……左右。当术语“约”与数值范围结合使用时,其通过使边界延伸高于和低于阐述的数值来修饰那个范围。一般来说,术语“约”可通过例如向上或向下(升高或降低)10%的变化修饰高于或低于所述值的数值。

[0110] 如本文所用,术语“腺相关病毒”(AAV)包括但不限于AAV 1型、AAV 2型、AAV 3型(包括3A型和3B型)、AAV 4型、AAV 5型、AAV 6型、AAV 7型、AAV 8型、AAV 9型、AAV 10型、AAV 11型、AAV 12型、AAV 13型、AAVrh.74、蛇AAV、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、绵羊AAV、山羊AAV、虾AAV、由Gao等人(J.Virol.78:6381(2004))和Moris等人(Virol.33:375(2004))公开的那些AAV血清型和进化枝以及现在已知或后来发现的任何其它AAV。参见例如,FIELDS等人VIROLOGY,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。在一些方面,“AAV”包括已知AAV的衍生物。在一些方面,“AAV”包括经修饰的或人工AAV。

[0111] 术语“施用(administration)”、“施用(administering)”及其语法变体是指通过药学上可接受的途径将组合物,如本公开的miRNA抑制剂引入受试者。通过任何合适的途径将组合物,如包含本公开的miRNA抑制剂的胶束引入受试者,所述途径包括肿瘤内、经口、经肺、鼻内、胃肠外(静脉内、动脉内、肌内、腹膜内或皮下)、经直肠、淋巴管内、鞘内、眼周或局部途径。施用包括自我施用和由另外的人施用。合适的施用途径允许组合物或剂执行其预期功能。例如,如果合适的途径是静脉内途径,则通过将组合物或剂引入受试者的静脉来施用组合物。

[0112] 如本文所用,在应用于一个或多个目标值时,术语“大约”是指类似于所阐述的参考值的值。在某些方面,术语“大约”是指在所阐述的参考值的任一方向上的(大于或小于)10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值范围,除非另外说明或以另外的方式从上下文显而易见(除了这样的数值将超过可能值的100%的情况)。

[0113] 如本文所使用,术语“保守的”是指分别在所比较的两个或更多个序列的相同位置上未发生改变的多核苷酸序列或多肽序列的核苷酸或氨基酸残基。相对保守的核苷酸或氨基酸是在较为相关的序列之间比出现于序列的其它地方的核苷酸或氨基酸保守的那些核

苷酸或氨基酸。

[0114] 在一些方面,如果两个或更多个序列彼此具有100%同一性,则称它们为“完全保守的”或“相同的”。在一些方面,如果两个或更多个序列彼此至少70%同一、至少80%同一、至少90%同一或至少95%同一,则它们被称为“高度保守的”。在一些方面,如果两个或更多个序列彼此约70%同一、约80%同一、约90%同一、约95%、约98%或约99%同一,则它们被称为“高度保守的”。在一些方面,如果两个或更多个序列彼此至少30%同一、至少40%同一、至少50%同一、至少60%同一、至少70%同一、至少80%同一、至少90%同一或至少95%同一,则它们被称为“保守的”。在一些方面,如果两个或更多个序列彼此约30%同一、约40%同一、约50%同一、约60%同一、约70%同一、约80%同一、约90%同一、约95%同一、约98%同一或约99%同一,则它们被称为“保守的”。序列的保守可适用于多核苷酸或多肽的整个长度或者可适用于其部分、区或特征。

[0115] 如本文所用,术语“源自”是指从特定分子或生物体中分离或使用特定分子或生物体制备的组分,或来自特定分子或生物体的信息(例如,氨基酸或核酸序列)。例如,源自第二核酸序列的核酸序列可包括与所述第二核酸序列的核苷酸序列同一或基本相似的核苷酸序列。在核苷酸或多肽的情况下,来源物种可通过例如天然存在的诱变、人工定向诱变或人工随机诱变获得。用于获得核苷酸或多肽的诱变可以是有意定向的或有意随机的,或两者的混合。核苷酸或多肽的诱变以产生源自第一核苷酸或多肽的不同核苷酸或多肽可以是随机事件(例如,由聚合酶失真引起)并且可通过适当的筛选方法(例如如本文所述)来鉴定来源核苷酸或多肽。在一些方面,源自第二核苷酸或氨基酸序列的核苷酸或氨基酸序列分别与所述第二核苷酸或氨基酸序列具有至少约50%、至少约51%、至少约52%、至少约53%、至少约54%、至少约55%、至少约56%、至少约57%、至少约58%、至少约59%、至少约60%、至少约61%、至少约62%、至少约63%、至少约64%、至少约65%、至少约66%、至少约67%、至少约68%、至少约69%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的序列同一性,其中第一核苷酸或氨基酸序列保留第二核苷酸或氨基酸序列的生物活性。

[0116] 如本文所用,“编码区”或“编码序列”是多核苷酸中由可翻译成氨基酸的密码子组成的一部分。虽然“终止密码子”(TAG、TGA或TAA)通常未被翻译成氨基酸,它可被认为是编码区的一部分,但是任何侧翼序列(例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等)并非编码区的一部分。编码区的边界通常通过位于5'末端处编码所得多肽的氨基末端的起始密码子和位于3'末端处编码所得多肽的羧基末端的翻译终止密码子决定。

[0117] 术语“互补的”和“互补性”是指通过沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对彼此相关的两种或更多种低聚物(即,各自包含核碱基序列),或在低聚物与靶基因之间。例如,核碱基序列“T-G-A(5'→3')”与核碱基序列“A-C-T(3'→5')”互补。互补性可以是“部分的”,其中根据碱基配对规则,给定核碱基序列的少于所有核碱基与另一核碱基序列匹配。例如,在一些方面,给定核碱基序列与其它核碱基序列之间的互补性可以是约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。因此,在某些方面,术语“互补”是指与靶核酸序列(例如,

miR-485核酸序列)至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%匹配或互补性。或者,在给定核碱基序列与其它核碱基序列之间可存在“完全”或“完美”(100%)互补性以继续所述实例。在一些方面,核碱基序列之间的互补性程度对序列之间杂交的效率和强度具有显著影响。

[0118] 术语“下游”是指位于参考核苷酸序列3'的核苷酸序列。在某些方面,下游核苷酸序列涉及转录起始点之后的序列。例如,基因的翻译起始密码子位于转录起始位点的下游。

[0119] 术语“赋形剂”和“载体”可互换使用并且是指添加至药物组合物中以进一步促进化合物,例如本公开的miRNA抑制剂的施用的惰性物质。

[0120] 如本文所用,术语“表达”是指多核苷酸产生基因产物,例如RNA或多肽的过程。它包括但不限于将多核苷酸转录成微小RNA结合位点、小发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)或任何其它RNA产物。它包括但不限于将多核苷酸转录成信使RNA(mRNA)和将mRNA翻译成多肽。表达产生“基因产物”。如本文所用,基因产物可以是例如核酸,如通过基因的转录产生的RNA。如本文所用,基因产物可以是由基因的转录产生的核酸、RNA或miRNA,或从转录物翻译的多肽。本文所述的基因产物还包括具有转录后修饰的核酸,所述修饰例如为聚腺苷酸化或剪接;或具有翻译后修饰的多肽,所述修饰例如为磷酸化、甲基化、糖基化、添加脂质、与其它蛋白质亚基缔合或蛋白水解裂解。

[0121] 如本文所用,术语“同源性”是指聚合物分子之间,例如核酸分子之间的总体相关性。一般来说,术语“同源性”意味着两个分子之间的进化关系。因此,两个同源的分子将具有共同的进化祖先。在本公开的上下文中,术语同源性涵盖同一性和相似性两者。

[0122] 在一些方面,如果聚合物分子中至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%的单体是同一的(完全相同的单体)或相似的(保守取代),则所述分子被认为是彼此“同源的”。术语“同源的”必定是指至少两个序列(例如,多核苷酸序列)之间的比较。

[0123] 在本公开的上下文中,取代(即使当它们被称为氨基酸取代时)在核酸水平下进行,即用替代氨基酸残基取代氨基酸残基通过用编码第二氨基酸的密码子取代编码第一氨基酸的密码子来进行。

[0124] 如本文所用,术语“同一性”是指聚合物分子之间,例如多核苷酸分子之间的总体单体保守性。没有任何额外限定符的术语“同一的”,例如多核苷酸A与多核苷酸B同一,意味着多核苷酸序列是100%同一的(100%序列同一性)。将两个序列描述为例如“70%同一”等同于将它们描述为具有例如“70%序列同一性”。

[0125] 两个多肽或多核苷酸序列的同一性百分比的计算例如可通过出于最佳比较目的比对两个序列来进行(例如,为了最佳比对可将空位引入第一和第二多肽或多核苷酸序列之一或两者中并且出于比较目的可忽视不相同的序列)。在某些方面,出于比较目的比对的序列的长度是参考序列的长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后对相应氨基酸位置的氨基酸,或在多核苷酸的情况下对碱基进行比较。

[0126] 第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸或核苷酸占据时,则分

子在所述位置处是同一的。两个序列之间的同一性百分比随将为了两个序列的最优比对而需要引入的空位的数目和每个空位的长度考虑在内,由所述序列共有的相同位置的数目而变化。两个序列之间的序列的比较和一致性百分比的确定可使用数学算法来完成。

[0127] 可用于比对不同序列(例如,多核苷酸序列)的合适软件程序可从各种来源获得。用于确定序列同一性百分比的一种合适的程序是bl2seq,其为可从美国政府国家生物技术信息中心BLAST网址([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov))获得的BLAST程序套件的一部分。Bl2seq使用BLASTN或BLASTP算法进行两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。其它合适的程序是例如Needle、Stretcher、Water或Matcher,其为生物信息学程序的EMBOSS套件的一部分,并且也可从欧洲生物信息学研究所(EBI)在[www.ebi.ac.uk/Tools/psa](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa)获得。

[0128] 序列比对可使用本领域中已知的方法如MAFFT、Clustal (ClustalW、Clustal X或Clustal Omega)、MUSCLE等来进行。

[0129] 与多核苷酸或多肽参考序列比对的单个多核苷酸或多肽靶序列内的不同区域可各自具有其自己的序列同一性百分比。应注意,序列同一性百分比值四舍五入至最接近的十分位。例如,80.11、80.12、80.13和80.14向下舍入到80.1,而80.15、80.16、80.17、80.18和80.19向上舍入到80.2。还应注意,长度值将始终是整数。

[0130] 在某些方面,第一氨基酸序列(或核酸序列)与第二氨基酸序列(或核酸序列)的同一性百分比(%ID)被计算为 $\%ID = 100 \times (Y/Z)$ ,其中Y是在第一序列和第二序列的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基(或核碱基)的数目(如通过目视检查或特定序列比对程序所比对),并且Z是第二序列中的残基总数。如果第一序列的长度长于第二序列,则第一序列与第二序列的同一性百分比将高于第二序列与第一序列的同一性百分比。

[0131] 本领域技术人员将理解,用于计算序列同一性百分比的序列比对的生成不限于仅由一级序列数据驱动的二进制序列-序列比较。还应理解,序列比对可通过将序列数据与来自异构源的数据如结构数据(例如,晶体学蛋白质结构)、功能数据(例如,突变的位置)或系统发育数据整合而产生。整合异构数据以生成多重序列比对的合适程序是可在[www.tcoffee.org](http://www.tcoffee.org)获得且可替代地可例如从EBI获得的T-Coffee。还应了解,用于计算百分比序列同一性的最终比对可自动地或人工地加以开展。

[0132] 如本文所用,术语“分离的”、“纯化的”、“提取的”及其语法变体可互换地使用并且是指已进行一个或多个纯化过程的本公开的所需组合物,例如本公开的miRNA抑制剂的制剂状态。在一些方面,如本文所用的分离或纯化是从含有污染物的样品中除去、部分除去(例如,一部分)本公开的组合物,例如本公开的miRNA抑制剂的过程。

[0133] 在一些方面,分离的组合物没有可检测的不希望的活性,或者可替代地,不希望的活性的水平或量处于或低于可接受的水平或量。在其它方面,分离的组合物在本公开的所需组合物的量和/或浓度处于或高于可接受的量和/或浓度和/或活性。在其它方面,与从其中获得组合物的起始材料相比,分离的组合物得到富集。这种富集可以是与起始材料相比,至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、至少约99.9%、至少约99.99%、至少约99.999%、至少约99.9999%或大于99.9999%。

[0134] 在一些方面,分离的制剂基本上不含残留生物产物。在一些方面,分离的制剂

100%不含、至少约99%不含、至少约98%不含、至少约97%不含、至少约96%不含、至少约95%不含、至少约94%不含、至少约93%不含、至少约92%不含、至少约91%不含或至少约90%不含任何污染性生物物质。残留生物产物可包括非生物物质(包括化学物质)或不想要的核酸、蛋白质、脂质或代谢物。

[0135] 如本文所用,术语“连接的”是指第一氨基酸序列或多核苷酸序列分别共价或非共价连接至第二氨基酸序列或多核苷酸序列。第一氨基酸或多核苷酸序列可直接连接至第二氨基酸或多核苷酸序列或与第二氨基酸或多核苷酸序列并置,或者可替代地插入序列可将第一序列共价连接至第二序列。术语“连接”不仅指第一多核苷酸序列在5'-端或3'-端与第二多核苷酸序列的融合,而且包括将整个第一多核苷酸序列(或第二多核苷酸序列)插入第二多核苷酸序列(或相应地第一多核苷酸序列)中的任何两个核苷酸中。第一多核苷酸序列可通过磷酸二酯键或接头与第二多核苷酸序列连接。接头可以是例如多核苷酸。

[0136] 如本文所用,“miRNA抑制剂”是指可降低、改变和/或调节miRNA表达、功能和/或活性的化合物。miRNA抑制剂可以是与靶miRNA核酸序列至少部分互补的多核苷酸序列,使得所述miRNA抑制剂与所述靶miRNA序列杂交。例如,在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含编码与靶miR-485核酸序列至少部分互补的核苷酸序列,使得所述miR-485抑制剂与所述miR-485序列杂交。在其它方面,miR-485与miR-485序列的杂交降低、改变和/或调节miR-485的表达、功能和/或活性(例如,杂交导致SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达增加)。

[0137] 术语“miRNA”、“miR”和“微小RNA”可互换地使用,并且是指在真核生物中发现的参与基于RNA的基因调控的微小RNA分子。所述术语将用于指由前体加工的单链RNA分子。在一些方面,术语“反义低聚物”也可用于描述本公开的微小RNA分子。本文提供了与本公开有关的miRNA的名称及其序列。微小RNA通过不完美的碱基配对识别并结合至靶mRNA,从而导致靶mRNA的不稳定或翻译抑制,并且由此下调靶基因表达。相反,通过包含miRNA结合位点的分子(通常是包含与miRNA的种子区互补的序列的分子)靶向miRNA可减少或抑制miRNA诱导的翻译抑制,从而导致靶基因上调。

[0138] 术语“错配(mismatch)”或“错配(mismatches)”是指低聚物核碱基序列(例如,miR-485抑制剂)中根据碱基配对规则与靶核酸序列(例如,miR-485)不匹配的一个或多个核碱基(无论是连续的还是分离的)。虽然通常需要完美互补性,但在一些方面,可相对于靶核酸序列存在一个或多个(例如,6、5、4、3、2或1个错配)。包括在低聚物内的任何位置处的变化。在某些方面,本公开的反义低聚物(例如,miR-485抑制剂)包括末端附近的核碱基序列的变化、内部的变化,并且如果存在,通常在5'和/或3'末端的约6、5、4、3、2或1个亚基范围内。在一些方面,可除去一个、两个或三个核碱基并且仍然提供中靶结合。

[0139] 如本文所用,术语“调节”、“修饰”及其语法变体当应用于特定浓度、水平、表达、功能或行为时,通常是指通过增加或降低,例如直接地或间接地促进/刺激/上调或干扰/抑制/下调特定浓度、水平、表达、功能或行为进行改变的能力,诸如,例如以充当拮抗剂或激动剂。在一些情况下,调节剂可相对于对照、或相对于通常可预期的平均活性水平、或相对于对照活性水平,增加和/或降低特定浓度、水平、活性或功能。在一些方面,本文公开的miRNA抑制剂(例如miR-485抑制剂)可调节(例如,降低、改变或消除)miR-485表达、功能和/或活性,并且由此调节SIRT1蛋白或基因表达和/或活性。

[0140] “核酸”、“核酸分子”、“核苷酸序列”、“多核苷酸”及其语法变化形式可互换使用并

且是指呈单链形式或双链螺旋形式的核糖核苷(腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷;“RNA分子”)或脱氧核糖核苷(脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷或脱氧胞苷;“DNA分子”)的磷酸酯聚合形式或其任何磷酸酯类似物,如硫代磷酸酯和硫酯。单链核酸序列是指单链DNA(ssDNA)或单链RNA(ssRNA)。双链DNA-DNA、DNA-RNA和RNA-RNA螺旋是可能的。术语核酸分子,并且特别是DNA或RNA分子,仅指分子的一级和二级结构,并且不将其限于任何特定三级形式。因此,这一术语包括尤其见于线性或环状DNA分子(例如限制片段)、质粒、超螺旋DNA和染色体中的双链DNA。在讨论特定双链DNA分子的结构时,在本文中可根据仅沿非转录DNA链(即具有与mRNA同源的序列的链)以5'至3'方向给出序列的正常惯例来描述序列。“重组DNA分子”是经过分子生物学操作的DNA分子。DNA包括但不限于cDNA、基因组DNA、质粒DNA、合成DNA和半合成DNA。本公开的“核酸组合物”包含一种或多种如本文所述的核酸。

[0141] 术语“药学上可接受的载体”、“药学上可接受的赋形剂”及其语法变化形式涵盖美国联邦政府的监管机构批准的或美国药典中列出的用于包括人在内的动物的任何剂,以及不会导致产生以至于禁止向受试者施用所述组合物的程度的不希望的生理效应并且不会消除所施用的化合物的生物活性和性质的任何载体或稀释剂。包括可用于制备药物组合物并且通常是安全、无毒且合乎需要的赋形剂和载体。

[0142] 如本文所用,术语“药物组合物”是指本文所述的一种或多种化合物,诸如(例如)与一种或多种其它化学组分,诸如药学上可接受的载体和赋形剂混合或掺混或悬浮在其中的本公开的miRNA抑制剂。药物组合物的一个目的是促进包含本公开的miRNA抑制剂的制剂至受试者的施用。

[0143] 如本文所用的术语“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸聚合物,包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、其类似物或其混合物。

[0144] 在一些方面,所述术语是指分子的一级结构。因此,所述术语包括三链、双链和单链脱氧核糖核酸(“DNA”),以及三链、双链和单链核糖核酸(“RNA”)。它还包括修饰(例如通过烷基化和/或通过加帽)和未修饰形式的多核苷酸。

[0145] 在一些方面,术语“多核苷酸”包括聚脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖);聚核糖核苷酸(含有D-核糖),包括tRNA、rRNA、shRNA、siRNA、miRNA和mRNA,无论是剪接的还是未剪接的;为嘌呤或嘧啶碱基的N-或C-糖苷的任何其它类型的多核苷酸;以及含有正核苷酸主链的其它聚合物,例如聚酰胺(例如,肽核酸“PNA”)和聚吗啉代聚合物;以及其它合成的序列特异性核酸聚合物,条件是所述聚合物含有呈允许碱基配对和碱基堆积,如在DNA和RNA中发现的构型的核碱基。

[0146] 在本公开的一些方面,多核苷酸可以是例如寡核苷酸,如反义寡核苷酸。在一些方面,寡核苷酸是RNA。在一些方面,RNA是合成RNA。在一些方面,合成RNA包含至少一个非天然核碱基。在一些方面,某一类别的所有核碱基已被非天然核碱基替代(例如,本文公开的多核苷酸中的所有尿苷都可被非天然核碱基,例如5-甲氧基尿苷替代)。

[0147] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指例如由SIRT1基因编码的任何长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可包含经修饰的氨基酸。所述术语还涵盖已经天然地或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操纵或修饰,诸如与标记组分缀合。定义中还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括,例如非天然氨基酸,诸如高半胱氨酸、鸟氨酸、对乙酰基苯丙氨酸、D-氨基酸和肌酸)

以及本领域已知的其它修饰的多肽。如本文所用,术语“多肽”是指具有任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。

[0148] 多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同源物、直向同源物、横向同源物、前述的片段和其它等效物、变体和类似物。

[0149] 多肽可以是单个多肽或者可以是多分子复合物,如二聚物、三聚物或四聚物。它们还可包含单链或多链多肽。最常见地,二硫键存在于多链多肽中。术语多肽还可应用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物。在一些方面,“肽”可小于或等于约50个氨基酸长,例如约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45或约50个氨基酸长。

[0150] 如本文所使用的术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”及其变体是指部分或完全延迟疾病、病症和/或疾患的发作;部分或完全延迟特定疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状、特征或临床表现的发作;部分或完全延迟特定疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状、特征或表现的发作;部分或完全延迟从特定疾病、病症和/或疾患的进展;和/或降低发展与疾病、病症和/或疾患相关的病理的风险。在一些方面,通过防治性治疗来实现预防结果。

[0151] 如本文所用,术语“启动子”和“启动子序列”可互换使用并且是指能够控制编码序列或功能性RNA的表达的DNA序列。一般来说,编码序列位于启动子序列的3'。启动子可全部来源于天然基因,或由来源于自然界中发现的不同启动子的不同元件构成,或甚至包含合成的DNA区段。本领域技术人员应理解不同启动子可在不同组织或细胞类型中、或在不同发育阶段、或响应于不同环境或生理条件来引导基因的表达。引起基因大部分时候在大部分细胞类型中表达的启动子通常被称为“组成型启动子”。引起基因在特定细胞类型中表达的启动子通常被称为“细胞特异性启动子”或“组织特异性启动子”。引起基因在发育或细胞分化的特定阶段表达的启动子通常被称为“发育特异性启动子”或“细胞分化特异性启动子”。在用诱导启动子的剂、生物分子、化学品、配体、光等暴露或处理细胞后被诱导并引起基因表达的启动子通常被称为“诱导型启动子”或“可调控的启动子”。进一步认识到由于在大部分情况下调控序列的精确边界未完全限定,具有不同长度的DNA片段可具有相同的启动子活性。

[0152] 启动子序列通常在其3'末端上通过转录起始位点结合并且向上游(5'方向)延伸以包括启动高于背景的可检测水平转录所需要的最小数目的碱基或元件。在启动子序列内将发现转录起始位点(通常例如通过用核酸酶S1映射来限定)以及负责RNA聚合酶的结合的蛋白质结合结构域(共有序列)。在一些方面,可与本公开一起使用的启动子包括组织特异性启动子。

[0153] 如本文所用,“防治性(prophylactic)”是指用于预防疾病或疾患的发作或用于预防或延迟与疾病或疾患相关的症状的治疗或作用过程。

[0154] 如本文所用,“防治(prophylaxis)”是指为维持健康和预防疾病或疾患的发作或预防或延迟与疾病或疾患相关的症状而采取的措施。

[0155] 如本文所用,术语“基因调控区”或“调控区”是指位于编码区上游(5'非编码序列)、编码区内或编码区下游(3'非编码序列)的核苷酸序列,并且其影响相关编码区的转录、RNA加工、稳定性或翻译。调控区可包括启动子、翻译前导序列、内含子、聚腺苷酸化识别

序列、RNA加工位点、效应子结合位点或茎环结构。如果编码区意图在真核细胞中表达,则聚腺苷酸化信号和转录终止序列通常将位于编码区的3'。

[0156] 在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂(例如,编码包含一个或多个miR-485结合位点的RNA的多核苷酸)可包含与一个或多个编码区可操作地关联的启动子和/或其它表达(例如,转录)控制元件。在可操作关联中,基因产物的编码区按以下这种方式与一个或多个调控区缔合,所述方式使得所述基因产物的表达处于所述一个或多个调控区的影响或控制之下。例如,如果启动子功能的诱导导致编码由所述编码区编码的基因产物的mRNA的转录,并且如果所述启动子与所述编码区之间的连键的性质不干扰表达启动子引导基因产物的表达的能力或不干扰DNA模板转录的能力,那么所述编码区和启动子“可操作地关联”。除了启动子以外,其它表达控制元件例如增强子、操纵子、阻遏子以及转录终止信号也能够与编码区可操作地关联以便引导基因产物表达。

[0157] 如本文所用,术语“相似性”是指聚合物分子之间,例如多核苷酸分子(例如miRNA分子)之间的总体相关性。可与同一性百分比计算相同的方式进行聚合物分子彼此的相似性百分比的计算,除了相似性百分比计算将如本领域中所理解的保守性取代考虑在内。应当理解,相似性百分比取决于所使用的比较量表,即是否例如根据核酸的进化相近性、电荷、体积、柔性、极性、疏水性、芳香性、等电点、抗原性或它们的组合来对核酸进行比较。

[0158] 术语“受试者”、“患者”、“个体”和“宿主”及其变体在本文中可互换使用,并且是指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者,包括但不限于人、家养动物(例如,狗、猫等)、农场动物(例如,牛、羊、猪、马等)和实验室动物(例如,猴、大鼠、小鼠、兔、豚鼠等),特别是人。本文描述的方法适用于人的疗法和兽医应用。

[0159] 如本文所用,短语“有需要的受试者”包括将受益于施用本公开的miRNA抑制剂(例如,miR-485抑制剂)例如以增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达水平的受试者,如哺乳动物受试者。

[0160] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指足以对有需要的受试者产生所需的治疗作用、药理学和/或生理学作用的包含本公开的miRNA抑制剂的试剂或药物化合物的量。在防治可视为疗法时,治疗有效量可以是“防治有效量”。

[0161] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指例如疾病或疾患的严重程度的降低;病程持续时间的缩短;与疾病或疾患相关的一种或多种症状的改善或消除;向患有疾病或疾患的受试者提供有益作用,但不一定治愈所述疾病或疾患。所述术语还包括疾病或疾患或其症状的防治或预防。

[0162] 术语“下游”是指位于参考核苷酸序列5'的核苷酸序列。

[0163] “载体”是指用于将核酸克隆和/或转移至宿主细胞中的任何运载体。载体可以是复制子,另一个核酸区段可连接至所述复制子以引起所连接的区段的复制。“复制子”是指充当体内复制的自主单元,即能够在其自身控制下复制的任何遗传元件(例如,质粒、噬菌体、粘粒、染色体、病毒)。术语“载体”包括用于在体外、离体或体内将核酸引入细胞中的病毒和非病毒媒介物。大量载体是本领域已知和使用的,包括例如质粒、经修饰的真核病毒或经修饰的细菌病毒。将多核苷酸插入合适的载体中可通过将适当的多核苷酸片段连接至具有互补粘性末端的选定载体中来完成。

[0164] 可对载体进行工程化以编码选择性标记物或报告基因,所述选择性标记物或报告

基因提供已掺入所述载体的细胞的选择或鉴定。选择性标记物或报告基因的表达允许鉴定和/或选择掺入并表达所述载体上含有的其它编码区的宿主细胞。本领域已知和使用的选择性标记物基因的实例包括：提供对氨苄青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、潮霉素、双丙氨膦除草剂、磺胺等的抗性的基因；以及用作表型标记物的基因，即花青素调控基因、异戊基转移酶基因等。本领域中已知和使用的报告基因的实例包括：荧光素酶 (Luc)、绿色荧光蛋白 (GFP)、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、 $\beta$ -半乳糖苷酶 (LacZ)、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶 (Gus) 等。选择性标记物也可被认为是报告基因。

[0165] II. 使用方法

[0166] 治疗亨廷顿病

[0167] 在一些方面，本公开提供了一种治疗有需要的受试者的亨廷顿病的方法，所述方法通过向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(miRNA抑制剂)来进行。在一些方面，所述受试者在施用前表现出以下一种或多种特征：易怒、抑郁、不自主运动、协调性差、难以学习新信息或做出决定、不受控制的运动、情绪问题和思维能力(认知)的丧失。在一些方面，受试者在施用后表现出亨廷顿病的一种或多种特征的改善。在一些方面，所述改善是与施用前的特征相比至少约1.5倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍或至少约10倍。

[0168] SIRT1调控

[0169] 在一些方面，所述亨廷顿病与SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平降低相关。在一些方面，所述miR-485抑制剂增加所述受试者中SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达。

[0170] 长寿蛋白1 (SIRT1)，也称为NAD依赖性去乙酰化酶长寿蛋白-1，是人类中由SIRT1基因编码的蛋白质。SIRT1基因位于人类中10号染色体上 (GenBank登录号NC\_000010.11的核苷酸67,884,656至67,918,390，正链取向)。SIRT1基因的同义词及其编码蛋白是已知的并且包括“调控蛋白SIR2同源物1”、“沉默接合型信息调控2同源物1”、“SIR2”、“SIR2样蛋白1”、“SIR2L1”、“SIR2 $\alpha$ ”、“长寿蛋白1型”、“hSIRT1”或“hSIR2”。

[0171] 存在由选择性剪接产生的至少两种已知的人SIRT1蛋白异型体。SIRT1异型体1 (UniProt标识符:Q96EB6-1) 由747个氨基酸组成，并且已被选择作为规范序列 (SEQ ID NO: 31)。SIRT1异型体2 (也称为“ $\delta$ -外显子8”) (UniProt标识符:Q96EB6-2) 由561个氨基酸组成，并且与规范序列的区别如下：454-639：缺失 (SEQ ID NO: 32)。下表1提供两种SIRT1异型体的序列。

[0172] 表1. SIRT1蛋白异型体

|        |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0173] | 异型体 1<br>(UniProt:<br>Q96EB6-1)<br>(SEQ ID<br>NO: 31) | MADEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEPLRKRPRRDGPGLE<br>RSPGEPGGAAPEREPVPAARGCPGAAAAALWREAEAEAAAAGGE<br>QEAQATAAAGEGDNGPGLQGPSREPPLADNLYDEDDDDDEGEEEE<br>AAAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCESEEDRASHASSSDWTTPRP<br>RIGPYTFVQQHLMIGTDPRTILKDLLPETIPPELDDMTLWQIVINIL<br>SEPPKRKKRKDINTIEDAVKLLQECKKIIVLTGAGVSVSCGIPDFRSR<br>DGIYARLAVDFPDLDPQAMFDIEYFRKDP RPFFKFAKEIYPGQFQP<br>SLCHKFIALSDKEGKLLRNYTQNIDTLEQVAGIQRIIQCHGSFATASC<br>LICKYKVDCEAVRGDIFNQVVRCPRCPADEPLAIMKPEIVFFGENL<br>PEQFHRAMKYDKDEVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIPHEVPQILINR<br>EPLPHLHFDVELLGDCDVIINELCHRLGGEYAKLCCNPVKLSEITEK<br>PPRTQKELAYLSELPTPLHVSEDSSSPERTSPDSSVIVTLLDQAAK<br>SNDDL DVSESKGCMEEKPQEVQTSRNVESIAEQMENPDLKNVGSS<br>TGEKNERTSVAGTVRKCWPNRVAKEQISRRLDGNQYLFLPPNRYIF<br>HGAEVYSDSEDDVLSSSSCGSNSDSGTCQSPSLEEPMEDESEIEEFY<br>NGLEDEPDVPERAGGAGFGTDGDDQEAINAISVKQEV TDMNYP<br>NKS |
|        | 异型体 2<br>(UniProt:<br>Q96EB6-2)<br>(SEQ ID<br>NO: 32) | MADEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEPLRKRPRRDGPGLE<br>RSPGEPGGAAPEREPVPAARGCPGAAAAALWREAEAEAAAAGGE<br>QEAQATAAAGEGDNGPGLQGPSREPPLADNLYDEDDDDDEGEEEE<br>AAAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCESEEDRASHASSSDWTTPRP<br>RIGPYTFVQQHLMIGTDPRTILKDLLPETIPPELDDMTLWQIVINIL<br>SEPPKRKKRKDINTIEDAVKLLQECKKIIVLTGAGVSVSCGIPDFRSR<br>DGIYARLAVDFPDLDPQAMFDIEYFRKDP RPFFKFAKEIYPGQFQP<br>SLCHKFIALSDKEGKLLRNYTQNIDTLEQVAGIQRIIQCHGSFATASC<br>LICKYKVDCEAVRGDIFNQVVRCPRCPADEPLAIMKPEIVFFGENL<br>PEQFHRAMKYDKDEVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSNQYLFLPPNRYI<br>FHGAEVYSDSEDDVLSSSSCGSNSDSGTCQSPSLEEPMEDESEIEEF<br>YNGLEDEPDVPERAGGAGFGTDGDDQEAINAISVKQEV TDMNYP<br>SNKS                                                                                                                                                                                                         |

[0174] 如本文所用,术语“SIRT1”包括由细胞天然表达的SIRT1的任何变体或异型体。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加SIRT1异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加SIRT1异型体2的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加SIRT1异型体1和异型体2的表达。除非另有说明,否则异型体1和异型体2在本文中统称为“SIRT1”。

[0175] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者中SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达)相比增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%。

[0176] 不受任一种理论的束缚,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂通过降低miR-485(例如miR-485-3p)的表达和/或活性来增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可降低miR-485-3p的表达和/或活性。

[0177] 在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂使miR-485-3p的表达和/或活性与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者中的miR-485-3p表达)相比降低至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。在某些方面,本文公开的miR-485抑制剂使miR-

485-5p的表达和/或活性与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者中的miR-485-5p表达)相比降低至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂使miR-485-3p和miR-485-5p两者的表达和/或活性与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者中的miR-485-3p和miR-485-5p表达)相比降低至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。在一些方面,在施用miR-485抑制剂后,miR-485-3p和/或miR-485-5p的表达被完全抑制。

[0178] 如本文所述,本公开的miR-485抑制剂在施用于受试者时可增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种治疗有需要的受试者中与SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的异常(例如,降低)水平相关的亨廷顿病的方法。

[0179] CD36调控

[0180] 在一些方面,所述亨廷顿病与CD36蛋白和/或CD36基因的水平降低相关。在一些方面,所述miR-485抑制剂增加有需要的受试者中CD36蛋白和/或CD36基因的表达。

[0181] 决定簇36 (CD36) 也称为血小板糖蛋白4,是人类中由CD36基因编码的蛋白质。CD36基因位于7号染色体上 (GenBank登录号NC\_000007.14的核苷酸80,602,656至80,679,277,正链取向)。CD36基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“血小板糖蛋白IV”、“脂肪酸转位酶”、“清道夫受体B类成员3”、“糖蛋白88”、“糖蛋白IIIb”、“糖蛋白IV”、“血小板反应蛋白受体”、“GPIIIB”、“PAS IV”、“GP3B”、“GPIV”、“FAT”、“GP4”、“BDPLT10”、“SCARB3”、“CHDS7”、“PASIV”或“PAS-4”。

[0182] 存在由选择性剪接产生的至少四种已知的人CD36蛋白异型体。CD36异型体1 (UniProt标识符:P16671-1) 由472个氨基酸组成,并且已被选择作为规范序列 (SEQ ID NO: 36)。CD36异型体2 (也称为“ex8-del”) (UniProt标识符:P16671-2) 由288个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:274-288:SIYAVFESDVNLKGI→ETCVHFTSSFSVCKS;以及289-472:缺失 (SEQ ID NO:37)。CD36异型体3 (也称为“ex6-7-del”) (UniProt标识符:P16671-3) 由433个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:234-272:缺失 (SEQ ID NO:38)。CD36异型体4 (也称为“ex4-del”) (UniProt标识符:P16671-4) 由412个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:144-203:缺失 (SEQ ID NO:39)。下表2提供四种CD36异型体的序列。

[0183] 表2.CD36蛋白异型体

|        |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0184] | 异型体 1<br>(UniProt:<br>P16671-1)<br>(SEQ ID<br>NO: 36) | MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVVLEE<br>GTIAFKNWVKTGTE<br>VYRQFWIFDVQNPQEVMNMSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVT<br>QDAEDNTVSFLQPNGA<br>IFEPSLSVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSLINKSKS<br>SMFQVRTLRELLW<br>GYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFYPPYNNNTADGVYKVFNGKDNISKVAI<br>IDTYKGKRNLSYWE |
|--------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0185]

|                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                       | SHCDMINGTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGI<br>PVYRFVLPSKAF<br>ASPVENPDNYCFCTEKIISKNCSTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLY<br>ASPDVSEPIDGL<br>NPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLLVKPSEKIQVLKLNKR<br>NYIVPILWLNETG<br>TIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSVGVMFVAFMISYCAC<br>RSKTIK                                                                                                                                                                                                                    |
| 异型体 2<br>(UniProt:<br>P16671-2)<br>(SEQ ID<br>NO: 37) | MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVV<br>LEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQV<br>KQRGPYTYRVRFLAKENVTDQDAEDNTVSFLQPNGAIFEPSLSV<br>GTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSLINKSKSSMFQV<br>RTLRELLWGYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFYYPYNNADGVYKVF<br>NGKDNISKVAIIDTYKGKRNLISYWESHCDMINGTDAASFPPFVE<br>KSQVLQFFSSDICRETCHFTSSFSVCKS                                                                                                                                                               |
| 异型体 3<br>(UniProt:<br>P16671-3)<br>(SEQ ID<br>NO: 38) | MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVV<br>LEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQV<br>KQRGPYTYRVRFLAKENVTDQDAEDNTVSFLQPNGAIFEPSLSV<br>GTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSLINKSKSSMFQV<br>RTLRELLWGYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFYYPYNNADGVYKVF<br>NGKDNISKVAIIDTYKGKRNIYAVFESDVNLKGIPVYRFVLPSKA<br>FASPVENPDNYCFCTEKIISKNCSTSYGVLDISKCKEGRPVYISLP<br>HFLYASPDVSEPIDGLNPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQV<br>NLLVKPSEKIQVLKLNKRNYIVPILWLNETGTIGDEKANMFRSQ<br>VTGKINLLGLIEMILLSVGVMFVAF MISYCACRSKTIK |
| 异型体 4<br>(UniProt:<br>P16671-4)<br>(SEQ ID<br>NO: 39) | MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVV<br>LEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQV<br>KQRGPYTYRVRFLAKENVTDQDAEDNTVSFLQPNGAIFEPSLSV<br>GTEADNFTVLNLAVAYNNADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKG<br>KRNLISYWESHCDMINGTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIYA<br>VFESDVNLKGIPVYRFVLPSKAFASPVENPDNYCFCTEKIISKNC<br>TSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASPDVSEPIDGLNPNEEEH<br>RTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLLVKPSEKIQVLKLNKRNYIV<br>PILWLNETGTIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSVGVM<br>MFVAFMISYCACRSKTIK                       |

[0186] 如本文所用,术语“CD36”包括由细胞天然表达的CD36的任何变体或异型体。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体2的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体3的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体4的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体1和异型体2、和/或异型体3和异型体4、和/或异型体1和异型体4、和/或异型体2和异型体3的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加所有CD36异型体的表达。除非另外指示,否则异型体1、异型体2、异型体3和异型体4在本文中统称为“CD36”。

[0187] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使CD36蛋白和/或CD36基因的表达与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者中CD36蛋白和/或CD36基因的表达)相比增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%。

[0188] 不受任一种理论的束缚, 在一些方面, 本文公开的miR-485抑制剂通过降低miR-485的表达和/或活性来增加CD36蛋白和/或CD36基因的表达。存在两种已知的miR-485成熟形式:miR-485-3p和miR-485-5p。如本文所公开, 在一些方面, 本公开的miR-485抑制剂可降低miR-485-3p的表达和/或活性。在一些方面, miR-485抑制剂可降低miR-485-5p的表达和/或活性。在其它方面, 本文公开的miR-485抑制剂可降低miR-485-3p和miR-485-5p两者的表达和/或活性。

[0189] PGC1调控

[0190] 在一些方面, 亨廷顿病与PGC-1 $\alpha$ 蛋白和/或PGC-1 $\alpha$ 基因的水平降低相关。在一些方面, 所述miR-485抑制剂增加有需要的受试者中PGC-1 $\alpha$ 蛋白和/或PGC-1 $\alpha$ 基因的表达。

[0191] 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅激活剂1- $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ), 也称为PPARG辅激活剂1 $\alpha$ 或配体效应调节剂-6, 是在人类中由PPARGC1A基因编码的蛋白质。PGC1- $\alpha$ 基因位于人类中4号染色体上 (GenBank登录号NC\_000004.12的核苷酸23,792,021至24,472,905, 正链取向)。PGC1- $\alpha$ 基因的同义词及其编码蛋白是已知的, 并且包括“PPARGC1A”、“LEM6”、“PGC1”、“PGC1A”、“PGC-1v”、“PPARGC1”、“PGC1 $\alpha$ ”或“PGC-1 ( $\alpha$ )。”

[0192] 存在由选择性剪接产生的至少九种已知的人PGC1- $\alpha$ 蛋白异型体。PGC1- $\alpha$ 异型体1 (UniProt标识符:Q9UBK2-1) 由798个氨基酸组成, 并且已被选择作为规范序列 (SEQ ID NO: 40)。PGC1- $\alpha$ 异型体2 (也称为“异型体NT-7a”) (UniProt标识符:Q9UBK2-2) 由271个氨基酸组成, 并且与规范序列的区别如下:269-271:DPK $\rightarrow$ LFL;272-798:缺失 (SEQ ID NO:41)。PGC1- $\alpha$ 异型体3 (也称为“异型体B5”) (UniProt标识符:Q9UBK2-3) 由803个氨基酸组成, 并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE $\rightarrow$ MDETSPRLEEDWKKVLQREAGWQ (SEQ ID NO: 42)。PGC1- $\alpha$ 异型体4 (也称为“异型体B4”) (UniProt标识符:Q9UBK2-4) 由786个氨基酸组成, 并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE $\rightarrow$ MDEGYF (SEQ ID NO:43)。PGC1- $\alpha$ 异型体5 (也称为“异型体B4-8a”) (UniProt标识符:Q9UBK2-5) 由289个氨基酸组成, 并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE $\rightarrow$ MDEGYF;294-301:LTPPTTPP $\rightarrow$ VKTNLISK;302-798:缺失 (SEQ ID NO:44)。PGC1- $\alpha$ 异型体6 (也称为“异型体B5-NT”) (UniProt标识符:Q9UBK2-6) 由276个氨基酸组成, 并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE $\rightarrow$ MDETSPRLEEDWKKVLQREAGWQ;269-271:DPK $\rightarrow$ LFL;272-798:缺失 (SEQ ID NO:45)。PGC1- $\alpha$ 异型体7 (也称为“异型体B4-3ext”) (UniProt标识符:Q9UBK2-7) 由138个氨基酸组成, 并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE $\rightarrow$ MDEGYF;144-150:LKKLLLA $\rightarrow$ VRTLPTV;151-798:缺失 (SEQ ID NO:46)。PGC1- $\alpha$ 异型体8 (也称为“异型体8a”) (UniProt标识符:Q9UBK2-8) 由301个氨基酸组成, 并且与规范序列的区别如下:294-301:LTPPTTPP $\rightarrow$ VKTNLISK;302-798:缺失 (SEQ ID NO:47)。PGC1- $\alpha$ 异型体9 (也称为“异型体9”或“L-PGG-1 $\alpha$ ”) (UniProt标识符:Q9UBK2-9) 由671个氨基酸组成, 并且与规范序列的区别如下:1-127:缺失 (SEQ ID NO:48)。下表3提供九种PGC1- $\alpha$ 异型体的序列。

[0193] 表3.PGC1- $\alpha$ 蛋白异型体

[0194]

|                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 异型体 1<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>1) (SEQ<br>ID NO:<br>40) | MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDV<br>NDLDTDSFLGGLKWCSQDSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLL<br>AVLTETLDSLPLVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGTTP<br>PQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRT<br>NPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTNTDDPPH<br>TKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPESP<br>NDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTTPPHKANQDNPFRA<br>SPKLKSSCKTVVPPPSKKPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQSELYAQ<br>LSKSSVLTGGHEERKTKRPSLRLFGDHDYQCSINSKTEILINISQE<br>LQDSRQLENKDVSSDWQGGQICSSTSDQCYLRETLEASKQVSPC<br>STRKQLQDQEIRAELENKHFGHPSQAVFDDEADKTGELRDSDFS<br>EQFSKLPFMFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQSYSLFN<br>VSPSCSSFNSPCRDVSPPKSLFSQRPQRMRSRSPSRHRSRSP<br>YSRSPSRSPGSRSSSRSCYYYESSHYRHRTHRNSPLYVRSRSP<br>SRRPRYDSYEEYQHERLKRREYRREYEKRESERAKQRE<br>AIEERRVIYVGKIRPDTRTELDRDFEVFGEIEECTVNLRDDGDS<br>YGFITYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKS<br>NYADLDSNSDDDFDPASTKSKYDSLDFDSLLKEAQRSLRR                      |
| 异型体 2<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>2) (SEQ<br>ID NO:<br>41) | MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDV<br>NDLDTDSFLGGLKWCSQDSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLL<br>AVLTETLDSLPLVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGTTP<br>PQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRT<br>NPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTNTDDPPH<br>TKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPESP<br>NLFL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 异型体 3<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>3) (SEQ<br>ID NO:<br>42) | MDETSPRLEEDWKKVLQREAGWQCAALVGEDQPLCPDLPELD<br>LSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSQDSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEE<br>NEANLLAVLTETLDSLPLVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSM<br>PDGTPPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANH<br>NHRIRTNPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTNT<br>DDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLP<br>LTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTTPPHKANQD<br>NPFRA SPKLKSSCKTVVPPPSKKPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQS<br>ELYAQLSKSSVLTGGHEERKTKRPSLRLFGDHDYQCSINSKTEIL<br>NISQELQDSRQLENKDVSSDWQGGQICSSTSDQCYLRETLEASK<br>QVSPCSTRKQLQDQEIRAELENKHFGHPSQAVFDDEADKTGELRD<br>SDFSNEQFSKLPFMFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQS<br>YSLFNVSPSCSSFNSPCRDVSPPKSLFSQRPQRMRSRSPSRHRSR<br>SCSRSPYSRSPSRSPGSRSSSRSCYYYESSHYRHRTHRNSPLYVRS<br>RSRSPYSRSPRYDSYEEYQHERLKRREYRREYEKRESERAKQRE<br>RQRQKAIEERRVIYVGKIRPDTRTELDRDFEVFGEIEECTVNLR<br>DDGDSYGFITYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQ<br>FFKS NYADLDSNSDDDFDPASTKSKYDSLDFDSLLKEAQRSLRR |
| 异型体 4<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>4) (SEQ<br>ID NO:<br>43) | MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLK<br>WCSQDSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPLV<br>DGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSLLKKL<br>LLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRTNPAIVKTENSWSN<br>KAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTNTDDPPHTKPTENRNSSRDK<br>CTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTI<br>ERTLSVELSGTAGLTPPTTPPHKANQDNPFRA SPKLKSSCKTVV<br>PPSKKPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQSELYAQLSKSSVLTGGHEE<br>RKTKRPSLRLFGDHDYQCSINSKTEILINISQELQDSRQLENKDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

[0195]

|                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                           | SDWQGQICSSTDSQCYLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRA<br>ELNKHFGHPSQAVFDDEADKTGELRDSDFSNEQFSKLPMFINSGL<br>AMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQSYSLFNVSPSCSSFNSPCRDS<br>VSPPKSLFSQRPQRMRSRFSRHRSCSRSPYSRSPGSRSSS<br>RSCYYYESSHYRHRTHRNSPLYVRSRSPYSRRPRYDSYEEYQH<br>ERLKREEYRREYEKRESERAKQERQRQKAIEERRVIYVGKIRP<br>DTTRTELDRDFEVFGEIEECTVNLRDDGDSYGFITYRYTCDAFAA<br>LENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDSNSDDFDPAST<br>KSKYDSLDFDSLLEAQRSLRR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 异型体 5<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>5) (SEQ<br>ID NO:<br>44) | MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLK<br>WCSDQSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSL PVD<br>EDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLLKKL<br>LLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRTNPAIVKTENSWSN<br>KAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLT TNDDPPHTKPTENRNSSRDK<br>CTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTI<br>ERTLSVELSGTAGVKTNLISK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 异型体 6<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>6) (SEQ<br>ID NO:<br>45) | MDETSRLEEDWKKVLQREAGWQCAALVGEDQPLCPDLPELD<br>LSELDVNDLDTDSFLGGLKWCS DQSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEE<br>NEANLLAVLTETLDSL PVDDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSM<br>PDGTPPPQEAEEPSLLKKLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANH<br>NHRIRTNPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLT TN<br>DDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLP<br>LTPEPNLFL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 异型体 7<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>7) (SEQ<br>ID NO:<br>46) | MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLK<br>WCSDQSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSL PVD<br>EDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLVRTL<br>PTV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 异型体 8<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>8) (SEQ<br>ID NO:<br>47) | MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDV<br>NDLDTDSFLGGLKWCS DQSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLL<br>AVLTETLDSL PVDDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PP<br>PQEAEEPSLLKKLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRT<br>NPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLT TNDDPPH<br>TKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPESP<br>NDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGVKTNLISK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 异型体 9<br>(UniProt:<br>Q9UBK2-<br>9) (SEQ<br>ID NO:<br>48) | MPDGT PPPQEAEEPSLLKKLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN<br>HNHRIRTNPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLT T<br>NDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSL<br>PLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTPPHKAQ<br>DNPFRASPKLKSSCKTVPPPSKKPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQ<br>SELYAQLSKSSVLTGGHEERKTKRPSLRLFGDHDYCQSINSKTEI<br>LINISQELQDSRQLENKDVSSDWQGQICSSTDSQCYLRETLEAS<br>KQVSPCSTRKQLQDQEIRAELNKHFGHPSQAVFDDEADKTGELR<br>DSDFSNEQFSKLPMFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQ<br>SYSLFNVSPSCSSFNSPCRDSVSPPKSLFSQRPQRMRSRFSRHR<br>RSCSRSPYSRSPGSRSSSRSCYYYESSHYRHRTHRNSPLYVR<br>SRSPYSRRPRYDSYEEYQHERLKREEYRREYEKRESERAKQR<br>ERQRQKAIEERRVIYVGKIRPD TTRTELDRDFEVFGEIEECTVNL<br>RDDGDSYGFITYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRK<br>QFFKSNYADLDSNSDDFDPASTKSKYDSLDFDSLLEAQRSLRR |

[0196] 如本文所用,术语“PGC1- $\alpha$ ”包括由细胞天然表达的PGC1- $\alpha$ 的任何变体或异型体。

因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体2的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体2的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体3的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体4的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体5的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体6的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体7的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体8的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体9的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1- $\alpha$ 异型体1、异型体2、异型体3、异型体4、异型体5、异型体6、异型体7、异型体8和异型体9的表达。除非另外指示,否则异型体1和异型体2两者在本文中统称为“PGC1- $\alpha$ ”。

[0197] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使PGC1- $\alpha$ 蛋白和/或PGC1- $\alpha$ 基因的表达与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者中PGC1- $\alpha$ 蛋白和/或PGC1- $\alpha$ 基因的表达)相比增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%。

[0198] 不受任一种理论的束缚,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂通过降低miR-485的表达和/或活性来增加PGC1- $\alpha$ 蛋白和/或PGC1- $\alpha$ 基因的表达。存在两种已知的miR-485成熟形式:miR-485-3p和miR-485-5p。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可降低miR-485-3p的表达和/或活性。在一些方面,miR-485抑制剂可降低miR-485-5p的表达和/或活性。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可降低miR-485-3p和miR-485-5p两者的表达和/或活性。

[0199] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂可改善与异常(例如,降低的)SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水平相关的亨廷顿病的一种或多种症状。在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂可改善与异常(例如,降低的)CD36蛋白和/或CD36基因水平相关的亨廷顿病的一种或多种症状。在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂可改善与异常(例如,降低的)PGC1- $\alpha$ 蛋白和/或PGC1- $\alpha$ 基因水平相关的亨廷顿病的一种或多种症状。此类症状的非限制性实例在下文描述。

[0200] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者中亨廷顿病的一种或多种症状的发生或发生风险与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0201] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的记忆丧失与参考(例如,施用前所述受试者中的记忆丧失)相比降低。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的记忆丧失或记忆丧失的发生风险与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至

少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0202] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的记忆保持与参考(例如,施用前所述受试者中的记忆保持)相比改善。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的记忆保持与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比改善和/或增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0203] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的空间工作记忆与参考(例如,施用前所述受试者中的空间工作记忆)相比改善。如本文所用,术语“空间工作记忆”是指在短时间段内将空间信息活动保持在工作记忆中的能力。在一些方面,与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比,空间工作记忆改善和/或增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0204] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中清除细胞(例如,神经胶质细胞)的吞噬活性与参考(例如,施用前所述受试者中的吞噬活性)相比增加(例如,通过增加CD36蛋白和/或CD36基因的表达)。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中神经元的树突棘密度与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0205] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的淀粉样蛋白 $\beta$  (A $\beta$ ) 斑块负荷与参考(例如,施用前所述受试者中的淀粉样蛋白 $\beta$  (A $\beta$ ) 斑块负荷)相比降低(例如,通过增加CD36蛋白和/或CD36基因的表达)。如本文所用,“淀粉样蛋白 $\beta$  斑块”是指淀粉样蛋白 $\beta$ 的所有形式的异常沉积,包括一些淀粉样蛋白 $\beta$ 肽的大聚集体和小缔合,并且可包括淀粉样蛋白 $\beta$ 肽的任何变异。已知淀粉样蛋白 $\beta$  (A $\beta$ ) 斑块引起神经元变化,例如突触组成、突触形状、突触密度异常、突触传导性丧失、树突直径变化、树突长度变化、棘密度变化、棘面积变化、棘长度变化或棘头部直径变化。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的淀粉样蛋白 $\beta$  斑块负荷与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0206] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的神经发生与参考(例如,施用前所述受试者中的神经发生)相比增加(例如,通过增加CD36蛋白和/或CD36基因的表达)。如本文所用,术语“神经发生”是指产生神经元的过程。神经发生涵盖神经干细胞和祖细胞的增殖,这些细胞分化成新的神经细胞类型,以及新细胞的迁移和存活。所述术语意图涵盖在正常发育过程中发生的神经发生,主要是在产前和围产期发育

过程中;以及在疾病、损伤或治疗干预后发生的神经细胞再生。成人神经发生也称为“神经(nerve或neural)”再生。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的神经发生与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0207] 在一些方面,增加和/或诱导神经发生与神经干细胞和/或祖细胞的增殖、分化、迁移和/或存活增加相关。因此,在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂可增加受试者中神经干细胞和/或祖细胞的增殖。在某些方面,与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比,神经干细胞和/或祖细胞的增殖增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。在一些方面,与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比,神经干细胞和/或祖细胞的存活增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0208] 在一些方面,增加和/或诱导神经发生与神经干细胞和/或祖细胞的数量增加相关。在某些方面,与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比,神经干细胞和/或祖细胞的数量增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0209] 在一些方面,增加和/或诱导神经发生与增加的轴突、树突和/或突触发育相关。在某些方面,与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比,轴突、树突和/或突触发育增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0210] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中神经元的树突棘密度与参考(例如,施用前所述受试者中神经元的树突棘密度)相比增加。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中神经元的树突棘密度与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0211] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中神经元的树突棘的损失与参考(例如,施用前所述受试者中神经元的树突棘的损失)相比降低。在某些方面,施用miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中神经元的树突棘的损失与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约

50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0212] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的神经炎症与参考(例如,施用前所述受试者中的神经炎症)相比减少(例如,通过增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达)。在某些方面,施用miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的神经炎症与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比减少至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。在一些方面,神经炎症减少包括神经胶质细胞产生减少量的炎症介质。因此,在某些方面,向患有亨廷顿病的受试者施用本文公开的miR-485抑制剂使由神经胶质细胞产生的炎症介质的量与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比减少至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。在一些方面,由神经胶质细胞产生的炎症介质包括TNF- $\alpha$ 。在一些方面,炎症介质包括IL-1 $\beta$ 。在一些方面,由神经胶质细胞产生的炎症介质包括TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 两者。

[0213] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的自噬增加(例如,通过增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达)。如本文所用,术语“自噬”是指细胞应激反应和负责降解长寿命蛋白质、蛋白质聚集体以及受损细胞器以维持细胞稳态的存活途径。不足为奇,自噬的异常一直与许多疾病,包括许多神经变性疾病如亨廷顿病相关。在一些方面,向患有亨廷顿病的受试者施用本文公开的miR-485抑制剂使自噬与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0214] 如本领域已知的,患有亨廷顿病的受试者表现出某些运动和/或非运动症状。例如,与亨廷顿病相关的运动症状的非限制性实例包括静止性震颤、自发运动减少(运动迟缓)、不自主运动(舞蹈病)、强直、姿势不稳、步态冻结、书写受损(写字过小症)、面部表情减少、运动开始延迟(运动不能)、运动保持困难、口齿不清、吞咽困难和不受控制的快速运动。与亨廷顿病相关的非运动症状的非限制性实例包括自主神经功能障碍、神经精神问题(情绪、认知、行为或思维改变)、感觉改变(尤其是嗅觉改变)和睡眠困难。

[0215] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的一种或多种运动症状与参考(例如,施用前所述受试者中的相应运动症状)相比改善。在某些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的一种或多种运动症状与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比改善至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0216] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的一种或多种非运动症状与参考(例如,施用前所述受试者中的相应非运动症状)相比改善。在某些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的一种或多种非运动症状与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比改善至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0217] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的突触功能与参考相比(例如,施用前所述受试者中的突触功能)改善。如本文所用,术语“突触功能”是指细胞(例如,神经元)的突触将电或化学信号传递至另一个细胞(例如,神经元)的能力。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的突触功能与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比改善至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0218] 在一些方面,与参考(例如,施用前所述受试者中的突触功能丧失)相比,施用本公开的miR-485抑制剂可预防、延迟和/或改善患有亨廷顿病的受试者中的突触功能丧失。在一些方面,施用miR-485抑制剂使患有亨廷顿病的受试者中的突触功能丧失与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的受试者)相比预防、延迟和/或改善至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0219] 在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可通过本领域已知的任何合适的途径施用。在某些方面,miR-485抑制剂通过胃肠外、肌肉、皮下、眼部、静脉内、腹膜内、皮内、眶内、脑内、颅内、脑室内、脊柱内、心室内、鞘内、脑池内、囊内、肿瘤内或它们的任何组合施用。

[0220] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可与一种或多种另外的治疗剂组合使用。在一些方面,同时施用另外的治疗剂和miR-485抑制剂。在某些方面,依序施用另外的治疗剂和miR-485抑制剂。

[0221] 在一些方面,另外的治疗剂减少运动或非运动症状。在一些方面,另外的治疗剂是控制运动的药物(例如丁苯那嗪)、抗精神病药物(例如氟哌啶醇、利培酮、奥氮平和喹硫平)、抗抑郁药(例如西酞普兰、氟西汀和舍曲林)、情绪稳定药物(例如双丙戊酸、卡马西平和拉莫三嗪)、金刚胺、左乙拉西坦、氯硝西洋或它们的组合。

[0222] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可用于治疗未能对其它治疗(例如丁苯那嗪、氟哌啶醇、西酞普兰、双丙戊酸、氯硝西洋等)有反应的受试者的亨廷顿病。

[0223] 在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂的施用不会导致任何副作用。在某些方面,本公开的miR-485抑制剂在施用于受试者时不会不利地影响体重。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂在施用于受试者时不会导致死亡率增加或引起病理性异常。

### [0224] III.miRNA-485抑制剂

[0225] 本文公开了能够抑制miR-485活性的化合物(miR-485抑制剂)。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含编码核苷酸分子的核苷酸序列,所述核苷酸分子包含至少一个miR-485结合位点,其中所述核苷酸分子不编码蛋白质。如本文所述,在一些方面,miR-485结合位点与靶miRNA核酸序列(即,miR-485)至少部分互补,使得miR-485抑制剂与miR-485核酸序列杂交。

[0226] 在一些方面,本文公开的miR抑制剂的miR-485结合位点与miR-485的核酸序列具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列互补性。在某些方面,miR-485结合位点与miR-485的核酸序列完全互补。

[0227] miR-485发夹前体可产生miR-485-5p和miR-485-3p。在本公开的上下文中,“miR-485”涵盖miR-485-5p和miR-485-3p两者,除非另外说明。人成熟miR-485-3p具有序列5'-GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU-3'(SEQ ID NO:1;miRBase登录号MIMAT0002176)。miR-485-3p的5'末端子序列5'-UCAUACA-3'(SEQ ID NO:49)是种子序列。人成熟miR-485-5p具有序列5'-AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC-3'(SEQ ID NO:33;miRBase登录号MIMAT0002175)。miR-485-5p的5'末端子序列5'-GAGGCUG-3'(SEQ ID NO:50)是种子序列。

[0228] 如本领域技术人员显而易见的,人成熟miR-485-3p与其它物种具有显著序列相似性。例如,小鼠成熟miR-485-3p与人成熟miR-485-3p的不同之处在于5'端和3'端各自的单个氨基酸(即,在5'端具有额外“A”并且在3'端缺失“C”)。小鼠成熟miR-485-3p具有以下序列:5'-AGUCAUACACGGCUCUCCUCUCU-3'(SEQ ID NO:34;miRBase登录号MIMAT0003129;下划线部分对应于与人成熟miR-485-3p的重叠)。小鼠成熟miR-485-5p的序列与人的序列同一:5'-agaggcuggccgugaugaauuc-3'(SEQ ID NO:33;miRBase登录号MIMAT0003128)。在某些方面,本文公开的miR-485抑制剂能够结合来自人和小鼠两者的miR-485-3p和/或miR-485-5p。

[0229] 在一些方面,miR-485结合位点是与miR-485-3p的序列(或其子序列)互补(例如,完全互补)的单链多核苷酸序列。在一些方面,miR-485-3p子序列包含种子序列。因此,在某些方面,miR-485结合位点与SEQ ID NO:49中所示的核酸序列具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列互补性。在某些方面,miR-485结合位点与miR-485-3p互补,除了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配。在其它方面,miR-485结合位点与SEQ ID NO:1中所示的核酸序列完全互补。

[0230] 在一些方面,miR-485结合位点是与miR-485-5p的序列(或其子序列)互补(例如,完全互补)的单链多核苷酸序列。在一些方面,miR-485-5p子序列包含种子序列。在某些方面,miR-485结合位点与SEQ ID NO:50中所示的核酸序列具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列互补性。在某些方面,miR-485结合位点与miR-485-5p互补,除了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配。在其它方面,miR-485结合位点与SEQ ID NO:35中所示的核酸序列完全互补。

[0231] miRNA的种子区域与靶mRNA形成紧密双链体。大多数miRNA与靶mRNA的3'非翻译区(UTR)不完全碱基配对,而miRNA的5'近端“种子”区域提供大部分配对特异性。不受任何理论束缚,据信前九个miRNA核苷酸(涵盖种子序列)提供更大的特异性,而此区域3'的miRNA核糖核苷酸允许较低的序列特异性并因此耐受较高程度的错配碱基配对,其中位置2-7是最重要的。因此,在本公开的特定方面,miR-485结合位点包含在miR-485的种子序列的整个长度上完全互补(即,100%互补)的子序列。

[0232] 可用于本公开上下文中的miRNA序列和miRNA结合序列包括但不限于本文提供的序列表中的那些序列的全部或部分,以及miRNA前体序列或这些miRNA中的一者或多者的互补序列。根据名称涉及特定miRNA或miRNA结合位点的本公开的任何方面也预期涵盖miRNA或其互补序列,其序列与指定miRNA序列的成熟序列或互补序列至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一。

[0233] 在一些方面,本公开的miRNA结合序列可在本文提供的序列表中的那些序列的5'端、3'端或5'端和3'端两者处包含额外的核苷酸,只要经修饰的序列仍然能够与miR-485特异性结合。在一些方面,本公开的miRNA结合序列相对于所提供的序列表中的那些序列可在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核苷酸上不同,只要经修饰的序列仍然能够与miR-485特异性结合。

[0234] 还特别考虑到本文关于miRNA结合分子或miRNA论述的任何方法和组合物可关于合成miRNA结合分子实施。还应理解,本公开中涉及RNA序列的公开内容同样适用于相应的DNA序列。

[0235] 在一些方面,本公开的miRNA-485抑制剂在所述核苷酸序列的5'包含至少1个核苷酸、至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。在一些方面,miRNA-485抑制剂在所述核苷酸序列的3'包含至少1个核苷酸、至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。

[0236] 在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂的长度是约6至约30个核苷酸。在某些方面,本文公开的miR-485抑制剂的长度是7个核苷酸。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂的长度是8个核苷酸。在一些方面,miR-485抑制剂的长度是9个核苷酸。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂的长度是10个核苷酸。在某些方面,miR-485抑制剂的长度是11个核苷酸。在其它方面,miR-485抑制剂的长度是12个核苷酸。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂的长度是13个核苷酸。在某些方面,本文公开的miR-485抑制剂的长度是14个核苷酸。

在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂的长度是15个核苷酸。在其它方面,miR-485抑制剂的长度是16个核苷酸。在某些方面,本公开的miR-485抑制剂的长度是17个核苷酸。在一些方面,miR-485抑制剂的长度是18个核苷酸。在某些方面,miR-485抑制剂的长度是19个核苷酸。在某些方面,miR-485抑制剂的长度是20个核苷酸。在其它方面,本公开的miR-485抑制剂的长度是21个核苷酸。在某些方面,miR-485抑制剂的长度是22个核苷酸。

[0237] 在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂包含与选自SEQ ID NO:2至30的序列至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一的核苷酸序列。在某些方面,miR-485抑制剂包含选自SEQ ID NO:2至30组成的组的核苷酸序列,其中所述核苷酸序列可任选地包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配。

[0238] 在一些方面,miRNA抑制剂包含5'-UGUAUGA-3' (SEQ ID NO:2)、5'-GUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:3)、5'-CGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:4)、5'-CCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:5)、5'-GCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:6)、5'-AGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:7)、5'-GAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:8)、5'-AGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:9)、5'-GAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:10)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:11)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:12)、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:13)、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:14) 或5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3' (SEQ ID NO:15)。

[0239] 在一些方面,miRNA抑制剂具有5'-UGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:16)、5'-GUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:17)、5'-CGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:18)、5'-CCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:19)、5'-GCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:20)、5'-AGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:21)、5'-GAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:22)、5'-AGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:23)、5'-GAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:24)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:25)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:26)、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:27)、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28) 或5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:29)。

[0240] 在一些方面,miRNA抑制剂包含5'-TGTATGA-3' (SEQ ID NO:62)、5'-GTGTATGA-3' (SEQ ID NO:63)、5'-CGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:64)、5'-CCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:65)、5'-GCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:66)、5'-AGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:67)、5'-GAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:68)、5'-AGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:69)、5'-GAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:70)、5'-GGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:71)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:72)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:73)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:74)、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGA-3' (SEQ ID NO:75)、5'-TGTATGAC-3' (SEQ ID NO:76)、5'-GTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:77)、5'-CGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:78)、5'-CCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:79)、5'-GCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:80)、5'-AGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:81)、5'-GAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:82)、5'-AGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:83)、5'-GAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:84)、5'-GGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:85)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:86)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:87)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:88) 或5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:89)。

[0241] 在一些方面,本文公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂)包含与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同一的核苷酸序列。在一些方面,miRNA抑制剂包含与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)具有至少90%相似性的核苷酸序列。在一些方面,所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88),具有一个取代或两个取代。在某些方面,miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:88)。

[0242] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含本文公开的序列,例如SEQ ID NO:2至35或62至89中的任一个,以及在N末端的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个额外核酸,在C末端的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个额外核酸,或两者。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含本文公开的序列,例如SEQ ID NO:2至35或62至89中的任一个,以及在N末端的一个额外核酸和/或在C末端的一个额外核酸。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含本文公开的序列,例如SEQ ID NO:2至35或62至89中的任一个,以及在N末端的一个或两个额外核酸和/或在C末端的一个或两个额外核酸。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含本文公开的序列,例如SEQ ID NO:2至35或62至89中的任一个,以及在N末端的一至三个额外核酸和/或在C末端的一至三个额外核酸。在一些方面,miR-485抑制剂包含5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:29)。

[0243] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含一个miR-485结合位点。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂包含至少两个miR-485结合位点。在某些方面,miR-485抑制剂包含三个miR-485结合位点。在一些方面,miR-485抑制剂包含四个miR-485结合位点。在一些方面,miR-485抑制剂包含五个miR-485结合位点。在某些方面,miR-485抑制剂包含六个或更多个miR-485结合位点。在一些方面,所有的miR-485结合位点都是相同的。在一些方面,所有的miR-485结合位点都是不同的。在一些方面,至少一个miR-485结合位点是不同的。在一些方面,所有的miR-485结合位点都是miR-485-3p结合位点。在其它方面,所有的miR-485结合位点都是miR-485-5p结合位点。在其它方面,miR-485抑制剂包含至少一个miR-485-3p结合位点和至少一个miR-485-5p结合位点。

[0244] III.a.经化学修饰的多核苷酸

[0245] 在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂包含多核苷酸,所述多核苷酸包含至少一个经化学修饰的核苷和/或核苷酸。当本公开的多核苷酸经化学修饰时,所述多核苷酸可被称为“经修饰的多核苷酸”。

[0246] “核苷”是指含有糖分子(例如戊糖或核糖)或其衍生物与有机碱基(例如嘌呤或嘧啶)或其衍生物(在本文中也称为“核碱基”)组合的化合物。“核苷酸”是指包含磷酸酯基团的核苷。经修饰的核苷酸可通过任何有用的方法,例如像化学、酶促或重组地合成,以包括一个或多个经修饰的或非天然的核苷。

[0247] 多核苷酸可包含连接的核苷的一个或多个区。此类区可具有可变主链连键。连键可以是标准磷酸二酯连键,在这种情况下多核苷酸将包含核苷酸的区。

[0248] 本文公开的经修饰的多核苷酸可包含各种不同的修饰。在一些方面,经修饰的多核苷酸含有一种、两种或更多种(任选不同的)核苷或核苷酸修饰。在一些方面,经修饰的多核苷酸可表现出一种或多种合乎需要的性质,例如,与未修饰的多核苷酸相比改进的热稳定性或化学稳定性、降低的免疫原性、降低的降解、与靶微RNA的结合增加、与其它微小RNA或其它分子的非特异性结合降低。

[0249] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)经化学修饰。如本文所用,关于多核苷酸,术语“化学修饰”或适当时“经化学修饰的”是指相对于腺苷(A)、鸟苷(G)、尿苷(U)、胸苷(T)或胞苷(C)核糖核苷或脱氧核糖核苷在它们的位置、模式、百分比或群体中的一个或多个方面(包括但不限于其核碱基、糖、主链或它们的任何组合)的修饰。

[0250] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)可具有全部或任何同一核苷类型的均一化学修饰,或通过在全部分或任何同一核苷类型中的相同起始修饰的向下滴定而产生的修饰群体,或全部或任何同一核苷类型的测量百分比的化学修饰但伴有随机并入。在其它方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)可在整个多核苷酸中具有两种、三种或四种同一核苷类型的均一化学修饰(如所有尿苷和所有胞嘧啶等以相同方式修饰)。

[0251] 修饰的核苷酸碱基配对不仅涵盖标准腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶或鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对,而且涵盖在核苷酸和/或包含非标准或修饰的碱基的修饰的核苷酸之间形成的碱基对,其中氢键供体和氢键受体的排列允许非标准碱基与标准碱基之间或两个互补的非标准碱基结构之间的氢键合。这种非标准碱基配对的一个实例是经修饰的核碱基肌苷与腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之间的碱基配对。碱/糖或接头的任何组合可并入本公开的多核苷酸中。

[0252] 本领域技术人员将理解,除非另有说明,否则本申请中列出的多核苷酸序列将在代表性DNA序列中列举“T”,但是当序列代表RNA时,“T”将被取代为“U”。例如,本公开的TD可作为RNA、作为DNA或作为包含RNA和DNA单元两者的杂合分子施用。

[0253] 在一些方面,多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)包含至少两个(例如,2、3、4、5、6、7、8、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、18、20个或更多个)经修饰的核碱基的组合。

[0254] 在一些方面,多核苷酸中的核碱基、糖、主链连键或它们的任何组合被修饰至少约5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%。

[0255] (i) 碱基修饰

[0256] 在某些方面,化学修饰在本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)中的核碱基处。在一些方面,至少一个经化学修饰的核苷是经修饰的尿苷(例如,假尿苷( $\psi$ )、2-硫尿苷( $s2U$ )、1-甲基-假尿苷( $m1\psi$ )、1-乙基-假尿苷( $e1\psi$ )或5-甲氧基-尿苷( $mo5U$ ))、经修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基-胞苷( $m5C$ ))、经修饰的腺苷(例如,1-甲基-腺苷( $m1A$ )、N6-甲基-腺苷( $m6A$ )或2-甲基-腺嘌呤( $m2A$ ))、经修饰的鸟苷(例如,7-甲基-鸟苷( $m7G$ )或1-甲基-鸟苷( $m1G$ ))或它们的组合。

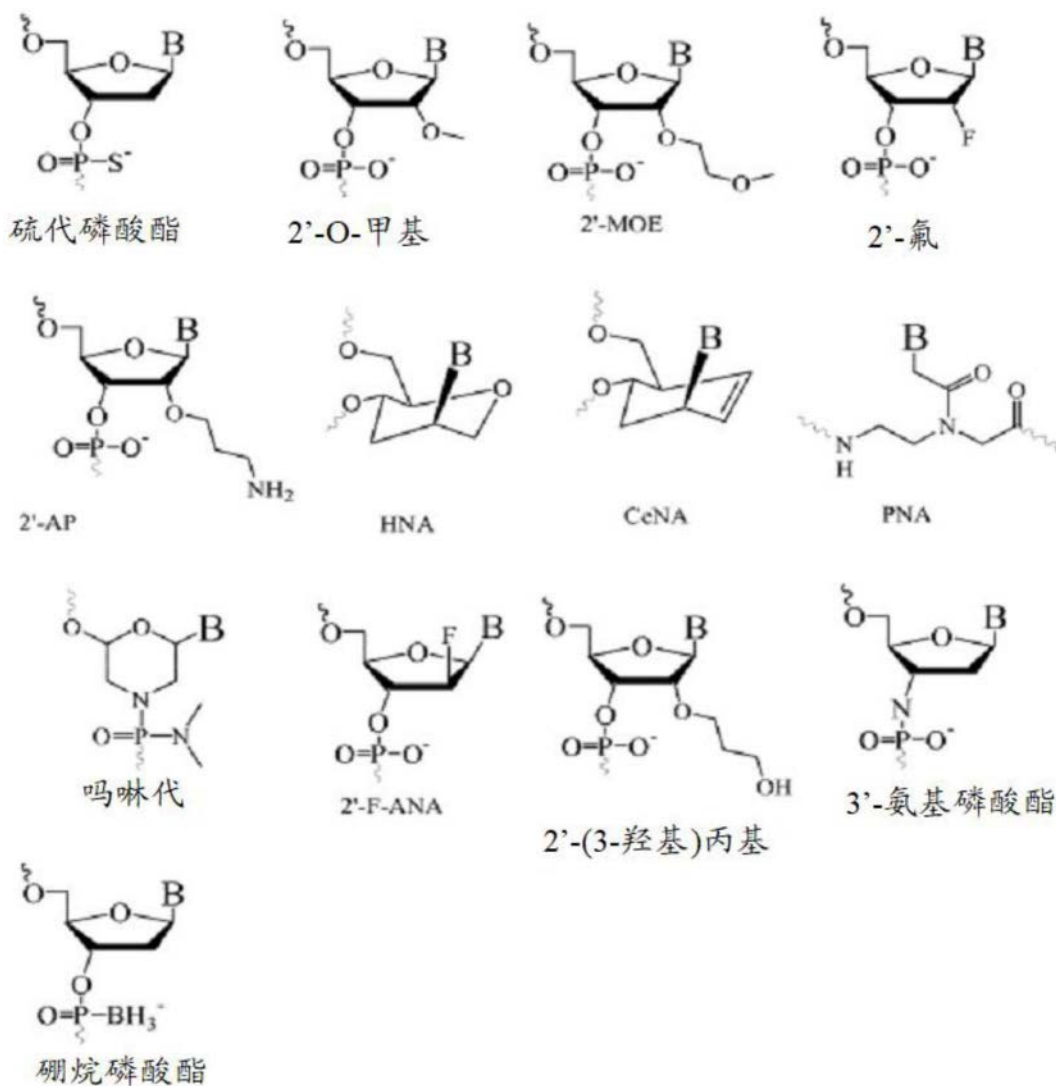
[0257] 在一些方面,对于特定修饰,对本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)进行均一修饰(例如,完全修饰,在整个序列中修饰)。例如,可用统一类型的碱基修饰,例如5-甲

基-胞苷 (m5C) 均一修饰多核苷酸,这意味着多核苷酸序列中的所有胞嘧啶残基都被5-甲基-胞苷 (m5C) 置换。类似地,可通过用经修饰的核苷(如以上列出的那些中的任一者)置换针对序列中存在的任何类型的核苷残基均一地修饰多核苷酸。

[0258] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)包含至少两个(例如,2、3、4个或更多个)经修饰的核碱基的组合。在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)中至少约5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%的核碱基类型是经修饰的核碱基。

[0259] (ii) 主链修饰

[0260] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)可包含核苷之间的任何有用的连键。可用于本公开的组合物中的此类连键(包括主链修饰)包括但不限于以下:3'-亚烷基膦酸酯、3'-氨基氨基磷酸酯、含烯烃的主链、氨基烷基氨基磷酸酯、氨基烷基磷酸三酯、硼烷磷酸酯、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、手性膦酸酯、手性硫代磷酸酯、甲酰基和硫代甲酰基主链、亚甲基(甲基亚氨基)、亚甲基甲酰基和硫代甲酰基主链、亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链、吗啉代连键、 $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、具有杂原子核苷间连键的寡核苷、次膦酸酯、氨基磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代磷酸酯核苷间连键、硫代磷酸酯、磷酸三酯、PNA、硅氧烷主链、氨基磺酸酯主链、硫化亚砷和砷主链、磺酸酯和磺酰胺主链、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯以及硫羰基氨基磷酸酯。



[0261]

[0262] 在一些方面,以上公开的主链连键的存在增加本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)的稳定性和对降解的抗性。

[0263] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)中至少约5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%的主链连键经修饰(例如,它们全部是硫代磷酸酯)。

[0264] 在一些方面,可包含在本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)中的主链修饰包括二氨基磷酸酯吗啉代低聚物(PMO)和/或硫代磷酸酯(PS)修饰。

[0265] (iii) 糖修饰

[0266] 可并入本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)中的经修饰的核苷和核苷酸可在核酸的糖上进行修饰。在一些方面,糖修饰增加miR-485抑制剂与miR-485核酸序列结合的亲和力。在miR-485抑制剂中并入增强亲和力的核苷酸类似物(如LNA或2'-取代的糖)可减小miR-485抑制剂的长度和/或大小。

[0267] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)中至少约5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约

50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%的核苷酸含有糖修饰(例如,LNA)。

[0268] 在一些方面,本公开的多核苷酸中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个核苷酸单元是糖修饰的(例如,LNA)。

[0269] 一般来说,RNA包括糖基核糖,所述糖基核糖是具有氧的5元环。示例性、非限制性的修饰核苷酸包括核糖中的氧的置换(例如,用S、Se或亚烷基如亚甲基或亚乙基置换);添加双键(例如,以使用环戊烯基或环己烯基置换核糖);核糖的环缩反应(例如,以便形成环丁烷或环氧丙烷的4元环);核糖的扩环反应(例如,以便形成具有额外碳或杂原子的也具有氨基磷酸酯主链的6元或7元环,如对于失水己糖醇、阿卓糖醇、甘露醇、环己烷基、环己烯基以及吗啉代来说);多环形式(例如,三环;以及“非锁定”形式,如乙二醇核酸(GNA)(例如,R-GNA或S-GNA,其中核糖被连接至磷酸二酯键的乙二醇单元置换)、苏糖核酸(TNA,其中核糖被 $\alpha$ -L-苏型呋喃糖基-(3'→2')置换),和肽核酸(PNA,其中2-氨基-乙基-甘氨酸连键置换核糖和磷酸二酯主链)。糖基团还可含有一个或多个相比于核糖中相应碳的构型,具有相反立体化学构型的碳。因此,多核苷酸分子可包括含有例如阿拉伯糖作为糖的核苷酸。

[0270] 核糖的2'羟基(OH)可被多个不同的取代基修饰或置换。2'-位置处的示例性取代包括但不限于H、卤基、任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基;任选取代的 $C_{1-6}$ 烷氧基;任选取代的 $C_{6-10}$ 芳氧基;任选取代的 $C_{3-8}$ 环烷基;任选取代的 $C_{3-8}$ 环烷氧基;任选取代的 $C_{6-10}$ 芳氧基;任选取代的 $C_{6-10}$ 芳基- $C_{1-6}$ 烷氧基,任选取代的 $C_{1-12}$ (杂环基)氧基;糖(例如,核糖、戊糖或本文所述的任何糖);聚乙二醇(PEG), $-O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ,其中R是H或任选取代的烷基,并且n是0至20(例如,0至4、0至8、0至10、0至16、1至4、1至8、1至10、1至16、1至20、2至4、2至8、2至10、2至16、2至20、4至8、4至10、4至16以及4至20)的整数;“锁”核酸(LNA),其中2'-羟基通过 $C_{1-6}$ 亚烷基或 $C_{1-6}$ 亚杂烷基桥连接至同一核糖的4'-碳,其中示例性桥包括亚甲基、亚丙基、醚、氨基桥、氨基烷基、氨基烷氧基、氨基和氨基酸。

[0271] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,mir-485抑制剂)中存在的核苷酸类似物包含例如2'-O-烷基-RNA单元、2'-OMe-RNA单元、2'-O-烷基-SNA、2'-氨基-DNA单元、2'-氟-DNA单元、LNA单元、阿拉伯核酸(ANA)单元、2'-氟-ANA单元、HNA单元、INA(嵌入核酸)单元、2'-MOE单元或它们的任何组合。在一些方面,LNA是例如氧基-LNA(如 $\beta$ -D-氧基-LNA或 $\alpha$ -L-氧基-LNA)、氨基-LNA(如 $\beta$ -D-氨基-LNA或 $\alpha$ -L-氨基-LNA)、硫代-LNA(如 $\beta$ -D-硫代O-LNA或 $\alpha$ -L-硫代-LNA)、ENA(如 $\beta$ -D-ENA或 $\alpha$ -L-ENA)或它们的任何组合。在其它方面,可包含在本公开的多核苷酸(即,mir-485抑制剂)中的核苷酸类似物包括锁定核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)、阿拉伯核酸(ABA)、桥联核酸(BNA)和/或肽核酸(PNA)。

[0272] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,mir-485抑制剂)可包含经修饰的RNA核苷酸类似物(例如,LNA)和DNA单元两者。在一些方面,mir-485抑制剂是缺口聚物(gapmer)。参见例如,美国专利号8,404,649;8,580,756;8,163,708;和9,034,837;所述专利全部以引用的方式整体并入本文。在一些方面,mir-485抑制剂是micromir。参见美国专利申请公布号US20180201928,其以引用的方式整体并入本文。

[0273] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,mir-485抑制剂)可包含修饰以防止被核酸内切酶和核酸外切酶快速降解。修饰包括但不限于例如(a)末端修饰,例如5'端修饰(磷酸化、

去磷酸化、缀合、反向连接等)、3'端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接等);(b) 碱基修饰,例如用修饰的碱基、稳定性碱基、去稳定性碱基或与扩增的配偶体库碱基配对的碱基、或缀合碱基置换;(c) 糖修饰(例如,在2'位置或4'位置)或糖的置换;以及(d) 核苷间连键修饰,包括磷酸二酯连键的修饰或置换。

#### [0274] IV. 载体和递送系统

[0275] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可使用本领域已知的任何相关的递送系统施用于例如患有与异常(例如降低的)SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水平相关的疾病或疾患的受试者。在某些方面,递送系统是载体。因此,在一些方面,本公开提供了包含本公开的miR-485抑制剂的载体。

[0276] 在一些方面,载体是病毒载体。在一些方面,病毒载体是腺病毒载体或腺相关病毒载体。在某些方面,病毒载体是具有血清型AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或它们的任何组合的AAV。在一些方面,腺病毒载体是第三代腺病毒载体。ADEASY™是迄今为止最流行的产生腺病毒载体构建体的方法。所述系统由两种类型的质粒组成:穿梭(或转移)载体和腺病毒载体。将目标转基因克隆到穿梭载体中,验证并用限制酶PmeI线性化。然后将此构建体转化到ADEASIER-1细胞中,所述细胞是含有PADEASY™的BJ5183大肠杆菌细胞。PADEASY™是含有病毒生产所必需的腺病毒基因的约33Kb的腺病毒质粒。穿梭载体和腺病毒质粒具有匹配的左和右同源臂,这有助于转基因同源重组到腺病毒质粒中。也可将具有超螺旋PADEASY™的标准BJ5183和穿梭载体共同转化,但这种方法导致非重组腺病毒质粒的背景较高。然后验证重组腺病毒质粒的大小和适当的限制性消化模式,以确定转基因已插入到腺病毒质粒中,并且没有发生其它重组模式。一旦验证,就将重组质粒用PacI线性化,以产生由ITR侧接的线性dsDNA构建体。将293或911细胞用线性化构建体转染,并且约7-10天后可收获病毒。除了这方法外,在提交本申请时本领域中已知的用于产生腺病毒载体构建体的其它方法可用于实践本文公开的方法。

[0277] 在一些方面,病毒载体是逆转录病毒载体,例如,慢病毒载体(例如,第三代或第四代慢病毒载体)。慢病毒载体通常在瞬时转染系统中产生,其中用三种单独的质粒表达系统转染细胞系。这些包括转移载体质粒(HIV原病毒的部分)、包装质粒或构建体以及具有不同病毒的异源包膜基因(env)的质粒。将载体的三种质粒组分放入包装细胞中,然后将所述包装细胞插入HIV外壳中。载体的病毒部分含有插入序列,因此病毒不能在细胞系统内复制。当前的第三代慢病毒载体仅编码九种HIV-1蛋白中的三种(Gag、Pol、Rev),它们从单独质粒中表达,以避免重组介导的有复制能力的病毒的产生。在第四代慢病毒载体中,逆转录病毒基因组被进一步减少(参见例如,TAKARA®LENTI-X™第四代包装系统)。

[0278] 本领域已知的任何AAV载体均可用于本文公开的方法中。AAV载体可包含已知载体或者可包含其变体、片段或融合物。在一些方面,AAV载体选自由以下组成的组:AAV1型(AAV1)、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、牛AAV、虾AAV、蛇AAV以及它们的任何组合。

[0279] 在一些方面,AAV载体源自选自由以下组成的组的AAV载体:AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AAV、蛇AAV以及

它们的任何组合。

[0280] 在一些方面, AAV载体是源自选自由以下组成的组的至少两种AAV载体的嵌合载体: AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AAV、蛇AAV以及它们的任何组合。

[0281] 在某些方面, AAV载体包含本领域已知的至少两种不同AAV载体的区域。

[0282] 在一些方面, AAV载体包含来自第一AAV (例如, AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AAV、蛇AAV或它们的任何衍生物) 的反向末端重复序列和来自第二AAV (例如, AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AAV、蛇AAV或它们的任何衍生物) 的第二反向末端重复序列。

[0283] 在一些方面, AAV载体包含选自由以下组成的组的AAV载体的一部分: AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AAV、蛇AAV以及它们的任何组合。在一些方面, AAV载体包含AAV2。

[0284] 在一些方面, AAV载体包含剪接受体位点。在一些方面, AAV载体包含启动子。本领域已知的任何启动子均可用于本公开的AAV载体中。在一些方面, 启动子是RNA Pol III启动子。在一些方面, RNA Pol III启动子选自由以下组成的组: U6启动子、H1启动子、7SK启动子、5S启动子、腺病毒2 (Ad2) VAI启动子以及它们的任何组合。在一些方面, 启动子是巨细胞病毒立即早期基因 (CMV) 启动子、EF1a启动子、SV40启动子、PGK1启动子、Ubc启动子、人β肌动蛋白启动子、CAG启动子、TRE启动子、UAS启动子、Ac5启动子、多角体启动子、CaMKIIa启动子、GAL1启动子、GAL10启动子、TEF启动子、GDS启动子、ADH1启动子、CaMV35S启动子或Ubi启动子。在一个具体方面, 启动子包括U6启动子。

[0285] 在一些方面, AAV载体包含组成型活性启动子 (组成型启动子)。在一些方面, 组成型启动子选自由以下组成的组: 次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、β-肌动蛋白启动子、巨细胞病毒 (CMV)、猿病毒 (例如, SV40)、乳头瘤病毒、腺病毒、人免疫缺陷病毒 (HIV)、劳斯肉瘤病毒、逆转录病毒长末端重复序列 (LTR)、鼠干细胞病毒 (MSCV) 和单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。

[0286] 在一些方面, 启动子是诱导型启动子。在一些方面, 诱导型启动子是组织特异性启动子。在某些方面, 组织特异性启动子驱动AAV载体的编码区在神经元、神经胶质细胞或在神经元和神经胶质细胞两者中的转录。

[0287] 在一些方面, AAV载体包含一个或多个增强子。在一些方面, 一个或多个增强子单独或与本文公开的启动子一起存在于AAV中。在一些方面, AAV载体包含3'UTR poly (A) 尾序列。在一些方面, 3'UTR poly (A) 尾序列选自由以下组成的组: bGH poly (A)、肌动蛋白poly (A)、血红蛋白poly (A) 以及它们的任何组合。在一些方面, 3'UTR poly (A) 尾序列包括bGH poly (A)。

[0288] 在一些方面, 本文公开的miR-485抑制剂与递送剂一起施用。可使用的递送剂的非

限制性实例包括类脂质、脂质体、脂质复合物、脂质纳米颗粒、聚合化合物、肽、蛋白质、细胞、纳米颗粒模拟物、纳米管、胶束或缀合物。

[0289] 因此,在一些方面,本公开还提供了包含本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂)和递送剂的组合物。在一些方面,所述递送剂包含阳离子载体单元,所述阳离子载体单元包含

[0290] [WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (式I)

[0291] 或

[0292] [WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (式II)

[0293] 其中

[0294] WP是水溶性生物聚合物部分;

[0295] CC是带正电荷的载体部分;

[0296] AM是佐剂部分;并且,

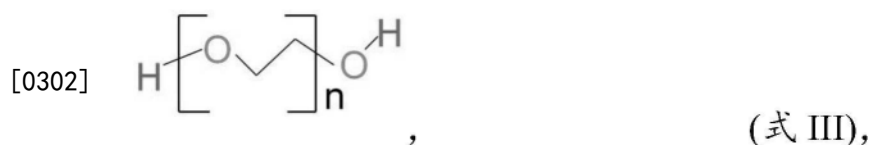
[0297] L1和L2独立地是任选的接头,并且

[0298] 其中当以约1:1的离子比率与核酸混合时,所述阳离子载体单元形成胶束。

[0299] 在一些方面,包含本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂)的组合物通过离子键与阳离子载体单元相互作用。

[0300] 在一些方面,本公开的阳离子载体单元包含至少一种水溶性生物聚合物。如本文所用的术语“水溶性生物聚合物”是指生物相容性、生物学惰性、非免疫原性、无毒且亲水性的聚合物,例如PEG。

[0301] 在一些方面,所述水溶性生物聚合物包括聚(烷二醇)、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯二醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚( $\alpha$ -羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚甘油、聚磷脂、聚噁唑啉(“POZ”)聚(N-丙烯酰吗啉)或它们的任何组合。在一些方面,所述水溶性生物聚合物包括聚乙二醇(“PEG”)、聚甘油或聚(丙二醇)(“PPG”)。在一些方面,所述水溶性聚合物包含:



[0303] 其中n是1-1000。

[0304] 在一些方面,n是至少约110、至少约111、至少约112、至少约113、至少约114、至少约115、至少约116、至少约117、至少约118、至少约119、至少约120、至少约121、至少约122、至少约123、至少约124、至少约125、至少约126、至少约127、至少约128、至少约129、至少约130、至少约131、至少约132、至少约133、至少约134、至少约135、至少约136、至少约137、至少约138、至少约139、至少约140或至少约141。在一些方面,n是约80至约90、约90至约100、约100至约110、约110至约120、约120至约130、约140至约150、约150至约160。

[0305] 在一些方面,所述水溶性聚合物是直链的、支链的或树枝状的。在一些方面,所述阳离子载体部分包含一个或多个碱性氨基酸。

[0306] 在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约三个、至少约四个、至少约五个、至少约六个、至少约七个、至少约八个、至少约九个、至少约十个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至

少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个、至少约40个、至少约41个、至少约42个、至少约43个、至少约44个、至少约45个、至少约46个、至少约47个、至少约48个、至少约49个、至少约50个、至少约51个、至少约52个、至少约53个、至少约54个、至少约55个、至少约56个、至少约57个、至少约58个、至少约59个、至少约60个、至少约61个、至少约62个、至少约63个、至少约64个、至少约65个、至少约66个、至少约67个、至少约68个、至少约69个、至少约70个、至少约71个、至少约72个、至少约73个、至少约74个、至少约75个、至少约76个、至少约77个、至少约78个、至少约79个、至少约80个碱性氨基酸,例如,赖氨酸、精氨酸或它们的组合。

[0307] 在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约40个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约45个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约50个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约55个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约60个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约65个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约70个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约75个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少约80个碱性氨基酸,例如,赖氨酸。

[0308] 在一些方面,碱性氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸或它们的组合)的数量可基于阴离子有效载荷的长度进行调整。如本文所用,术语“有效载荷”是指可通过自身或通过衔接子与本公开的阳离子载体单元相互作用并且被包括在本公开的胶束的核心内的生物活性分子,例如,治疗剂(例如,miR485-3p抑制剂)。例如,具有较长序列的阴离子有效载荷可与更多数量的碱性氨基酸(例如,赖氨酸)配对。在一些方面,可计算阳离子载体单元中的碱性氨基酸(例如,赖氨酸)的数量,使得聚合物中的质子化胺与阴离子有效载荷例如寡核苷酸(例如,antimir)中的磷酸盐的摩尔比(N/P比)是约1.0、约1.1、约1.2、约1.3、约1.4、约1.5、约1.6、约1.7、约1.8、约1.9、约2.0、约2.1、约2.2、约2.3、约2.4、约2.5、约2.6、约2.7、约2.8、约2.9或约3。在一些方面,计算阳离子载体单元中的碱性氨基酸(例如,赖氨酸)的数量,使得聚合物中的质子化胺与阴离子有效载荷例如寡核苷酸(例如,antimir)中的磷酸盐的摩尔比(N/P比)是约1.3至约1.7,例如约1.5。在一些方面,计算阳离子载体单元中的碱性氨基酸(例如,赖氨酸)的数量,使得聚合物中的质子化胺与阴离子有效载荷例如寡核苷酸(例如,antimir)中的磷酸盐的摩尔比(N/P比)是约1.4。在一些方面,计算阳离子载体单元中的碱性氨基酸(例如,赖氨酸)的数量,使得聚合物中的质子化胺与阴离子有效载荷例如寡核苷酸(例如,antimir)中的磷酸盐的摩尔比(N/P比)是约1.6。在一些方面,计算阳离子载体单元中的碱性氨基酸(例如,赖氨酸)的数量,使得聚合物中的质子化胺与阴离子有效载荷例如寡核苷酸(例如,antimir)中的磷酸盐的摩尔比(N/P比)是约1.3。在一些方面,计算阳离子载体单元中的碱性氨基酸(例如,赖氨酸)的数量,使得聚合物中的质子化胺与阴离子有效载荷例如寡核苷酸(例如,antimir)中的磷酸盐的摩尔比(N/P比)是约1.7。

[0309] 本领域技术人员将理解,由于阳离子载体部分的作用是通过静电相互作用中和和有效载荷上的负电荷(例如,miRNA抑制剂的磷酸主链中的负变化),在一些方面(例如,当有效

载荷是核酸如antimir时),阳离子载体的长度、阳离子载体上带正电的基团的数量以及阳离子载体上存在的电荷的分布和取向将取决于有效载荷分子的长度和上的电荷分布。

[0310] 在一些方面,阳离子载体包含约5个与约10个之间、约10个与约15个之间、约15个与约20个之间、约20个与约25个之间、约25个与约30个之间、约30个与约35个之间、约35个与约40个之间、约40个与约45个之间、约45个与约50个之间、约50个与约55个之间、约55个与约60个之间、约60个与约65个之间、约与约70个之间、约70个与约75个之间或约75个与约80个之间的碱性氨基酸。在一些具体方面,带正电的载体包含约30与约50个之间的碱性氨基酸。在一些具体方面,带正电的载体包含约70与约80个之间的碱性氨基酸。

[0311] 在一些方面,所述碱性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸或它们的任何组合。在一些方面,碱性氨基酸是D-氨基酸。在一些方面,碱性氨基酸是L-氨基酸。在一些方面,带正电的载体包含D-氨基酸和L-氨基酸。在一些方面,碱性氨基酸包含至少一种非天然氨基酸或其衍生物。在一些方面,碱性氨基酸是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、L-4-氨基甲基-苯丙氨酸、L-4-胍-苯丙氨酸、L-4-氨基甲基-N-异丙基-苯丙氨酸、L-3-吡啶基-丙氨酸、L-反式-4-氨基甲基环己基-丙氨酸、L-4-哌啶基-丙氨酸、L-4-氨基环己基-丙氨酸、4-胍基丁酸、L-2-氨基-3-胍基丙酸、DL-5-羟基赖氨酸、吡咯赖氨酸、5-羟基-L-赖氨酸、甲基赖氨酸、羧腐胺赖氨酸或它们的任何组合。在特定方面,带正电的载体包含约40个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约50个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约60个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约70个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约80个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约30个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约40个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约38个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约32个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约35个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约64个赖氨酸。在特定方面,带正电的载体包含约63个赖氨酸。

[0312] 在一些方面,阳离子载体部分结合至单个有效载荷分子。在其它方面,阳离子载体部分可结合至多个有效载荷分子,所述分子可相同或不同。

[0313] 在一些方面,阳离子载体部分的正电荷与核酸有效载荷的负电荷的离子比率是约5:1、约4:1、约3:1、约2.9:1、约2.8:1、约2.7:1、约2.6:1、约2.5:1、约2.4:1、约2.3:1、约2.2:1、约2:1、约2:1、约1.9:1、约1.8:1、约1.7:1、约1.6:1、约1.5:1、约1.4:1、约1.3:1、约1.2:1、约1.1:1、约1:1、约1:1.1、约1:1.2、约1:1.3、约1:1.4、约1:1.5、约1:1.6、约1:1.7、约1:1.8、约1:1.9、约1:2、约1:2.1、约1:2.2、约1:2.3、约1:2.4、约1:2.5、约1:2.6、约1:2.7、约1:2.8、约1:2.9、约1:3、约1:4或约1:5。在一些方面,阳离子载体部分的正电荷与核酸有效载荷的负电荷的电荷比率是约1:1。在一些方面,阳离子载体部分的正电荷与核酸有效载荷的负电荷的电荷比率是约3:2。在一些方面,阳离子载体部分的正电荷与核酸有效载荷的负电荷的电荷比率是约2:3。

[0314] 在一些方面,本公开的阳离子载体单元还可包含至少一个交联部分(CM)。术语“交联部分”是指包含多种能够形成交联的剂的聚合物嵌段的部分(moiety)或部分(portion)。在一些方面,能够形成交联的多种剂包括具有交联剂侧链的氨基酸。在一些方面,CM包含连接至交联剂的生物聚合物,例如肽(例如,聚赖氨酸)。

[0315] 在一些方面,交联部分包含一个或多个氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸或它们的任何组合)。在一些方面,交联部分包含至少约三个、至少约四个、至少约五个、至少约

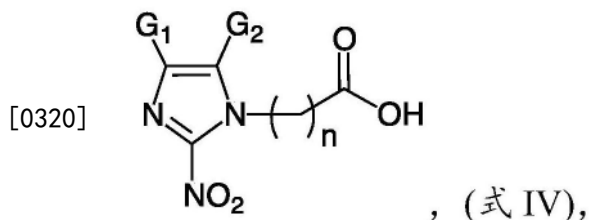
六个、至少约七个、至少约八个、至少约九个、至少约十个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个氨基酸或至少约35个氨基酸,例如,赖氨酸、精氨酸或它们的组合,其各自与交联剂连接。

[0316] 在一些方面,交联部分的赖氨酸具有中性电荷(例如,含有叔胺)。在一些方面,交联部分的赖氨酸含有硫醇基团(例如,赖氨酸-硫醇)和叔胺,使得赖氨酸具有中性电荷。在一些方面,交联部分通过叔胺形成交联。在一些方面,交联部分通过硫醇形成交联。如本文所用,在交联部分的上下文中的“赖氨酸”是指具有中性电荷(例如,含有叔胺)的赖氨酸,使得交联部分的赖氨酸不贡献于载体单元的总电荷。在一些方面,交联部分的赖氨酸通过酰胺键与交联剂连接。

[0317] 在一些方面,交联部分包含至少约10个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约11个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约12个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约13个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约14个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约15个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约16个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约17个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约18个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约19个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约20个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约23个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接。在一些方面,交联部分包含至少约35个氨基酸(例如赖氨酸),每个氨基酸与交联剂连接(例如,赖氨酸-硫醇)。

[0318] 在一些方面,交联剂是硫醇。在一些方面,交联剂是硫醇衍生物。

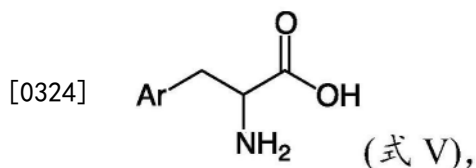
[0319] 在一些方面,所述佐剂部分能够调节免疫应答、炎症应答和/或组织微环境。在一些方面,所述佐剂部分包含咪唑衍生物、氨基酸、维生素或它们的任何组合。在一些方面,所述佐剂部分包含:

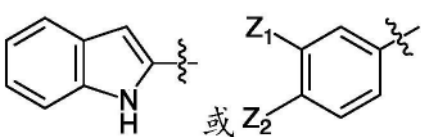


[0321] 其中 $G_1$ 和 $G_2$ 各自是H、芳族环或1-10烷基,或者 $G_1$ 和 $G_2$ 一起形成芳族环,并且其中n是1-10。

[0322] 在一些方面,所述佐剂部分包含硝基咪唑。在一些方面,所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼、奥硝唑、美格唑、阿扎硝唑、苄硝唑或它们的任何组合。在一些方面,所述佐剂部分包含氨基酸。

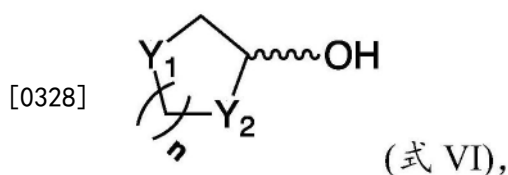
[0323] 在一些方面,所述佐剂部分包含



[0325] 其中Ar是  并且

[0326] 其中Z<sub>1</sub>和Z<sub>2</sub>各自是H或OH。

[0327] 在一些方面,所述佐剂部分包含维生素。在一些方面,所述维生素包含环状环或环状杂原子环和羧基或羟基。在一些方面,所述维生素包含:



[0329] 其中Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>各自是C、N、O或S,并且其中n是1或2。

[0330] 在一些方面,所述维生素选自由以下组成的组:维生素A、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B6、维生素B7、维生素B9、维生素B12、维生素C、维生素D2、维生素D3、维生素E、维生素M、维生素H以及它们的任何组合。在一些方面,所述维生素是维生素B3。

[0331] 在一些方面,所述佐剂部分包含至少约两个、至少约三个、至少约四个、至少约五个、至少约六个、至少约七个、至少约八个、至少约九个、至少约十个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个或至少约40个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约30个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约31个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约32个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约33个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约34个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约35个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约36个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约37个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约38个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约39个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约40个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。

[0332] 在一些方面,佐剂部分包含约20至约25个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;约25至约30个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;约30至约

35个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;约35至约40个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;约40至约45个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;或约45至约50个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。在一些方面,佐剂部分包含约20至约30个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;约30至约40个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;约40至约50个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;约25至约35个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接;或约35至约45个氨基酸(例如,赖氨酸),每个氨基酸与维生素B3连接。

[0333] 在一些方面,所述佐剂部分包含至少约2个、至少约3个、至少约4个、至少约5个、至少约6个、至少约7个、至少约8个、至少约9个、至少约10个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个或至少约20个维生素B3单元。在一些方面,所述佐剂部分包含约10个维生素B3单元。

[0334] 在一些方面,阳离子载体单元包含靶向部分,所述靶向部分任选地通过接头连接至水溶性聚合物。如本文所用,术语“靶向部分”是指结合至特定生物物质或位点的生物识别分子。在一些方面,靶向部分对特定靶分子(例如,靶向受体的配体,或靶向表面蛋白的抗体)、组织(例如,将优先携带胶束至特定器官或组织例如肝、大脑或内皮的分子)具有特异性,或促进通过生理屏障的转运(例如,可促进转运穿过脑血屏障或质膜的肽或其它分子)。

[0335] 为了靶向根据本公开的有效载荷(例如,核苷酸分子,例如,miR485-3p抑制剂),靶向部分可偶联至阳离子载体单元,并且因此偶联至胶束的外表面,而所述胶束具有包埋于其核心内的有效载荷。

[0336] 在一些方面,靶向部分是能够使本公开的胶束靶向组织的靶向部分。在一些方面,组织是肝、脑、肾、肺、卵巢、胰腺、甲状腺、乳腺、胃或它们的任何组合。在一些方面,组织是癌症组织,例如,肝癌、脑癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状腺癌、乳腺癌、胃癌或它们的任何组合。

[0337] 在一些方面,组织是中枢神经系统中的组织,例如神经组织。在一些方面,靶向中枢神经系统的靶向部分能够由大型中性氨基酸转运蛋白1(LAT1)转运。LAT1(SLC7A5)是摄取大型中性氨基酸和许多药物的转运蛋白。LAT1可转运诸如左旋多巴或加巴喷丁的药物。LAT1始终在脑微血管内皮细胞中以高水平表达。作为主要位于BBB中的溶质载体,使本公开的胶束靶向LAT1允许通过BBB进行递送。在一些方面,使本公开的胶束靶向LAT1转运蛋白的靶向部分是氨基酸,例如支链或芳香族氨基酸。在一些方面,氨基酸是缬氨酸、亮氨酸和/或异亮氨酸。在一些方面,氨基酸是色氨酸和/或酪氨酸。在一些方面,氨基酸是色氨酸。在其它方面,氨基酸是酪氨酸。

[0338] 在一些方面,靶向部分是选自以下的LAT1配体:色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、甲状腺素、美法仑、左旋多巴、加巴喷丁、3,5-I-二碘酪氨酸、3-碘-I-酪氨酸、芬克洛宁、阿西维辛、亮氨酸、BCH、甲硫氨酸、组氨酸、缬氨酸或它们的任何组合。在一些方面,靶向部分包含酪氨酸,其可结合至LAT1并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含赖氨酸,其可结合至LAT1并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含赖氨酸,其可结合至LAT1并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含苯丙氨酸,其可结合至GABA受体、LAT1、CNS逆转录酶抑制剂和/或多巴胺(DA)受体并穿过BBB。多巴胺受体是一类在脊椎动物中枢神经系统(CNS)中重要的G蛋白偶联受体。多巴胺受体不仅通过G蛋白偶联激活不同的效应子,而且通过不同的

蛋白质(多巴胺受体相互作用蛋白)相互作用发出信号。神经递质多巴胺是多巴胺受体的主要内源性配体。

[0339] 多巴胺受体牵涉于许多神经过程中,包括动机、愉悦、认知、记忆、学习和精细运动控制,以及神经内分泌信号的调节。异常多巴胺受体信号传导和多巴胺能神经功能牵涉于多种神经精神病症中。因此,多巴胺受体是常见的神经药物靶点;抗精神病药通常是多巴胺受体拮抗剂,而精神兴奋剂通常是多巴胺受体的间接激动剂。

[0340] 在一些方面,靶向部分包含缬氨酸,其可结合至CNS逆转录酶抑制剂并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含色氨酸,其可结合至GABA受体和/或CNS逆转录酶抑制剂并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含亮氨酸,其可结合至GABA受体和/或CNS逆转录酶抑制剂并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含甲硫氨酸,其可结合至GABA受体和/或CNS逆转录酶抑制剂并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含组氨酸,其可结合至GABA受体并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含异亮氨酸,其可结合至CNS逆转录酶抑制剂并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含谷胱甘肽,其可结合至GSH转运蛋白并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含谷胱甘肽-Met,其可结合至GSH转运蛋白并穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含脲/硫脲,其可结合至一氧化氮合酶(NOS)并结合至BBB。在一些方面,靶向部分包含NAD<sup>+</sup>/NADH,其能够通过REDOX机制穿过BBB。在一些方面,靶向部分包含嘌呤并且能够穿过BBB。用于CNS靶向的靶向部分的另外实例在Sutera等人(2016):Small endogenous molecules as moiety to improve targeting of CNS drugs,Expert Opinion on Drug Delivery,DOI:10.1080/17425247.2016.1208651中示出,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0341] 在一些方面,所述组合物包含具有约120至约130个PEG单元的水溶性生物聚合物部分、包含具有约30至约40个赖氨酸的聚赖氨酸的阳离子载体部分和具有约5至约10个维生素B3单元的佐剂部分。

[0342] 本公开还提供了包含本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂)的胶束,其中所述miRNA抑制剂和递送剂彼此缔合。

[0343] 在一些方面,所述缔合是共价键、非共价键或离子键。在一些方面,当在溶液中与本文公开的miR-485抑制剂混合时,阳离子载体单元的阳离子载体部分的正电荷足以形成胶束,其中所述溶液中阳离子载体单元的阳离子载体部分的正电荷与miR-485抑制剂(或包含所述抑制剂的载体)的负电荷的总离子比率是约1:1。

[0344] 在一些方面,阳离子载体单元能够保护本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂)免于酶促降解。参见W02020261227A1,其以引用的方式整体并入本文。

[0345] 在一些方面,阳离子载体单元与本公开的miRNA抑制剂(例如,miR485-3p抑制剂)缔合。在一些方面,与本公开的miRNA抑制剂(例如,miR485-3p抑制剂)缔合的阳离子载体单元包含80个赖氨酸残基,其中64个赖氨酸残基未经修饰(例如,含有带正电的胺,例如,-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>),并且其中16个赖氨酸残基经修饰以用于交联(例如,连接至硫醇、烷基硫醇或赖氨酸-硫醇)。在一些方面,与本公开的miRNA抑制剂(例如,miR485-3p抑制剂)缔合的阳离子载体单元包含80个赖氨酸残基,其中40个赖氨酸残基未经修饰(例如,含有带正电的胺),并且其中35个赖氨酸残基经修饰以用于交联(例如,连接至硫醇、烷基硫醇或赖氨酸-硫醇),并且其中5个赖氨酸残基经修饰以含有佐剂部分(例如,维生素)。在一些方面,与本公开的miRNA抑制剂(例如,miR485-3p抑制剂)缔合的阳离子载体单元包含80个赖氨酸残基,其中38个赖氨酸

酸残基未经修饰(例如,含有带正电的季胺),并且其中23个赖氨酸残基经修饰以用于交联(例如,连接至硫醇、烷基硫醇或赖氨酸-硫醇),并且其中19个赖氨酸残基经修饰以含有佐剂部分(例如,维生素)。在一些方面,与本公开的miRNA抑制剂(例如,miR485-3p抑制剂)缔合的阳离子载体单元包含80个赖氨酸残基,其中32个赖氨酸残基未经修饰(例如,含有带正电的胺,例如,-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>),并且其中16个赖氨酸残基经修饰以用于交联(例如,连接至硫醇、烷基硫醇或赖氨酸-硫醇),并且其中32个赖氨酸残基经修饰以含有佐剂部分(例如,维生素)。在一些方面,与本公开的miRNA抑制剂(例如,miR485-3p抑制剂)缔合的阳离子载体单元包含80个赖氨酸残基,其中63个赖氨酸残基未经修饰(例如,含有带正电的季胺),并且其中17个赖氨酸残基经修饰以含有佐剂部分(例如,维生素)。

#### [0346] VI. 药物组合物

[0347] 在一些方面,本公开还提供了适合施用于受试者的包含本文公开的miR-485抑制剂(例如,包含miR-485抑制剂的多核苷酸或载体)的药物组合物。所述药物组合物通常包含本文所述的miR-485抑制剂(例如,多核苷酸或载体)和呈适合施用于受试者的形式的药学上可接受的赋形剂或载体。药学上可接受的赋形剂或载体部分地由所施用的特定组合物以及由用于施用组合物的特定方法决定。

[0348] 因此,存在多种合适的药物组合物制剂,所述药物组合物制剂包含本公开的miR-485抑制剂。(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 第18版(1990))。药物组合物通常被配制为无菌并且完全遵循美国食品与药品管理局的所有良好生产规范(GMP)条例。

#### [0349] VII. 药盒

[0350] 本公开还提供了药盒或制造产品,所述药盒或制造产品包括本公开的miRNA抑制剂(例如,本文公开的多核苷酸、载体或药物组合物)和任选的使用说明书,例如,根据本文公开的方法的使用说明书。在一些方面,所述药盒或制造产品包括在一个或多个容器中的miR-485抑制剂(例如,本公开的载体(例如AAV载体)、多核苷酸或药物组合物)。在一些方面,所述药盒或制造产品包括miR-485抑制剂(例如,本公开的载体(例如AAV载体)、多核苷酸或药物组合物)和手册。本领域技术人员将容易地认识到,本公开的miR-485抑制剂(例如,本公开的载体、多核苷酸和药物组合物或它们的组合)可容易地并入本领域熟知的已确定的药盒形式之一中。

[0351] 通过说明而不是通过限制的方式提供以下实例。

#### [0352] 实施例

##### [0353] 实施例1:miR-485抑制剂的制备

[0354] (a) 炔烃修饰的酪氨酸的合成:产生炔烃修饰的酪氨酸作为用于合成阳离子载体单元的组织特异性靶向部分(TM,参见图1)以将本公开的胶束引导至BBB中的LAT1转运蛋白的中间体。

[0355] 将N-(叔丁氧基羰基)-L-酪氨酸甲酯(Boc-Tyr-OMe)(0.5g,1.69mmol)和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.5当量,2.54mmol)于乙腈(4.0ml)中的混合物逐滴添加至炔丙基溴(1.2当量,2.03mmol)。将反应混合物在60℃下加热过夜。反应后,使用水:乙酸乙酯(EA)萃取反应混合物。然后,使用盐水溶液洗涤有机层。将粗物质通过快速柱(于己烷10%中的EA)纯化。接下来,将所得产物溶解于1,4-二噁烷(1.0ml)和6.0M HCl(1.0ml)中。将反应混合物在100℃下加热过夜。接下

来,通过EA除去并提取二噁烷。将NaOH水溶液(0.5M)添加至混合物中直至pH值变为7。通过蒸发器浓缩反应物并在0℃下以12,000rpm离心。用去离子水洗涤沉淀并冻干。

[0356] (b) 聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)(PEG-PLL)的合成:此合成步骤产生了本公开的阳离子载体单元的水溶性生物聚合物(WP)和阳离子载体(CC)(参见图1)。

[0357] 通过Lys(TFA)-NCA与作为大分子引发剂的单甲氧基PEG(MeO-PEG)的开环聚合合成聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)。简言之,将MeO-PEG(600mg,0.12mmol)和Lys(TFA)-NCA(2574mg,9.6mmol)分别溶解于含有1M硫脲和DMF(或NMP)的DMF中。通过微型注射器将Lys(TFA)-NCA溶液滴入MeO-PEG溶液中,并将反应混合物在37℃下搅拌4天。用氩气和真空吹扫反应瓶。所有反应均在氩气氛中进行。反应后,将混合物沉淀到过量的乙醚中。将沉淀物重新溶解于甲醇中并再次沉淀到冷乙醚中。然后将其过滤,并在真空中干燥后获得白色粉末。对于PEG-PLL(TFA)中TFA基团的脱保护,遵循下一步骤。

[0358] 将MeO-PEG-PLL(TFA)(500mg)溶解于甲醇(60mL)中,并在搅拌下将1N NaOH(6mL)滴入聚合物溶液中。将混合物在搅拌下在37℃下保持1天。将反应混合物用10mM HEPES和蒸馏水透析4次。冻干后得到白色PEG-PLL粉末。

[0359] (b) 叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)(N<sub>3</sub>-PEG-PLL)的合成:此合成步骤产生了本公开的阳离子载体单元的水溶性生物聚合物(WP)和阳离子载体(CC)(参见图1)。

[0360] 叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)通过Lys(TFA)-NCA与叠氮基-PEG(N<sub>3</sub>-PEG)的开环聚合合成。简言之,将N<sub>3</sub>-PEG(300mg,0.06mmol)和Lys(TFA)-NCA(1287mg,4.8mmol)分别溶解于含有1M硫脲和DMF(或NMP)的DMF中。通过微型注射器将Lys(TFA)-NCA溶液滴入N<sub>3</sub>-PEG溶液中,并将反应混合物在37℃下搅拌4天。用氩气和真空吹扫反应瓶。所有反应均在氩气氛中进行。反应后,将混合物沉淀到过量的乙醚中。将沉淀物重新溶解于甲醇中并再次沉淀到冷乙醚中。然后将其过滤,并在真空中干燥后获得白色粉末。对于PEG-PLL(TFA)中TFA基团的脱保护,遵循下一步骤。

[0361] 将N<sub>3</sub>-PEG-PLL(500mg)溶解于甲醇(60mL)中,并在搅拌下将1N NaOH(6mL)滴入聚合物溶液中。将混合物在搅拌下在37℃下保持1天。将反应混合物用10mM HEPES和蒸馏水透析4次。冻干后得到白色N<sub>3</sub>-PEG-PLL粉末。

[0362] (c) (甲氧基或)叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸/烟酰胺/巯基丙酰胺)(N<sub>3</sub>-PEG-PLL(Nic/SH))的合成:在此步骤中,将组织特异性佐剂部分(AM,参见图1)连接至本公开的阳离子载体单元的WP-CC组分。阳离子载体单元中使用的组织特异性佐剂部分(AM)是烟酰胺(维生素B3)。此步骤将产生图1中描绘的阳离子载体单元的WP-CC-AM组分。

[0363] 叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸/烟酰胺/巯基丙酰胺)(N<sub>3</sub>-PEG-PLL(Nic/SH))在EDC/NHS存在下通过N<sub>3</sub>-PEG-PLL和烟酸的化学改性合成。将N<sub>3</sub>-PEG-PLL(372mg,25.8μmol)和烟酸(556.7mg,针对PEG-PLL的NH<sub>2</sub> 1.02当量)分别溶解于去离子水和甲醇(1:1)的混合物中。将EDC·HCl(556.7mg,针对N<sub>3</sub>-PEG-PLL的NH<sub>2</sub> 1.5当量)添加至烟酸溶液中,并将NHS(334.2mg,针对PEG-PLL的NH<sub>2</sub> 1.5当量)逐步添加至混合物中。

[0364] 将反应混合物添加至N<sub>3</sub>-PEG-PLL溶液中。将反应混合物在搅拌下保持在37℃持续16小时。16小时后,将3,3'-二硫代二丙酸(36.8mg,0.1当量)溶解于甲醇中,将EDC·HCl(40.3mg,0.15当量)和NHS(24.2mg,0.15当量)各自溶解于去离子水中。然后,将NHS和EDC·HCl依次添加至3,3'-二硫代二丙酸溶液中。添加粗N<sub>3</sub>-PEG-PLL(Nic)溶液后,将混合物溶液

在37℃下搅拌4小时。

[0365] 为了纯化,将混合物用甲醇透析2小时,添加DL-二硫苏糖醇(DTT,40.6mg,0.15当量),然后激活30分钟。

[0366] 为了除去DTT,将混合物依次用甲醇、去离子水中的50%甲醇、去离子水透析。

[0367] d) 苯丙氨酸-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸/烟酰胺/巯基丙酰胺)(Phe-PEG-PLL(Nic/SH))的合成:在此步骤中,将组织特异性靶向部分(TM)连接至在前一步骤中合成的WP-CC-AM组分。通过步骤(a)中产生的中间体与步骤(c)的产物的反应产生了TM组分(苯丙氨酸)。

[0368] 为了靶向血管中的脑内皮组织,作为LAT1靶向氨基酸,在铜催化剂存在下通过N<sub>3</sub>-PEG-PLL(Nic/SH)与炔烃修饰的酪氨酸之间的点击反应引入苯丙氨酸。简言之,将N<sub>3</sub>-PEG-PLL(Nic/SH)(130mg,6.5μmol)和炔烃修饰的苯丙氨酸(5.7mg,4.0当量)溶解于去离子水(或50mM磷酸钠缓冲液)中。然后,将CuSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O(0.4mg,25mol%)和三(3-羟丙基三唑基甲基)胺(THPTA,3.4mg,1.2当量)溶解于去离子水中并添加N<sub>3</sub>-PEG-PLL(Nic/SH)溶液。然后,将抗坏血酸钠(3.2mg,2.5当量)添加至混合物溶液中。将反应混合物在室温下在搅拌下保持16小时。反应后,将混合物转移至透析膜(MWCO=7,000)中并用去离子水透析1天。冻干后获得最终产物。

[0369] (e) 聚离子复合物(PIC)胶束制备-一旦如上所述产生了本公开的阳离子载体单元,就产生了胶束。本实施例中描述的胶束包含与反义寡核苷酸有效载荷组合的阳离子载体单元。

[0370] 通过混合MeO-或Phe-PEG-PLL(Nic)和miRNA来制备纳米尺寸的PIC胶束。将PEG-PLL(Nic)以0.5mg/mL浓度溶解于HEPES缓冲液(10mM)中。然后以2:1(v/v)的miRNA抑制剂(SEQ ID NO:2-30)(例如,5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)与聚合物比率将不含RNA酶的游离水中的miRNA溶液(22.5μM)与聚合物溶液混合。

[0371] 通过优化胶束形成条件,即聚合物(本公开的载体)中的胺与抗miRNA(有效载荷)中的磷酸酯之间的比率来确定聚合物与抗miRNA的混合比率。将聚合物(载体)和抗miRNA(有效载荷)的混合物通过多涡旋以3000rpm剧烈混合90秒,并在室温下保持30分钟以使胶束稳定。

[0372] 在使用前将胶束(10μM的抗miRNA浓度)储存在4℃。使用相同方法制备MeO-或Phe-胶束,并且在胶束制备过程中通过混合两种聚合物还制备了不同量的含Phe胶束(25%至75%)。

[0373] 实施例2:miR-485抑制剂对NSC-34细胞中的Htt降解的影响

[0374] 细胞培养

[0375] 小鼠运动神经元样杂交细胞系(NSC-34)细胞购自Cedarlane Labs。将NSC-34细胞维持在培养基(补充有10%(vol/vol)胎牛血清(Gibco)、100单位/ml青霉素、50μg/ml链霉素的DMEM)中并在37℃下保持在加湿5% CO<sub>2</sub>孵育箱中。

[0376] 蛋白质印迹(不溶性级分)

[0377] 为了从NSC-34细胞获得不溶性级分,将细胞团块在冰上在含有蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物的不溶性提取缓冲液[50mM Tris-HCl(pH 7.5)+2% SDS]中裂解30分钟。将裂解物在4℃下以13,000rpm离心15分钟。使用二辛可宁酸(BCA)测定试剂盒(Bio-Rad

Laboratories, 目录号5000116) 对蛋白质进行定量, 并调整至相同最终浓度。变性后, 对裂解物进行加工以用于蛋白质印迹来测量不溶性Htt。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品, 转移至PVDF膜并与小鼠抗Htt第一抗体 (Merck, 目录号MAB5374, 1:1000) 一起孵育。使用增强的化学发光系统使结果可视化。

#### [0378] 结果

[0379] 为了确定miR-485抑制剂对亨廷顿蛋白 (Htt) 降解的影响, 用GFP标记的野生型 (Q23) (pEGFP-Q23) 或突变型 (Q74) (pEGFP-Q74) Htt转染NSC-34细胞 (小鼠运动神经元样细胞)。在用GFP标记的野生型Q23 (pEGFP-Q23) Htt或突变型Q74 (pEGFP-Q74) Htt转染后, miR485-3p抑制剂在转染的NSC34中进行共处理。如前所述 (48小时后) 获得不溶性级分, 并分析Q74-GFP标记的NSC-34细胞和Q24-GFP标记的NSC-34细胞中不溶性聚集Htt的水平。在含有miR485-3p抑制剂 (5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28)) 处理的表达突变型Htt的NSC-34细胞的胶束中, 不溶性聚集Htt显著减少 (图2A和2B)。

[0380] 实施例3: miR-485抑制剂对HEK293T、PC12和原代皮层神经元中的Htt降解的影响

[0381] 为了确定miR485-3p ASO处理是否能够减弱Htt聚集, 将HEK293T和PC12细胞涂铺在6孔板中过夜, 并使用JETOPTIMUS® 转染试剂 (polyplus) 用2μg Q23-EGFP、Q74-EGFP转染并用miR485-3pASO (即, SEQ ID NO:28) 以50、100和300nM的最终浓度处理48小时。如图3A和3B所示, 蛋白质印迹分析揭示Htt-Q74过表达增加了Htt聚集。通过荧光显微术对细胞进行分析并收获裂解物用于蛋白质印迹分析。

[0382] 在荧光显微术下基于增强的绿色荧光基因 (EGFP) 表达评估转染后48小时的Htt聚集 (色斑)。

[0383] 在上述处理后, 收获细胞并在冰上用含有蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物 (Cell signaling Technology, 目录号5872) 的冰冷RIPA缓冲液 (iNtRON Biotechnology) 裂解30分钟。将裂解物在4℃下以13,000rpm离心15分钟并收集上清液。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品, 转移至PVDF膜并与以下第一抗体一起孵育: 小鼠抗HTT克隆EM48 (1:1000, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、小鼠抗SIRT1 (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA)、小鼠抗PGC-1α (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA)、小鼠抗p62 (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA)、兔抗裂解的半胱天冬酶-3 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、小鼠抗GFP (1:1000; Santa Cruz Biotechnology)、兔抗LC3B (1:1000; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) 和小鼠抗β-肌动蛋白 (Santa Cruz Biotechnology)。随后, 将膜与第二抗体在室温下孵育1小时, 且使用蛋白质印迹检测试剂 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 检测条带。对于定量分析, 使用计算机成像装置和随附软件 (Fuji Film, Tokyo, Japan) 测量每个条带的密度, 并将水平定量表示为针对每个样品的管家蛋白质条带归一化的密度。

[0384] 蛋白质印迹分析揭示HTT-Q74过表达增加了HTT聚集。然而, miR485-3p ASO处理减少了HTT聚集, 从而表明miR485-3p ASO处理能够抑制过表达HTT-Q74的HEK293T细胞中的Htt聚集 (图3A和3B)。

[0385] 由于自噬能够除去细胞内错误折叠的蛋白质, 如Htt聚集体, 所以通过蛋白质印迹分析对自噬相关蛋白质进行了分析。图4A至4E显示, miR485-3p ASO处理显著上调了自噬刺激物, 如SIRT1、PGC-1α、p62和LC3-II, 从而证明miR485-3p ASO通过自噬机制减少Htt聚集。

通过增加的SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、p62和LC3表达来刺激自噬,在用miR485-3p ASO处理的PC12细胞中也观察到Htt聚集减少。(图5和6)。此外,miR485-3p ASO处理减少了半胱天冬酶-3(一种细胞凋亡标志物)的裂解(图6),从而证明Htt诱导的神经元细胞凋亡被miR485-3p ASO阻断。

[0386] 为了进一步验证miR485-3p ASO处理对Htt聚集体减少的影响,用miR485-3p ASO处理表达GFP标记的野生型(Q23)或突变型(Q74)Htt的PC12和原代皮层神经元。在对照条件下,表达Q23-Htt的细胞显示弥漫性GFP分布,在PC12细胞(图7A-7E)或原代皮层神经元(图8A-8D)中没有可检测的聚集体。相比之下,表达Q74-Htt的两种细胞类型都显示出Htt聚集体,并且与对照PC12细胞(图7A-7E)和原代皮层神经元(图8A-8D)相比,miR-485-3p ASO处理减少了Htt聚集体。

[0387] 从胚胎第17天的鼠培养原代皮层神经元。简言之,将皮层解剖并在冰冷HBSS(Welgene, LB003-02)溶液中孵育,并在37°C下在accumax(sigma, 目录号A7089)中解离15分钟。将培养物在HBSS中冲洗两次。将小鼠神经元重新悬浮在含有2% B27(Gibco, 目录号17504)、1%丙酮酸钠和1% P/S的神经基底培养基(Gibco, 目录号21103049)中。将细胞通过70 $\mu$ m细胞过滤器(SPL, 93070)过滤,涂铺在培养板上,并在湿润5% CO<sub>2</sub>孵育箱中保持在37°C。每3天更换培养基,然后在体外10天后,将细胞用于实验。

[0388] 所有数据均表示为平均值 $\pm$ s.d.。事后比较(斯图登特-纽曼-柯尔斯(Student-Newman-Keuls)检验)使用Prism 8进行。

[0389] 实施例4:miR485-3p ASO通过调控自噬增强Htt聚集体的降解

[0390] 为了进一步验证miR485-3p ASO处理能够促进Htt聚集体的降解,将PC12细胞用Htt Q23或Htt Q74与miR485-3p(5'-AGAGGAGAGCCGUGAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)的组合转染。与Q23(图9A-9I)转染的细胞相比,在Q74转染的PC12细胞(PJ-9R)中可检测到Htt蛋白的聚集增加,并且在miR485-3p ASO转染后显著降低(图9A-9R)。还观察到更高丰度的自噬泡(例如,与Q74-对照相比,在Q74-miR485-3p ASO中具有Htt蛋白的LC3B与LC3B共定位),从而表明miR-485-3p ASO能够显著降低Q74-miR485-3p ASO转染的细胞中的Htt聚集水平。

[0391] 将PC12细胞( $8 \times 10^4$ 个)涂铺于12孔板中过夜。将从美国典型培养物保藏中心(Bethesda, MD, USA)获得的PC12细胞保持在含有10%胎牛血清、100单位/mL青霉素、100 $\mu$ g/mL链霉素的杜氏改良的伊格尔氏培养基(DMEM; Welgene)中;并在37°C下保持在5% CO<sub>2</sub>的润湿环境中。将细胞在24孔板中培养,并且在培养24小时后用2 $\mu$ g的含TransIT-X2<sup>TM</sup>(Mirus)的pEGFP Htt(Q23)/mHtt(Q74)质粒转染。在转染和培养基更换后,用miR485-3p ASO转染细胞。在转染48小时后,将在盖玻片上生长的细胞用4%多聚甲醛溶液固定,封闭,然后与第一抗体和相应的荧光缀合的第二抗体一起孵育。在荧光显微术下,基于增强的绿色荧光基因(EGFP)表达和LC3B色斑评估Htt蛋白的聚集和自噬。

[0392] \*\*\*

[0393] 应当理解,意图使用具体实施方式部分而非发明内容以及摘要部分来对权利要求进行解释。发明内容和摘要部分可阐明如发明人所构想的本公开的一个或多个但非所有的示例性方面,并且因此,并不意图通过任何方式对本公开和所附权利要求进行限制。

[0394] 本公开已经在上文中借助于说明特定功能的实施及其关系的功能性结构单元进行了描述。为便于描述,本文中已经任意地界定这些功能性结构单元的边界。也可限定替代

边界,只要指定功能及其相互关系被适当地执行。

[0395] 具体方面的前述描述将充分地揭示本公开的一般特性,以使得其它人通过应用本领域中的知识,在无过度实验且不背离本公开的一般概念的情况下,可容易地针对各种应用对此类具体方面进行修改和/或改变。因此,基于本文呈现的教义和指导,此类改变和修改意图在所公开方面的等效物的含义和范围内。应了解,本文的措辞或术语是出于描述而非限制的目的,以使得本说明书的术语或措辞应由熟练的技术人员根据教义和指导进行解释。

[0396] 本公开的广度和范围不应受任何上述示例性方面限制,而应仅根据以下权利要求及其等效物定义。

[0397] 可在整篇本申请中引用的所有引用参考文献(包括参考文献、专利、专利申请和网站)的内容据此出于任何目的以引用的方式明确整体并入本文,所述参考文献中引用的参考文献也是如此。

## 序列表

|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| <110> | 生物欧赛加有限责任公司                |    |
| <120> | 用于亨廷顿病的miRNA-485抑制剂        |    |
| <130> | 4366.031PC01               |    |
| <150> | US 63/047,090              |    |
| <151> | 2020-07-01                 |    |
| <160> | 89                         |    |
| <170> | PatentIn version 3.5       |    |
| <210> | 1                          |    |
| <211> | 22                         |    |
| <212> | RNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |
| <400> | 1                          |    |
|       | gucauacacg gcucuccucu cu   | 22 |
| <210> | 2                          |    |
| <211> | 7                          |    |
| <212> | RNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |
| <400> | 2                          |    |
|       | uguauga                    | 7  |
| <210> | 3                          |    |
| <211> | 8                          |    |
| <212> | RNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |
| <400> | 3                          |    |
|       | guguauga                   | 8  |
| <210> | 4                          |    |
| <211> | 9                          |    |
| <212> | RNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <400> 4                          |    |
| cguguauga                        | 9  |
| <210> 5                          |    |
| <211> 10                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 5                          |    |
| ccguguauga                       | 10 |
| <210> 6                          |    |
| <211> 11                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 6                          |    |
| gccguguaug a                     | 11 |
| <210> 7                          |    |
| <211> 12                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 7                          |    |
| agccguguau ga                    | 12 |
| <210> 8                          |    |
| <211> 13                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 8                          |    |
| gagccgugua uga                   | 13 |
| <210> 9                          |    |
| <211> 14                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 9                         |    |
| agagccgugu aua                  | 14 |
| <210> 10                        |    |
| <211> 15                        |    |
| <212> RNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 10                        |    |
| gagagccgug uaua                 | 15 |
| <210> 11                        |    |
| <211> 16                        |    |
| <212> RNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 11                        |    |
| ggagagccgu guaua                | 16 |
| <210> 12                        |    |
| <211> 17                        |    |
| <212> RNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 12                        |    |
| aggagagccg uguaua               | 17 |
| <210> 13                        |    |
| <211> 18                        |    |
| <212> RNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 13                        |    |
| gaggagagcc guguaa               | 18 |
| <210> 14                        |    |
| <211> 19                        |    |
| <212> RNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 14                         |    |
| agaggagagc cguguauga             | 19 |
| <210> 15                         |    |
| <211> 20                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 15                         |    |
| gagaggagag ccguguauga            | 20 |
| <210> 16                         |    |
| <211> 8                          |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 16                         |    |
| uguaugac                         | 8  |
| <210> 17                         |    |
| <211> 9                          |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 17                         |    |
| guguaugac                        | 9  |
| <210> 18                         |    |
| <211> 10                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 18                         |    |
| cguguaugac                       | 10 |
| <210> 19                         |    |
| <211> 11                         |    |
| <212> RNA                        |    |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 19                         |    |
| ccguguauga c                     | 11 |
| <210> 20                         |    |
| <211> 12                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 20                         |    |
| gccguguaug ac                    | 12 |
| <210> 21                         |    |
| <211> 13                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 21                         |    |
| agccguguau gac                   | 13 |
| <210> 22                         |    |
| <211> 14                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 22                         |    |
| gagccgugua ugac                  | 14 |
| <210> 23                         |    |
| <211> 15                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 23                         |    |
| agagccgugu augac                 | 15 |
| <210> 24                         |    |
| <211> 16                         |    |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 24                         |    |
| gagagccgug uaugac                | 16 |
| <210> 25                         |    |
| <211> 17                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 25                         |    |
| ggagagccgu guaugac               | 17 |
| <210> 26                         |    |
| <211> 18                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 26                         |    |
| aggagagccg uguaugac              | 18 |
| <210> 27                         |    |
| <211> 19                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 27                         |    |
| gaggagagcc guguaugac             | 19 |
| <210> 28                         |    |
| <211> 20                         |    |
| <212> RNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> 寡核苷酸                       |    |
| <400> 28                         |    |
| agaggagagc cguguaugac            | 20 |
| <210> 29                         |    |

|                          |                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <211>                    | 21                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212>                    | RNA                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213>                    | 人工序列 (Artificial Sequence) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>                    |                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223>                    | 寡核苷酸                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400>                    | 29                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| gagaggagag ccguguauga c  |                            | 21  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210>                    | 30                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211>                    | 22                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212>                    | RNA                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213>                    | 人工序列 (Artificial Sequence) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>                    |                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223>                    | 寡核苷酸                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400>                    | 30                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| agagaggaga gccguguaug ac |                            | 22  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210>                    | 31                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211>                    | 747                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212>                    | PRT                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213>                    | 人工序列 (Artificial Sequence) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>                    |                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223>                    | miRNA抑制剂                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400>                    | 31                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met                      | Ala                        | Asp | Glu | Ala | Ala | Leu | Ala | Leu | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Pro | Ser |
| 1                        |                            |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ala                      | Ala                        | Gly | Ala | Asp | Arg | Glu | Ala | Ala | Ser | Ser | Pro | Ala | Gly | Glu | Pro |
|                          |                            |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Leu                      | Arg                        | Lys | Arg | Pro | Arg | Arg | Asp | Gly | Pro | Gly | Leu | Glu | Arg | Ser | Pro |
|                          |                            | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Gly                      | Glu                        | Pro | Gly | Gly | Ala | Ala | Pro | Glu | Arg | Glu | Val | Pro | Ala | Ala | Ala |
|                          | 50                         |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Arg                      | Gly                        | Cys | Pro | Gly | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Leu | Trp | Arg | Glu | Ala | Glu |
| 65                       |                            |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Ala                      | Glu                        | Ala | Ala | Ala | Ala | Gly | Gly | Glu | Gln | Glu | Ala | Gln | Ala | Thr | Ala |
|                          |                            |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Ala                      | Ala                        | Gly | Glu | Gly | Asp | Asn | Gly | Pro | Gly | Leu | Gln | Gly | Pro | Ser | Arg |
|                          |                            | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| Glu                      | Pro                        | Pro | Leu | Ala | Asp | Asn | Leu | Tyr | Asp | Glu | Asp | Asp | Asp | Asp | Glu |
|                          |                            | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly                      | Glu                        | Glu | Glu | Glu | Glu | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Ile | Gly | Tyr | Arg | Asp |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Asn Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Glu Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Ile Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| Ala Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile |     |         |
| 450                                                             | 455 | 460     |
| Asn Arg Glu Pro Leu Pro His Leu His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly |     |         |
| 465                                                             | 470 | 475 480 |
| Asp Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu |     |         |
|                                                                 | 485 | 490 495 |
| Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu |     |         |
|                                                                 | 500 | 505 510 |
| Lys Pro Pro Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Leu Pro |     |         |
|                                                                 | 515 | 520 525 |
| Pro Thr Pro Leu His Val Ser Glu Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr |     |         |
|                                                                 | 530 | 535 540 |
| Ser Pro Pro Asp Ser Ser Val Ile Val Thr Leu Leu Asp Gln Ala Ala |     |         |
| 545                                                             | 550 | 555 560 |
| Lys Ser Asn Asp Asp Leu Asp Val Ser Glu Ser Lys Gly Cys Met Glu |     |         |
|                                                                 | 565 | 570 575 |
| Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr Ser Arg Asn Val Glu Ser Ile Ala |     |         |
|                                                                 | 580 | 585 590 |
| Glu Gln Met Glu Asn Pro Asp Leu Lys Asn Val Gly Ser Ser Thr Gly |     |         |
|                                                                 | 595 | 600 605 |
| Glu Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Gly Thr Val Arg Lys Cys Trp |     |         |
| 610                                                             | 615 | 620     |
| Pro Asn Arg Val Ala Lys Glu Gln Ile Ser Arg Arg Leu Asp Gly Asn |     |         |
| 625                                                             | 630 | 635 640 |
| Gln Tyr Leu Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu |     |         |
|                                                                 | 645 | 650 655 |
| Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly |     |         |
|                                                                 | 660 | 665 670 |
| Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro |     |         |
|                                                                 | 675 | 680 685 |
| Met Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp |     |         |
| 690                                                             | 695 | 700     |
| Glu Pro Asp Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Phe Gly Thr Asp |     |         |
| 705                                                             | 710 | 715 720 |
| Gly Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu |     |         |
|                                                                 | 725 | 730 735 |
| Val Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser                     |     |         |
|                                                                 | 740 | 745     |

&lt;210&gt; 32

<211> 561  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> miRNA抑制剂  
 <400> 32  
 Met Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Leu Gln Pro Gly Gly Ser Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Gly Ala Asp Arg Glu Ala Ala Ser Ser Pro Ala Gly Glu Pro  
 20 25 30  
 Leu Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Glu Arg Ser Pro  
 35 40 45  
 Gly Glu Pro Gly Gly Ala Ala Pro Glu Arg Glu Val Pro Ala Ala Ala  
 50 55 60  
 Arg Gly Cys Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Glu Gln Glu Ala Gln Ala Thr Ala  
 85 90 95  
 Ala Ala Gly Glu Gly Asp Asn Gly Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Arg  
 100 105 110  
 Glu Pro Pro Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 115 120 125  
 Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp  
 130 135 140  
 Asn Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp  
 165 170 175  
 Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu  
 180 185 190  
 Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu  
 195 200 205  
 Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val  
 210 215 220  
 Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile  
 225 230 235 240  
 Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile  
 245 250 255  
 Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp

|                                     |                                 |     |
|-------------------------------------|---------------------------------|-----|
| 260                                 | 265                             | 270 |
| Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr     | Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro |     |
| 275                                 | 280                             | 285 |
| Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe | Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys     |     |
| 290                                 | 295                             | 300 |
| Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala | Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln     |     |
| 305                                 | 310                             | 315 |
| Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys Phe | Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu     |     |
| 325                                 | 330                             | 335 |
| Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr Gln | Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln     |     |
| 340                                 | 345                             | 350 |
| Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Ile Gln | Cys His Gly Ser Phe Ala Thr     |     |
| 355                                 | 360                             | 365 |
| Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr Lys | Val Asp Cys Glu Ala Val Arg     |     |
| 370                                 | 375                             | 380 |
| Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val Pro | Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala     |     |
| 385                                 | 390                             | 395 |
| Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys Pro | Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu     |     |
| 405                                 | 410                             | 415 |
| Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg Ala | Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu     |     |
| 420                                 | 425                             | 430 |
| Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly Ser | Ser Leu Lys Val Arg Pro Val     |     |
| 435                                 | 440                             | 445 |
| Ala Leu Ile Pro Ser Asn Gln Tyr Leu | Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr     |     |
| 450                                 | 455                             | 460 |
| Ile Phe His Gly Ala Glu Val Tyr Ser | Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu     |     |
| 465                                 | 470                             | 475 |
| Ser Ser Ser Ser Cys Gly Ser Asn Ser | Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser     |     |
| 485                                 | 490                             | 495 |
| Pro Ser Leu Glu Glu Pro Met Glu Asp | Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe     |     |
| 500                                 | 505                             | 510 |
| Tyr Asn Gly Leu Glu Asp Glu Pro Asp | Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly     |     |
| 515                                 | 520                             | 525 |
| Ala Gly Phe Gly Thr Asp Gly Asp Asp | Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala     |     |
| 530                                 | 535                             | 540 |
| Ile Ser Val Lys Gln Glu Val Thr Asp | Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys     |     |
| 545                                 | 550                             | 555 |
| Ser                                 |                                 | 560 |
| <210>                               | 33                              |     |

69

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Ser Asn Ile Gln Val Lys Gln Arg Gly Pro Tyr Thr Tyr Arg Val Arg |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Asn Thr Val |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Ser Phe Leu Gln Pro Asn Gly Ala Ile Phe Glu Pro Ser Leu Ser Val |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe Val Gln Met Ile Leu Asn Ser |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Leu Ile Asn Lys Ser Lys Ser Ser Met Phe Gln Val Arg Thr Leu Arg |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Glu Leu Leu Trp Gly Tyr Arg Asp Pro Phe Leu Ser Leu Val Pro Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Pro Val Thr Thr Thr Val Gly Leu Phe Tyr Pro Tyr Asn Asn Thr Ala |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Asp Gly Val Tyr Lys Val Phe Asn Gly Lys Asp Asn Ile Ser Lys Val |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Ala Ile Ile Asp Thr Tyr Lys Gly Lys Arg Asn Leu Ser Tyr Trp Glu |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Ser His Cys Asp Met Ile Asn Gly Thr Asp Ala Ala Ser Phe Pro Pro |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Phe Val Glu Lys Ser Gln Val Leu Gln Phe Phe Ser Ser Asp Ile Cys |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Arg Ser Ile Tyr Ala Val Phe Glu Ser Asp Val Asn Leu Lys Gly Ile |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Pro Val Tyr Arg Phe Val Leu Pro Ser Lys Ala Phe Ala Ser Pro Val |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Glu Asn Pro Asp Asn Tyr Cys Phe Cys Thr Glu Lys Ile Ile Ser Lys |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Asn Cys Thr Ser Tyr Gly Val Leu Asp Ile Ser Lys Cys Lys Glu Gly |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Arg Pro Val Tyr Ile Ser Leu Pro His Phe Leu Tyr Ala Ser Pro Asp |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Val Ser Glu Pro Ile Asp Gly Leu Asn Pro Asn Glu Glu Glu His Arg |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Thr Tyr Leu Asp Ile Glu Pro Ile Thr Gly Phe Thr Leu Gln Phe Ala |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |

|                                                                 |                            |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------|-----|-----|
| Lys Arg Leu Gln Val Asn Leu Leu Val Lys Pro Ser Glu Lys Ile Gln |                            |     |     |
| 385                                                             | 390                        | 395 | 400 |
| Val Leu Lys Asn Leu Lys Arg Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Trp Leu |                            |     |     |
|                                                                 | 405                        | 410 | 415 |
| Asn Glu Thr Gly Thr Ile Gly Asp Glu Lys Ala Asn Met Phe Arg Ser |                            |     |     |
|                                                                 | 420                        | 425 | 430 |
| Gln Val Thr Gly Lys Ile Asn Leu Leu Gly Leu Ile Glu Met Ile Leu |                            |     |     |
|                                                                 | 435                        | 440 | 445 |
| Leu Ser Val Gly Val Val Met Phe Val Ala Phe Met Ile Ser Tyr Cys |                            |     |     |
|                                                                 | 450                        | 455 | 460 |
| Ala Cys Arg Ser Lys Thr Ile Lys                                 |                            |     |     |
| 465                                                             | 470                        |     |     |
| <210>                                                           | 37                         |     |     |
| <211>                                                           | 288                        |     |     |
| <212>                                                           | PRT                        |     |     |
| <213>                                                           | 人工序列 (Artificial Sequence) |     |     |
| <220>                                                           |                            |     |     |
| <223>                                                           | miRNA抑制剂                   |     |     |
| <400>                                                           | 37                         |     |     |
| Met Gly Cys Asp Arg Asn Cys Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Ile Gly |                            |     |     |
| 1                                                               | 5                          | 10  | 15  |
| Ala Val Leu Ala Val Phe Gly Gly Ile Leu Met Pro Val Gly Asp Leu |                            |     |     |
|                                                                 | 20                         | 25  | 30  |
| Leu Ile Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Glu Glu Gly Thr |                            |     |     |
|                                                                 | 35                         | 40  | 45  |
| Ile Ala Phe Lys Asn Trp Val Lys Thr Gly Thr Glu Val Tyr Arg Gln |                            |     |     |
|                                                                 | 50                         | 55  | 60  |
| Phe Trp Ile Phe Asp Val Gln Asn Pro Gln Glu Val Met Met Asn Ser |                            |     |     |
| 65                                                              | 70                         | 75  | 80  |
| Ser Asn Ile Gln Val Lys Gln Arg Gly Pro Tyr Thr Tyr Arg Val Arg |                            |     |     |
|                                                                 | 85                         | 90  | 95  |
| Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Asn Thr Val |                            |     |     |
|                                                                 | 100                        | 105 | 110 |
| Ser Phe Leu Gln Pro Asn Gly Ala Ile Phe Glu Pro Ser Leu Ser Val |                            |     |     |
|                                                                 | 115                        | 120 | 125 |
| Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala |                            |     |     |
|                                                                 | 130                        | 135 | 140 |
| Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe Val Gln Met Ile Leu Asn Ser |                            |     |     |
| 145                                                             | 150                        | 155 | 160 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Leu | Ile | Asn | Lys | Ser | Lys | Ser | Ser | Met | Phe | Gln | Val | Arg | Thr | Leu | Arg |     |  |
| 165 |     |     |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |  |
| Glu | Leu | Leu | Trp | Gly | Tyr | Arg | Asp | Pro | Phe | Leu | Ser | Leu | Val | Pro | Tyr |     |  |
| 180 |     |     |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |  |
| Pro | Val | Thr | Thr | Thr | Val | Gly | Leu | Phe | Tyr | Pro | Tyr | Asn | Asn | Thr | Ala |     |  |
| 195 |     |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |  |
| Asp | Gly | Val | Tyr | Lys | Val | Phe | Asn | Gly | Lys | Asp | Asn | Ile | Ser | Lys | Val |     |  |
| 210 |     |     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Ala | Ile | Ile | Asp | Thr | Tyr | Lys | Gly | Lys | Arg | Asn | Leu | Ser | Tyr | Trp | Glu |     |  |
| 225 |     |     |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |  |
| Ser | His | Cys | Asp | Met | Ile | Asn | Gly | Thr | Asp | Ala | Ala | Ser | Phe | Pro | Pro |     |  |
| 245 |     |     |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |  |
| Phe | Val | Glu | Lys | Ser | Gln | Val | Leu | Gln | Phe | Phe | Ser | Ser | Asp | Ile | Cys |     |  |
| 260 |     |     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |  |
| Arg | Glu | Thr | Cys | Val | His | Phe | Thr | Ser | Ser | Phe | Ser | Val | Cys | Lys | Ser |     |  |
| 275 |     |     |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |  |

<210> 38  
 <211> 433  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> miRNA抑制剂  
 <400> 38

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|--|
| Met | Gly | Cys | Asp | Arg | Asn | Cys | Gly | Leu | Ile | Ala | Gly | Ala | Val | Ile | Gly |    |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |    |  |
| Ala | Val | Leu | Ala | Val | Phe | Gly | Gly | Ile | Leu | Met | Pro | Val | Gly | Asp | Leu |    |  |
| 20  |     |     |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |    |  |
| Leu | Ile | Gln | Lys | Thr | Ile | Lys | Lys | Gln | Val | Val | Leu | Glu | Glu | Gly | Thr |    |  |
| 35  |     |     |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |    |  |
| Ile | Ala | Phe | Lys | Asn | Trp | Val | Lys | Thr | Gly | Thr | Glu | Val | Tyr | Arg | Gln |    |  |
| 50  |     |     |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |    |  |
| Phe | Trp | Ile | Phe | Asp | Val | Gln | Asn | Pro | Gln | Glu | Val | Met | Met | Asn | Ser |    |  |
| 65  |     |     |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80 |  |
| Ser | Asn | Ile | Gln | Val | Lys | Gln | Arg | Gly | Pro | Tyr | Thr | Tyr | Arg | Val | Arg |    |  |
| 85  |     |     |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |    |  |
| Phe | Leu | Ala | Lys | Glu | Asn | Val | Thr | Gln | Asp | Ala | Glu | Asp | Asn | Thr | Val |    |  |
| 100 |     |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |    |  |
| Ser | Phe | Leu | Gln | Pro | Asn | Gly | Ala | Ile | Phe | Glu | Pro | Ser | Leu | Ser | Val |    |  |
| 115 |     |     |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |    |  |

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala |     |         |
| 130                                                             | 135 | 140     |
| Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe Val Gln Met Ile Leu Asn Ser |     |         |
| 145                                                             | 150 | 155 160 |
| Leu Ile Asn Lys Ser Lys Ser Ser Met Phe Gln Val Arg Thr Leu Arg |     |         |
|                                                                 | 165 | 170 175 |
| Glu Leu Leu Trp Gly Tyr Arg Asp Pro Phe Leu Ser Leu Val Pro Tyr |     |         |
|                                                                 | 180 | 185 190 |
| Pro Val Thr Thr Thr Val Gly Leu Phe Tyr Pro Tyr Asn Asn Thr Ala |     |         |
|                                                                 | 195 | 200 205 |
| Asp Gly Val Tyr Lys Val Phe Asn Gly Lys Asp Asn Ile Ser Lys Val |     |         |
|                                                                 | 210 | 215 220 |
| Ala Ile Ile Asp Thr Tyr Lys Gly Lys Arg Ser Ile Tyr Ala Val Phe |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |
| Glu Ser Asp Val Asn Leu Lys Gly Ile Pro Val Tyr Arg Phe Val Leu |     |         |
|                                                                 | 245 | 250 255 |
| Pro Ser Lys Ala Phe Ala Ser Pro Val Glu Asn Pro Asp Asn Tyr Cys |     |         |
|                                                                 | 260 | 265 270 |
| Phe Cys Thr Glu Lys Ile Ile Ser Lys Asn Cys Thr Ser Tyr Gly Val |     |         |
|                                                                 | 275 | 280 285 |
| Leu Asp Ile Ser Lys Cys Lys Glu Gly Arg Pro Val Tyr Ile Ser Leu |     |         |
|                                                                 | 290 | 295 300 |
| Pro His Phe Leu Tyr Ala Ser Pro Asp Val Ser Glu Pro Ile Asp Gly |     |         |
| 305                                                             | 310 | 315 320 |
| Leu Asn Pro Asn Glu Glu Glu His Arg Thr Tyr Leu Asp Ile Glu Pro |     |         |
|                                                                 | 325 | 330 335 |
| Ile Thr Gly Phe Thr Leu Gln Phe Ala Lys Arg Leu Gln Val Asn Leu |     |         |
|                                                                 | 340 | 345 350 |
| Leu Val Lys Pro Ser Glu Lys Ile Gln Val Leu Lys Asn Leu Lys Arg |     |         |
|                                                                 | 355 | 360 365 |
| Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Trp Leu Asn Glu Thr Gly Thr Ile Gly |     |         |
|                                                                 | 370 | 375 380 |
| Asp Glu Lys Ala Asn Met Phe Arg Ser Gln Val Thr Gly Lys Ile Asn |     |         |
| 385                                                             | 390 | 395 400 |
| Leu Leu Gly Leu Ile Glu Met Ile Leu Leu Ser Val Gly Val Val Met |     |         |
|                                                                 | 405 | 410 415 |
| Phe Val Ala Phe Met Ile Ser Tyr Cys Ala Cys Arg Ser Lys Thr Ile |     |         |
|                                                                 | 420 | 425 430 |
| Lys                                                             |     |         |

<210> 39  
 <211> 412  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> miRNA抑制剂  
 <400> 39  
 Met Gly Cys Asp Arg Asn Cys Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Val Leu Ala Val Phe Gly Gly Ile Leu Met Pro Val Gly Asp Leu  
 20 25 30  
 Leu Ile Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Glu Glu Gly Thr  
 35 40 45  
 Ile Ala Phe Lys Asn Trp Val Lys Thr Gly Thr Glu Val Tyr Arg Gln  
 50 55 60  
 Phe Trp Ile Phe Asp Val Gln Asn Pro Gln Glu Val Met Met Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Asn Ile Gln Val Lys Gln Arg Gly Pro Tyr Thr Tyr Arg Val Arg  
 85 90 95  
 Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Asn Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Phe Leu Gln Pro Asn Gly Ala Ile Phe Glu Pro Ser Leu Ser Val  
 115 120 125  
 Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Tyr  
 130 135 140  
 Asn Asn Thr Ala Asp Gly Val Tyr Lys Val Phe Asn Gly Lys Asp Asn  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Lys Val Ala Ile Ile Asp Thr Tyr Lys Gly Lys Arg Asn Leu  
 165 170 175  
 Ser Tyr Trp Glu Ser His Cys Asp Met Ile Asn Gly Thr Asp Ala Ala  
 180 185 190  
 Ser Phe Pro Pro Phe Val Glu Lys Ser Gln Val Leu Gln Phe Phe Ser  
 195 200 205  
 Ser Asp Ile Cys Arg Ser Ile Tyr Ala Val Phe Glu Ser Asp Val Asn  
 210 215 220  
 Leu Lys Gly Ile Pro Val Tyr Arg Phe Val Leu Pro Ser Lys Ala Phe  
 225 230 235 240  
 Ala Ser Pro Val Glu Asn Pro Asp Asn Tyr Cys Phe Cys Thr Glu Lys  
 245 250 255

Ile Ile Ser Lys Asn Cys Thr Ser Tyr Gly Val Leu Asp Ile Ser Lys  
 260 265 270  
 Cys Lys Glu Gly Arg Pro Val Tyr Ile Ser Leu Pro His Phe Leu Tyr  
 275 280 285  
 Ala Ser Pro Asp Val Ser Glu Pro Ile Asp Gly Leu Asn Pro Asn Glu  
 290 295 300  
 Glu Glu His Arg Thr Tyr Leu Asp Ile Glu Pro Ile Thr Gly Phe Thr  
 305 310 315 320  
 Leu Gln Phe Ala Lys Arg Leu Gln Val Asn Leu Leu Val Lys Pro Ser  
 325 330 335  
 Glu Lys Ile Gln Val Leu Lys Asn Leu Lys Arg Asn Tyr Ile Val Pro  
 340 345 350  
 Ile Leu Trp Leu Asn Glu Thr Gly Thr Ile Gly Asp Glu Lys Ala Asn  
 355 360 365  
 Met Phe Arg Ser Gln Val Thr Gly Lys Ile Asn Leu Leu Gly Leu Ile  
 370 375 380  
 Glu Met Ile Leu Leu Ser Val Gly Val Val Met Phe Val Ala Phe Met  
 385 390 395 400  
 Ile Ser Tyr Cys Ala Cys Arg Ser Lys Thr Ile Lys  
 405 410

<210> 40

<211> 798

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> miRNA抑制剂

<400> 40

Met Ala Trp Asp Met Cys Asn Gln Asp Ser Glu Ser Val Trp Ser Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Glu Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln Pro Leu Cys Pro Asp  
 20 25 30  
 Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val Asn Asp Leu Asp Thr  
 35 40 45  
 Asp Ser Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser Asp Gln Ser Glu Ile  
 50 55 60  
 Ile Ser Asn Gln Tyr Asn Asn Glu Pro Ser Asn Ile Phe Glu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val Leu Thr Glu Thr Leu  
 85 90 95

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Asp Ser Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro Ser Phe Asp Ala Leu |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Thr Asp Gly Asp Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala Ser Pro Ser Ser Met |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Pro Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu Glu Pro Ser Leu Leu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Lys Leu Leu Leu Ala Pro Ala Asn Thr Gln Leu Ser Tyr Asn Glu |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Cys Ser Gly Leu Ser Thr Gln Asn His Ala Asn His Asn His Arg Ile |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn Ser Trp Ser Asn Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln Arg Arg Pro Cys Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp Pro Pro His Thr Lys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys Cys Thr Ser Lys Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Lys Ser His Thr Gln Ser Gln Ser Gln His Leu Gln Ala Lys Pro Thr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro Asn Asp Pro Lys Gly |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ser Pro Phe Glu Asn Lys Thr Ile Glu Arg Thr Leu Ser Val Glu Leu |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Ser Gly Thr Ala Gly Leu Thr Pro Pro Thr Thr Pro Pro His Lys Ala |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Asn Gln Asp Asn Pro Phe Arg Ala Ser Pro Lys Leu Lys Ser Ser Cys |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Lys Thr Val Val Pro Pro Pro Ser Lys Lys Pro Arg Tyr Ser Glu Ser |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Ser Gly Thr Gln Gly Asn Asn Ser Thr Lys Lys Gly Pro Glu Gln Ser |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Glu Leu Tyr Ala Gln Leu Ser Lys Ser Ser Val Leu Thr Gly Gly His |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Glu Glu Arg Lys Thr Lys Arg Pro Ser Leu Arg Leu Phe Gly Asp His |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Asp Tyr Cys Gln Ser Ile Asn Ser Lys Thr Glu Ile Leu Ile Asn Ile |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Ser Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Glu Asn Lys Asp Val Ser |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |  |
| Ser | Asp | Trp | Gln | Gly | Gln | Ile | Cys | Ser | Ser | Thr | Asp | Ser | Asp | Gln | Cys |  |  |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |  |  |
| Tyr | Leu | Arg | Glu | Thr | Leu | Glu | Ala | Ser | Lys | Gln | Val | Ser | Pro | Cys | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |  |  |
| Thr | Arg | Lys | Gln | Leu | Gln | Asp | Gln | Glu | Ile | Arg | Ala | Glu | Leu | Asn | Lys |  |  |
|     |     |     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |  |  |
| His | Phe | Gly | His | Pro | Ser | Gln | Ala | Val | Phe | Asp | Asp | Glu | Ala | Asp | Lys |  |  |
| 465 |     |     |     |     |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |  |
| Thr | Gly | Glu | Leu | Arg | Asp | Ser | Asp | Phe | Ser | Asn | Glu | Gln | Phe | Ser | Lys |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |  |  |
| Leu | Pro | Met | Phe | Ile | Asn | Ser | Gly | Leu | Ala | Met | Asp | Gly | Leu | Phe | Asp |  |  |
|     |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |  |  |
| Asp | Ser | Glu | Asp | Glu | Ser | Asp | Lys | Leu | Ser | Tyr | Pro | Trp | Asp | Gly | Thr |  |  |
|     |     |     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |  |  |
| Gln | Ser | Tyr | Ser | Leu | Phe | Asn | Val | Ser | Pro | Ser | Cys | Ser | Ser | Phe | Asn |  |  |
|     |     |     |     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |  |  |
| Ser | Pro | Cys | Arg | Asp | Ser | Val | Ser | Pro | Pro | Lys | Ser | Leu | Phe | Ser | Gln |  |  |
| 545 |     |     |     |     |     | 550 |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |  |
| Arg | Pro | Gln | Arg | Met | Arg | Ser | Arg | Ser | Arg | Ser | Phe | Ser | Arg | His | Arg |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     |     | 575 |  |  |
| Ser | Cys | Ser | Arg | Ser | Pro | Tyr | Ser | Arg | Ser | Arg | Ser | Arg | Ser | Pro | Gly |  |  |
|     |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     |     | 590 |  |  |
| Ser | Arg | Ser | Ser | Ser | Arg | Ser | Cys | Tyr | Tyr | Tyr | Glu | Ser | Ser | His | Tyr |  |  |
|     |     |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     |     | 605 |  |  |
| Arg | His | Arg | Thr | His | Arg | Asn | Ser | Pro | Leu | Tyr | Val | Arg | Ser | Arg | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |  |  |
| Arg | Ser | Pro | Tyr | Ser | Arg | Arg | Pro | Arg | Tyr | Asp | Ser | Tyr | Glu | Glu | Tyr |  |  |
| 625 |     |     |     |     |     | 630 |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |  |
| Gln | His | Glu | Arg | Leu | Lys | Arg | Glu | Glu | Tyr | Arg | Arg | Glu | Tyr | Glu | Lys |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     |     | 655 |  |  |
| Arg | Glu | Ser | Glu | Arg | Ala | Lys | Gln | Arg | Glu | Arg | Gln | Arg | Gln | Lys | Ala |  |  |
|     |     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     |     | 670 |  |  |
| Ile | Glu | Glu | Arg | Arg | Val | Ile | Tyr | Val | Gly | Lys | Ile | Arg | Pro | Asp | Thr |  |  |
|     |     |     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     | 685 |  |  |
| Thr | Arg | Thr | Glu | Leu | Arg | Asp | Arg | Phe | Glu | Val | Phe | Gly | Glu | Ile | Glu |  |  |
|     |     |     |     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     |     | 700 |  |  |
| Glu | Cys | Thr | Val | Asn | Leu | Arg | Asp | Asp | Gly | Asp | Ser | Tyr | Gly | Phe | Ile |  |  |
| 705 |     |     |     |     |     | 710 |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |  |  |

|                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr                             | Tyr | Arg | Tyr | Thr | Cys | Asp | Ala | Phe | Ala | Ala | Leu | Glu | Asn | Gly | Tyr |
| 725                             |     |     |     | 730 |     |     |     | 735 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr                             | Leu | Arg | Arg | Ser | Asn | Glu | Thr | Asp | Phe | Glu | Leu | Tyr | Phe | Cys | Gly |
| 740                             |     |     |     | 745 |     |     |     | 750 |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg                             | Lys | Gln | Phe | Phe | Lys | Ser | Asn | Tyr | Ala | Asp | Leu | Asp | Ser | Asn | Ser |
| 755                             |     |     |     | 760 |     |     |     | 765 |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp                             | Asp | Phe | Asp | Pro | Ala | Ser | Thr | Lys | Ser | Lys | Tyr | Asp | Ser | Leu | Asp |
| 770                             |     |     |     | 775 |     |     |     | 780 |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe                             | Asp | Ser | Leu | Leu | Lys | Glu | Ala | Gln | Arg | Ser | Leu | Arg | Arg |     |     |
| 785                             |     |     |     | 790 |     |     |     | 795 |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> 41                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 271                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> PRT                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223> miRNA抑制剂                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 41                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met                             | Ala | Trp | Asp | Met | Cys | Asn | Gln | Asp | Ser | Glu | Ser | Val | Trp | Ser | Asp |
| 1                               |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |
| Ile                             | Glu | Cys | Ala | Ala | Leu | Val | Gly | Glu | Asp | Gln | Pro | Leu | Cys | Pro | Asp |
| 20                              |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu                             | Pro | Glu | Leu | Asp | Leu | Ser | Glu | Leu | Asp | Val | Asn | Asp | Leu | Asp | Thr |
| 35                              |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp                             | Ser | Phe | Leu | Gly | Gly | Leu | Lys | Trp | Cys | Ser | Asp | Gln | Ser | Glu | Ile |
| 50                              |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile                             | Ser | Asn | Gln | Tyr | Asn | Asn | Glu | Pro | Ser | Asn | Ile | Phe | Glu | Lys | Ile |
| 65                              |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Asp                             | Glu | Glu | Asn | Glu | Ala | Asn | Leu | Leu | Ala | Val | Leu | Thr | Glu | Thr | Leu |
| 85                              |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp                             | Ser | Leu | Pro | Val | Asp | Glu | Asp | Gly | Leu | Pro | Ser | Phe | Asp | Ala | Leu |
| 100                             |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr                             | Asp | Gly | Asp | Val | Thr | Thr | Asp | Asn | Glu | Ala | Ser | Pro | Ser | Ser | Met |
| 115                             |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro                             | Asp | Gly | Thr | Pro | Pro | Pro | Gln | Glu | Ala | Glu | Glu | Pro | Ser | Leu | Leu |
| 130                             |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys                             | Lys | Leu | Leu | Leu | Ala | Pro | Ala | Asn | Thr | Gln | Leu | Ser | Tyr | Asn | Glu |
| 145                             |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |
| Cys                             | Ser | Gly | Leu | Ser | Thr | Gln | Asn | His | Ala | Asn | His | Asn | His | Arg | Ile |
| 165                             |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn Ser Trp Ser Asn Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln Arg Arg Pro Cys Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp Pro Pro His Thr Lys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys Cys Thr Ser Lys Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Lys Ser His Thr Gln Ser Gln Ser Gln His Leu Gln Ala Lys Pro Thr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro Asn Leu Phe Leu     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 803

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; miRNA抑制剂

&lt;400&gt; 42

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Met Asp Glu Thr Ser Pro Arg Leu Glu Glu Asp Trp Lys Lys Val Leu |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Gln Arg Glu Ala Gly Trp Gln Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Pro Leu Cys Pro Asp Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Asn Asp Leu Asp Thr Asp Ser Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Asp Gln Ser Glu Ile Ile Ser Asn Gln Tyr Asn Asn Glu Pro Ser Asn |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Ile Phe Glu Lys Ile Asp Glu Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Leu Thr Glu Thr Leu Asp Ser Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ser Phe Asp Ala Leu Thr Asp Gly Asp Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Ser Pro Ser Ser Met Pro Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Glu Pro Ser Leu Leu Lys Lys Leu Leu Leu Ala Pro Ala Asn Thr Gln |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
|                                                                 |     | 160 |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Leu Ser Tyr Asn Glu Cys Ser Gly Leu Ser Thr Gln Asn His Ala Asn |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| His Asn His Arg Ile Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ser Trp Ser Asn Lys Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Arg Arg Pro Cys Ser Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Pro Pro His Thr Lys Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Cys Thr Ser Lys Lys Lys Ser His Thr Gln Ser Gln Ser Gln His Leu |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Gln Ala Lys Pro Thr Thr Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Asn Asp Pro Lys Gly Ser Pro Phe Glu Asn Lys Thr Ile Glu Arg Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Leu Ser Val Glu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Leu Thr Pro Pro Thr Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Pro Pro His Lys Ala Asn Gln Asp Asn Pro Phe Arg Ala Ser Pro Lys |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Leu Lys Ser Ser Cys Lys Thr Val Val Pro Pro Pro Ser Lys Lys Pro |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Arg Tyr Ser Glu Ser Ser Gly Thr Gln Gly Asn Asn Ser Thr Lys Lys |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Gly Pro Glu Gln Ser Glu Leu Tyr Ala Gln Leu Ser Lys Ser Ser Val |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Leu Thr Gly Gly His Glu Glu Arg Lys Thr Lys Arg Pro Ser Leu Arg |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Leu Phe Gly Asp His Asp Tyr Cys Gln Ser Ile Asn Ser Lys Thr Glu |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Ile Leu Ile Asn Ile Ser Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Glu |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Asn Lys Asp Val Ser Ser Asp Trp Gln Gly Gln Ile Cys Ser Ser Thr |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Asp Ser Asp Gln Cys Tyr Leu Arg Glu Thr Leu Glu Ala Ser Lys Gln |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Val Ser Pro Cys Ser Thr Arg Lys Gln Leu Gln Asp Gln Glu Ile Arg |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Ala Glu Leu Asn Lys His Phe Gly His Pro Ser Gln Ala Val Phe Asp |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
| Asp Glu Ala Asp Lys Thr Gly Glu Leu Arg Asp Ser Asp Phe Ser Asn |     |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 | 495 |
| Glu Gln Phe Ser Lys Leu Pro Met Phe Ile Asn Ser Gly Leu Ala Met |     |     |     |
|                                                                 | 500 | 505 | 510 |
| Asp Gly Leu Phe Asp Asp Ser Glu Asp Glu Ser Asp Lys Leu Ser Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 515 | 520 | 525 |
| Pro Trp Asp Gly Thr Gln Ser Tyr Ser Leu Phe Asn Val Ser Pro Ser |     |     |     |
|                                                                 | 530 | 535 | 540 |
| Cys Ser Ser Phe Asn Ser Pro Cys Arg Asp Ser Val Ser Pro Pro Lys |     |     |     |
| 545                                                             | 550 | 555 | 560 |
| Ser Leu Phe Ser Gln Arg Pro Gln Arg Met Arg Ser Arg Ser Arg Ser |     |     |     |
|                                                                 | 565 | 570 | 575 |
| Phe Ser Arg His Arg Ser Cys Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Ser Arg |     |     |     |
|                                                                 | 580 | 585 | 590 |
| Ser Arg Ser Pro Gly Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Cys Tyr Tyr Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 595 | 600 | 605 |
| Glu Ser Ser His Tyr Arg His Arg Thr His Arg Asn Ser Pro Leu Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 610 | 615 | 620 |
| Val Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Arg Pro Arg Tyr Asp |     |     |     |
| 625                                                             | 630 | 635 | 640 |
| Ser Tyr Glu Glu Tyr Gln His Glu Arg Leu Lys Arg Glu Glu Tyr Arg |     |     |     |
|                                                                 | 645 | 650 | 655 |
| Arg Glu Tyr Glu Lys Arg Glu Ser Glu Arg Ala Lys Gln Arg Glu Arg |     |     |     |
|                                                                 | 660 | 665 | 670 |
| Gln Arg Gln Lys Ala Ile Glu Glu Arg Arg Val Ile Tyr Val Gly Lys |     |     |     |
|                                                                 | 675 | 680 | 685 |
| Ile Arg Pro Asp Thr Thr Arg Thr Glu Leu Arg Asp Arg Phe Glu Val |     |     |     |
|                                                                 | 690 | 695 | 700 |
| Phe Gly Glu Ile Glu Glu Cys Thr Val Asn Leu Arg Asp Asp Gly Asp |     |     |     |
| 705                                                             | 710 | 715 | 720 |
| Ser Tyr Gly Phe Ile Thr Tyr Arg Tyr Thr Cys Asp Ala Phe Ala Ala |     |     |     |
|                                                                 | 725 | 730 | 735 |
| Leu Glu Asn Gly Tyr Thr Leu Arg Arg Ser Asn Glu Thr Asp Phe Glu |     |     |     |
|                                                                 | 740 | 745 | 750 |
| Leu Tyr Phe Cys Gly Arg Lys Gln Phe Phe Lys Ser Asn Tyr Ala Asp |     |     |     |
|                                                                 | 755 | 760 | 765 |
| Leu Asp Ser Asn Ser Asp Asp Phe Asp Pro Ala Ser Thr Lys Ser Lys |     |     |     |
|                                                                 | 770 | 775 | 780 |

Tyr Asp Ser Leu Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu Ala Gln Arg Ser  
 785                                      790                                      795                                      800  
 Leu Arg Arg  
 <210> 43  
 <211> 786  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> miRNA抑制剂  
 <400> 43  
 Met Asp Glu Gly Tyr Phe Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln Pro  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Leu Cys Pro Asp Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val Asn  
                                     20                                      25                                      30  
 Asp Leu Asp Thr Asp Ser Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser Asp  
                                     35                                      40                                      45  
 Gln Ser Glu Ile Ile Ser Asn Gln Tyr Asn Asn Glu Pro Ser Asn Ile  
                                     50                                      55                                      60  
 Phe Glu Lys Ile Asp Glu Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val Leu  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Thr Glu Thr Leu Asp Ser Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro Ser  
                                     85                                      90                                      95  
 Phe Asp Ala Leu Thr Asp Gly Asp Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala Ser  
                                     100                                      105                                      110  
 Pro Ser Ser Met Pro Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu Glu  
                                     115                                      120                                      125  
 Pro Ser Leu Leu Lys Lys Leu Leu Leu Ala Pro Ala Asn Thr Gln Leu  
                                     130                                      135                                      140  
 Ser Tyr Asn Glu Cys Ser Gly Leu Ser Thr Gln Asn His Ala Asn His  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Asn His Arg Ile Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn Ser  
                                     165                                      170                                      175  
 Trp Ser Asn Lys Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln Arg  
                                     180                                      185                                      190  
 Arg Pro Cys Ser Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp Pro  
                                     195                                      200                                      205  
 Pro His Thr Lys Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys Cys  
                                     210                                      215                                      220  
 Thr Ser Lys Lys Lys Ser His Thr Gln Ser Gln Ser Gln His Leu Gln

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Ala Lys Pro Thr Thr Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro Asn |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Asp Pro Lys Gly Ser Pro Phe Glu Asn Lys Thr Ile Glu Arg Thr Leu |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Ser Val Glu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Leu Thr Pro Pro Thr Thr Pro |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Pro His Lys Ala Asn Gln Asp Asn Pro Phe Arg Ala Ser Pro Lys Leu |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Lys Ser Ser Cys Lys Thr Val Val Pro Pro Pro Ser Lys Lys Pro Arg |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Tyr Ser Glu Ser Ser Gly Thr Gln Gly Asn Asn Ser Thr Lys Lys Gly |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Pro Glu Gln Ser Glu Leu Tyr Ala Gln Leu Ser Lys Ser Ser Val Leu |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Thr Gly Gly His Glu Glu Arg Lys Thr Lys Arg Pro Ser Leu Arg Leu |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Phe Gly Asp His Asp Tyr Cys Gln Ser Ile Asn Ser Lys Thr Glu Ile |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Leu Ile Asn Ile Ser Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Glu Asn |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Lys Asp Val Ser Ser Asp Trp Gln Gly Gln Ile Cys Ser Ser Thr Asp |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Ser Asp Gln Cys Tyr Leu Arg Glu Thr Leu Glu Ala Ser Lys Gln Val |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Ser Pro Cys Ser Thr Arg Lys Gln Leu Gln Asp Gln Glu Ile Arg Ala |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Glu Leu Asn Lys His Phe Gly His Pro Ser Gln Ala Val Phe Asp Asp |     |     |     |
|                                                                 | 450 | 455 | 460 |
| Glu Ala Asp Lys Thr Gly Glu Leu Arg Asp Ser Asp Phe Ser Asn Glu |     |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
| Gln Phe Ser Lys Leu Pro Met Phe Ile Asn Ser Gly Leu Ala Met Asp |     |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 | 495 |
| Gly Leu Phe Asp Asp Ser Glu Asp Glu Ser Asp Lys Leu Ser Tyr Pro |     |     |     |
|                                                                 | 500 | 505 | 510 |
| Trp Asp Gly Thr Gln Ser Tyr Ser Leu Phe Asn Val Ser Pro Ser Cys |     |     |     |
|                                                                 | 515 | 520 | 525 |
| Ser Ser Phe Asn Ser Pro Cys Arg Asp Ser Val Ser Pro Pro Lys Ser |     |     |     |
| 530                                                             | 535 | 540 |     |

|                                                                 |                            |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------|-----|-----|
| Leu Phe Ser Gln Arg Pro Gln Arg Met Arg Ser Arg Ser Arg Ser Phe |                            |     |     |
| 545                                                             | 550                        | 555 | 560 |
| Ser Arg His Arg Ser Cys Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Ser Arg Ser |                            |     |     |
|                                                                 | 565                        | 570 | 575 |
| Arg Ser Pro Gly Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Cys Tyr Tyr Tyr Glu |                            |     |     |
|                                                                 | 580                        | 585 | 590 |
| Ser Ser His Tyr Arg His Arg Thr His Arg Asn Ser Pro Leu Tyr Val |                            |     |     |
|                                                                 | 595                        | 600 | 605 |
| Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Arg Pro Arg Tyr Asp Ser |                            |     |     |
|                                                                 | 610                        | 615 | 620 |
| Tyr Glu Glu Tyr Gln His Glu Arg Leu Lys Arg Glu Glu Tyr Arg Arg |                            |     |     |
| 625                                                             | 630                        | 635 | 640 |
| Glu Tyr Glu Lys Arg Glu Ser Glu Arg Ala Lys Gln Arg Glu Arg Gln |                            |     |     |
|                                                                 | 645                        | 650 | 655 |
| Arg Gln Lys Ala Ile Glu Glu Arg Arg Val Ile Tyr Val Gly Lys Ile |                            |     |     |
|                                                                 | 660                        | 665 | 670 |
| Arg Pro Asp Thr Thr Arg Thr Glu Leu Arg Asp Arg Phe Glu Val Phe |                            |     |     |
|                                                                 | 675                        | 680 | 685 |
| Gly Glu Ile Glu Glu Cys Thr Val Asn Leu Arg Asp Asp Gly Asp Ser |                            |     |     |
|                                                                 | 690                        | 695 | 700 |
| Tyr Gly Phe Ile Thr Tyr Arg Tyr Thr Cys Asp Ala Phe Ala Ala Leu |                            |     |     |
| 705                                                             | 710                        | 715 | 720 |
| Glu Asn Gly Tyr Thr Leu Arg Arg Ser Asn Glu Thr Asp Phe Glu Leu |                            |     |     |
|                                                                 | 725                        | 730 | 735 |
| Tyr Phe Cys Gly Arg Lys Gln Phe Phe Lys Ser Asn Tyr Ala Asp Leu |                            |     |     |
|                                                                 | 740                        | 745 | 750 |
| Asp Ser Asn Ser Asp Asp Phe Asp Pro Ala Ser Thr Lys Ser Lys Tyr |                            |     |     |
|                                                                 | 755                        | 760 | 765 |
| Asp Ser Leu Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu Ala Gln Arg Ser Leu |                            |     |     |
|                                                                 | 770                        | 775 | 780 |
| Arg Arg                                                         |                            |     |     |
| 785                                                             |                            |     |     |
| <210>                                                           | 44                         |     |     |
| <211>                                                           | 289                        |     |     |
| <212>                                                           | PRT                        |     |     |
| <213>                                                           | 人工序列 (Artificial Sequence) |     |     |
| <220>                                                           |                            |     |     |
| <223>                                                           | miRNA抑制剂                   |     |     |
| <400>                                                           | 44                         |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Glu | Gly | Tyr | Phe | Cys | Ala | Ala | Leu | Val | Gly | Glu | Asp | Gln | Pro |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Cys | Pro | Asp | Leu | Pro | Glu | Leu | Asp | Leu | Ser | Glu | Leu | Asp | Val | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asp | Leu | Asp | Thr | Asp | Ser | Phe | Leu | Gly | Gly | Leu | Lys | Trp | Cys | Ser | Asp |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gln | Ser | Glu | Ile | Ile | Ser | Asn | Gln | Tyr | Asn | Asn | Glu | Pro | Ser | Asn | Ile |
|     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Phe | Glu | Lys | Ile | Asp | Glu | Glu | Asn | Glu | Ala | Asn | Leu | Leu | Ala | Val | Leu |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Thr | Glu | Thr | Leu | Asp | Ser | Leu | Pro | Val | Asp | Glu | Asp | Gly | Leu | Pro | Ser |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Phe | Asp | Ala | Leu | Thr | Asp | Gly | Asp | Val | Thr | Thr | Asp | Asn | Glu | Ala | Ser |
|     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Pro | Ser | Ser | Met | Pro | Asp | Gly | Thr | Pro | Pro | Pro | Gln | Glu | Ala | Glu | Glu |
|     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| Pro | Ser | Leu | Leu | Lys | Lys | Leu | Leu | Leu | Ala | Pro | Ala | Asn | Thr | Gln | Leu |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Ser | Tyr | Asn | Glu | Cys | Ser | Gly | Leu | Ser | Thr | Gln | Asn | His | Ala | Asn | His |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
| Asn | His | Arg | Ile | Arg | Thr | Asn | Pro | Ala | Ile | Val | Lys | Thr | Glu | Asn | Ser |
|     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| Trp | Ser | Asn | Lys | Ala | Lys | Ser | Ile | Cys | Gln | Gln | Gln | Lys | Pro | Gln | Arg |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Arg | Pro | Cys | Ser | Glu | Leu | Leu | Lys | Tyr | Leu | Thr | Thr | Asn | Asp | Asp | Pro |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Pro | His | Thr | Lys | Pro | Thr | Glu | Asn | Arg | Asn | Ser | Ser | Arg | Asp | Lys | Cys |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Thr | Ser | Lys | Lys | Lys | Ser | His | Thr | Gln | Ser | Gln | Ser | Gln | His | Leu | Gln |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| Ala | Lys | Pro | Thr | Thr | Leu | Ser | Leu | Pro | Leu | Thr | Pro | Glu | Ser | Pro | Asn |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |
| Asp | Pro | Lys | Gly | Ser | Pro | Phe | Glu | Asn | Lys | Thr | Ile | Glu | Arg | Thr | Leu |
|     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |
| Ser | Val | Glu | Leu | Ser | Gly | Thr | Ala | Gly | Val | Lys | Thr | Asn | Leu | Ile | Ser |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |

Lys

<210> 45

<211> 276

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; miRNA抑制剂

&lt;400&gt; 45

```

Met Asp Glu Thr Ser Pro Arg Leu Glu Glu Asp Trp Lys Lys Val Leu
1           5           10           15
Gln Arg Glu Ala Gly Trp Gln Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln
          20           25           30
Pro Leu Cys Pro Asp Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val
          35           40           45
Asn Asp Leu Asp Thr Asp Ser Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser
          50           55           60
Asp Gln Ser Glu Ile Ile Ser Asn Gln Tyr Asn Asn Glu Pro Ser Asn
65           70           75           80
Ile Phe Glu Lys Ile Asp Glu Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val
          85           90           95
Leu Thr Glu Thr Leu Asp Ser Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro
          100          105          110
Ser Phe Asp Ala Leu Thr Asp Gly Asp Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala
          115          120          125
Ser Pro Ser Ser Met Pro Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu
          130          135          140
Glu Pro Ser Leu Leu Lys Lys Leu Leu Leu Ala Pro Ala Asn Thr Gln
          145          150          155          160
Leu Ser Tyr Asn Glu Cys Ser Gly Leu Ser Thr Gln Asn His Ala Asn
          165          170          175
His Asn His Arg Ile Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn
          180          185          190
Ser Trp Ser Asn Lys Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln
          195          200          205
Arg Arg Pro Cys Ser Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp
          210          215          220
Pro Pro His Thr Lys Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys
          225          230          235          240
Cys Thr Ser Lys Lys Lys Ser His Thr Gln Ser Gln Ser Gln His Leu
          245          250          255
Gln Ala Lys Pro Thr Thr Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro
          260          265          270

```

Asn Leu Phe Leu

275

<210> 46

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> miRNA抑制剂

<400> 46

Met Asp Glu Gly Tyr Phe Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln Pro

1 5 10 15

Leu Cys Pro Asp Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val Asn

20 25 30

Asp Leu Asp Thr Asp Ser Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser Asp

35 40 45

Gln Ser Glu Ile Ile Ser Asn Gln Tyr Asn Asn Glu Pro Ser Asn Ile

50 55 60

Phe Glu Lys Ile Asp Glu Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val Leu

65 70 75 80

Thr Glu Thr Leu Asp Ser Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro Ser

85 90 95

Phe Asp Ala Leu Thr Asp Gly Asp Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala Ser

100 105 110

Pro Ser Ser Met Pro Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu Glu

115 120 125

Pro Ser Leu Val Arg Thr Leu Pro Thr Val

130 135

<210> 47

<211> 301

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> miRNA抑制剂

<400> 47

Met Ala Trp Asp Met Cys Asn Gln Asp Ser Glu Ser Val Trp Ser Asp

1 5 10 15

Ile Glu Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln Pro Leu Cys Pro Asp

20 25 30

Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val Asn Asp Leu Asp Thr

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Asp Ser Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser Asp Gln Ser Glu Ile |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Ile Ser Asn Gln Tyr Asn Asn Glu Pro Ser Asn Ile Phe Glu Lys Ile |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Asp Glu Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val Leu Thr Glu Thr Leu |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Asp Ser Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro Ser Phe Asp Ala Leu |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Thr Asp Gly Asp Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala Ser Pro Ser Ser Met |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Pro Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu Glu Pro Ser Leu Leu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Lys Leu Leu Leu Ala Pro Ala Asn Thr Gln Leu Ser Tyr Asn Glu |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Cys Ser Gly Leu Ser Thr Gln Asn His Ala Asn His Asn His Arg Ile |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn Ser Trp Ser Asn Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln Arg Arg Pro Cys Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp Pro Pro His Thr Lys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys Cys Thr Ser Lys Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Lys Ser His Thr Gln Ser Gln Ser Gln His Leu Gln Ala Lys Pro Thr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro Asn Asp Pro Lys Gly |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ser Pro Phe Glu Asn Lys Thr Ile Glu Arg Thr Leu Ser Val Glu Leu |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Ser Gly Thr Ala Gly Val Lys Thr Asn Leu Ile Ser Lys             |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 671

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; miRNA抑制剂

&lt;400&gt; 48

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Asp | Gly | Thr | Pro | Pro | Pro | Gln | Glu | Ala | Glu | Glu | Pro | Ser | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Lys | Lys | Leu | Leu | Leu | Ala | Pro | Ala | Asn | Thr | Gln | Leu | Ser | Tyr | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Glu | Cys | Ser | Gly | Leu | Ser | Thr | Gln | Asn | His | Ala | Asn | His | Asn | His | Arg |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Ile | Arg | Thr | Asn | Pro | Ala | Ile | Val | Lys | Thr | Glu | Asn | Ser | Trp | Ser | Asn |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Lys | Ala | Lys | Ser | Ile | Cys | Gln | Gln | Gln | Lys | Pro | Gln | Arg | Arg | Pro | Cys |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Ser | Glu | Leu | Leu | Lys | Tyr | Leu | Thr | Thr | Asn | Asp | Asp | Pro | Pro | His | Thr |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| Lys | Pro | Thr | Glu | Asn | Arg | Asn | Ser | Ser | Arg | Asp | Lys | Cys | Thr | Ser | Lys |
|     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |
| Lys | Lys | Ser | His | Thr | Gln | Ser | Gln | Ser | Gln | His | Leu | Gln | Ala | Lys | Pro |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| Thr | Thr | Leu | Ser | Leu | Pro | Leu | Thr | Pro | Glu | Ser | Pro | Asn | Asp | Pro | Lys |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Pro | Phe | Glu | Asn | Lys | Thr | Ile | Glu | Arg | Thr | Leu | Ser | Val | Glu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
| Leu | Ser | Gly | Thr | Ala | Gly | Leu | Thr | Pro | Pro | Thr | Thr | Pro | Pro | His | Lys |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |
| Ala | Asn | Gln | Asp | Asn | Pro | Phe | Arg | Ala | Ser | Pro | Lys | Leu | Lys | Ser | Ser |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |
| Cys | Lys | Thr | Val | Val | Pro | Pro | Pro | Ser | Lys | Lys | Pro | Arg | Tyr | Ser | Glu |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| Ser | Ser | Gly | Thr | Gln | Gly | Asn | Asn | Ser | Thr | Lys | Lys | Gly | Pro | Glu | Gln |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ser | Glu | Leu | Tyr | Ala | Gln | Leu | Ser | Lys | Ser | Ser | Val | Leu | Thr | Gly | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| His | Glu | Glu | Arg | Lys | Thr | Lys | Arg | Pro | Ser | Leu | Arg | Leu | Phe | Gly | Asp |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |     |
| His | Asp | Tyr | Cys | Gln | Ser | Ile | Asn | Ser | Lys | Thr | Glu | Ile | Leu | Ile | Asn |
|     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Ile | Ser | Gln | Glu | Leu | Gln | Asp | Ser | Arg | Gln | Leu | Glu | Asn | Lys | Asp | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ser | Ser | Asp | Trp | Gln | Gly | Gln | Ile | Cys | Ser | Ser | Thr | Asp | Ser | Asp | Gln |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Cys Tyr Leu Arg Glu Thr Leu Glu Ala Ser Lys Gln Val Ser Pro Cys |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Ser Thr Arg Lys Gln Leu Gln Asp Gln Glu Ile Arg Ala Glu Leu Asn |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Lys His Phe Gly His Pro Ser Gln Ala Val Phe Asp Asp Glu Ala Asp |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Lys Thr Gly Glu Leu Arg Asp Ser Asp Phe Ser Asn Glu Gln Phe Ser |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Lys Leu Pro Met Phe Ile Asn Ser Gly Leu Ala Met Asp Gly Leu Phe |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Asp Asp Ser Glu Asp Glu Ser Asp Lys Leu Ser Tyr Pro Trp Asp Gly |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Thr Gln Ser Tyr Ser Leu Phe Asn Val Ser Pro Ser Cys Ser Ser Phe |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Asn Ser Pro Cys Arg Asp Ser Val Ser Pro Pro Lys Ser Leu Phe Ser |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Gln Arg Pro Gln Arg Met Arg Ser Arg Ser Arg Ser Phe Ser Arg His |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Arg Ser Cys Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro |     |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |     |
| Gly Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Cys Tyr Tyr Tyr Glu Ser Ser His |     |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
| Tyr Arg His Arg Thr His Arg Asn Ser Pro Leu Tyr Val Arg Ser Arg |     |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 | 495 |
| Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Arg Pro Arg Tyr Asp Ser Tyr Glu Glu |     |     |     |
|                                                                 | 500 | 505 | 510 |
| Tyr Gln His Glu Arg Leu Lys Arg Glu Glu Tyr Arg Arg Glu Tyr Glu |     |     |     |
|                                                                 | 515 | 520 | 525 |
| Lys Arg Glu Ser Glu Arg Ala Lys Gln Arg Glu Arg Gln Arg Gln Lys |     |     |     |
|                                                                 | 530 | 535 | 540 |
| Ala Ile Glu Glu Arg Arg Val Ile Tyr Val Gly Lys Ile Arg Pro Asp |     |     |     |
| 545                                                             | 550 | 555 | 560 |
| Thr Thr Arg Thr Glu Leu Arg Asp Arg Phe Glu Val Phe Gly Glu Ile |     |     |     |
|                                                                 | 565 | 570 | 575 |
| Glu Glu Cys Thr Val Asn Leu Arg Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Gly Phe |     |     |     |
|                                                                 | 580 | 585 | 590 |
| Ile Thr Tyr Arg Tyr Thr Cys Asp Ala Phe Ala Ala Leu Glu Asn Gly |     |     |     |
|                                                                 | 595 | 600 | 605 |
| Tyr Thr Leu Arg Arg Ser Asn Glu Thr Asp Phe Glu Leu Tyr Phe Cys |     |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 610                                                             | 615 | 620 |
| Gly Arg Lys Gln Phe Phe Lys Ser Asn Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Asn |     |     |
| 625                                                             | 630 | 635 |
| Ser Asp Asp Phe Asp Pro Ala Ser Thr Lys Ser Lys Tyr Asp Ser Leu |     |     |
| 645                                                             | 650 | 655 |
| Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg     |     |     |
| 660                                                             | 665 | 670 |

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 49

ucauaca

7

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 50

gaggcug

7

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 51

cgaggtcgac ttcctaga

18

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 52

catacacggc tctcctctct aaa

23

|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| <210> | 53                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |
| <400> | 53                         |    |
|       | tcctgtggca tccatgaaac      | 20 |
| <210> | 54                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |
| <400> | 54                         |    |
|       | caatgcctgg gtacatggtg      | 20 |
| <210> | 55                         |    |
| <211> | 18                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |
| <400> | 55                         |    |
|       | ccaagtggag gagcagct        | 18 |
| <210> | 56                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |
| <400> | 56                         |    |
|       | gacaaggtac aacccatcgg      | 20 |
| <210> | 57                         |    |
| <211> | 22                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220> |                            |    |
| <223> | 寡核苷酸                       |    |
| <400> | 57                         |    |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| ttcgacacat gggataacga gg        | 22 |
| <210> 58                        |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 58                        |    |
| tttttgctgt gagtcccgga g         | 21 |
| <210> 59                        |    |
| <211> 20                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 59                        |    |
| cagcctagca gcacgtaaat           | 20 |
| <210> 60                        |    |
| <211> 19                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 60                        |    |
| gaatcgagca ccagttacg            | 19 |
| <210> 61                        |    |
| <211> 22                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> 寡核苷酸                      |    |
| <400> 61                        |    |
| ccttccctga aggttcctcc tt        | 22 |
| <210> 62                        |    |
| <211> 7                         |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <400> 62                         |    |
| tgtatga                          | 7  |
| <210> 63                         |    |
| <211> 8                          |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 63                         |    |
| gtgtatga                         | 8  |
| <210> 64                         |    |
| <211> 9                          |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 64                         |    |
| cgtgtatga                        | 9  |
| <210> 65                         |    |
| <211> 10                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 65                         |    |
| ccgtgtatga                       | 10 |
| <210> 66                         |    |
| <211> 11                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 66                         |    |
| gccgtgtatg a                     | 11 |
| <210> 67                         |    |
| <211> 12                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 67                        |    |
| agccgtgtat ga                   | 12 |
| <210> 68                        |    |
| <211> 13                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 68                        |    |
| gagccgtgta tga                  | 13 |
| <210> 69                        |    |
| <211> 14                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 69                        |    |
| agagccgtgt atga                 | 14 |
| <210> 70                        |    |
| <211> 15                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 70                        |    |
| gagagccgtg tatga                | 15 |
| <210> 71                        |    |
| <211> 16                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 71                        |    |
| ggagagccgt gtatga               | 16 |
| <210> 72                        |    |
| <211> 17                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 72                         |    |
| aggagagccg tgtatga               | 17 |
| <210> 73                         |    |
| <211> 18                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 73                         |    |
| gaggagagcc gtgtatga              | 18 |
| <210> 74                         |    |
| <211> 19                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 74                         |    |
| agaggagagc cgtgtatga             | 19 |
| <210> 75                         |    |
| <211> 20                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 75                         |    |
| gagaggagag ccgtgtatga            | 20 |
| <210> 76                         |    |
| <211> 8                          |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 76                         |    |
| tgtatgac                         | 8  |
| <210> 77                         |    |
| <211> 9                          |    |
| <212> DNA                        |    |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 77                         |    |
| gtgtatgac                        | 9  |
| <210> 78                         |    |
| <211> 10                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 78                         |    |
| cgtgtatgac                       | 10 |
| <210> 79                         |    |
| <211> 11                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 79                         |    |
| ccgtgtatga c                     | 11 |
| <210> 80                         |    |
| <211> 12                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 80                         |    |
| gccgtgtatg ac                    | 12 |
| <210> 81                         |    |
| <211> 13                         |    |
| <212> DNA                        |    |
| <213> 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                            |    |
| <223> miRNA抑制剂                   |    |
| <400> 81                         |    |
| agccgtgtat gac                   | 13 |
| <210> 82                         |    |
| <211> 14                         |    |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 82                        |    |
| gagccgtgta tgac                 | 14 |
| <210> 83                        |    |
| <211> 15                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 83                        |    |
| agagccgtgt atgac                | 15 |
| <210> 84                        |    |
| <211> 16                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 84                        |    |
| gagagccgtg tatgac               | 16 |
| <210> 85                        |    |
| <211> 17                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 85                        |    |
| ggagagccgt gtatgac              | 17 |
| <210> 86                        |    |
| <211> 18                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |    |
| <220>                           |    |
| <223> miRNA抑制剂                  |    |
| <400> 86                        |    |
| aggagagccg tgtatgac             | 18 |
| <210> 87                        |    |

|                         |                            |    |
|-------------------------|----------------------------|----|
| <211>                   | 19                         |    |
| <212>                   | DNA                        |    |
| <213>                   | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                   |                            |    |
| <223>                   | miRNA抑制剂                   |    |
| <400>                   | 87                         |    |
| gaggagagcc gtgtatgac    |                            | 19 |
| <210>                   | 88                         |    |
| <211>                   | 20                         |    |
| <212>                   | DNA                        |    |
| <213>                   | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                   |                            |    |
| <223>                   | miRNA抑制剂                   |    |
| <400>                   | 88                         |    |
| agaggagagc cgtgtatgac   |                            | 20 |
| <210>                   | 89                         |    |
| <211>                   | 21                         |    |
| <212>                   | DNA                        |    |
| <213>                   | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <220>                   |                            |    |
| <223>                   | miRNA抑制剂                   |    |
| <400>                   | 89                         |    |
| gagaggagag ccgtgtatga c |                            | 21 |

阳离子载体单元

L1, L2, L3 ~ 任选的接头部分(每个部分可包含一个或多个接头, 所述一个或多个接头可相同或不同)

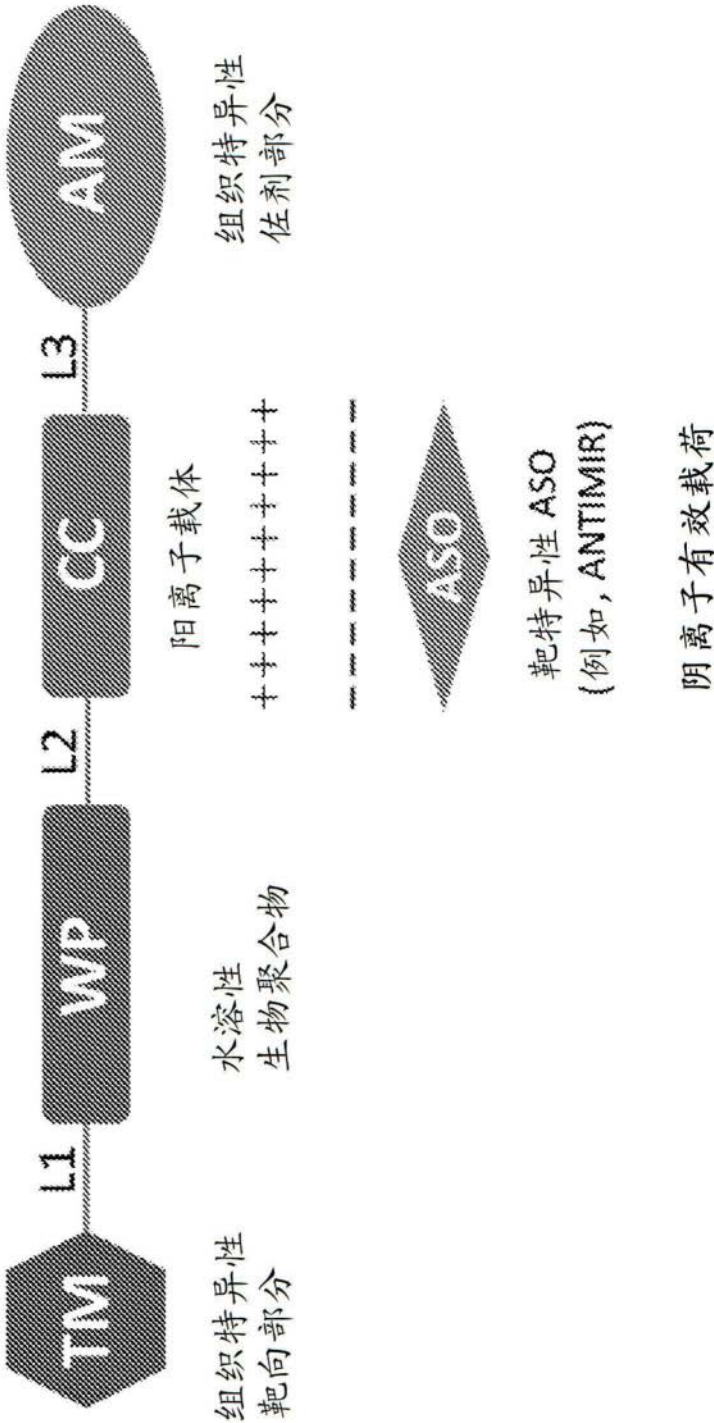


图1

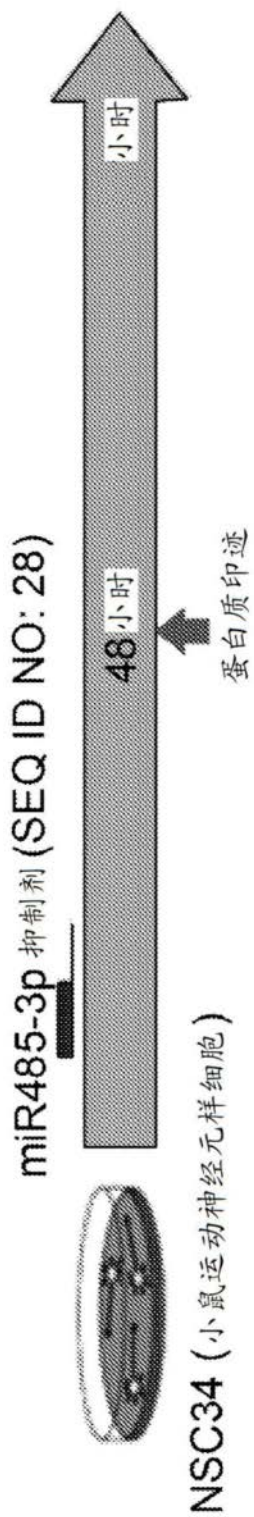


图2A

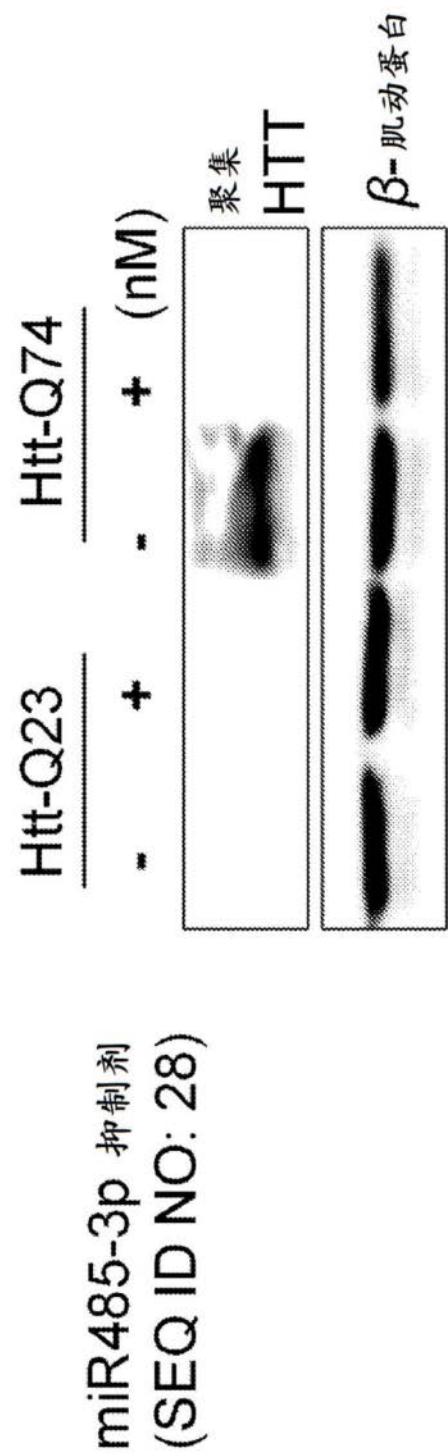


图2B

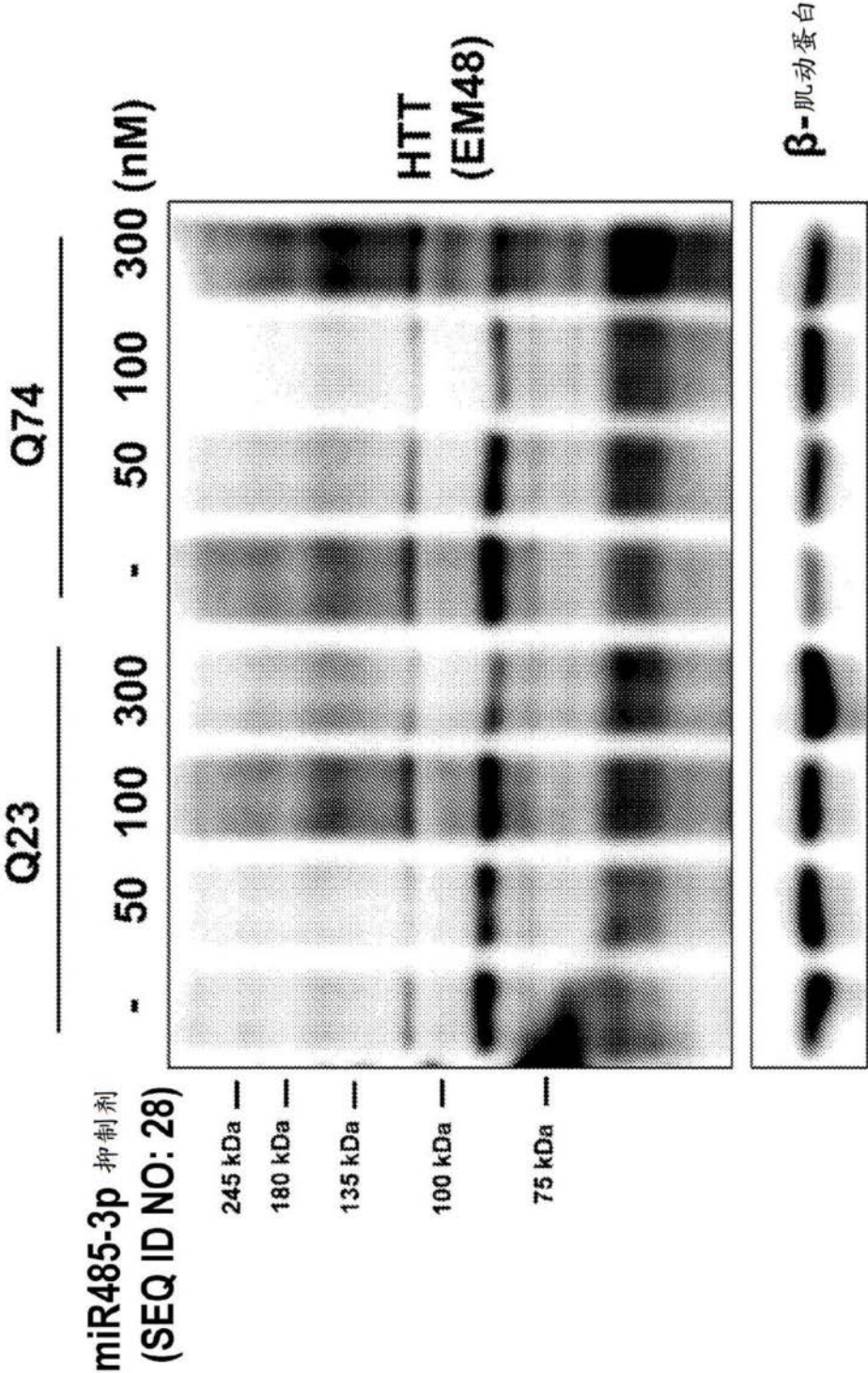


图3A

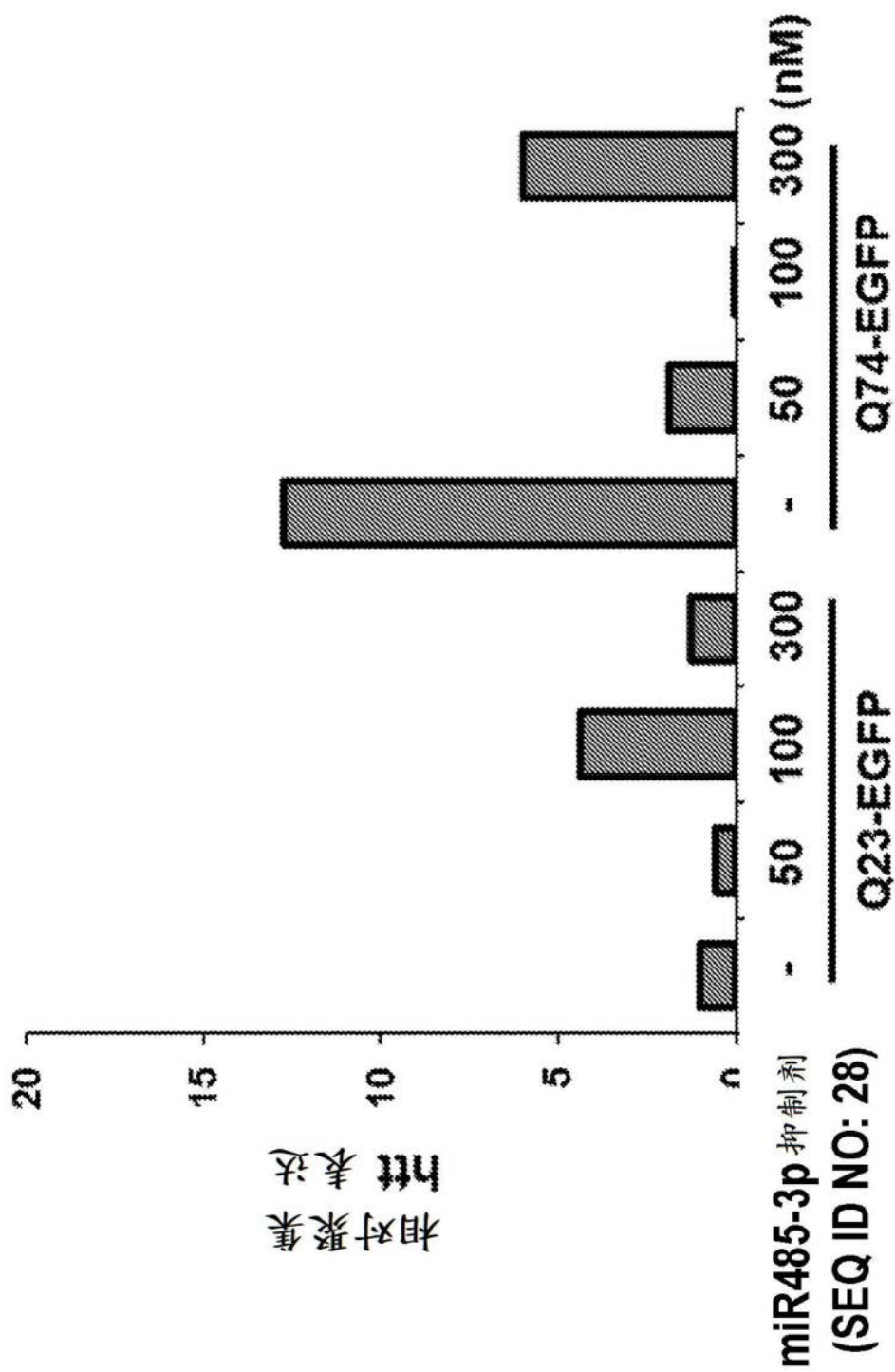


图3B

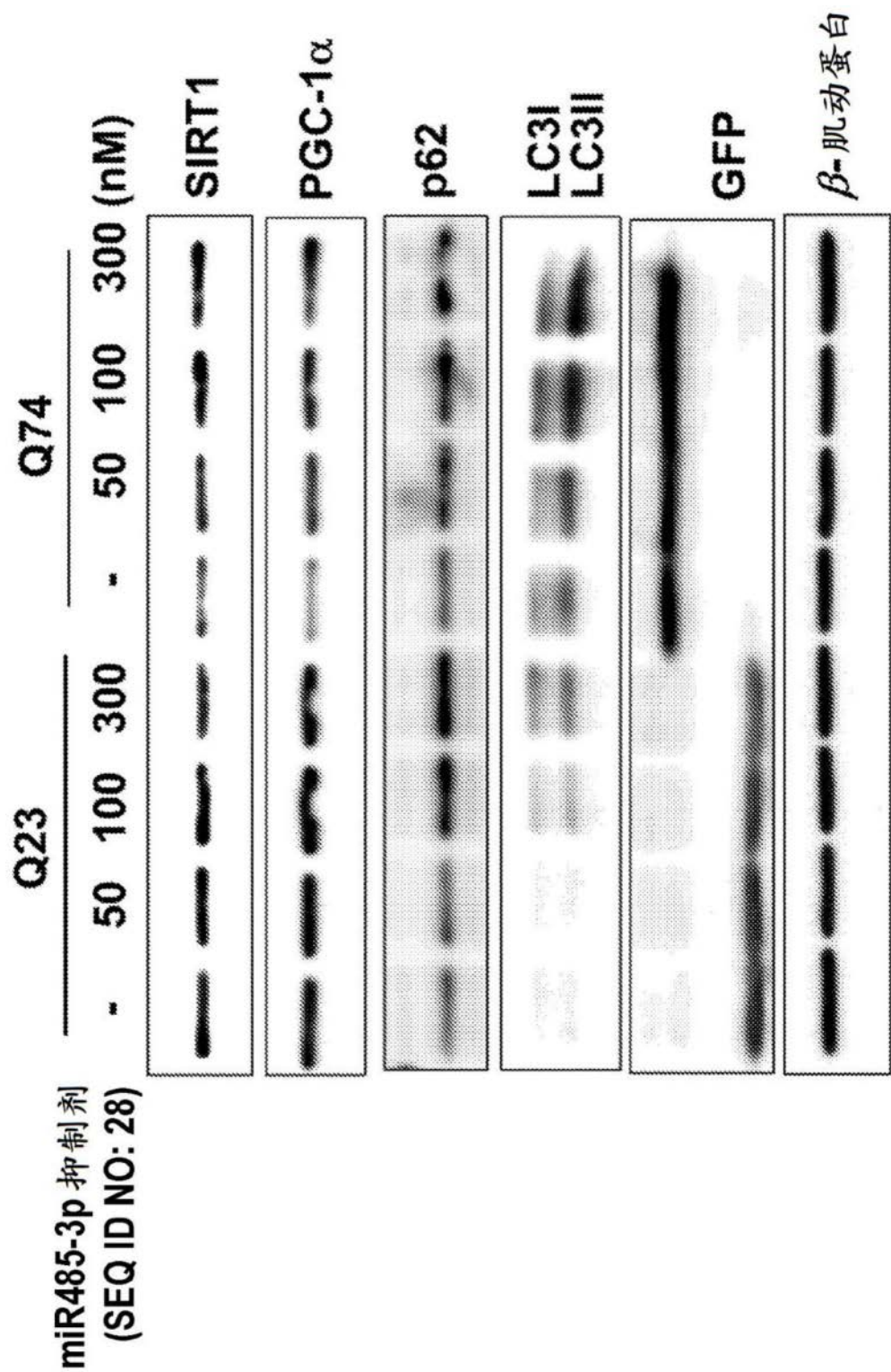


图4A

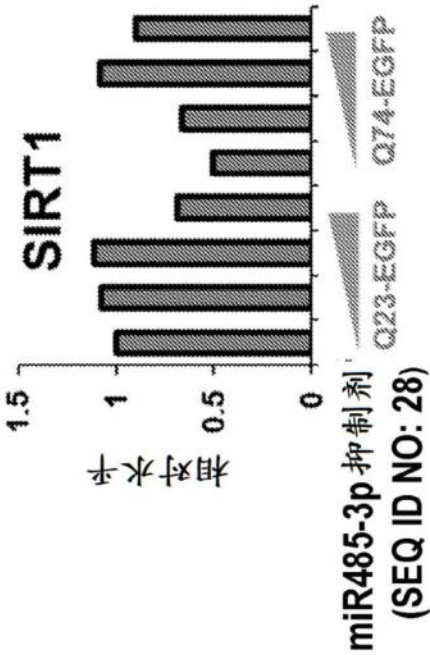


图4B

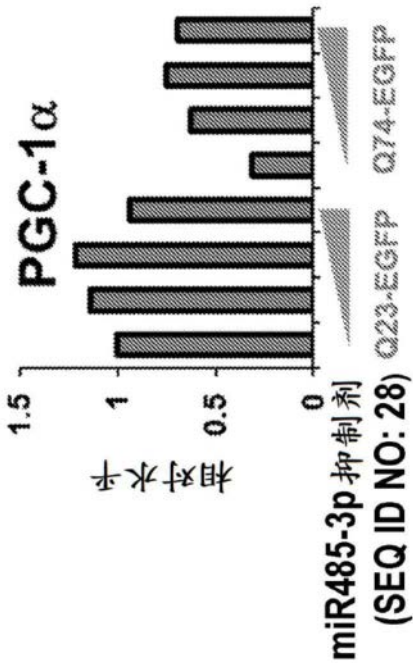
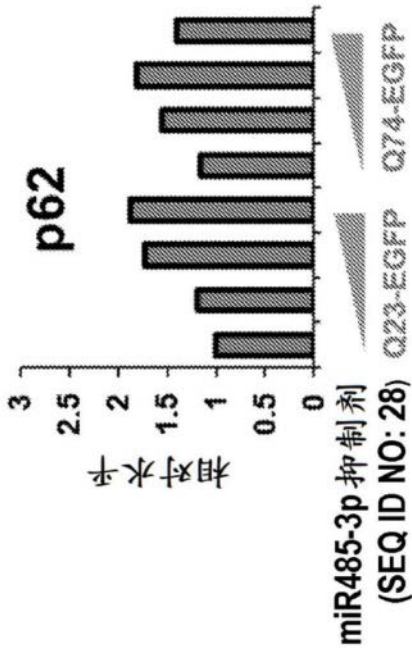


图4C



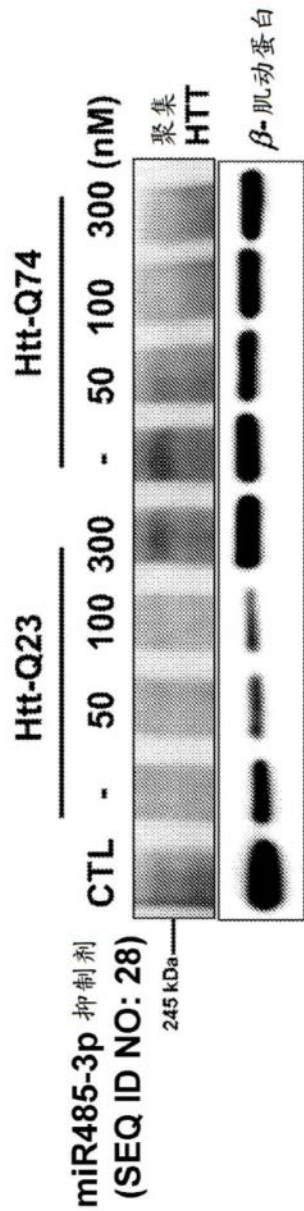


图5

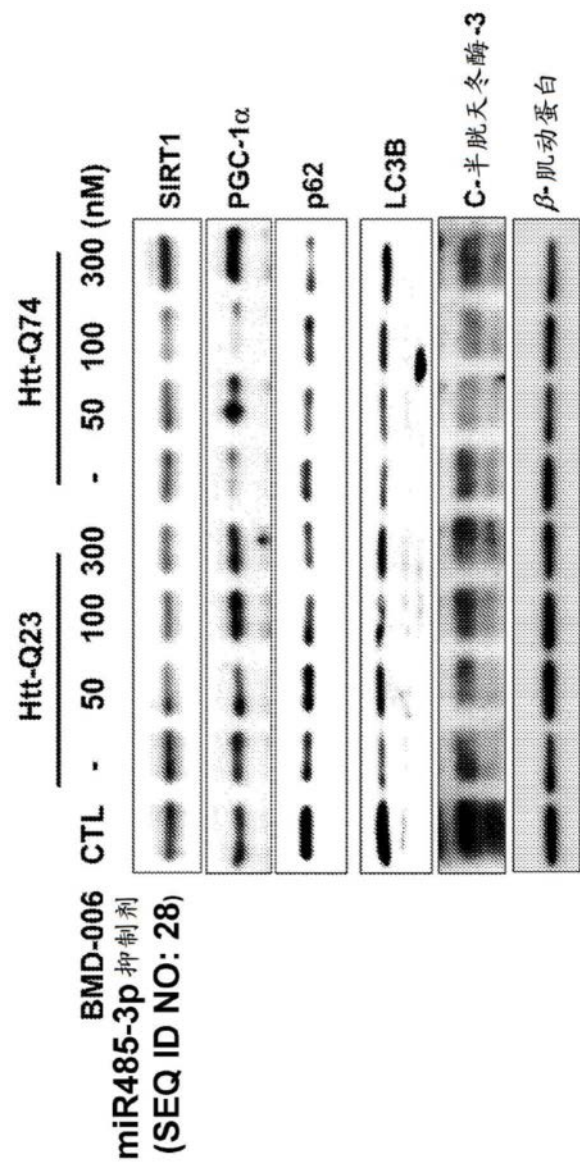


图6

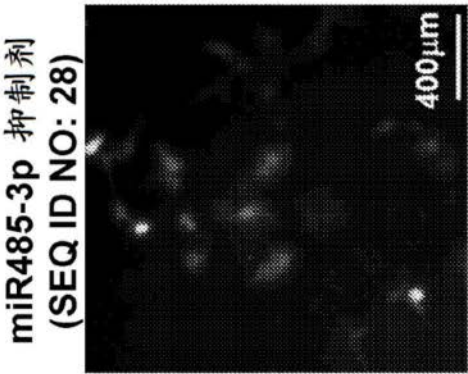


图 7C

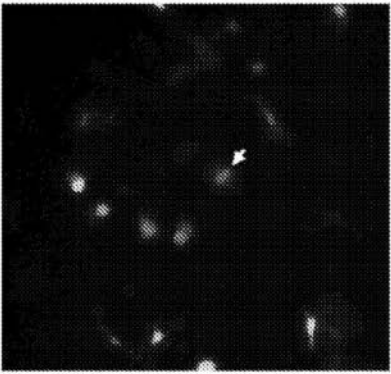


图 7E

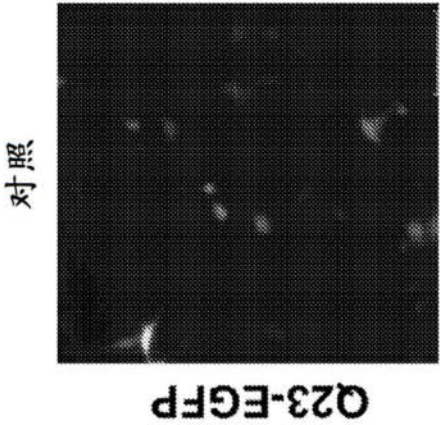


图 7B

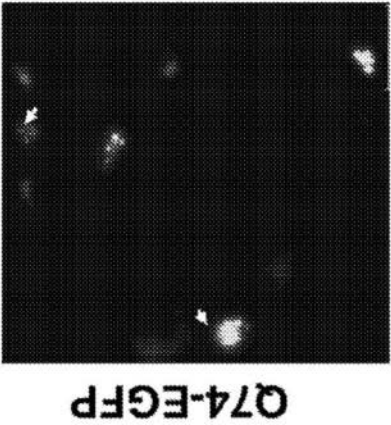


图 7D

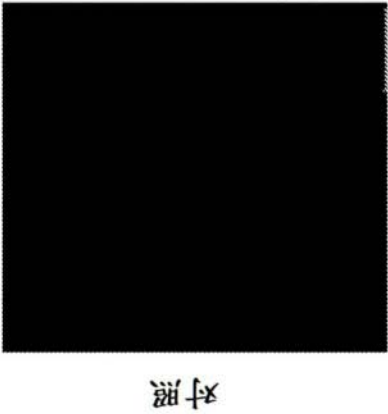


图 7A

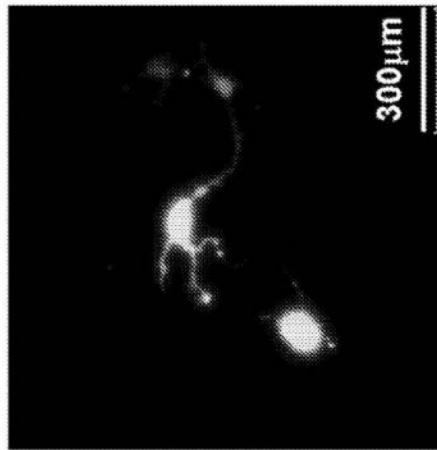


图 8B

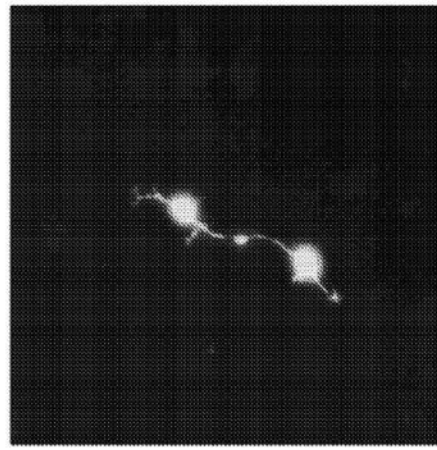


图 8D

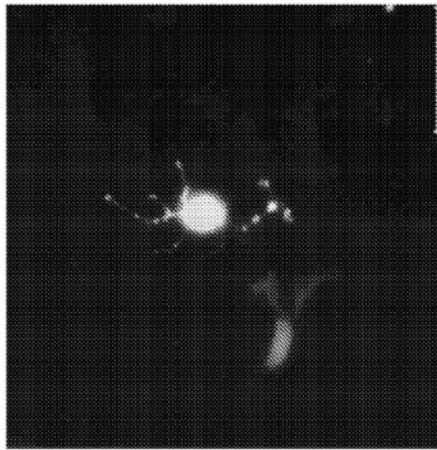


图 8A

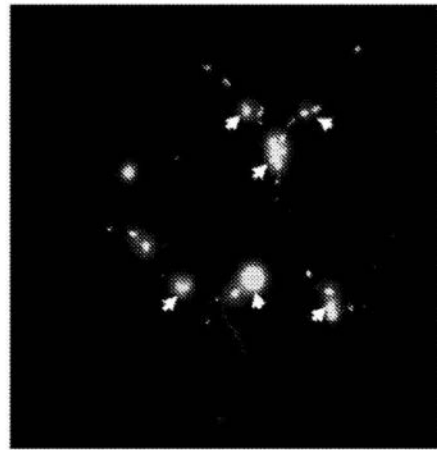


图 8C

Q23-EGFP

Q74-EGFP

