



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115443154 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 06

(21) 申请号 202180026126.4

(22) 申请日 2021.02.05

(30) 优先权数据

62/971,767 2020.02.07 US

62/989,486 2020.03.13 US

63/047,155 2020.07.01 US

63/064,314 2020.08.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2021/050974 2021.02.05

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/156831 EN 2021.08.12

(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 樊英如 张静

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 31/4164 (2006.01)

A61K 31/455 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

权利要求书8页 说明书99页

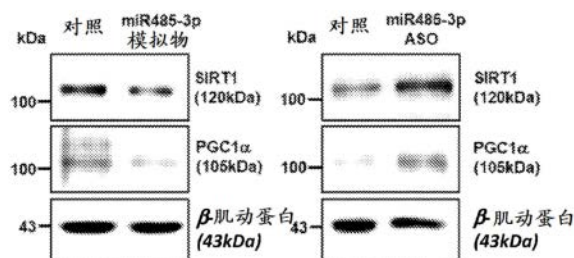
序列表117页 附图69页

(54) 发明名称

用于基因上调的miRNA-485抑制剂

(57) 摘要

本公开包括miRNA抑制剂用于治疗与SIRT1、PGC-1 α 、CD36、LRRK2、NRG1、STMN2、VLDLR、NRXN1、GRIA4、NXP1、PSD-95和/或突触素蛋白或SIRT1、PGC-1 α 、CD36、LRRK2、NRG1、STMN2、VLDLR、NRXN1、GRIA4、NXP1、PSD-95和/或突触素基因表达的水平降低相关的疾病或疾患的用途。在一些方面,所述miRNA抑制剂能够用于治疗与半胱天冬酶-3蛋白或基因表达的水平增加相关的疾病或疾患。可用于本公开的miRNA抑制剂能够抑制miR-485表达和/或活性,其进而能够增加SIRT1、PGC-1 α 、CD36、LRRK2、NRG1、STMN2、VLDLR、NRXN1、GRIA4、NXP1、PSD-95和/或突触素蛋白或基因表达的水平;和/或能够降低半胱天冬酶3蛋白或基因表达的水平。



1. 一种增加有需要的受试者中的SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水平的方法,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,其中所述受试者患有与SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平降低相关的疾病或疾患。

3. 如权利要求1或2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。

4. 一种增加有需要的受试者中的CD36蛋白和/或CD36基因水平的方法,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)。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与CD36蛋白和/或CD36基因的水平降低相关的疾病或疾患。

6. 一种增加有需要的受试者中的PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因水平的方法,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)。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因的水平降低相关的疾病或疾患。

8. 一种增加有需要的受试者中的LRRK2蛋白和/或LRRK2基因水平的方法,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)。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的水平降低相关的疾病或疾患。

10. 一种增加有需要的受试者中的NRG1蛋白和/或NRG1基因水平的方法,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)。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与NRG1蛋白和/或NRG1基因的水平降低相关的疾病或疾患。

12. 一种增加有需要的受试者中的STMN2蛋白和/或STMN2基因水平的方法,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)。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与STMN2蛋白和/或STMN2基因的水平降低相关的疾病或疾患。

14. 一种增加有需要的受试者中的VLDLR蛋白和/或VLDLR基因水平的方法,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)。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的水平降低相关的疾病或疾患。

16. 一种增加有需要的受试者中的NRXN1蛋白和/或NRXN1基因水平的方法,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)。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的水平降低相关的疾病或疾患。

18. 一种增加有需要的受试者中的GRIA4蛋白和/或GRIA4基因水平的方法,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)。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的水平降低相关的疾病或疾患。

20. 一种增加有需要的受试者中的NXPH1蛋白和/或NXPH1基因水平的方法,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)。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的水平降低相关的疾病或疾患。

22. 一种增加有需要的受试者中的PSD-95蛋白和/或PSD-95基因水平的方法,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)。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的水平降低相关的疾病或疾患。

24. 一种增加有需要的受试者中的突触素蛋白和/或突触素基因水平的方法,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)。

25. 如权利要求1至24中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与突触素蛋白和/或突触素基因的水平降低相关的疾病或疾患。

26. 一种降低有需要的受试者中的半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因水平的方法,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)。

27. 如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述受试者患有与半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的水平增加相关的疾病或疾患。

28. 如权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂诱导神经发生。

29. 如权利要求28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。

30. 如权利要求28或29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。

31. 如权利要求28至30中任一项所述的方法,其中诱导神经发生包括轴突、树突和/或突触发育增加。

32. 如权利要求1至31中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂诱导吞噬作用。

33. 一种治疗有需要的受试者中与异常SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平。

34. 一种治疗有需要的受试者中与异常CD36蛋白和/或CD36基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述CD36蛋白和/或CD36基因的水平。

35. 一种治疗有需要的受试者中与异常PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因的水平。

36. 一种治疗有需要的受试者中与异常LRRK2蛋白和/或LRRK2基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的水平。

37. 一种治疗有需要的受试者中与异常NRG1蛋白和/或NRG1基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述NRG1蛋白和/或NRG1基因的水平。

38. 一种治疗有需要的受试者中与异常STMN2蛋白和/或STMN2基因水平相关的疾病或

疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述STMN2蛋白和/或STMN2基因的水平。

39.一种治疗有需要的受试者中与异常VLDLR蛋白和/或VLDLR基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的水平。

40.一种治疗有需要的受试者中与异常NRXN1蛋白和/或NRXN1基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的水平。

41.一种治疗有需要的受试者中与异常GRIA4蛋白和/或GRIA4基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的水平。

42.一种治疗有需要的受试者中与异常NXPH1蛋白和/或NXPH1基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的水平。

43.一种治疗有需要的受试者中与异常PSD-95蛋白和/或PSD-95基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的水平。

44.一种治疗有需要的受试者中与异常突触素蛋白和/或突触素基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述突触素蛋白和/或突触素基因的水平。

45.一种治疗有需要的受试者中与异常半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因水平相关的疾病或疾患的方法,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),其中所述miRNA抑制剂增加所述半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的水平。

46.如权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂抑制miR485-3p。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述miR485-3p包含5'-gucauacacggcucuccucucu-3'(SEQ ID NO:1)。

48.如权利要求1至47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6至约30个核苷酸的长度。

49.如权利要求1至48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;增加CD36基因的转录和/或CD36蛋白的表达;增加PGC1基因的转录和/或PGC1蛋白的表达;增加LRRK2基因的转录和/或LRRK2蛋白的表达;增加NRG1基因的转录和/或NRG1蛋白的表达;增加STMN2基因的转录和/或STMN2蛋白的表达;增加VLDLR基因的转录和/或VLDLR蛋白的表达;增加NRXN1基因的转录和/或NRXN1蛋白的表达;增加GRIA4基因的转录和/或GRIA4蛋白的表达;增加NXPH1基因的转录和/或NXPH1蛋白的表达;增加PSD-95基因的转录和/或PSD-95蛋白的表达;增加突触素基因的转录和/或突触素蛋白的表达;降低半胱天冬酶-3基因的转录和/或半胱天冬酶-3蛋白的表达;或它们的任何组合。

50.如权利要求1至49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。

51. 如权利要求1至50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。

52. 如权利要求1至51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'-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)、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:29) 或 AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC (SEQ ID NO:30)。

53. 如权利要求1至46和49至51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'-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)、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:89) 和 5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'。

(SEQ ID NO:90)。

54.如权利要求1至51中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂的序列与5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:30)或5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:90)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。

55.如权利要求54所述的方法,其中所述miRNA抑制剂具有与5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:30)或5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:90)具有至少90%相似性的序列。

56.如权利要求1至51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'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:30)或5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:90),具有一个取代或两个取代。

57.如权利要求1至51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'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:30)或5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:90)。

58.如权利要求57所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:30)。

59.如权利要求1至58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。

60.如权利要求59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)。

61.如权利要求1至60中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含主链修饰。

62.如权利要求61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。

63.如权利要求1至62中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂在递送剂中递送。

64.如权利要求63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。

65.如权利要求1至64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。

66.如权利要求65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。

67.如权利要求66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。

68.如权利要求1至67中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂用递送剂递送。

69.如权利要求68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。

70.如权利要求68或69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

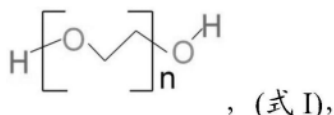
其中当以约1:1的离子比率与核酸混合时，所述阳离子载体单元形成胶束。

71. 如权利要求70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。

72. 如权利要求70或71所述的方法，其中所述水溶性聚合物包括聚(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(α -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。

73. 如权利要求70至72所述的方法，其中所述水溶性聚合物包括聚乙二醇(“PEG”)、聚甘油或聚(丙二醇)(“PPG”)。

74. 如权利要求70至73中任一项所述的方法，其中所述水溶性聚合物包含：



其中n是1-1000。

75. 如权利要求74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。

76. 如权利要求74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、约150至约160。

77. 如权利要求70至76中任一项所述的方法，其中所述水溶性聚合物是直链的、支链的或树枝状的。

78. 如权利要求70至77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。

79. 如权利要求78所述的方法，其中所述阳离子载体部分包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少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。

80. 如权利要求79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。

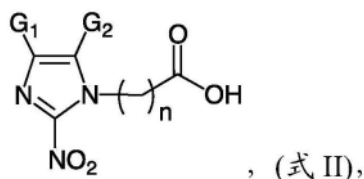
81. 如权利要求79或80所述的方法, 其中所述碱性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸或它们的任何组合。

82. 如权利要求70至81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。

83. 如权利要求70至82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。

84. 如权利要求70至82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。

85. 如权利要求84所述的方法, 其中所述佐剂部分包含:



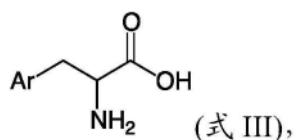
其中G1和G2各自是H、芳族环或1-10烷基, 或者G1和G2一起形成芳族环, 并且其中n是1-10。

86. 如权利要求84所述的方法, 其中所述佐剂部分包含硝基咪唑。

87. 如权利要求84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。

88. 如权利要求70至84中任一项所述的方法, 其中所述佐剂部分包含氨基酸。

89. 如权利要求88所述的方法, 其中所述佐剂部分包含



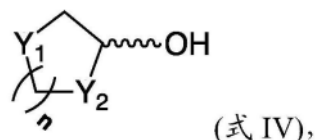
其中Ar是 或 , 并且

其中Z1和Z2各自是H或OH。

90. 如权利要求70至84中任一项所述的方法, 其中所述佐剂部分包含维生素。

91. 如权利要求90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。

92. 如权利要求90或91所述的方法, 其中所述维生素包含:



其中Y1和Y2各自是C、N、O或S, 并且其中n是1或2。

93. 如权利要求90至92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。

94. 如权利要求90至93中任一项所述的方法, 其中所述维生素是维生素B3。

95. 如权利要求90至94中任一项所述的方法,其中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个或至少约20个维生素B3。

96. 如权利要求95所述的方法,其中所述佐剂部分包含约10个维生素B3。

97. 如权利要求90至96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的佐剂部分。

98. 如权利要求90至97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。

99. 如权利要求98所述的方法,其中所述缔合是共价键、非共价键或离子键。

100. 如权利要求98或99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。

101. 如权利要求98至100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。

102. 如权利要求2、3、5、7、9、11、13、15、17、19和21-101中任一项所述的方法,其中所述疾病或疾患包括阿尔茨海默氏病。

103. 如权利要求2、3、5、7、9、11、13、15、17、19和21-101中任一项所述的方法,其中所述疾病或疾患包括自闭症谱系障碍、智力迟钝、癫痫发作、中风、帕金森氏病、脊髓损伤或它们的任何组合。

104. 如权利要求103所述的方法,其中所述疾病或疾患是帕金森氏病。

105. 如权利要求63所述的方法,其中所述递送剂是胶束。

106. 如权利要求105所述的方法,其中所述胶束包含 (i) 约100至约200个PEG单元; (ii) 约30至约40个赖氨酸,各自具有胺基团; (iii) 约15至约20个赖氨酸,各自具有硫醇基团;以及 (iv) 约30至约40个赖氨酸,各自连接至维生素B3。

107. 如权利要求105所述的方法,其中所述胶束包含 (i) 约120至约130个PEG单元; (ii) 约32个赖氨酸,各自具有胺基团; (iii) 约16个赖氨酸,各自具有硫醇基团;以及 (iv) 约32个赖氨酸,各自连接至维生素B3。

108. 如权利要求106或107所述的方法,其中靶向部分进一步连接至所述PEG单元。

109. 如权利要求108所述的方法,其中所述靶向部分是LAT 1靶向配体。

110. 如权利要求109所述的方法,其中所述靶向部分是苯丙氨酸。

用于基因上调的miRNA-485抑制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本PCT申请要求2020年2月7日提出申请的美国临时申请号62/971,767;2020年3月13日提出申请的美国临时申请号62/989,486;2020年7月1日提出申请的美国临时申请号63/047,155;和2020年8月11日提出申请的美国临时申请号63/064,314的优先权权益,所述临时申请各自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] 与本申请一起提出申请的以ASCII文本文件(名称:4366_014PC04_Seqlisting_ST25.txt;大小:264,023字节;和创建日期:2021年2月5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)用于治疗与SIRT1表达降低相关的疾病和病症(例如,神经变性疾病和病症,例如,阿尔茨海默氏病)的用途。

[0006] 发明背景

[0007] Sirtulin 1(也称为NAD依赖性脱乙酰酶长寿蛋白-1(sirtuin-1))是在人类中由SIRT1基因编码的酶。它属于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)依赖性组蛋白脱乙酰酶家族并且可使多种底物脱乙酰化。Rahman,S.等人,Cell Communication and Signaling 9:11(2011)。因此,sirtulin 1已被描述为在广泛生理功能中发挥作用,包括控制基因表达、新陈代谢和衰老。而且,异常sirtulin活性与某些人类疾病相关。例如,患有神经变性疾病的受试者被描述为表现出低水平的sirtulin 1活性。

[0008] 神经变性疾病如阿尔茨海默氏病(AD)和帕金森氏病是全世界发病率和死亡率的常见且不断增长的原因。据估计,到2050年,全球超过1亿人将受到AD的影响。Gaugler等人,Alzheimer's Dement 12(4):459-509(2016);Pan等人,Sci Adv 5(2)(2019)。全球范围内的AD成本估计超过8000亿美元。在过去的二十年中,研究人员一直在尝试开发能够抑制A β 产生和聚集或促进 β 淀粉样蛋白清除的化合物和抗体。不幸的是,这些尝试并未在轻度AD患者的大型临床试验中实现成功的临床益处。Panza等人,Nat Rev Neurol 15(2):73-88(2019)。

[0009] 目前,没有已知的用于神经变性病症的治愈方法。可用的治疗选择通常仅限于缓解各种症状,而不是解决病症的根本原因。因此,非常需要治疗神经变性疾病的新的且更有效的方法。

发明内容

[0010] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平降低相关的疾病或疾患。在一些方面,所

述miRNA抑制剂诱导自噬和/或治疗或预防炎症。

[0011] 本文还提供了一种增加有需要的受试者中的CD36蛋白和/或CD36基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与CD36蛋白和/或CD36基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0012] 本公开进一步提供了一种增加有需要的受试者中的PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0013] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的LRRK2蛋白和/或LRRK2基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0014] 本文还提供了一种增加有需要的受试者中的NRG1蛋白和/或NRG1基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与NRG1蛋白和/或NRG1基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0015] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的STMN2蛋白和/或STMN2基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与STMN2蛋白和/或STMN2基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0016] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的VLDLR蛋白和/或VLDLR基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0017] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的NRXN1蛋白和/或NRXN1基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0018] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的GRIA4蛋白和/或GRIA4基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0019] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的NXPH1蛋白和/或NXPH1基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0020] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的PSD-95蛋白和/或PSD-95基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0021] 本文提供了一种增加有需要的受试者中的突触素蛋白和/或突触素基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与突触素蛋白和/或突触素基因的水平降低相关的疾病或疾患。

[0022] 本文提供了一种降低有需要的受试者中的半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因水平的方法,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)。在一些方面,所述受试者患有与半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的水平增加相关的疾病或疾患。

[0023] 在一些方面,可用于上述方法中的miR-485抑制剂诱导神经发生。在某些方面,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。在一些方面，miR-485抑制剂诱导吞噬作用。

[0024] 本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常CD36蛋白和/或CD36基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述CD36蛋白和/或CD36基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常LRRK2蛋白和/或LRRK2基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常NRG1蛋白和/或NRG1基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述NRG1蛋白和/或NRG1基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常STMN2蛋白和/或STMN2基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述STMN2蛋白和/或STMN2基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常VLDLR蛋白和/或VLDLR基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常NRXN1蛋白和/或NRXN1基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常GRIA4蛋白和/或GRIA4基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常NXPH1蛋白和/或NXPH1基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常PSD-95蛋白和/或PSD-95基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常突触素蛋白和/或突触素基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述突触素蛋白和/或突触素基因的水平。本文还提供了一种治疗有需要的受试者中与异常半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因水平相关的疾病或疾患的方法，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)，其中所述miRNA抑制剂增加所述半胱天冬酶-3蛋白

和/或半胱天冬酶-3基因的水平。

[0025] 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)。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6至约30个核苷酸的长度。

[0026] 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;增加CD36基因的转录和/或CD36蛋白的表达;增加PGC1基因的转录和/或PGC1蛋白的表达;增加LRRK2基因的转录和/或LRRK2蛋白的表达;增加NRG1基因的转录和/或NRG1蛋白的表达;增加STMN2基因的转录和/或STMN2蛋白的表达;增加VLDLR基因的转录和/或VLDLR蛋白的表达;增加NRXN1基因的转录和/或NRXN1蛋白的表达;增加GRIA4基因的转录和/或GRIA4蛋白的表达;增加NXP1基因的转录和/或NXP1蛋白的表达;增加PSD-95基因的转录和/或PSD-95蛋白的表达;增加突触素基因的转录和/或突触素蛋白的表达;降低半胱天冬酶-3基因的转录和/或半胱天冬酶-3蛋白的表达;或它们的任何组合。

[0027] 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。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。

[0028] 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)和5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:15)。

[0029] 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'-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)、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:29)和AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC (SEQ ID

NO:30)。

[0030] 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)、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:89) 和 5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:90)。

[0031] 在一些方面,所述miRNA抑制剂的序列与5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:30) 或 5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:90) 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。在某些方面,所述miRNA抑制剂具有与5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:30) 或 5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:90) 具有至少90%相似性的序列。在一些方面,所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:30) 或 5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:90), 具有一个取代或两个取代。在一些方面,所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:30) 或 5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:90)。在一些方面,所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:30)。

[0032] 在一些方面,所述miRNA抑制剂包含至少一种经修饰的核苷酸。在某些方面,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)。

[0033] 在一些方面,所述miRNA抑制剂包含主链修饰。在某些方面,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。

[0034] 在一些方面,所述miRNA抑制剂在递送剂中递送。在某些方面,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。

[0035] 在一些方面,所述miRNA抑制剂通过病毒载体递送。在某些方面,所述病毒载体是AAV、腺病毒、逆转录病毒或慢病毒。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。在某些方面,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。

[0037] 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

[0038] [WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (式I)

[0039] 或

[0040] [WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (式II)

[0041] 其中

[0042] WP是水溶性生物聚合物部分;

[0043] CC是带正电荷的载体部分;

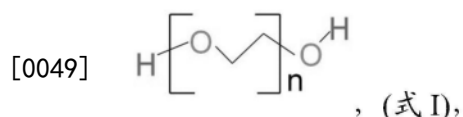
[0044] AM是佐剂部分;并且,

[0045] L1和L2独立地是任选的接头,并且

[0046] 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。

[0047] 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。在一些方面,所述水溶性聚合物包括聚(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(α -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。在其它方面,所述水溶性聚合物包括聚乙二醇(“PEG”)、聚甘油或聚(丙二醇)(“PPG”)。

[0048] 在一些方面,所述水溶性聚合物包含:



[0050] 在一些方面,n是1-1000。在某些方面,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。在其它方面,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。

[0051] 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。

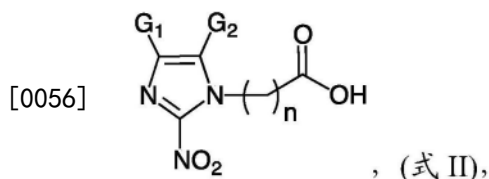
[0052] 在一些方面,所述阳离子载体部分包含一个或多个碱性氨基酸。在某些方面,所述阳离子载体部分包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个、至少31个、至少32个、至少33个、至少34个、至少35个、至少36个、至少37个、至少38个、至少39个、至少40个、至少41个、至少42个、至少43个、至少44个、至少45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。在某些方面,所述阳离子载体部分包含约30至约50个碱性氨基酸。

[0053] 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,所述阳离子载体部分包含约40个赖氨酸单体。

[0054] 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。在某

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。

[0055] 在一些方面,所述佐剂部分包含:

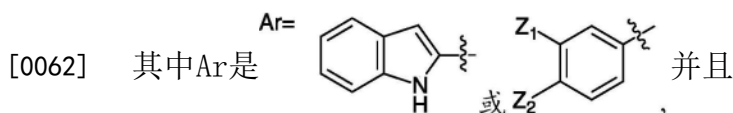
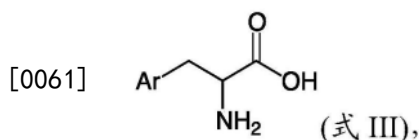


[0057] 其中G1和G2各自是H、芳族环或1-10烷基,或者G1和G2一起形成芳族环,并且其中n是1-10。

[0058] 在一些方面,所述佐剂部分包含硝基咪唑。在某些方面,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 (pretomanid)、奥硝唑、美格唑 (megazol)、阿扎硝唑、苜硝唑或它们的任何组合。

[0059] 在一些方面,所述佐剂部分包含氨基酸。

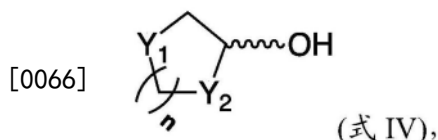
[0060] 在一些方面,所述佐剂部分包含



[0063] 其中Z1和Z2各自是H或OH。

[0064] 在一些方面,所述佐剂部分包含维生素。在某些方面,所述维生素包含环状环或环状杂原子环和羧基或羟基。

[0065] 在一些方面,所述维生素包含:



[0067] 其中Y1和Y2各自是C、N、O或S,并且其中n是1或2。

[0068] 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。例如,所述维生素可以是维生素B3。

[0069] 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个或至少约20个维生素B3。在某些方面,所述佐剂部分包含约10个维生素B3。

[0070] 在一些方面,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的佐剂部分。

[0071] 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。例如,所述缔合可以是共价键、非共价键或离子键。

[0072] 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。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。

[0073] 在一些方面,可用本公开治疗的疾病或疾患包括阿尔茨海默氏病。在某些方面,所述疾病或疾患包括自闭症谱系障碍、智力迟钝、癫痫发作、中风、帕金森氏病、脊髓损伤或它们的任何组合。在某些方面,所述疾病或疾患是帕金森氏病。

[0074] 在一些方面,所述递送剂是胶束。在一些方面,所述胶束包含(i)约100至约200个PEG单元;(ii)约30至约40个赖氨酸,各自具有胺基团;(iii)约15至约20个赖氨酸,各自具有硫醇基团;以及(iv)约30至约40个赖氨酸,各自连接至维生素B3。在一些方面,所述胶束包含(i)约120至约130个PEG单元;(ii)约32个赖氨酸,各自具有胺基团;(iii)约16个赖氨酸,各自具有硫醇基团;以及(iv)约32个赖氨酸,各自连接至维生素B3。

[0075] 在一些方面,靶向部分进一步连接至所述PEG单元。在一些方面,所述靶向部分是LAT 1靶向配体。在一些方面,所述靶向部分是苯丙氨酸(pennyl alanine)。

附图说明

[0076] 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,如图4所例示,CC和AM可以支架方式排列。

[0077] 图2A、2B、2C和2D示出在阿尔茨海默氏病受试者中SIRT1表达降低。图2A提供来自正常(即,未患AD的受试者)和AD患者(每组n=6)的中央前回组织中代表性SIRT1蛋白表达的比较。图2B提供图2A中所示结果的定量比较。通过光密度测定法分析SIRT1条带并针对β-肌动蛋白归一化。示出来自对照(n=6)或AD中央前回(n=6)组织的SIRT1蛋白的相对水平。图2C提供6月龄野生型(WT)小鼠(n=4)、6月龄5XFAD小鼠(n=3)、11月龄野生型小鼠(WT)和11月龄5XFAD小鼠(n=3)中SIRT1 mRNA的比较。对相同年龄的小鼠进行了比较分析。图2D提供根据年龄5XFAD小鼠中SIRT1 mRNA表达的比较。每个年龄组的5xFAD表达针对WT归一化。在图2B、2C和2D中,条形代表平均值±SD。

[0078] 图3A和3B分别提供正常(即,未患AD的受试者)和AD患者中miR485-3p和miR485-5p表达的比较。

[0079] 图4提供用对照寡核苷酸或miR485抑制剂转染的原代皮层神经元中小鼠miR485-3p表达的相对水平的比较。左侧的图示出用miR485-3p ASO(本文也称为“miRNA抑制剂”或“miR-485抑制剂”)处理3小时后的miR485-3p表达。右侧的图示出用miR485-3p ASO处理6小时后的表达。在每个图中,左侧条形代表对照组,并且右侧条形代表miR-485抑制剂转染组。

[0080] 图5A和5B示出miR-485抑制剂可增加SIRT1和PGC-1α表达。图5A提供示出在用miR-对照、miR485-3p(“miR485-3p模拟物”)或miR-485抑制剂(“miR485-3p ASO”)转染的小鼠原代皮层神经元中SIRT1和PGC-1α蛋白的蛋白质印迹结果。图5B提供图5A中所示结果的定量比较。

[0081] 图6A、6B和6C示出miR-485抑制剂在功能上结合至SIRT1的3'UTR。图6A是SIRT1

3'-UTR中野生型(WT)或突变体形式(MT)的示意性图示,示出推定miR-485-3p靶位点。图6B提供用SIRT1 3'-UTR WT或MT报告基因构建体和miR-对照、miR-485-3p共转染48小时的HEK293T细胞中的相对荧光素酶活性的比较。进行了至少三个独立实验。图6C提供与SIRT1的WT 3'-UTR相比,miR485-3p相对结合到具有突变体种子区的SIRT1的3'-UTR上的比较。

[0082] 图7A、7B、7C、7D、7E、7F和7G示出miR-485抑制剂减少A β 沉积并改变APP加工。图7A提供在10月龄5XFAD小鼠中miR-485抑制剂ICV注射的时间表。图7B提供来自注射了对照(n=5)和miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=5)的5XFAD小鼠的皮层和海马DG区中A β (6E10)的免疫组织化学染色的代表性图像。图7C提供图7B中所示结果的定量比较(A β 斑块的平均数量/mm²)。图7D提供注射了对照(n=3)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=3)的10月龄5XFAD小鼠中不溶性A β 级分的免疫印迹。图7E提供图7D中所示数据的定量比较。左侧条形代表对照组,并且右侧条形代表miR-485抑制剂转染组。图7F提供示出注射了对照(n=3)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=3)的10月龄5XFAD小鼠中APP、sAPP β 、sAPP α 、 β -CTF、BACE1、Adam10、SIRT1和PGC-1 α 蛋白表达的蛋白质印迹。图7G提供图7F中所示数据的定量比较(即,相对水平)。在图7G所示的每个图中,左侧条形代表对照组,并且右侧条形代表miR-485抑制剂组。

[0083] 图8A、8B、8C、8D、8E、8F、8G和8H示出miR-485抑制剂通过增加CD36表达在体外和体内增强A β 的吞噬作用。图8A提供注射了对照(来自五只小鼠的n=11个图像)或miR485-3p ASO("miR485-3p ASO")(来自五只小鼠的n=11个图像)的5XFAD小鼠的冠状切片上Iba1(小胶质细胞)和 β -淀粉样蛋白1-16 (6E10,以检测A β 斑块)的免疫组织化学分析。图8B提供图8A所示数据的定量比较(Iba1⁺A β ⁺细胞的平均数量/mm²)。图8C提供对施用了对照(来自三只小鼠的n=7个图像)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(来自三只小鼠的n=7个图像)的小鼠的海马体和皮层中的A β 斑块的ThS染色的代表性图像。图8D提供图8C中所示数据的定量比较。图8E提供示出在用以下之一转染和/或处理的小鼠原代混合神经胶质细胞中原代神经胶质细胞(Iba1⁺)对A β 斑块(A β 1-42)的摄取的免疫组织化学分析:(i)用对照寡核苷酸转染,(ii)用fA β (1-42)(1 μ M)处理,或(iii)用miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")转染并用fA β (1-42)(1 μ M)处理。图8F提供使用抗Iba1、抗CD68(吞噬体)和抗 β -淀粉样蛋白1-16 (6E10),来自注射了对照(n=6)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=6)的5XFAD小鼠的组织学脑切片的免疫组织化学分析。图8G提供图8F中所示结果的定量比较(Iba1⁺A β ⁺CD68⁺细胞的平均数量/mm²)。图8H提供用对照寡核苷酸或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")转染并进一步用fA β (1-42)(1 μ M)处理的BV2小胶质细胞上清液中A β 水平的比较。处理4小时后收集上清液并使用ELISA进行分析。

[0084] 图9A、9B、9C、9D和9E示出miR-485抑制剂可增加CD36表达。图9A提供注射了对照(n=3)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=3)的10月龄5XFAD小鼠中CD36蛋白表达的相对水平的比较。图9B提供图9A中所示结果的定量比较。图9C提供使用抗Iba1和抗 β -淀粉样蛋白1-16 (6E10),来自对照或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")处理的5XFAD小鼠的组织学脑切片的免疫组织化学分析。图9D提供如使用Alexa488缀合的抗CD36抗体通过流式细胞术所测量,在对照(n=3)、miR485-3p模拟物或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=3)转染的原代混合神经胶质细胞中CD36的细胞表面表达。图9E提供图9D中所示结果的定量比较(相对平均荧光强度)。

[0085] 图10示出miR-485抑制剂可功能性地结合至CD36的3'-UTR。测量用CD36 3'-UTR WT或MT报告基因构建体和miR-对照或miR-485抑制剂共转染48小时的HEK293T细胞中的相对荧光素酶活性。

[0086] 图11示出miR-485抑制剂可通过CD36调控促进A β 吞噬作用增加。用对照寡核苷酸或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")转染并进一步用fA β (1-42) (1 μ M)处理的BV2小胶质细胞上清液中的A β 水平。在指明的情况下,还添加了阻断性抗CD36抗体。处理4小时后收集上清液并使用ELISA进行分析。

[0087] 图12A、12B、12C、12D、12E、12F、12H、12I和12J示出miR-485抑制剂可减轻神经胶质细胞中的神经炎症。图12A提供示出用fA β (1-42) (1 μ M)处理3或6小时的对照或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")转染的原代混合神经胶质细胞中SIRT1、NF- κ B (p65)、TNF- α 和IL-1 β 蛋白表达的蛋白质印迹分析。"(1)"对应于仅用对照寡核苷酸转染的细胞。"(2)"对应于仅用fA β (1-42)处理的细胞。"(3)"对应于用miR-485抑制剂转染并用fA β (1-42)处理的细胞。图12B提供图12A中提供的结果的定量比较。在图12B所示的每个图中,左侧的条形代表对照,中间的条形代表仅用fA β (1-42)处理的细胞,并且右侧的条形代表用miR-485抑制剂转染并用fA β (1-42)处理的细胞。图12C提供注射了对照(n=3)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=3)的10月龄5XFAD小鼠中Iba1、NF- κ B (p65)、TNF- α 和IL-1 β 蛋白的免疫印迹检测。示出来自两个独立实验的结果(即,集合#1和集合#2)。图12D提供图12C中所示结果的定量比较。在图12D所示的每个图中,左侧条形代表对照组,并且右侧条形代表miR-485抑制剂组。图12E提供注射了对照(来自五只小鼠的n=11个图像)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(来自五只小鼠的n=11个图像)的5XFAD小鼠中Iba1和TNF- α 表达的免疫组织化学分析。图12F提供图12E中所示结果的定量比较(Iba1和TNF- α 染色细胞的平均数量/mm²)。图12G提供注射了对照(来自五只小鼠的n=11个图像)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(来自五只小鼠的n=11个图像)的5XFAD小鼠中Iba1和IL-1 β 表达的免疫组织化学分析。图12H提供图12G中所示结果的定量比较(Iba1和IL-1 β 染色细胞的平均数量/mm²)。图12I和12J提供在用mPFF(小鼠 α 突触核蛋白聚集形式;1 μ g/mL)和不同浓度的miR-485抑制剂(50和100nM)处理的原代混合神经胶质细胞的上清液中观察到的TNF- α (图12I)和IL-1 β (图12J)的量的比较。

[0088] 图13A、13B、13C、13D、13E、13F和13G示出miR-485抑制剂改善神经元损失、促进神经发生并增加突触后。图13A提供示出注射了对照(n=3)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=5)的10月龄5XFAD小鼠的海马体(左)和皮层(右)中NeuN和裂解的半胱天冬酶3蛋白表达的免疫印迹。图13B提供图13A中提供的结果的定量比较。图13C提供示出来自注射了对照(n=4)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=5)的10月龄5XFAD小鼠的冠状脑切片中NeuN和裂解的半胱天冬酶-3表达的免疫组织化学分析。图13D提供图13C中所示结果的定量比较(NeuN和裂解的半胱天冬酶-3染色细胞的平均数量/mm²)。图13E提供注射了对照(n=3)或miR-485抑制剂("miR485-3p ASO")(n=5)的10月龄5XFAD小鼠中PSD-95蛋白表达的免疫印迹分析。示出来自两个独立实验的结果(即,集合#1和集合#2)。图13F提供图13E中所示结果的定量比较。图13G提供对照小鼠或用miR-485抑制剂处理的5XFAD小鼠的脑组织中双皮质素(DCX)阳性细胞的比较。

[0089] 图14A和14B示出miR-485抑制剂改善5XFAD小鼠中的认知减退。图14A和14B提供来

自分别用对照寡核苷酸或miR-485抑制剂(“miR485-3p ASO”)处理的小鼠(10月龄5XFAD小鼠)的Y-迷宫和被动回避测试的结果。注射了对照或miR485-3p的5XFAD小鼠的平均交替(%)和Y-迷宫上每个臂中的总进入数。在被动回避测试中注射了对照或miR485-3p的5XFAD小鼠在黑暗隔室中的平均步入潜伏期(step through latency)和时间(秒)。

[0090] 图15提供如通过5XFAD小鼠所证明,miR-485抑制剂可治疗阿尔茨海默氏病的可能的非限制性不同方式的示意图。5XFAD中的miR-485抑制剂可增加神经元中的SIRT1表达。SIRT1进而可通过调控淀粉样蛋白产生酶来减少 β 淀粉样蛋白产生。此外,miR-485抑制剂可增强神经胶质细胞中的CD36表达和 $A\beta$ 斑块的吞噬作用。同时,miR-485抑制剂可诱导SIRT1表达并减轻神经炎症和神经元损伤。

[0091] 图16A、16B和16C示出在单次脑室内施用miR-485抑制剂后SIRT1和PGC-1 α 的表达在小鼠脑皮层中增加。图16A提供在施用miR-485抑制剂(100 μ g/小鼠)后6、24、48和72小时SIRT1(左图)和PGC-1 α (右图)的表达水平。图16B和16C分别示出在约50小时过程中SIRT1和PGC-1 α 表达与时间之间的正相关。在图16A、16B和16C中的每个中,SIRT1和PGC-1 α 表达水平显示为针对对照(即,未用miR-485抑制剂处理的小鼠中的表达水平)归一化。图16A中提供的百分比值代表在施用miR-485抑制剂后48小时SIRT1和PGC-1 α 表达相对于对照的平均百分比增加。在图16A中,所提供的p值表示t检验的p值。在图16B和16C中,所提供的p值表示皮尔逊相关性的p值。“C.C”表示皮尔逊相关性的相关系数。

[0092] 图17A、17B和17C示出,在单次静脉内施用miR-485抑制剂后,SIRT1和PGC-1 α 的表达在小鼠脑的海马体中增加。图17A提供在施用miR-485抑制剂(100 μ g/小鼠)后6、24、48和72小时SIRT1(左图)和PGC-1 α (右图)的表达水平。图17B和17C分别示出在约24小时过程中SIRT1和PGC-1 α 表达与时间之间的正相关。在图17A、17B和17C中的每个中,SIRT1和PGC-1 α 表达水平显示为针对对照(即,未用miR-485抑制剂处理的小鼠中的表达水平)归一化。图17A中提供的百分比值代表在施用miR-485抑制剂后24小时SIRT1和PGC-1 α 表达相对于对照的平均百分比增加。在图17A中,所提供的p值表示t检验的p值。在图17B和17C中,所提供的p值表示皮尔逊相关性的p值。“C.C”表示皮尔逊相关性的相关系数。

[0093] 图18A和18B示出在单次静脉内施用miR-485抑制剂(100 μ g/小鼠)后,CD36的表达在小鼠脑中增加。图18A提供在施用miR-485抑制剂(100 μ g/小鼠)后24、48、72和120小时的CD36表达水平。图18B示出在约80小时的过程中CD36表达与时间之间的正相关。在图18A和18B中的每个中,CD36表达显示为针对对照(即,未用miR-485抑制剂处理的小鼠中的表达水平)归一化。图18A中提供的百分比值代表在施用miR-485抑制剂后48小时CD36表达相对于对照的平均百分比增加。在图18A中,所提供的p值表示t检验的p值。在图18B中,所提供的p值表示皮尔逊相关性的p值。“C.C”表示皮尔逊相关性的相关系数。

[0094] 图19A和19B示出miR-485抑制剂的施用分别对雄性大鼠和雌性大鼠的体重没有可观察到的影响。如所示,雄性大鼠和雌性大鼠接受了以下剂量的miR-485抑制剂之一:(i) 0mg/kg (G1), (ii) 3.75mg/kg (G2), (iii) 7.5mg/kg (G3), 和 (iv) 15mg/kg (G4)。在miR-485抑制剂施用后第0天、第3天、第7天和第14天测量体重。

[0095] 图20A和20B示出,miR-485抑制剂的施用分别对雄性大鼠和雌性大鼠的死亡率没有影响。如所示,雄性大鼠和雌性大鼠接受了以下剂量的miR-485抑制剂之一:(i) 0mg/kg (G1), (ii) 3.75mg/kg (G2), (iii) 7.5mg/kg (G3), 和 (iv) 15mg/kg (G4)。从miR-485抑制剂施

用后0至14天每天测量动物的死亡率。

[0096] 图21A和21B示出当分别向雄性大鼠和雌性大鼠施用miR-485抑制剂的施用没有持久的临床副作用。如所示,雄性大鼠和雌性大鼠接受了以下剂量的miR-485抑制剂之一:(i) 0mg/kg (G1), (ii) 3.75mg/kg (G2), (iii) 7.5mg/kg (G3), 和(iv) 15mg/kg (G4)。测量到的不良反应包括以下:(i) NOA(无可观察到的异常), (ii) 充血(尾部), (iii) 水肿(面部), (iv) 水肿(前肢)和(v) 水肿(后肢)。在miR-485抑制剂施用后0小时、0.5小时、1小时、2小时、4小时、6小时、1天、3天、5天、8天、11天和14天测量副作用。

[0097] 图22A和22B示出miR-485抑制剂的施用分别在雄性大鼠和雌性大鼠中没有可观察到的病理异常。如所示,雄性大鼠和雌性大鼠接受了以下剂量的miR-485抑制剂之一:(i) 0mg/kg (G1), (ii) 3.75mg/kg (G2), (iii) 7.5mg/kg (G3), 和(iv) 15mg/kg (G4)。

[0098] 图23A、23B、23C、23D、23E、23F、23G、23H、23I、23J和23K示出miR-485抑制剂施用在帕金森氏病小鼠模型(即,6-OHDA小鼠)中的治疗效果。图23A提供实验设计的示意图。图23B提供用PBS或miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠的转棒潜伏期(如实施例所述,动物从转棒跑步机上跌落的时间)的比较。图23C提供对于用PBS或miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠,动物从金属丝笼跌落时的潜伏期的比较。图23D提供用PBS或miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠爬下杆所用时间的比较。图23E提供用PBS或miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠的脚滑数目(左图)和跨过梁的长度所用时间的比较。图23F和23H提供分别示出来自以下组的小鼠的黑质(SN)和纹状体(STR)中酪氨酸羟化酶(TH)表达的蛋白质印迹分析:(i) 用PBS处理的野生型小鼠(Con+PBS;左起第1列和第3列);(ii) 用PBS处理的6-OHDA小鼠(Exp+PBS;左起第2列和第4列);(iii) 用miR-485抑制剂处理的野生型小鼠(Con+miR-485;左起第5列和第7列);以及(iv) 用miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠(Exp+miR-485;左起第6列和第8列)。图23G和23I分别提供图23F和23H中所示结果的定量比较(相对TH表达)。图23J提供示出如在来自不同处理组的小鼠的黑质中测量的以下蛋白质的表达的蛋白质印迹分析:TNF- α 、IL-1 β 、Iba1、GFAP和 β -肌动蛋白(对照)。不同的处理组是如下:(i) 用PBS处理的野生型小鼠(Con+PBS;左起第1列和第3列);(ii) 用PBS处理的6-OHDA小鼠(Exp+PBS;左起第2列和第4列);(iii) 用miR-485抑制剂处理的野生型小鼠(Con+miR-485;左起第5列和第7列);以及(iv) 用miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠(Exp+miR-485;左起第6列和第8列)。图23K提供图23J中所示的IL-1 β 表达的定量比较。

[0099] 图24A和24B分别示出miR-485抑制剂对原代皮层神经元和原代混合神经胶质细胞中自噬的影响。图24A提供比较在用mPFF小鼠 α 突触核蛋白聚集形式;1 μ g/mL)和增加浓度的miR-485抑制剂处理的原代皮层神经元中p62和LC3B的表达的蛋白质印迹结果。在图24A中,左侧的凝胶显示处理24小时后的结果,并且右侧的凝胶表示处理48小时后的结果。图24B提供比较在用mPFF小鼠 α 突触核蛋白聚集形式;1 μ g/mL)和增加浓度的miR-485抑制剂处理的原代混合神经胶质细胞中p62和LC3B的表达的蛋白质印迹结果。在图24A和24B中的每个中,第一列(从左起)表示未处理的细胞(即,没有mPFF且没有miR-485抑制剂),并且第二列(从左起)表示仅mPFF处理的细胞。

[0100] 图25A和25B分别示出小鼠海马体中的病毒载体注射部位和慢病毒诱导的miR-485-3p过表达。图25A示出目标双侧病毒载体注射部位(即,后部海马体中的齿状回(DG)和CA1)。图25B示出后部和前部海马体DG和CA1中的绿色荧光蛋白(GFP)表达。

[0101] 图26示出用于认知和记忆的啮齿动物行为测试的方案。OFT (旷场实验)、Y-迷宫、NORT (新物体识别测试) 和PAT (被动回避测试) 在指定日期进行。

[0102] 图27A和27B示出来自注射了lenti-对照载体 (n=8) (黑色条形) 或lenti-miR485-3p载体 (n=7) (灰色条形) 的小鼠的旷场试验 (OFT) 的结果。图27A提供注射了对照或lenti-miR485-3p载体的小鼠行进30分钟的总距离 (cm)。图27B提供注射了对照或lenti-miR485-3p载体的小鼠的中心区活性 (%)。误差条表示平均值±平均值的标准误差 (SEM)。统计显著性通过非配对t检验、然后邦弗朗尼 (Bonferroni) 事后统计检验确定。

[0103] 图28A和28B示出来自注射了lenti-对照载体 (n=8) (黑色条形) 或lenti-miR485-3p载体 (n=7) (灰色条形) 的小鼠的Y-迷宫测试的结果。图28A示出Y-迷宫上每个臂的总进入数, 并且图28B示出注射了对照或lenti-miR485-3p的小鼠的平均交替 (%)。P值=0.795。误差条表示平均值±SEM。统计显著性通过非配对t检验、然后邦弗朗尼事后统计检验确定。

[0104] 图29A、29B、29C、29D、29E、29F和29G示出来自注射了lenti-对照载体或lenti-miR485-3p载体的小鼠的新物体识别测试 (NORT) 的结果。图29A示出新物体识别测试实验方案。实施例19 (在“新物体识别测试”下) 提供了实验方案的详细描述。图29B示出来自不同处理组的动物在短期记忆测试后对新的或熟悉物体的偏好 (物体x miR485-3p相互作用p值=0.1288; 物体p=0.5287, $F(1,22)=0.4098$; 病毒p=0.0143, $F(1,22)=7.075$; lenti-对照n=11, lenti-mir485-3p n=9)。图29C示出来自不同处理组的动物在被放置在室中后第3天 (或物体识别训练后的第二天) (长期记忆测试2) 对新的或熟悉物体的偏好 (物体x mir485-3p相互作用p值<0.0001, $F(1,26)=33.75$, 物体p=0.0459, $F(1,26)=43.18$; lenti-对照n=8, lenti-mir485-3p n=7)。图29D示出来自不同处理组的动物在被放置在室中后第24天 (或物体识别训练后第22天) (长期记忆测试3) 对新的或熟悉物体的偏好 (物体x mir485-3p相互作用p值=0.0169, $F(1,26)=6.523$, 物体p<0.0001, $F(1,26)=37.29$; lenti-对照n=8, lenti-mir485-3p n=7)。图29E、29F和29G分别基于图29B、29C和29D中提供的结果提供辨别指数 (区分新物体与熟悉物体的能力)。误差条表示平均值±SEM。统计显著性通过双因素Anova和非配对t检验、然后邦弗朗尼事后统计检验确定。N.S.=不显著。

[0105] 图30示出对于注射了lenti-对照载体 (n=8) (黑色) 或lenti-miR485-3p载体 (n=7) (灰色) 小鼠, 来自被动回避测试 (PAT) 的结果, 即进入潜伏时间 (秒)。P值=0.18, 误差条表示平均值±SEM。统计显著性通过非配对t检验、然后邦弗朗尼事后统计检验确定。

[0106] 图31A和31B示出来自测试淀粉样蛋白 β (A β) 产生和A β 的神经元至神经元扩散的实验设计和结果。图31A示出如实施例19中所述的实验设计。图31B示出测试病毒表达 (分别为第3和第6个图像) 和 β 淀粉样蛋白 (分别为第2和第5个图像) 的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。

[0107] 图32示出来自测试裂解的tau (C3) 产生和裂解的tau的神经元至神经元扩散的结果。它示出测试病毒表达 (分别为第3和第6个图像) 和裂解的tau产生 (C3) (分别为第2和第5个图像) 的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。

[0108] 图33A和33B分别示出来自测试PSD-95和突触素蛋白表达的结果。图33A示出测试病毒表达 (分别为第3和第6个图像) 和PSD-95蛋白表达 (分别为第2和第5个图像) 的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。图33B示出测试病毒表达 (分别为第3和第6个图像) 和突触素蛋白表达 (分别为第2和第5个图像) 的lenti-对照载体或

lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。

[0109] 图34示出来自测试裂解的半胱天冬酶3蛋白表达的结果。它示出测试病毒表达(分别为第3和第6个图像)和裂解的半胱天冬酶3表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。

[0110] 图35A、35B和35C示出实验设计(图35A)和来自测试小鼠原代小胶质细胞中小胶质细胞特异性标志物(离子化钙结合衔接蛋白-1(Iba-1)(图35B))和裂解的半胱天冬酶3蛋白表达(图35C)的结果。图35A示出如实施例19中所述的实验设计。图35B示出测试病毒表达(分别为第3和第6个图像)和Iba-1表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。图35C示出测试小鼠原代小胶质细胞中病毒表达(分别为第3和第6个图像)和裂解的半胱天冬酶3表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。

[0111] 图36A和36B分别示出测试小鼠原代星形胶质细胞中星形胶质细胞特异性标志物、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和裂解的半胱天冬酶3蛋白表达的结果。图36A示出测试小鼠原代星形胶质细胞中病毒表达(分别为第3和第6个图像)和GFAP表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。图36B示出测试小鼠原代星形胶质细胞中病毒表达(分别为第3和第6个图像)和裂解的半胱天冬酶3蛋白表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。

[0112] 图37A、37B和37C示出实验设计(图37A)和来自测试人小胶质细胞中小胶质细胞特异性标志物(离子化钙结合衔接蛋白-1(Iba-1)(图37B))和裂解的半胱天冬酶3蛋白表达(图37C)的结果。图37A示出如实施例19中所述的实验设计。图37B示出测试人小胶质细胞中病毒表达(分别为第3和第6个图像)和Iba-1表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。图37C示出测试人小胶质细胞中病毒表达(分别为第3和第6个图像)和裂解的半胱天冬酶3表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。

[0113] 图38A和38B分别示出测试人星形胶质细胞中星形胶质细胞特异性标志物、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和裂解的半胱天冬酶3蛋白表达的结果。图38A示出测试人星形胶质细胞中病毒表达(分别为第3和第6个图像)和GFAP表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。图38B示出测试人星形胶质细胞中病毒表达(分别为第3和第6个图像)和裂解的半胱天冬酶3蛋白表达(分别为第2和第5个图像)的lenti-对照载体或lenti-miR485-3p转导细胞的免疫细胞化学结果。

[0114] 图39A、39B、39C和39D示出两种不同剂量(2mg/kg或5mg/kg)的miR-485抑制剂在帕金森氏病小鼠模型(即,6-OHDA)中的治疗效果。用PBS处理的健康动物和6-OHDA小鼠用作对照。图39A提供转棒潜伏期(如实施例19中所述,动物从转棒跑步机上跌落的时间)的比较。图39B提供爬下杆所用时间的比较。图39C提供动物从金属丝笼跌落时的潜伏期的比较。图39D提供在跨过梁的长度中发生的脚滑数目的比较。在各图中,“(1)”对应于健康对照组;“(2)”对应于用PBS处理的6-OHDA小鼠;“(3)”对应于用2.5mg/kg的miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠;并且“(4)”对应于用5mg/kg的miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠。

[0115] 图40A、40B、40C和40D示出miR-485抑制剂对BV2小胶质细胞中的自噬的影响。图

40A提供比较用纤维状淀粉样蛋白 β (oA β) 处理并用不同剂量的miR-485抑制剂 (0nM、50nM、100nM或300nM) 转染的BV2细胞中FOXO3a、LC3-I和LC3-II蛋白的表达的蛋白质印迹结果。既没有用oA β 处理也没有用miR-485抑制剂转染的细胞用作对照。图40B、40C和40D分别提供来自处理组的BV2细胞中FOXO3、p62和LC3-II蛋白表达的定量比较。在每个图中,“(1)”对应于对照细胞(即,既没有用oA β 处理也没有用miR-485抑制剂转染);“(2)”对应于仅用oA β 处理的BV2细胞;“(3)”对应于用oA β 和50nM的miR-485抑制剂处理的BV2细胞;“(4)”对应于用oA β 和100nM的miR-485抑制剂处理的BV2细胞;并且“(5)”对应于用oA β 和300nM的miR-485抑制剂处理的BV2细胞。

具体实施方式

[0116] 本公开涉及miR-485抑制剂的用途,所述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。在一些方面,所述一个或多个miRNA结合位点可结合至内源性miR-485,所述内源性miR-485抑制和/或降低内源性SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性CD36蛋白和/或CD36基因的表达水平。类似地,在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性PGC-1 α 的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性LRRK2和/或LRRK2基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性NRG1蛋白和/或NRG1基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性STMN2蛋白和/或STMN2基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性NXP1蛋白和/或NXP1基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可抑制和/或降低内源性突触素蛋白和/或突触素基因的表达水平。在一些方面,内源性miR-485与一个或多个miRNA结合位点的结合可促进和/或增加内源性半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的表达水平。

[0117] 因此,在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平可用于治疗与SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中CD36蛋白和/或CD36基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中CD36蛋白和/或CD36基因的水平可用于治疗与CD36蛋白和/或CD36基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方

面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因的水平可用于治疗与PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中LRRK2蛋白和/或LRRK2基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的水平可用于治疗与LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中NRG1蛋白和/或NRG1基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中NRG1蛋白和/或NRG1基因的水平可用于治疗与NRG1蛋白和/或NRG1基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中STMN2蛋白和/或STMN2基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中STMN2蛋白和/或STMN2基因的水平可用于治疗与STMN2蛋白和/或STMN2基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中VLDLR蛋白和/或VLDLR基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的水平可用于治疗与VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中NRXN1蛋白和/或NRXN1基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的水平可用于治疗与NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中GRIA4蛋白和/或GRIA4基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的水平可用于治疗与GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中NXPH1蛋白和/或NXPH1基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的水平可用于治疗与NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中PSD-95蛋白和/或PSD-95基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的水平可用于治疗与PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种增加有需要的受试者中突触素蛋白和/或突触素基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,增加受试者中突触素蛋白和/或突触素基因的水平可用于治疗与突触素蛋白和/或突触素基因的水平降低相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。在一些方面,本公开涉及一种降低有需要的受试者中半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用miR-485抑制剂。在其它方面,降低受试者中半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的水平可用于治疗与半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的水平增加相关的疾病或疾患(例如,神经变性疾病和病症)。

[0118] 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。

[0119] 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。

[0120] I. 术语

[0121] 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。

[0122] 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,这份说明书仅欲充当一个先行基础。

[0123] 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,本文在短语中使用的术语“和/或”诸如“A和/或B”意为包括:“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)。

[0124] 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。

[0125] 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。

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 核苷酸可以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。

[0129] 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。

[0130] 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。

[0131] 如本文所用,术语“腺相关病毒”(AAV)包括但不限于AAV1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。

[0132] 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。

[0133] 如本文所用,术语“与……相关”是指两种或更多种实体或属性之间的密切关系。例如,当用于描述可用本公开治疗的疾病或疾患(例如,与异常SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水平相关的疾病或疾患)时,术语“与……相关”是指当受试者表现出所述蛋白质和/或基因的异常表达时,受试者患有疾病或疾患的可能性增加。在一些方面,所述蛋白质和/或基因的异常表达引起所述疾病或疾患。在一些方面,异常表达不一定引起所述疾病或疾患,但与所述疾病或疾患相关。可用于确定受试者是否表现出与疾病或疾患相关的蛋白质和/或基因的异常表达的合适方法的非限制性实例在本公开的其它地方提供。

[0134] 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)。

[0135] 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。

[0136] 在一些方面,如果两个或更多个序列彼此100%同一,则它们被称为“完全保守的”。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。

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] 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。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 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。

[0145] 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。

[0146] 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”。

[0147] 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碱基进行比较。

[0148] 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。

[0149] 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)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worldwideweb.ebi.ac.uk/Tools/psa获得。

[0150] 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。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 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worldwideweb.tcoffee.org获得且可替代地可例如从EBI获得的T-Coffee。还应理解,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验证。

[0154] 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。

[0155] 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%。

[0156] 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。

[0157] 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。

[0158] 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)。

[0159] 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。

[0160] 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。

[0161] 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。

[0162] “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,并切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。

[0163] 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。

[0164] 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。

[0165] 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。

[0166] 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。

[0167] 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。

[0168] 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mRNA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)。

[0169] 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。

[0170] 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。

[0171] 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。

[0172] 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。

[0173] 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。

[0174] 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。

[0175] 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。

[0176] 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。

[0177] 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'。

[0178] 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。

[0179] 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。

[0180] 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。

[0181] 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。

[0182] 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”。

[0183] 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(例如,糖尿病)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。

[0184] 术语“下游”是指位于参考核苷酸序列5'的核苷酸序列。

[0185] “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。

[0186] 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)、 β -半乳糖苷酶 (LacZ)、 β -葡萄糖醛酸酶 (Gus) 等。选择性标记物也可被认为是报告基因。

[0187] II. 使用方法

[0188] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可通过调控一种或多种基因的表达和/或活性来发挥治疗效果(例如,在患有神经变性疾病的受试者中)。如本文所述,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂能够调控选自SIRT1、CD36、PGC1、LRRK2、NRG1、STMN2、VLDLR、NRXN1、GRIA4、NXP1、DLG4(在本文中也称为“PSD-95基因”)、SYP(在本文中也称为“突触素基因”)、CASP3(在本文中也称为“半胱天冬酶-3基因”)或它们的组合的基因的表达和/或活性。不受任一种理论的束缚,通过这种调节,miR-485抑制剂可影响许多生物过程,包括但不限于细胞稳态(例如,CD36、SIRT1、PGC1 α)、蛋白质稳态(例如,LRRK2和SIRT1)、与自噬-溶酶体途径相关的那些生物过程(例如,SIRT1和CD36)、吞噬作用(例如,CD36)、神经胶质生物学(例如,CD36和SIRT1)、神经发生/突触发生(例如,SIRT1、PGC1 α 、STMN2和NRG1)、神经炎症(例如,CD36和SIRT1)、与线粒体相关的那些生物过程(例如,PGC1 α)以及它们的组合(例如,SIRT1和PGC1 α)。

[0189] SIRT1调控

[0190] 在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达。

[0191] 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 α ”、“长寿蛋白1型”、“hSIRT1”或“hSIR2”。

[0192] 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“ δ -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。

[0193] 表1.SIRT1蛋白异型体

[0194]

异型体 1 (UniProt: Q96EB6-1) (SEQ ID NO: 31)	MADEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEP LRKRPRRDGPGGLERSPGEPGGAAPEREPVAAA RGCPGAAAAALWREAEEAAAAGGEQEAQAT AAAGEGDNGPGLQGSPREPPLADNLYDEDDDD EGEEEEEA AAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCE SDEEDRASHASSSDWTPRPRIGPYTFVQQHLM GTDPRITLKDLLPETIPPELDDMTLWQIVINILS EPPKRKKRKDINTIEDAVKLLQECKKIIIVLTGA GVSVSCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLDPDQA MFDIEYFRKDP RPFFKFAKEIYPGQFQPSLCHKF IALSDKEGKLLRNYTQNIDTLEQVAGIQRIIQCH GSFATASCLICKYKVDCEAVRGDIFNQVVP RCP RCPADEPLAIMKPEIVFFGENLPEQFHRAMKYD KDEVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIPHEVPQILIN REPLPHLHFDVELLGD CDVIINELCHRLGGEYA KLCCNPVKLSEITEKPPRTQKELAYLSELPTPL HVSEDSSSPERTSPPDSSVIVTLLDQA AKSNDDL DVSESKGCMEEKPQEVQTSRNVESIAEQMENP DLKNVGSSTGEKNERTSVAGTVRK CWP NRVA KEQISRRLDGNQYLFLPPNRYIFHGA EVYSDSE DDVLSSSSCGSNSDSGTCQSPSLEEPMEDESEIE EFYNGLEDEPDVPERAGGAGFGTDGDDQEAIN EASVKQEV TDMNYPSNKS
异型体 2 (UniProt: Q96EB6-2)	MADEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEP LRKRPRRDGPGGLERSPGEPGGAAPEREPVAAA RGCPGAAAAALWREAEEAAAAGGEQEAQAT

[0195]

(SEQ ID NO: 32)	AAAGEGDNGPGLQGSPREPPLADNLYDEDDDD EGEEEEEA AAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCE SDEEDRASHASSSDWTPRPRIGPYTFVQQHLM GTDPRITLKDLLPETIPPELDDMTLWQIVINILS EPPKRKKRKDINTIEDAVKLLQECKKIIIVLTGA GVSVSCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLDPDQA MFDIEYFRKDP RPFFKFAKEIYPGQFQPSLCHKF IALSDKEGKLLRNYTQNIDTLEQVAGIQRIIQCH GSFATASCLICKYKVDCEAVRGDIFNQVVP RCP RCPADEPLAIMKPEIVFFGENLPEQFHRAMKYD KDEVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSNQYLFLPPNR YIFHGA EVYSDSEDDVLSSSSCGSNSDSGTCQS PSLEEPMEDESEIEEFYNGLEDEPDVPERAGGA GFGTDGDDQEAIN EASVKQEV TDMNYPSNKS
--------------------	--

[0196] 如本文所用,术语“SIRT1”(包括其同义词)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”。

[0197] 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%。

[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(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。

[0199] 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。

[0200] 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)水平相关的疾病或疾患的方法。在某些方面,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂),其中所述miR-485抑制剂增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的水平。

[0201] CD36调控

[0202] 如本文所述,申请人已经鉴定人CD36 3'-UTR包含miR-485-3p的靶位点并且miR-485-3p的结合可降低CD36表达(参见例如,实施例7和8)。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中CD36蛋白和/或CD36基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中CD36蛋白和/或CD36基因的表达。

[0203] 分化簇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”。

[0204] 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。

[0205] 表2.CD36蛋白异型体

[0206]	异型体 1 (UniProt: P16671-1) (SEQ ID NO: 36)	MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDL LIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQ FWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRV RFLAKENVQTQDAEDNTVSFLQPNGAIFEPSLSV GTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNS LINKSKSSMFQVRTLRELLWGYRDPFLSLVPYP VTTTVGLFYYPYNNNTADGVYKVFNGKDNISKV AIIDTYKGKRNL SYWESHCDMINGTDAASFPPF VEKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGIPVY
[0207]	异型体 2 (UniProt: P16671-2) (SEQ ID NO: 37)	RFVLPSKAFASPVENPDNYCFCTEKIISKNCTSY GVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASPDVSEPIDG LNPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLL VKPSEKIQVLKLNKRNYIVPILWNETGTIGDE KANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSVGVMFV AFMISYCACRSKTIK
[0207]	异型体 3 (UniProt: P16671-3) (SEQ ID NO: 38)	MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDL LIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQ FWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRV RFLAKENVQTQDAEDNTVSFLQPNGAIFEPSLSV GTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNS LINKSKSSMFQVRTLRELLWGYRDPFLSLVPYP VTTTVGLFYYPYNNNTADGVYKVFNGKDNISKV AIIDTYKGKRNL SYWESHCDMINGTDAASFPPF VEKSQVLQFFSSDICRETCVHFTSSFSVCKS
[0207]	异型体 4 (UniProt: P16671-4) (SEQ ID NO: 39)	MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDL LIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQ FWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRV RFLAKENVQTQDAEDNTVSFLQPNGAIFEPSLSV GTEADNFTVLNLAVAYNNNTADGVYKVFNGK DNISKVAIIDTYKGKRNL SYWESHCDMINGTD AASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVN LKGIPVYRFVLPSKAFASPVENPDNYCFCTEKI SKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASP DVSEPIDGLNPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAK RLQVNLLVKPSEKIQVLKLNKRNYIVPILWLNE TGIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSV GVVMFVAFMISYCACRSKTIK

[0208] 如本文所用,术语“CD36”(包括其同义词)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”。

[0209] 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%。

[0210] 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。

[0211] PGC1调控

[0212] 本文提供的公开内容证明本公开的miR-485抑制剂可进一步调控例如患有本文公开的疾病或病症(参见例如实施例3)的受试者中PGC-1 α 的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中PGC-1 α 蛋白和/或PGC-1 α 基因的表达。

[0213] 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活剂1- α (PGC1- α),也称为PPARG辅激活剂1 α 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- α 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- α 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 α ”或“PGC-1(α)”。

[0214] 存在由选择性剪接产生的至少九种已知的人PGC1- α 蛋白异型体。PGC1- α 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- α 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→LFL;272-798:缺失(SEQ ID NO:41)。PGC1- α 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→MDETSRLEEDWKKVLQREAGWQ(SEQ ID NO: 42)。PGC1- α 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→MDEGYF(SEQ ID NO:43)。PGC1- α 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→MDEGYF;294-301:LTPPTTPP→VKTNLISK;302-798:缺失(SEQ ID NO:44)。PGC1- α 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→MDETSRLEEDWKKVLQREAGWQ;269-271:DPK→LFL;272-798:缺失(SEQ ID NO:45)。PGC1- α 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→MDEGYF;144-150:LKKLLLA→VRTLPTV;151-798:缺失(SEQ ID NO:46)。PGC1- α 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→VKTNLISK;302-798:缺失(SEQ ID NO:47)。PGC1- α 异型体9(也称为“异型体9”或“L-PGG-1 α ”(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- α 异型体的序列。

[0215] 表3.PGC1- α 蛋白异型体

[0216] 异型体 1 (UniProt: Q9UBK2- 1) (SEQ ID NO: 40)	MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCP DLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSQSEII SNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSL PVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLLKLLAPANTQLSYNECSGLST QNHANHNHRIRTNPAIVKTENSWSNKAKSICQQ QKPQRRPCSELLKYLTNDPPHTKPTENRNSS RDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPES PNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTTPP HKANQDNPFRA SPKLKSSCKTVVPPPSKKPRYS ESSGTQGNNSTKKGPEQSELYAQLSKSSVLTGG HEERKTKRPSLRLFGDHDYCSINSKTEILINISQ ELQDSRQLENKDVSSDWQGQICSSTDSDQCYLR ETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAE LNKHFGH PSQAVFDDEADKTGELRDSDFSNEQFSKLPMFI NSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQSYSL FNVSPSCSSFNSPCRDSVSPPKSLFSQRPQRMRS RSRSFSRHRSCSRSPYSR SRSPGSRSSSRSCYY YESSHYRHRTHRNSPLYVRSRSPYSRRPRYD SYEEYQHERLKR EYRREYEKRESERAKQRERQ RQKAIEERRVIYVGKIRPDTTRTELDRDFEVFGEI
--	---

[0217]

	EECTVNLRDDGDSYGFITYRYTCDAFAALENGY TLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDSNSD DFDPASTKSKYDSLDFDSLLEAQRSLRR
异型体 2 (UniProt: Q9UBK2- 2) (SEQ ID NO: 41)	MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCP DLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSQSEII SNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSL PVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLLKLLAPANTQLSYNECSGLST QNHANHNHRIRTNP AIVKTENSWSNKAKSICQQ QKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSS RDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPES PNLFL
异型体 3 (UniProt: Q9UBK2- 3) (SEQ ID NO: 42)	MDETSRLEEDWKKVLQREAGWQCAALVGED QPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCS DQSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTE TLDSL PVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSS MPDGT PPPQEAEEPSLLKLLAPANTQLSYNE CSGLSTQNHANHNHRIRTNP AIVKTENSWSNKA KSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPT NRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSL PLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLT PPTTPPHKANQDNPFRA SPKLKSSCKTVVPPPSK KPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQSELYAQLSKSS VLTGGHEERKTKRPSLRLFGDHDYCQSINSKTEI LINISQELQDSRQLENKDVSSDWQGQICSSTDSD QCYLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAELN KHFGHPSQAVFDDEADKTGELRDSDFSNEQFSK LPMFINSGLAMDGLFDDSEDES DKL SYPWDGT QSYSLFNVSPSCSSFN SPCRD SVPPKSLFSQRPQ RMRSRSRSFSRHRSCSRSPYSRSRSRSPGSRSSSR SCYYYESSHYRHRTHRNSPLYVRSRSRSPYSRR PRYDSYEEYQHERLKREEYRREYEKRESERAKQ RERQRQKAIEERRVIYVGKIRPD TTRTEL RDRFE VFGEIEECTVNLRDDGDSYGFITYRYTCDAFAA LENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADL DSNSDDFD PASTKSKYDSLDFDSLLEAQRSLR R
异型体 4 (UniProt: Q9UBK2- 4) (SEQ ID NO:	MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVN DLDTDSFLGGLKWCSQSEIISNQYNNEPSNIFE KIDEENEANLLAVLTETLDSL PVDEDGLPSFDAL TDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLLK KLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRT NP AIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELL

[0218]

43)	KYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKKKSHT QSQSQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENK TIERTLSVELSGTAGLTPPTTPPHKANQDNPFRA SPKLKSSCKTVVPPPSKKPRYSESSGTQGNNSTK KGPEQSELYAQLSKSSVLTGGHEERKTKRPSLR LFGDHDYCQSINSKTEILINISQELQDSRQLENK DVSSDWQGGQICSSTDSDQCYLRETLEASKQVSP CSTRKQLQDQEIRAELENKHFGHPSQAVFDDEAD KTGELRDSDFSNEQFSKLPMFINSGLAMDGFLD DSEDESKLSYPWDGTQSYSLFNVSPSCSSFNSP CRDSVSPPKSLFSQRPQRMRSRSRSFSRHRSCSR SPYSRSRSRSPGSRSSSRSCYYYESSHYRHRTHR NSPLYVRSRSRSPYSRRPRYDSYEEYQHERLKR EEYRREYEKRESERAKQREERQRQKAIEERRVIY VGKIRPDTTRTELDRFEVFGIEIECTVNLRDDG DSYGFITYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFE LYFCGRKQFFKSNYADLDSNSDDFDPASTKSKY DSLDFDSLLEAKQSLRR
异型体 5 (UniProt: Q9UBK2- 5) (SEQ ID NO: 44)	MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVN DLDTDSFLGGLKWCSQSEIISNQYNNEPSNIFE KIDEENEANLLAVLTETLDSLPLVDEDGLPSFDAL TDGDVTTDNEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSLLK KLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRT NPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELL KYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKKKSHT QSQSQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENK TIERTLSVELSGTAGVKTNLISK
异型体 6 (UniProt: Q9UBK2- 6) (SEQ ID NO: 45)	MDETSPLREEDWKKVLQREAGWQCAALVGED QPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCS DQSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTE TLDSLPLVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSS MPDGTTPPPQEAEEPSLLKLLLAPANTQLSYNE CSGLSTQNHANHNHRIRTNPAIVKTENSWSNKA KSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPT NRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSL PLTPESPFL
异型体 7 (UniProt: Q9UBK2- 7) (SEQ ID NO: 46)	MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVN DLDTDSFLGGLKWCSQSEIISNQYNNEPSNIFE KIDEENEANLLAVLTETLDSLPLVDEDGLPSFDAL TDGDVTTDNEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSLVR TLPTV

[0219]

异型体 8 (UniProt: Q9UBK2- 8) (SEQ ID NO: 47)	MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCP DLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSQSEII SNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSL PVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLLKLLAPANTQLSYNECSGLST QNHANHNHRITNPAIVKTENSWSNKAKSICQQ QKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSS RDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPES PNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGVKTNLIS K
异型体 9 (UniProt: Q9UBK2- 9) (SEQ ID NO: 48)	MPDGTPPPQEAEEPSLLKLLAPANTQLSYNE CSGLSTQNHANHNHRITNPAIVKTENSWSNKA KSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPT NRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTSL PLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLT PPTTPPHKANQDNPFRA SPKLKSSCKTVVPPPSK KPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQSELYAQLSKSS VLTGGHEERKTKRPSLRLFGDHDYCQSINSKTEI LINISQELQDSRQLENKDVSSDWQGQICSSTDSD QCYLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAEIN KHFGHPSQAVFDDEADKTGELRDSDFSNEQFSK LPMFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGT QSYSLFNVSPSCSSFNPCRDVSPPKSLFSQRPQ RMRSRSRFSRHRSCSRSPYSRSPGSRSSSR SCYYYESSHYRHRTHRNSPLYVRSRSPYSRR PRYDSYEEYQHERLKREEYRREYEKRESERAKQ RERQRQKAIEERRVIYVGKIRPDTRTELDRFE VFGEIEECTVNLRDDGDSYGFITYRYTCDAFAA LENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADL DSNSDDFDPA STKSKYDSLDFD SLLKEAQRSLR R

[0220] 如本文所用,术语“PGC1- α ”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的PGC1- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α 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- α ”。

[0221] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使PGC1- α 蛋白和/或PGC1- α 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- α 蛋白和/或PGC1- α 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%。

[0222] 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- α 蛋白和/或PGC1- α 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。

[0223] LRRK2调控

[0224] 在一些方面,本文提供的公开内容证明本公开的miR-485抑制剂可调控例如患有本文公开的疾病或病症(例如,帕金森氏病)的受试者中LRRK2的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的表达。

[0225] 富亮氨酸重复激酶2 (LRRK2) 是人类中由LRRK2基因编码的激酶。LRRK2基因位于人类中12号染色体上(GenBank登录号NC_000012.12的核苷酸40,224,890至40,369,285,正链取向)。LRRK2基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括PARK8、RIPK7、ROC02、AURA17和DARDARIN。

[0226] 下表4提供LRRK2蛋白的氨基酸序列。

[0227] 表4.LRRK2蛋白序列

[0228]

LRRK2 (UniProt: Q5S007.2) (SEQ ID NO: 110)	MASGSCQGCEEDEETLKKLIVRLNNVQEGKQIE TLVQILEDLLVFTYSERASKLFQGNHIVPLLIVL DSYMRVASVQQVGWSLLCKLIEVCPGTMQSLM GPQDVGNDEVLGVHQLILKMLTVHNASVNL VIGLKTLDLLTSGKITLLILDEESDIFMLIFDAM HSFPANDEVQKLGCKALHVLFEVSEEQLTEFV ENKDYMILLSALTNFKDEEEIVLHVLHCLHSLAI PCNNVEVLMSGNVRCYNIVVEAMKAFPMSE QEVSCCLLHRLTLGNFFNILVLNEVHEFVVKAV QQYPENAALQISALSCLALLTETIFLNQDLEEK ENQENDDEGEEDKLFWLEACYKALTWHRKNK HVQEAACWALNNLLMYQNSLHEKIGDEDGHFP AHREVMLSMLMHSSSKEVFQASANALSTLLEQ NVNFRKILLSKGIHLNVLELMQKHIHSPEVAESG CKMLNHLFEGSNTSLDIMA AVVPKILTVMKRHE TSLPVQLEALRAILHFIVPGMPEESREDTEFH LN MVKKQCFKNDIHKLVLAALNRFIGNPGIQKC GLKVISSIVHFPDALEMLSLEGAMDSVLHTLQM YPDDQEIQCLGLSLIGYLITKKNVFIGTGHL LAKI LVSSLYRFKDVAEIQTKGFQILAILKLSASFSKL LVHHSFDLVIFHQMSNIMEQKDQQFLNLCKC FAKVAMDDYLKNVMLERACDQNNSIMVECLLL
--	---

[0229]

LGADANQAKEGSSLICQVCEKESSPKLVELLLNS
 GSREQDVRKALTISIGKGDSQIISLLRRLALDVA
 NNSICLGGFCIGKVEPSWLGPLFPDKTSNLRKQT
 NIASTLARMVIRYQMKSAVEEGTASGSDGNFSE
 DVLSKFDEWTFIPDSSMDSVFAQSDDLSEGESE
 GSFLVKKKSNSISVGEFYRDAVLQRCSPNLQRHS
 NSLGPIFDHEDLLKRKRKILSSDDSLRSSKLQSH
 MRHSDSISSLASEREYITSLDLSANELRDIDALSQ
 KCCISVHLEHLEKLELHQNALTSFPQQLCETLKS
 LTHLDLHSNKFTSFPSYLLKMSCIANLDVSRNDI
 GPSVVLDPVKCPTLKQFNLSYNQLSFVPENLTD
 VVEKLEQLILEGNKISGICSPLRLKELKILNLSKN
 HISSLENFLEACPKVESFSARMNFLAAMPFLPPS
 MTILKLSQNKFSCIPEAILNPLHLRSLDMSSNDIQ
 YLPGPAHWKSLNLRELLFSHNQISILDSEKAYL
 WSRVEKLHLSHNKLKEIPPEIGCLENLTSLDVSY
 NLELRSFPNEMGKLSKIWDLPLDELHLNFDKHI
 GCKAKDIIRFLQQRLKKAVPYNRMKLMIVGNTG
 SGKTTLLQQLMKTKKSDLGMQSATVGIDVKDW
 PIQIRDKRKRDLVLNVWDFAGREEFYSTHPhFM
 TQRALYLAVYDLSKGQAEVDAMKPWLFNIKAR
 ASSPVILVGTHLDVSDEKQRKACMSKITKELLN
 KRGFPAIRDYHFVNATEESDALAKLRKTIINESL
 NFKIRDQLVVGQLIPDCYVELEKIILSERKNVPIE
 FPVIDRKRLQLVRENQLQLDENELPHAVHFLN
 ESGVLLHFQDPALQLSDLYFVEPKWLCKIMAQI
 LTVKVEGCPKHPKGIISRRDVEKFLSKKRKFPKN
 YMSQYFKLLEKFQIALPIGEEYLLVPSSLSDRP
 VIELPHCENSEIIRLYEMPYFPMGFWSRLINRLL
 EISPYMLSGRERALRPNRMYWRQGIYLNWSPEA
 YCLVGSEVLNHPESFLKITVPSCRKGCILLGQV
 VDHIDSLMEEWFPGLLEIDICGEGETLLKKWAL
 YSFNDGEEHQKILLDDLMKKAEEGDLLVNPDPQ
 RLTIPISQIAPDLILADLPRNIMLNNDLEFEQAPE
 FLLGDGSFGSVYRAAYEGEEVAVKIFNKHTSLR
 LLRQELVVLCHLHHPSLISLLAAGIRPRMLVMEL
 ASKGSLDRLLQQDKASLTRTLQHRIALHVADGL
 RYLHSAMIIYRDLKPHNVLLFTLYPNAAIIAKIA
 DYGIAQYCCRMGIKTSEGTGPFRAPEVARGNVI
 YNQQADVYSFGLLLYDILTTGGRIVEGLKFPNEF
 DELEIQGKLPDPVKEYGCAPWPMVEKLIKQCLK
 ENPQERPTSAQVFDILNSAELVCLTRRILLPKNVI
 VECMVATHHNSRNASIWLGCGHTRGQLSFLD

[0230]

```

LNTEGYTSEEVADSRILCLALVHLPVEKESWIVS
GTQSGTLLVINTEDGKKRHTLEKMTDSVTCLYC
NSFSKQSKQKNFLLVGTADGKLAIFEDKTVKLG
GAAPLKILNIGNVSTPLMCLSESTNSTERNVMW
GGCGTKIFSFSNDFTIQKLIETRTSQLFSYAAFSD
SNIITVVVDTALYIAKQNSPVVEVWDKKTEKLC
GLIDCVHFLREVMVKENKESKHKMSYSGRVKT
LCLQKNTALWIGTGGGHILLDLSTRRLIRVIYN
FCNSVRVMMTAQLGSLKNVMLVLGYNRKNTE
GTQKQKEIQSCLTVWDINLPHEVQNLEKHIEVR
KELAEKMRRTSVE

```

[0231] 如本文所用,术语“LRRK2”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的LRRK2的任何变体或异型体。

[0232] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使LRRK2蛋白和/或LRRK2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LRRK2蛋白和/或LRRK2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%。

[0233] 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LRRK2蛋白和/或LRRK2基因的表达。

[0234] NRG1调控

[0235] 本文提供的公开内容证明本公开的miR-485抑制剂可进一步调控例如患有本文公开的疾病或病症(参见例如,帕金森氏病)的受试者中NRG1的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中NRG1蛋白和/或NRG1基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中NRG1蛋白和/或NRG1基因的表达。

[0236] 神经调节蛋白1是人类中由NRG1基因编码的细胞粘附分子。NRG1是神经调节蛋白家族中作用于EGFR受体家族的四种蛋白质之一。NRG1基因位于人类中8号染色体上(GenBank登录号NC_000008.11的核苷酸31,639,245至32,774,046)。NRG1基因的同义词及其编码蛋白是已知的并且包括“GGF”、“HGL”、“HRG”、“NDF”、“ARIA”、“GGF2”、“HRG1”、“HRGA”、“SMDF”、“MST131”、“MSTP131”和“NRG1-IT2”。

[0237] 存在由选择性剪接产生的至少11种已知的人NRG1蛋白异型体。NRG1异型体1(也称为“α”) (UniProt标识符:Q02297-1)的长度是640个氨基酸,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO:91)。NRG1异型体2(也称为“α1A”) (UniProt标识符:Q02297-2)是648个氨基酸长,并且与规范序列的区别如下:234-234:K→KHLGIEFIE(SEQ ID NO:92)。NRG1异型体3(也称为“α2B”) (UniProt标识符:Q02297-3)是462个氨基酸长,并且与规范序列的区别如下:(i) 424-462:YVSAMTTPAR...SPPVSSMTVS→HNLIAELRRN...SSIPHLGFIL;和(ii) 463-640:缺失(SEQ ID NO:93)。NRG1异型体4(也称为“α3”) (UniProt标识符:Q02297-4)由247个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:(i) 234-247:KAEELYQKRVLTIT→SAQMSLLVIAAKTT;和(ii) 248-260:缺失(SEQ ID NO:94)。NRG1异型体6(也称为“β1”和“β1A”) (UniProt标识符:Q02297-6)的长度是645个氨基酸,并且与规范序列的区别如下:213-234:

QPGFTGARCTENVPMKVQNQE→PNEFTGDRCQNYVMASFYKHLGIEFME (SEQ ID NO:95)。NRG1异型体7 (也称为“β2”) (UniProt标识符:Q02297-7) 由647个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:213-233:QPGFTGARCTENVPMKVQNQE→PNEFTGDRCQNYVMASFY (SEQ ID NO:96)。NRG1异型体8 (也称为“β3”和“GGFHFBI”) (UniProt标识符:Q02297-8) 由241个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:(i) 213-241:QPGFTGARCTENVPMKVQNQEKAEEELYQK→PNEFTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE;和(ii) 242-640:缺失 (SEQ ID NO:97)。NRG1异型体9 (也称为“GGF2”和“GGFHPP2”) (UniProt标识符:Q02297-9) 的长度是422个氨基酸,并且与规范序列的区别如下:(i) 1-33:MSERKEGRGKGKGGKKKERGSGKKPESAAGSQSP→MRWRRAPRRS...EVSRLCKRC; (2) 134-168:EIITGMPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSS→A; (3) 213-241:QPGFTGARCTENVPMKVQNQEKAEEELYQK→PNEFTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE;和(iv) 242-640:缺失 (SEQ ID NO:98)。NRG1异型体10 (也称为“SMDF”) (UniProt标识符:Q02297-10) 是296个氨基酸长,并且与规范序列的区别如下:(i) 1-166:缺失; (ii) 167-167:S→MEIYSPDMSE...ETNLQTAPKL; (iii) 213-241:QPGFTGARCTENVPMKVQNQEKAEEELYQK→PNEFTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE;和(iv) 242-640:缺失 (SEQ ID NO:99)。NRG1异型体11 (也称为“IV-β1a型”) (UniProt标识符:Q02297-11) 是590个氨基酸长,并且与规范序列的区别如下:(i) 1-21:缺失; (ii) 22-33:KKPESAAGSQSP→MGKGRAGRVGTT; (iii) 134-168:EIITGMPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSS→A;和(iv) 213-234:QPGFTGARCTENVPMKVQNQE→PNEFTGDRCQNYVMASFYKHLGIEFME (SEQ ID NO:100)。NRG1异型体12 (UniProt标识符:Q02297-12) 由420个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:(i) 213-233:QPGFTGARCTENVPMKVQNQE→PNEFTGDRCQNYVMASFY;和(ii) 424-640:缺失 (SEQ ID NO:101)。

[0238] 下表5提供NRG1蛋白的氨基酸序列,包括已知的异型体。

[0239] 表5.NRG1蛋白序列

[0240]	异型体 1 (UniProt: Q02297-1) (SEQ ID NO: 91)	MSERKEGRGKGKGGKKKERGSGKKPESAAGSQSP ALPRLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLR KWFKNGNELNRKNKPQNIQKKPGKSELINKA SLADSGEYMCKVISKLGNDSASANITIVESNEITG MPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTTT GTSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSR YLCKCQPGFTGARCTENVPMKVQNQEKAEEELYQ
--------	---	---

[0241]

	KRVLITGICIALLVVGIMCVVAYCKTKKQRKKL HDRLRQSLRSENNMMNIANGPHHPNPPENVQL VNQYVSKNVISSEHIVEREAETSFSTSHYTSTAHH STTVTQTPSHSWSNGHTESILSESHSVIVMSSVENS RHSSPTGGPRGRLNGTGGPRECNSFLRHARETPD SYRDSPHSERYVSAMTTTPARMSPVDFHTPSSPKSP PSEMSPPVSSMTVSMPSMAVSPFMEEERPLLLVTP PRLREKKFDHHPQQFSSFHHNPAHDSNSLPASPLR IVEDEEYETTQEYEPAQEPVKKLANSRRAKRTKP NGHIANRLEVDSNTSSQSSNSESETEDETVGEDTP FLGIQNPLAASLEATPAFRLADSRTNPAGRFSTQE EIQARLSSVIANQDPIAV
异型体 2 (UniProt: Q02297-2) (SEQ ID NO: 92)	MSERKEGRGKGKGKKKERGSGKKPESAAGSQSP ALPPRLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF KWFKNGNELNRKNKPQNIQKKPGKSELRINKA SLADSGEYMCKVISKLGNDASANITIVESNEIITG MPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTSTT GTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSR YLCKCQPGFTGARCTENVPMKVQNQEKHLGIEFI EAEELYQKRVLITGICIALLVVGIMCVVAYCKTK KQRKKLHDRLRQSLRSENNMMNIANGPHHPNP PPENVQLVNQYVSKNVISSEHIVEREAETSFSTSH YTSTAHHSTTVTQTPSHSWSNGHTESILSESHSVI VMSSVENS RHSSPTGGPRGRLNGTGGPRECNSFL RHARETPDSYRDSPHSERYVSAMTTTPARMSPVDF HTPSSPKSPSEMSPPVSSMTVSMPSMAVSPFMEE ERPLLLVTPPRLREKKFDHHPQQFSSFHHNPAHDS NSLPASPLRIVEDEEYETTQEYEPAQEPVKKLANS RRAKRTKPNGHIANRLEVDSNTSSQSSNSESETEDE TVGEDTPFLGIQNPLAASLEATPAFRLADSRTNP AGRFSTQEEIQARLSSVIANQDPIAV
异型体 3 (UniProt: Q02297-3) (SEQ ID NO: 93)	MSERKEGRGKGKGKKKERGSGKKPESAAGSQSP ALPPRLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF KWFKNGNELNRKNKPQNIQKKPGKSELRINKA SLADSGEYMCKVISKLGNDASANITIVESNEIITG MPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTSTT GTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSR YLCKCQPGFTGARCTENVPMKVQNQEKAEELYQ KRVLITGICIALLVVGIMCVVAYCKTKKQRKKL HDRLRQSLRSENNMMNIANGPHHPNPPENVQL VNQYVSKNVISSEHIVEREAETSFSTSHYTSTAHH STTVTQTPSHSWSNGHTESILSESHSVIVMSSVENS RHSSPTGGPRGRLNGTGGPRECNSFLRHARETPD

[0242]

	SYRDSPHSERHNLIAELRRNKAHRSKCMQIQLSA THLRSSSIPLGFIL
异型体 4 (UniProt: Q02297-4) (SEQ ID NO: 94)	MSERKEGRGKGKGKKKGERGSGKKPESAAGSQSP ALPPRLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF KWFKNGNELNRKNKPQNIQKKPGKSELRINKA SLADSGEYMCKVISKLGNDASANITIVESNEIITG MPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTSTT GTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSR YLCKCQPGFTGARCTENVPMKVQNQESAQMSLL VIAAKTT
异型体 6 (UniProt: Q02297-6) (SEQ ID NO: 95)	MSERKEGRGKGKGKKKGERGSGKKPESAAGSQSP ALPPRLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF KWFKNGNELNRKNKPQNIQKKPGKSELRINKA SLADSGEYMCKVISKLGNDASANITIVESNEIITG MPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTSTT GTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSR YLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKHLGIEFMEA EELYQKRVLTITICIALLVVGIMCVVAYCKTKK QRKKLHDLRLRQSLRSERNMMNIANGPHHPNPP PENVLVNQYVSKNVISSEHIVEREAETSFSTSHY TSTAHHSTTVTQTPSHSWSNGHTESESLSHVIV MSSVENSRRHSSPTGGPRGRLNGTGGPRECNSFLR HARETPDSYRDSPHSERYVSAMTTTPARMSPVDFH TPSSPKSPPSEMSPPVSSMTVSMPSMAVSPFMEEE RPLLLVTPPRLREKKFDHHPQQFSSFHHPNPAHDS NSLPASPLRIVEDEEYETTQEYEPAQEPVKKLANS RRAKRTKPNGHIANRLEVDSNTSSQSSNSESETED ERVGEDTPFLGIQNPLAASLEATPAFRLADSRTNP AGRFSTQEEIQARLSSVIANQDPIAV
异型体 7 (UniProt: Q02297-7) (SEQ ID NO: 96)	MSERKEGRGKGKGKKKGERGSGKKPESAAGSQSP ALPPRLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF KWFKNGNELNRKNKPQNIQKKPGKSELRINKA SLADSGEYMCKVISKLGNDASANITIVESNEIITG MPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTSTT GTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSR YLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQKRV LTITICIALLVVGIMCVVAYCKTKKQRKKLHDR LRQSLRSERNMMNIANGPHHPNPPPENVLVNQ YVSKNVISSEHIVEREAETSFSTSHYTSTAHHSTTV TQTPSHSWSNGHTESESLSHVIVMSSVENSRRHS SPTGGPRGRLNGTGGPRECNSFLRHARETPDSYR DSPHSERYVSAMTTTPARMSPVDFHTPSSPKSPPSE MSPPVSSMTVSMPSMAVSPFMEEERPLLLVTPPR

[0243]

	LREKKFDHHPQQFSSFHHNPAHDSNSLPASPLRIV EDEEYETTQEYEPAQEPVKKLANSRRAKRTKPNG HIANRLEVDSNTSSQSSNSESETEDETVGEDTPFL GIQNPLAASLEATPAFRLADSRTNPAGRFSTQEEI QARLSSVIANQDPIAV
异型体 8 (UniProt: Q02297-8) (SEQ ID NO: 97)	MSERKEGRGKGKGKKKERGSGKKPESAAGSQSP ALPRLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF KWFKNGNELNRKNKPQNIQKKPGKSELRINKA SLADSGEYMCKVSKLGNDASANITIVESNEIITG MPASTEGAYVSSSPIRISVSTEGANTSSSTSTSTT GTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSR YLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE
异型体 9 (UniProt: Q02297-9) (SEQ ID NO: 98)	MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLP LLLLGTAAALAPGAAAGNEAAPAGASVCYSSPPS VGSVQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQQGALDRKA AAAAGEAGAWGGDREPPAAGPRALGPPAEPLL AANGTVPSWPTAPVPSAGEPGEEAPYLVKVHQQV WAVKAGGLKKDSLTVRLGTWGHAPFPSCGRLK EDSRYIFFMEPDANSTSRAPAAFRASFPLETGRN LKKEVSRVLCKRCALPRLKEMKSQESAAGSKLV LRCETSSEYSSLRFKWFKNGNELNRKNKPQNIQ KKPGKSELRINKASLADSGEYMCKVSKLGNDAS SANITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFCVN GGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYV MASFYSTSTPFLSLPE
异型体 10 (UniProt: Q02297-1 0) (SEQ ID NO: 99)	MEIYSPDMSEVAAERSSSPSTQLSADPSLDGLPAA EDMPEPQTEDGRTPGLVGLAVPCCACLEAERLRG CLNSEKICIVPILACLVSCLCIAGLKWWFVDKIFE YDSPTHLDPGGLGQDPIISLATAASAVWVSSEA YTSPVSRAQSESEVQVTVQGDKAVVSFEPSAAPT PKNRIFAFSFLPSTAPSFPSPTRNPEVRTPKSATQP QTTETNLQTAPKLSTSTSTTGTSHLVKCAEKEKT FCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQ NYVMASFYSTSTPFLSLPE
异型体 11 (UniProt: Q02297-1 1) (SEQ ID NO: 100)	MGKGRAGRVGTTALPRLKEMKSQESAAGSKLV LRCETSSEYSSLRFKWFKNGNELNRKNKPQNIQ KKPGKSELRINKASLADSGEYMCKVSKLGNDAS SANITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFCVN GGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYV MASFYKHLGIEFMEAEELYQKRVLITGICIALLV VGIMCVVAYCKTKKQRKKLHDRLRQSLRSERN MMNIANGPHHPNPPENVQLVNQYVSKNVISSEH IVEREAETSFSTSHYTSTAHHSTTVTQTPSHSWSN

	GHTESILSESHSVIVMSSVENSRRHSSPTGGPRGRL NGTGGPRECNSFLRHARETPDSYRDSPHSERYVS AMTTTPARMSPVDFHTPSSPKSPPSEMSPPVSSMTV SMPSMAVSPFMEEERPLLLVTPPRLREKKFDHHP QQFSSFHHNPAHDSNSLPASPLRIVEDEEYETTQE YEPAQEPVKKLANSRRRAKRTKPNGHIANRLEVDS NTSSQSSNSESETEDERVGEDTPFLGIQNPLAASLE ATPAFRLADSRTNPAGRFSTQEEIQARLSSVIANQ DPIAV
[0244]	异型体 12 (UniProt: Q02297-1 2) (SEQ ID NO: 101) MSERKEGRGKGKGKKKERGSGKKPESAAGSQSP ALPPRLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSSRF KWFKNGNELNRKNKPQNIQKKPGKSELRINKA SLADSGEYMCKVISKLGNDASANITIVESNEIITG MPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTSTT GTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSR YLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQKRV LTITICIALLVVGIMCVVAYCKTKKQRKKLHDR LRQSLRSENNMMNIANGPHHPNPPPENVLVNQ YVSKNVISSEHIVEREAETSFSSTSHYTSTAHHSTTV TQTPSHSWSNGHTEILSESHSVIVMSSVENSRRHS SPTGGPRGRLNGTGGPRECNSFLRHARETPDSYR DSPHSER

[0245] 如本文所用,术语“NRG1”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的NRG1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NRG1异型体1(即,规范序列)的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRG1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NRG1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NRG1异型体4的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRG1异型体6的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRG1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NRG1异型体8的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRG1异型体9的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRG1异型体10的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRG1异型体11的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRG1异型体12的表达。在某些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRG1异型体1、NRG1异型体2、NRG1异型体3、NRG1异型体4、NRG1异型体6、NRG1异型体7、NRG1异型体8、NRG1异型体9、NRG1异型体10、NRG1异型体11和NRG1异型体12的表达。除非另外指示,否则NRG1的上述异型体在本文中统称为“NRG1”。

[0246] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使NRG1蛋白和/或NRG1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NRG1蛋白和/或NRG1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%。

[0247] 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NRG1蛋白和/或NRG1基因的表达。

[0248] STMN2调控

[0249] 本文提供的公开内容证明本公开的miR-485抑制剂可进一步调控例如患有本文公

开的疾病或病症(参见例如,帕金森氏病)的受试者中STMN2的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中STMN2蛋白和/或STMN2基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中STMN2蛋白和/或STMN2基因的表达。

[0250] 驿蛋白-2是驿蛋白(stathmin) 磷蛋白家族的成员,并且在人类中由STMN2基因编码。驿蛋白在微管动力学和信号转导中发挥作用。所编码的蛋白质在神经元生长中起调控作用,并且也被认为参与骨生成。STMN2基因位于人类中8号染色体上(NC_000008.11的核苷酸79,611,117至79,666,162)。STMN2基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“SCG10”和“SCGN10”。

[0251] 存在由选择性剪接产生的至少2种已知的人STMN2蛋白异型体。STMN2异型体1(UniProt标识符:Q93045-1)的长度是179个氨基酸,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO:102)。STMN2异型体2(UniProt标识符:Q93045-2)的长度是187个氨基酸,并且与规范序列的区别如下:161-179:ERHAAEVR RNKELQVELSG→LVKFISSELKESIESQFLELQREGEKQ(SEQ ID NO:103)。

[0252] 下表6提供STMN2蛋白的氨基酸序列。

[0253] 表6.STMN2蛋白序列

[0254]	异型体 1 (UniProt: Q93045-1) (SEQ ID NO: 102)	MAKTAMAYKEKMKELSMLSLICSCFYPEPRNI NIYTYDDMEVKQINKRASGQAFELILKPPSPISE APRTLASPKKKDLSEEEIQKKLEAAEERRKSQE AQVLKQLAEKREHEREVLQKALEENNNFSKM AEEKLILKMEQIKENREANLAAIHERLQEKERH AAEVR RNKELQVELSG
	异型体 2 (UniProt: Q93045-2) (SEQ ID NO: 103)	MAKTAMAYKEKMKELSMLSLICSCFYPEPRNI NIYTYDDMEVKQINKRASGQAFELILKPPSPISE APRTLASPKKKDLSEEEIQKKLEAAEERRKSQE AQVLKQLAEKREHEREVLQKALEENNNFSKM AEEKLILKMEQIKENREANLAAIHERLQEKLVK FISSELKESIESQFLELQREGEKQ

[0255] 如本文所用,术语“STMN2”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的STMN2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STMN2异型体1(即,规范序列)的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加STMN2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STMN2异型体1和STMN2异型体2的表达。除非另外指明,否则以上所描述的STMN2异型体在本文中统称为“STMN2”。

[0256] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使STMN2蛋白和/或STMN2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STMN2蛋白和/或STMN2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%。

[0257] 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STMN2蛋白和/或STMN2基因的表达。

[0258] VLDLR调控

[0259] 本文提供的公开内容证明本公开的miR-485抑制剂可进一步调控例如患有本文公

开的疾病或病症(参见例如,阿尔茨海默氏病)的受试者中VLDLR的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的表达。

[0260] 极低密度脂蛋白受体(VLDLR)是低密度脂蛋白(LDL)受体家族的跨膜脂蛋白受体。VLDLR在许多组织中表达并在各种生物过程中发挥重要作用,包括发育中脑中的神经元迁移。在人类中,VLDLR由位于9号染色体上的VLDLR基因编码(NC_000009.12的核苷酸2,621,786至2,660,056)。VLDLR基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“CAMRQ1”、“CARMQ1”、“CHRMQ1”、“VLDLRCH”和“VLDL-R”。

[0261] 存在由选择性剪接产生的至少2种已知的人VLDLR蛋白异型体。VLDLR长异型体(Uniprot标识符:P98155-1)的长度是873个氨基酸,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO:111)。VLDLR短异型体(Uniprot标识符:P98155-2)是845个氨基酸长,并且与规范序列的区别如下:751-779:STATTVTYSETKDTNTTEISATSGLVPGG→R.(SEQ ID NO:112)。表7(以下)提供VLDLR蛋白的氨基酸序列。

[0262] 表7.VLDLR蛋白序列

[0263]

长异 型体 (UniProt: P9815 5-1) (SEQ ID NO: 111)	MGTSALWALWLLLALCWAPRESGATGTGRKAKCEP SQFQCTNGRCITLLWKCDGDEDCVDGSDEKNCVKKT CAESDFVCNNGQCVPSRWKCDGDPDCEDGSDESPEQ CHMRTCRIHEISCGAHSTQCIPVSWRCDGENDCDSGE DEENCGNITCSPDEFTCSSGRCISRNFVCNGQDDCSDG SDELDCAPTCGAHEFQCSTSSCIPISWVCDDDADCSD QSDESLEQCGRQPVHTKCPASEIQCGSGECIHKKWR CDGDPDCKDGSDEVNCPSTRCPDQFECEDGSCIHGS RQCNGIRDCVDGSDEVNCKNVNQCLGPGKFKCRSGE CIDISKVCNQEQDCRDWSDEPLKECHINECLVNNGGC SHICKDLVIGYECDAAGFELIDRKTCGDIDECQNPGE CSQICINLKGGYKCECSRGYQMDLATGVCKAVGKEP SLIFTNRRDIRKIGLERKEYIQLVEQLRNTVALDADIA AQKLFWADLSQKAIFSASIDDKVGRHVKMIDNVYNP AAIAVDWVYKTIYWTDAASKTISVATLDGTRKFLF NSDLREPASIAVDPLSGFVYWSDWGEPKIEKAGMN GFDRLPLVTADIQWPNGITLDLIKSRLYWLDLHML SSVDLNGQDRRIVLKSLEFLAHPLALTIFEDRVYWIDG ENEAVYGANKFTGSELATLVNNLNDQAQDIIVYHEL VQPSGKNWCEEDMENGGEYLCLPAPQINDHSPKYTC SCPSGYNVEENGRDCQSTATTVTYSETKDTNTTEISA TSGLVPGGINVTTAVSEVSVPPKGTSAAWAILPLLLL VMAAVGGYLMWRNWQHKNMKSMNFDNPVYLKTTE EDLSIDIGRHSASVGHTYPAISVVSTDDDLA
短异 型体 (UniProt: P9815 5-2) (SEQ ID NO: 112)	MGTSALWALWLLLALCWAPRESGATGTGRKAKCEP SQFQCTNGRCITLLWKCDGDEDCVDGSDEKNCVKKT CAESDFVCNNGQCVPSRWKCDGDPDCEDGSDESPEQ CHMRTCRIHEISCGAHSTQCIPVSWRCDGENDCDSGE DEENCGNITCSPDEFTCSSGRCISRNFVCNGQDDCSDG SDELDCAPTCGAHEFQCSTSSCIPISWVCDDDADCSD QSDESLEQCGRQPVHTKCPASEIQCGSGECIHKKWR CDGDPDCKDGSDEVNCPSTRCPDQFECEDGSCIHGS RQCNGIRDCVDGSDEVNCKNVNQCLGPGKFKCRSGE CIDISKVCNQEQDCRDWSDEPLKECHINECLVNNGGC SHICKDLVIGYECDAAGFELIDRKTCGDIDECQNPGE CSQICINLKGGYKCECSRGYQMDLATGVCKAVGKEP SLIFTNRRDIRKIGLERKEYIQLVEQLRNTVALDADIA AQKLFWADLSQKAIFSASIDDKVGRHVKMIDNVYNP

[0264]

	AAIAVDWVYKTIYWTDAASKTISVATLDGTRKFLF NSDLREPASIAVDPLSGFVYWSDWGEPKIEKAGMN GFDRLPLVTADIQWPNGITLDLIKSRLYWLDLHML SSVDLNGQDRRIVLKSLEFLAHPLALTIFEDRVYWIDG ENEAVYGANKFTGSELATLVNNLNDQAQDIIVYHEL VQPSGKNWCEEDMENGGEYLCLPAPQINDHSPKYTC SCPSGYNVEENGRDCQRIINVTTAVSEVSVPPKGTSA AWAILPLLLLVMMAAVGGYLMWRNWQHKNMKSMNFD NPVYLKTTEEDLSIDIGRHSASVGHTYPAISVVSTDD DLA
--	--

[0265] 如本文所用,术语“VLDLR”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的VLDLR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VLDLR长异型体(即,规范序列)的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加VLDLR短异型体的表达。在一

些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加VLDLR长异型体和VLDLR短异型体的表达。除非另外指示,否则VLDLR的上述异型体在本文中统称为“VLDLR”。

[0266] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使VLDLR蛋白和/或VLDLR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VLDLR蛋白和/或VLDLR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%。

[0267] 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VLDLR蛋白和/或VLDLR基因的表达。

[0268] NRXN1调控

[0269] 本文提供的公开内容证明本公开的miR-485抑制剂可进一步调控例如患有本文公开的疾病或病症(参见例如,阿尔茨海默氏病)的受试者中NRXN1的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的表达。

[0270] 轴突蛋白1(NRXN1)是在人类中由NRXN1基因编码的蛋白质。NRXN1基因位于人类中2号染色体上(NC_000003.12的核苷酸49,918,503至51,032,536)。NRXN1基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“PTHSL2”、“SCZD17”和“Hs.22998”。

[0271] 存在由替代启动子使用和选择性剪接产生的至少6种已知的人NRXN1蛋白异型体。NRXN1异型体1a(UniProt标识符:Q9ULB1-1)由1,477个氨基酸组成,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO:104)。NRXN1异型体2a(UniProt标识符:Q9ULB1-2)由1,496个氨基酸组成,并且与异型体1a规范序列的区别如下:379-386:缺失;1239-1239:A→AGNNDNERLAIARQRIPYRLGRVVDEWLLDK;1373-1375:缺失(SEQ ID NO:105)。NRXN1异型体3a(UniProt标识符:Q9ULB1-3)由1,547个氨基酸组成,并且与异型体1a规范序列的区别如下:258-258:→EIKFGLQCVPVLLHDNDQGYCCINTAKPLTEK;386-386:M→MVNKLHCS;1239-1239:A→AGNNDNERLAIARQRIPYRLGRVVDEWLLDK(SEQ ID NO:106)。NRXN1-β异型体4(UniProt标识符:Q9ULB1-4)由139个氨基酸组成,并且与异型体1a规范序列的区别如下:1-1335:缺失;1336-1344:GKPPTKEPI→MDMRWHCEN;1373-1375:缺失(SEQ ID NO:107)。NRXN1异型体1b(UniProt标识符:P58400-2)由472个氨基酸组成,并且已被选择作为NRXN1-β的规范序列(SEQ ID NO:108)。NRXN1-β异型体3b(UniProt标识符:P58400-1)由442个氨基酸组成,并且与异型体1b规范序列的区别如下:205-234:缺失(SEQ ID NO:109)。

[0272] 下表8提供六种NRXN1异型体的序列。

[0273] 表8.NRXN1蛋白异型体

[0274]

异型体 1a (UniProt: Q9ULB1- 1) (SEQ ID NO: 104)	MGTALLQRGGCFLCLSLLLGCWAE LGSGLEFP GAEGQWTRFPKWNACCESEMSFQLKTRSARGLV LYFDDEGFCDLELILTRGGRLQLSFSIFCAEPATL LADTPVNDGAWHSVRIRRQFRNTTLFIDQVEAKW VEVKSKRRDMTVFSGLFVGGLPPELRAAALKLTL ASVREREPFKGWIRDVRVNSSQVLPVDSGEVKLD DEPPNSGGGSPCEAGEEGEGGVCLNGGVCSVVDD QAVCDCSRTGFRGKDCSQEDNNVEGLAHLMMGD QGKSKGKEEYIATFKGSEYFCYDLSQNPIQSSSDEI TLSFKTLQRNGLMLHTGKSADYVNLALKNGAVS LVINLGSGAFEALVEPVNGKFNDNAWHDVKVTR NLRQHSGIGHAMVTISVDGILTTTGYTQEDYTML GSDDFFYVGGSPSTADLPSPVSNFMGCLKEVV YKNNDVRLLESLRAKQGDPKMKIHGVVAFKCN VATLDPITFETPESFISLPKWNAAKKTGSISFDFRTTE PNGLILFSHGKPRHQKDAKHPQMIKVDFFAIEMLD GHLYLLDMGSGTIKIKALLKKVNDGEWYHVDF QRDGRSGTISVNTLRTPYTAPGESEILDLDDEL YLGGLPENKAGLVFPTEVWTALLNYGYVGCIRD LFDGQSKDIRQMAEVQSTAGVKPSCSKETAKPCL SNPCKNNGMCRDGNRYVCDCSGTGYLGRSCERE ATVLSYDGSMFMKIQLPVVMHTEAEDVSLRFRSQR AYGILMATTSRDSADTLRLELDAGRVKLTVNLDC IRINCNSSKGPETLFAGYNLNDNEWHTVRVVRG KSLKLTVDQDQAMTGQMAGDHTRELFHNIETGII TERRYLSVPSNFIGHLQSLTFNGMAYIDLCKNGD IDYCELNARFGFRNIIADPVTFTKSSYVALATLQ AYTSMHLFFQFKTTSLDGLILYNSGDGNDFIVVEL VKGYLHYVFDLGNGANLIKSSNKPLNDNQWHN VMISRDTSNLHTVKIDTKITTQITAGARNLDLKS DLYIGGVAKETYKSLPKLVHAKGFGQCLASVDLN GRLPDLISDALFCNGQIERGCEGPSTTCQEDSCSNQ GVCLQQWDGFSCDCSMTSFSGPLCNDPGTTYIFSK GGGQITYKWPPNDRPSTRADRLAIGFSTVQKEAV LVRVDSSSGLGDYLELHHQKGKIGVKFNVGTDDIA IEESNAIINDGKYHVVRFRTRSGGNATLQVDSWPVI ERYPAGRQLTIFNSQATIIIGGKEQGQPFQGQLSGL YYNGLKVLNMAAENDANIAIVGNVRLVGEVPSS MTTESTATAMQSEMSTSIMETTTTLATSTARRGKP PTKEPISQTTDDILVASAECPSDDEDIDPCEPSSGGL
---	--

[0275]

	ANPTRAGGREPYPGSAEVIRESSSTTGMVVGIVAA AALCILILLYAMYKYRNRDEGSYHVDESRNYISNS AQSNQAVVKEKQPSSAKSSNKNKKNKDKEYYV
异型体 2a (UniProt: Q9ULB1- 2) (SEQ ID NO: 105)	MGTALLQRGGCFLCLSLLLLGCWAEGLSGLEFP GAEGQWTRFPKWNACCESEMSFQLKTRSARGLV LYFDDEGFCDLELILTRGGRLQLSFSIFCAEPATL LADTPVNDGAWHSVRIRRRQFRNTTLFIDQVEAKW VEVKSKRRDMTVFSGLFVGGGLPELRAAALKLTL ASVREREPFKGWIRDVRVNSSQVLPVDSGEVKLD DEPPNSGGGSPCEAGEEGEGGVCLNGGVCSVVDD QAVCDCSRTGFRGKDCSQEDNNVEGLAHLMMGD QGKSKGKEEYIATFKGSEYFCYDLSQNPIQSSDEI TLSFKTLQRNGLMLHTGKSADYVNLALKNGAVS LVINLGSGAFEALVEPVNGKFNDNAWHDVKVTR NLRQVTISVDGILTTTGYTQEDYTMLGSDDFFYVG GSPSTADLPGSPVSNNFMGCLKEVVYKNNDVRL LSRLAKQGDPMKIHGVAFAKCEVATLDPITFET PESFISLPKWNAKKTGSISFDFRTTEPNGLILFSHGK PRHQKDAKHPQMIKVDFFAIEMLDGHLYLDDM GSGTIKIKALLKKVNDGEWYHVDFQRDGRSGTIS VNTLRTPYTAPGESEILDDEL YLGGLPENKAGL VFPTEVWTALLNYGYVGCIRDLFIDGQSKDIRQM AEVQSTAGVKPSCSKETAKPCLSNPCKNNGMCRD GWNRYVCDCSGTGYLGRSCREATVLSYDGSMF MKIQLPVVMHTEAEDVSLRFRSQRAYGILMATT RDSADTLRLELDAGRVKLTVNLDCIRINCNSKGP ETLFAGYNLNDNEWHTVRVVRRGKSLKLTVDQ QAMTGQMAGDHTRLEFHNIETGIITERRYLSSVPS NFIGHLQSLTFNGMAYIDLCKNGDIDYCELNARFG FRNIIADPVTFTKTKSSYVALATLQAYTSMHLFFQF KTTSLDGLILYNSGDGNDFIVVELVKGYLHYVFDL GNGANLIKSSNKPLNDNQWHNVMISRDTSNLHT VKIDTKITTQITAGARNLDLKSDLYIGGVAKETYK SLPKLVHAKGEGFQGCLASVDLNGRLPDLISDALFC NGQIERGCEGPSTTCQEDSCSNQGVCLQQWDGFS CDCSMTSFSGPLCNDPGTTYIFSKGGGQITYKWPP NDRPSTRADRLAIGFSTVQKEAVLVRVDSSSGLGD YLELHHQKIGVKFNVGTDDIAIEESNAIINDGKY HVVRFRTRSGGNATLQVDSWPVIERYPAGNNDNER LAIARQRIPYRLGRVVDEWLLDKGRQLTIFNSQAT IIIGGKEQGQPFQGGQLSGLYYNGLKVLNMAAEND ANIAIVGNVRLVGEVPSSMTTESTATAMQSEMSTS IMETTTTLATSTARRGKPPTKEPISQTTDDILVASA

[0276]

	ECPSDDEDIDPCEPSSANPTRAGGREPYPGSAEVIR ESSSTTGMVVGIVAAAAALCILILLYAMYKYRNRD EGSYHVDESRNYISNSAQSNQAVVKEKQPSSAKSS NKNKKNKDKEYYV
异型体 3a (UniProt: Q9ULB1- 3) (SEQ ID NO: 106)	MGTALLQRGGCFLCLSLLLGCWAE LGSGLEFP GAEGQWTRFPKWNACCESEMSFQLKTRSARGLV LYFDDEGFCDLELILTRGGRLQLSFSIFCAEPATL LADTPVNDGAWHSVRIRRQFRNTTLFIDQVEAKW VEVKSRRDMTVFSGLFVGGLPPELRAAALKLTL ASVREREFPKGWIRDVRVNSSQVLPVDSGEVKLD DEPPNSGGGSPCEAGEEGEGGVCLNGGVCSVVDD QAVCDCSRTGFRGKDCSQEIKFGLQCVLPVLLHD NDQGKYCCINTAKPLTEKDNVVEGLAHLMMGDQ GKSKGKEEYIATFKGSEYFCYDLSQNP IQSSSDEIT LSFKTLQRNGLMLHTGKSADYVNLALKNGAVSL VINLGSGAFEALVEPVNGKFNDNAWHDVKVTRN LRQHSGIGHAMVKNLHCSVTISVDGILTTTGYTQE DYTMLGSDDFFYVGGSPSTADLP GSPVSNNFMGC LKEVVYKNNDVRLELSRLAKQGD PKMKIHGVVA FKCENVATLDPITFETPESFISLPKWN AKKTGSISF DFRTTEPNGLILFSHGKPRHQKDAKHPQMIKVDF AIEMLDGHL YLLLDMSGTIKIKALLKKVNDGEW YHVDFQRDGRSGTISVNTLRTPYTAPGESEILDLD DELYLGGLPENKAGLVFPTEVWTALLNYGYVGCI RDLFIDGQSKDIRQMAEVQSTAGVKPSCSKETAKP CLSNPCKNNGMCRDGNRYVCD CSGTGYLGRSC EREATVLSYDGS MFMKIQLPVVMHTEAEDVSLRF RSQRAYGILMATTSRDSADTLRLELDAGR VKLTV NLDCIRINCNSSKGPETLFAGYNLNDNEWHTVRV VRRGKSLKLTVD DQQAMTGQMAGDHTRLEFHNI ETGIITERRYLSSVPSNFIGHLQSLTFNGMAYIDLC KNGDIDYCELNARFGFRNIIADPVT FKT KSSYVAL ATLQAYTSMHLFFQFKTTS LDGLILYNSGDGNDFI VVELVKGYLHYVFDLGNGANLIK GSSNKPLNDNQ WHNVMISRDTSNLHTVKIDTKITTQITAGARNLDL KSDLYIGGVAKETYKSLPKLVHAK EGFQGCLASV DLNGRLPDLISDALFCNGQIERGCEGPSTTCQEDS CSNQGVCLQQWDGFSCDCSMTSFSG PLCNDPGTT YIFSKGGGQITYKWPPNDRPSTRADRLAIGFSTVQ KEAVLVRVDSSSGLGDYLELHIHQGKIGVKFNVG TDDIAIEESNAIINDGKYHVVRFTRSGGNATLQVD SWPVIERYPAGNNDNERLAIARQRI PYRLGRVVDE WLLDKGRQLTIFNSQATIIIGGKEQGQPFQQLSG

[0277]

	LYYNGLKVLNMAAENDANIAIVGNVRLVGEVPSS MTTESTATAMQSEMSTSIMETTTTLATSTARRGKP PTKEPISQTTDDILVASAECPSDDEDIDPCEPSSGGL ANPTRAGGREPYPGSAEVIRESSSTTGMVVGIVAA AALCILILLYAMYKYRNRDEGSYHVDESRNYISNS AQSNQAVVKEKQPSSAKSSNKNKKNKDKEYYV
异型体 4a (UniProt: Q9ULB1- 4) (SEQ ID NO: 107)	MDMRWHCENSQTTDDILVASAECPSDDEDIDPCE PSSANPTRAGGREPYPGSAEVIRESSSTTGMVVGI VAAAALCILILLYAMYKYRNRDEGSYHVDESRNY ISNSAQSNQAVVKEKQPSSAKSSNKNKKNKDKEY YV
异型体 1b (UniProt: P58400-2) (SEQ ID NO: 108)	MYQRMLRCGAELGSPGGGGGGGGGGGAGGRLA LLWIVPLTSLGLGVAWGASSLGAHHIHHFHGSS KHHSVPIAIYRSPASLRGGHAGTTYIFSKGGGQITY KWPPNDRPSTRADRLAIGFSTVQKEAVLVRVDSSS GLGDYLELHHQKGKIGVKFNVTDDIAIEESNAIIN DGKYHVVRFRTRSGGNATLQVDSWPVIERYPAGN NDNERLAIARQRIPLYRLGRVVDWLLDKGRQLTIF NSQATIIIGGKEQGQPFQGLSGLYYNGLKVLNM AAENDANIAIVGNVRLVGEVPSSMTTESTATAMQ SEMSTSIMETTTTLATSTARRGKPPTKEPISQTTDD ILVASAECPSDDEDIDPCEPSSGGLANPTRAGGREP YPGSAEVIRESSSTTGMVVGIVAAAALCILILLYA MYKYRNRDEGSYHVDESRNYISNSAQSNQAVVK EKQPSSAKSSNKNKKNKDKEYYV
异型体 3b (UniProt: P58400-1) (SEQ ID NO: 109)	MYQRMLRCGAELGSPGGGGGGGGGGGAGGRLA LLWIVPLTSLGLGVAWGASSLGAHHIHHFHGSS KHHSVPIAIYRSPASLRGGHAGTTYIFSKGGGQITY KWPPNDRPSTRADRLAIGFSTVQKEAVLVRVDSSS GLGDYLELHHQKGKIGVKFNVTDDIAIEESNAIIN DGKYHVVRFRTRSGGNATLQVDSWPVIERYPAGR QLTIFNSQATIIIGGKEQGQPFQGLSGLYYNGLKV LNMAAENDANIAIVGNVRLVGEVPSSMTTESTAT AMQSEMSTSIMETTTTLATSTARRGKPPTKEPISQT TDDILVASAECPSDDEDIDPCEPSSGGLANPTRAG GREPYPGSAEVIRESSSTTGMVVGIVAAAALCILIL LYAMYKYRNRDEGSYHVDESRNYISNSAQSNQAVV VKEKQPSSAKSSNKNKKNKDKEYYV

[0278] 如本文所用,术语“NRXN1”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的NRXN1和NRXN1-β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NRXN1异型体1a的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRXN1异型体2a的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRXN1异型体3a的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRXN1异型体4的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRXN1-β异型体1b的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRXN1-β异型体3b的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加NRXN1异型体1a、NRXN1-β异型体1b、NRXN1异型体2a、NRXN1异型体3a、NRXN1-β异型体3b和NRXN1异型体4中的一者或多者的表达。除非另外指明,否则NRXN1异型体1a、NRXN1-β异型体1b、NRXN1异型体2a、NRXN1异型体3a、NRXN1-β异型体3b和NRXN1异型体4在本文中统称为“NRXN1”。

[0279] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使NRXN1蛋白和/或NRXN1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NRXN1蛋白和/或NRXN1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%。

[0280] 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NRXN1蛋白和/或NRXN1基因的表达。

[0281] GRIA4调控

[0282] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可进一步调控例如患有本文公开的疾病或病症(参见例如,阿尔茨海默氏病)的受试者中GRIA4的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的表达。

[0283] 谷氨酸受体4(GRIA4)是介导快速突触兴奋性神经传递的L-谷氨酸门控离子通道家族的成员。这些通道也对谷氨酸激动剂 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸酯(AMPA)有反应。在人类中,GRIA4由位于11号染色体上的GRIA4基因编码(NC_000011.10的核苷酸105,609,540至105,982,092)。GRIA4基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括:“GLUR4”、“GLURD”、“GluA4”、“GLUR4C”、“NEDSGA”和“谷氨酸离子受体AMPA型亚基4”。

[0284] 存在由选择性剪接产生的至少两种已知的人GRIA4异型体。GRIA4异型体1(UniProt标识符:P48058-1)由902个氨基酸组成,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO: 113)。GRIA4异型体2(UniProt标识符:P48058-2)的长度是433个氨基酸,并且与规范序列的区别如下:(i) 424-433:ESPVVMYKKN $\rightarrow$ PLMKNPILRN;和(ii) 434-902:缺失(SEQ ID NO:114)。

[0285] 下表9提供不同GRIA4异型体的序列。

[0286] 表9.GRIA4蛋白异型体

[0287]	<table border="1"> <tr> <td>异型体 1 (UniProt: P48058-1) (SEQ ID NO: 113)</td><td> MRIISRQIVLLFSGFWGLAMGAFSSVQIGGLFIRNTDQ EYTAFLRLAIFLHNTSPNASEAPFNLVPHVDNIETANSFA VTNAFCSQYSRGVFAIFGLYDKRSVHTLTSFCSALHISL ITPSFPTGESQFVLQLRPSLRGALLSLLDHYEWNCVFV LYDTRGYSLQAIMEKAGQNGWHVSAICVENFNDVS YRQLLEELDRRQEKKFVIDCEIERLQNILEQIVSVGKHV KGYHYIIANLGFKDISLERFIHGGANVTGFQLVDFNTP MVIKLMDRWKKLDQREYPGSETPPKYTSALTYDGV VMAETFRSLRRQKIDISRRGNAGDCLANPAAPWGQGI DMERTLKQVRIQGLTGNVQFDHYGRRVNYTMDVFEL KSTGPRKVGWYNDMDKLVLIQDVPTLGNDTAAIENRT VVVTTIMESPYVMYKKNHEMFEGNDKYEGYCVDLAS EIAKHIGIKYKIAIVPDGKYGARDADTKIWNGMVGELV YGKAEIAIAPLTITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKPQ KSKPGVFSFLDPLAYEIMCIVFAYIGVSVVLFLVSRFS </td></tr> </table>	异型体 1 (UniProt: P48058-1) (SEQ ID NO: 113)	MRIISRQIVLLFSGFWGLAMGAFSSVQIGGLFIRNTDQ EYTAFLRLAIFLHNTSPNASEAPFNLVPHVDNIETANSFA VTNAFCSQYSRGVFAIFGLYDKRSVHTLTSFCSALHISL ITPSFPTGESQFVLQLRPSLRGALLSLLDHYEWNCVFV LYDTRGYSLQAIMEKAGQNGWHVSAICVENFNDVS YRQLLEELDRRQEKKFVIDCEIERLQNILEQIVSVGKHV KGYHYIIANLGFKDISLERFIHGGANVTGFQLVDFNTP MVIKLMDRWKKLDQREYPGSETPPKYTSALTYDGV VMAETFRSLRRQKIDISRRGNAGDCLANPAAPWGQGI DMERTLKQVRIQGLTGNVQFDHYGRRVNYTMDVFEL KSTGPRKVGWYNDMDKLVLIQDVPTLGNDTAAIENRT VVVTTIMESPYVMYKKNHEMFEGNDKYEGYCVDLAS EIAKHIGIKYKIAIVPDGKYGARDADTKIWNGMVGELV YGKAEIAIAPLTITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKPQ KSKPGVFSFLDPLAYEIMCIVFAYIGVSVVLFLVSRFS
异型体 1 (UniProt: P48058-1) (SEQ ID NO: 113)	MRIISRQIVLLFSGFWGLAMGAFSSVQIGGLFIRNTDQ EYTAFLRLAIFLHNTSPNASEAPFNLVPHVDNIETANSFA VTNAFCSQYSRGVFAIFGLYDKRSVHTLTSFCSALHISL ITPSFPTGESQFVLQLRPSLRGALLSLLDHYEWNCVFV LYDTRGYSLQAIMEKAGQNGWHVSAICVENFNDVS YRQLLEELDRRQEKKFVIDCEIERLQNILEQIVSVGKHV KGYHYIIANLGFKDISLERFIHGGANVTGFQLVDFNTP MVIKLMDRWKKLDQREYPGSETPPKYTSALTYDGV VMAETFRSLRRQKIDISRRGNAGDCLANPAAPWGQGI DMERTLKQVRIQGLTGNVQFDHYGRRVNYTMDVFEL KSTGPRKVGWYNDMDKLVLIQDVPTLGNDTAAIENRT VVVTTIMESPYVMYKKNHEMFEGNDKYEGYCVDLAS EIAKHIGIKYKIAIVPDGKYGARDADTKIWNGMVGELV YGKAEIAIAPLTITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKPQ KSKPGVFSFLDPLAYEIMCIVFAYIGVSVVLFLVSRFS		

	PYEWHTEEPEDGKEGPSDQPPNEFGIFNSLWFSLGAFM QQGCDISPRSLSGRIVGGVWWFFTLIISSYTANLAAFL TVERMVSPIESAEDLAKQTEIAYGTLDSGSTKEFFRRSK IAVYEKMWTYMRSAEPSVFTRTTAEGVARVRKSKGKF AFLLESTMNEYIEQRKPCDTMKVGGNLDKSGYGVATP KGSSLRTPVNLAVLKLSEAGVLDKLKNKWWYDKGEC GPKDSGSKDKTSALSLSNVAGVFYILVGGLGLAMLVA LIEFCYKSRAEAKRMKLTTFSEAIRNKARLSITGSVGENG RVLTPDCPKAVHTGTAIRQSSGLAVIASDLP
[0288]	异型体 2 (UniProt: P48058-2) (SEQ ID NO: 114) MRIISRQIVLLFSGFWGLAMGAFFSSVQIGGLFIRNTDQ EYTAFRLAIFLHNTSPNASEAPFNLVPHVDNIETANSFA VTNAFCSQYSRGVFAIFGLYDKRSVHTLTSTFCSALHISL ITPSFPTGESQFVLQLRPSLRGALLSLLDHYEWNCFVF LYDTRGYSILQAIMEKAGQNGWHVSAICVENFNDVS YRQLLEELDRRQEKKFVIDCEIERLQNILEQIVSVGKHV KGYHYIIANLGFKDISLERFIHGGANVTGFQLVDFNTP MVIKLMDRWKKLDQREYPGSETPPKYTSALTYDGLV VMAETFRSLRRQKIDISRRGNAGDCLANPAAPWGQGI DMERTLKQVRIQGLTGNVQFDHYGRRVNYTMDVFEL KSTGPRKVGYNWMDKLVLIQDVPTLGNDTAAIENRT VVVTTIMPLMKNPILRN

[0289] 如本文所用,术语“GRIA4”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的GRIA4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GRIA4异型体1(即,规范序列)的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加GRIA4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GRIA4异型体1和GRIA4异型体2的表达。除非另外指明,否则以上所描述的GRIA4异型体在本文中统称为“GRIA4”。

[0290] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使GRIA4蛋白和/或GRIA4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GRIA4蛋白和/或GRIA4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%。

[0291] 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GRIA4蛋白和/或GRIA4基因的表达。

[0292] NXPH1调控

[0293] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可进一步调控例如患有本文公开的疾病或病症(参见例如,阿尔茨海默氏病)的受试者中NXPH1的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的表达。

[0294] 神经外营养蛋白(Neurexophilin)-1(NXPH1)是在人类中由NXPH1基因编码的蛋白质。NXPH1基因是神经外营养蛋白家族的成员,并且编码分泌蛋白质,所述分泌蛋白质具有可变N末端结构域、高度保守的N-糖基化中心结构域、短接头区和富含半胱氨酸的C末端结构域。这种蛋白质与 α 轴突蛋白形成非常紧密的复合物,所述 α 轴突蛋白是一组促进树突与轴突之间的粘附的蛋白质。在人类中,NXPH1基因位于7号染色体上(NC_000007.14的核苷酸8,433,609至8,752,961)。NXPH1基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“NPH1”和

“Nb1a00697”。

[0295] 下表10提供NXPH1蛋白的氨基酸序列。

[0296] 表10.NXPH1氨基酸序列

[0297]	NXPH1 (UniProt: P58417-1) (SEQ ID NO: 115)	MQAACWYVLFLLQPTVYLVTCANLTNGGKSELL KSGSSKSTLKHIWTESSKDLISRLLSQTFRGKEND TDLDLRYDTPEPYSEQDLWDWLRNSTDLQEPRPR AKRRPIVKTGKFKKMFGWGDFHSNIKTVKLNLLIT GKIVDHGNGTFSVYFRHNSTGQGNVSVSLVPPTKI VEFDLAQQTVIDAKDSKSFNCRIEYKVDKATKNT LCNYDPSKTCYQEQTQSHVSWLCSKPFKVICIYISF YSTDYKLVQKVCPDYNHSDTPYFSPG
--------	--	--

[0298] 如本文所用,术语“NXPH1”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的NXPH1的任何变体或异型体。

[0299] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使NXPH1蛋白和/或NXPH1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NXPH1蛋白和/或NXPH1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%。

[0300] 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NXPH1蛋白和/或NXPH1基因的表达。

[0301] PSD-95调控

[0302] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可调控例如患有本文公开的疾病或病症(参见例如,阿尔茨海默氏病)的受试者中PSD-95的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中PSD-95蛋白和/或PSD-95基因(即,DLG4)的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的表达。

[0303] 突触后密度蛋白95(PSD-95),也称为突触相关蛋白90(SAP-90),是在人类中由DLG4(盘状大同源物4)基因(本文也称为“PSD-95基因”)编码的蛋白质。DLG4基因位于人类中17号染色体上(GenBank登录号NC_000017.11的核苷酸7,187,180至-7,220,050,负链取向)。DLG4基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“盘状大MAGUK支架蛋白4”、“MRD62”、“PSD95”和“SAP90”。

[0304] 存在由选择性剪接产生的至少3种已知的人PSD-95蛋白异型体。PSD-95异型体1(也称为PSD95-α)(UniProt标识符:P78352-1)由724个氨基酸组成,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO:116)。PSD-95异型体2(也称为PSD95-β)(UniProt标识符:P78352-2)由767个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:1-10:MDCLCIVTTK→MSQRPRAPRSALWLLAPLLRWAPPLLTVLHSDLFQALLDILDYIEASLSESQ(SEQ ID NO:117)。PSD-95异型体3(UniProt标识符:P78352-3)由721个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:51-53:缺失(SEQ ID NO:118)。

[0305] 下表11提供PSD-95蛋白的氨基酸序列,包括已知的异型体。

[0306] 表11.PSD-95蛋白序列

[0307]

异型体 1 (UniProt: P78352-1) (SEQ ID NO: 116)	MDCLCIVTTKKYRYQDEDTPPLEHSPAHLPNQANS PPVIVNTDTLEAPGYELQVNGTEGEMEYEEITLER GNSGLGFSIAGGTDNPHIGDDPSIFITKIIPGGAAAQ DGRLRVNDSILFVNEVDVREVTHSAAVEALKEAG SIVRLYVMRRKPPAEKVMEIKLIKGPGLGFSIAGG VGNQHIPGDNSIYVTKIIEGGAAHKDGRLQIGDKIL AVNSVGLEDVMHEDAVAALKNTYDVVYLKVAKP SNAYLSDSYAPPDITTSYSQHLDNEISHSSYLGTDY PTAMTPTSPRRYSPVAKDLLGEEDIPREPRRIVIHR GSTGLGFNIVGGEDGEGIFISFILAGGPADLSGELRK GDQILSVNGVDLRNASHEQAAIALKNAGQTVTHIA QYKPEEYSRFEAKIHDREQLMNSSLGSGTASLRS NPKRGFYIRALFDYDKTKDCGFLSQALSFRFGDVL HVIDASDEEWQARRVHSDSETDDIGFIPSKRRVE RREWSRLKAKDWGSSSGSQGREDSVLSYETVTQM EVHYARPIILGPTKDRANDDLLSEFPDKFGSCVPH TTRPKREYEIDGRDYHFVSSREKMEKDIQAHKFIE AGQYNShLYGTSVQSVREVAEQGKHCILDVSANA VRLQAHLHPAIFIRPRSLENVLEINKRITEEQAR KAFDRATKLEQEFTECFSAIVEGDSFEEIYHKVKRV IEDLSGPYIWVPARERL
异型体 2 (UniProt: P78352-2) (SEQ ID NO: 117)	MSQRPRAPRSALWLLAPLLRWAPLLTVLHSDLF QALLDILDYEEASLSQKYRYQDEDTPPLEHSPA HLPNQANSPPVIVNTDTLEAPGYELQVNGTEGEME YEEITLERGNSGLGFSIAGGTDNPHIGDDPSIFITKII PGGAAAQDGRLRVNDSILFVNEVDVREVTHSAAV

	EALKEAGSIVRLYVMRRKPPAEKVMEIKLIKGPKG LGFSIAGGVGNQHIPGDNSIYVTKIIEGGAAHKDGR LQIGDKILAVNSVGLEDVMHEDAVAALKNTYDVV YLKVAKPSNAYLSDSYAPPDITTSYSQHLNEISHS SYLGTDYPTAMTPTSPRRYSPVAKDLLGEEDIPREP RRIVHRGSTGLGFNIVGGEDGEGIFISFILAGGPAD LSGELRKGDQILSVNGVDLRNASHEQAAIALKNAG QTVTIIAQYKPEEYSRFEAKIHDRLREQLMNSSLGSG TASLRSNPKRGFYIRALFDYDKTKDCGFLSQALSF RFGDVLHVIDASDEEWWQARRVHSDSETDDIGFIP SKRRVERREWSRLKAKDWGSSSGSQGREDSVLSY ETVTQMEVHYARPIIILGPTKDRANDDLLSEFPDKF GSCVPHTTRPKREYEIDGRDYHFVSSREKMEKDIQ AHKFIEAGQYNHLYGTSVQSVREVAEQGKHCILD VSANAVRRLQAAHLHPAIFIRPRSLENVLEINKRIT EEQARKAFDRATKLEQEFTCECFS AIVEGDSFEEIYH KVKRVIEDLSGPYIWVPARERL
[0308]	异型体 3 (UniProt: P78352-3) (SEQ ID NO: 118) MDCLCIVTTKKYRYQDEDTPPLEHSPAHLPNQANS PPVIVNTDTLEAPGYVNGTEGEMEYEEITLERGNS GLGFSIAGGTDNPHIGDDPSIFITKIIPGGAAAQDGR LRVNSILFVNEVDVREVTHSAAVEALKEAGSIVR LYVMRRKPPAEKVMEIKLIKGPKGLGFSIAGGVGN QHIPGDNSIYVTKIIEGGAAHKDGR LQIGDKILAVN SVGLEDVMHEDAVAALKNTYDVVYLKVAKPSNA YLSDSYAPPDITTSYSQHLNEISHSSYLGTDYPTA MTPTSPRRYSPVAKDLLGEEDIPREPRRIVHRGST GLGFNIVGGEDGEGIFISFILAGGPADLSGELRKGD QILSVNGVDLRNASHEQAAIALKNAGQTVTIIAQY KPEEYSRFEAKIHDRLREQLMNSSLGSGTASLRSNPK RGFYIRALFDYDKTKDCGFLSQALSFRFGDVLHVI DASDEEWWQARRVHSDSETDDIGFIPSKRRVERRE WSRLKAKDWGSSSGSQGREDSVLSYETVTQMEVH YARPIIILGPTKDRANDDLLSEFPDKFGSCVPHTTRP KREYEIDGRDYHFVSSREKMEKDIQAHKFIEAGQY NSHLYGTSVQSVREVAEQGKHCILDVSANAVRRL QAAHLHPAIFIRPRSLENVLEINKRITEEQARKAFD RATKLEQEFTCECFS AIVEGDSFEEIYHKVKRVIEDL SGPYIWVPARER

[0309] 如本文所用,术语“PSD-95”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的PSD-95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PSD-95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PSD-95异型体2的表达。在一些方面,miR-485抑制剂可增加PSD-95异型体3的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PSD-95异型体1、PSD-95异型体2和PSD-95异型体3的表达。除非另外指明,否则上述PSD-95异型体在本文中统称为“PSD-95”。

[0310] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使PSD-95蛋白和/或PSD-95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PSD-95蛋白和/或PSD-95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%。

[0311] 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PSD-95蛋白和/或PSD-95基因的表达。

[0312] 突触素调控

[0313] 本文提供的公开内容进一步证明,本文所述的miR-485抑制剂可调控例如患有本文公开的疾病或病症(参见例如,帕金森氏病)的受试者中突触素的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种增加有需要的受试者中突触素蛋白和/或突触素基因(即,SYP)的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性增加受试者中突触素蛋白和/或突触素基因的表达。

[0314] 突触素(也称为主要突触囊泡蛋白p38)是在人类中由SYP基因(本文也称为“突触素基因”)编码的蛋白质。SYP基因位于X染色体的短臂上(GenBank登录号NC_000023.11的核苷酸49,187,804-49,200,259,负链取向)。SYP基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“MRX96”和“MRXSYP”。

[0315] 存在由选择性剪接产生的至少两种已知的突触素蛋白异型体。突触素异型体1(UniProt标识符:P08247-1)由313个氨基酸组成,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO: 119)。突触素异型体2(UniProt标识符:P08247-2)的长度是195个氨基酸,并且与规范序列的区别如下:1-118:缺失(SEQ ID NO:120)。

[0316] 下表12提供突触素蛋白的氨基酸序列,包括任何已知的异型体。

[0317] 表12.突触素蛋白序列

[0318]	异型体 1 (UniProt: P08247-1) (SEQ ID NO: 119)	MLLLADMDVVNQLVAGGQFRVVKEPLGFVKV LQWVFAIFAFATCGSYSSELQLSVDCANKTESD LSIEVEFEYPPFRLHQVYFDAPTCRGGTTKVFLVG DYSSSAEFFVTVAVFALYSMGALATYIFLQNK YRENNKGPMMLDFLATAVFAFMWLVSSEAWAK GLSDVKMATDPENIIKEMPVCRQTGNTCKELRD PVTSGLNLSVVFGFLNLVLWVGNLWVFKETG WAAPFLRAPPGAPEKQPAPGDAGYGDAGYGGP GGYGPQDSYGPQGGYQPDYGGPAGSGSGYGP QGDYGQQGYGPQGAPTSFSNQM
	异型体 2 (UniProt: P08247-2) (SEQ ID NO: 120)	MGALATYIFLQNKYRENNKGPMMLDFLATAVFA FMWLVSSEAWAKGLSDVKMATDPENIIKEMPV CRQTGNTCKELRDPVTSGLNLSVVFGFLNLVLW VGNLWVFKETGWAAPFLRAPPGAPEKQPAPG DAYGDAGYGGPQGGYGPQDSYGPQGGYQPDY GQPAGSGSGYGPQGDYGQQGYGPQGAPTSFS NQM

[0319] 如本文所用,术语“突触素”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的突触素的任何变体或异型体。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加突触素异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加突触素异型体2的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加突触素异型体1和突触素异型体2两者的表达。除非另外指明,否则上述突触素异型体在本文中统称为“突触素”。

[0320] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使突触素蛋白和/或突触素基因的表达与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者中突触素蛋白和/或突触素基因的表达)

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%。

[0321] 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/或活性来增加突触素蛋白和/或突触素基因的表达。

[0322] 半胱天冬酶-3调控

[0323] 在一些方面,本文提供的公开内容证明本公开的miR-485抑制剂可调控例如患有本文公开的疾病或病症(例如,帕金森氏病)的受试者中半胱天冬酶-3的表达。因此,在一些方面,本公开提供了一种降低有需要的受试者中半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因(即,CASP3)的表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485活性的化合物(即,miR-485抑制剂)。在某些方面,抑制miR-485活性降低受试者中半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的表达。

[0324] 半胱天冬酶-3是半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶(半胱天冬酶)家族的成员,并且通过与半胱天冬酶-8和半胱天冬酶-9相互作用在细胞凋亡中发挥核心作用。在人类中,半胱天冬酶-3蛋白由CASP3基因(本文也称为“半胱天冬酶-3基因”)编码。CASP3基因位于人类中4号染色体上(GenBank登录号NC_000004.12的核苷酸184,627,696至-184,649,509,负链取向)。CASP3基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“凋亡素(apopain)”、“CPP32”、“SREBP裂解活性1”、“蛋白质yama”、“SCA-1”、“PARP裂解蛋白酶”、“胱天蛋白酶原(procaspase)3”和“Yama”。

[0325] 下表13提供半胱天冬酶-3蛋白前体的氨基酸序列,以及半胱天冬酶-3蛋白的裂解形式。

[0326] 表13. 半胱天冬酶-3蛋白序列

[0327]	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="311 1209 462 1400"> 异型体 1 (UniProt: P42574-1) (SEQ ID NO: 121) </td><td data-bbox="470 1209 1184 1485"> MENTENSVDSKSIKNLEPKIIHGSESMDSGISLDNS YKMDYPEMGLCHINNKNFHKSTGMTSRSGTDVD AANLRETFRNLYEVRNKNDLTREEIVELMRDVS KEDHSKRSSFVCVLLSHGEEGIIFGTNGPVDLKKIT NFFRGDRCSRSLTGPKPLFIIQACRGTELDGCIETDS GVDDDMACHKIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNS KDGSWFIQSLCAMLKQYADKLEFMHILTRVNRKV ATEFESFSFDATFHAKKQIPCIVSMLTKELYFYH </td></tr> </table>	异型体 1 (UniProt: P42574-1) (SEQ ID NO: 121)	MENTENSVDSKSIKNLEPKIIHGSESMDSGISLDNS YKMDYPEMGLCHINNKNFHKSTGMTSRSGTDVD AANLRETFRNLYEVRNKNDLTREEIVELMRDVS KEDHSKRSSFVCVLLSHGEEGIIFGTNGPVDLKKIT NFFRGDRCSRSLTGPKPLFIIQACRGTELDGCIETDS GVDDDMACHKIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNS KDGSWFIQSLCAMLKQYADKLEFMHILTRVNRKV ATEFESFSFDATFHAKKQIPCIVSMLTKELYFYH
异型体 1 (UniProt: P42574-1) (SEQ ID NO: 121)	MENTENSVDSKSIKNLEPKIIHGSESMDSGISLDNS YKMDYPEMGLCHINNKNFHKSTGMTSRSGTDVD AANLRETFRNLYEVRNKNDLTREEIVELMRDVS KEDHSKRSSFVCVLLSHGEEGIIFGTNGPVDLKKIT NFFRGDRCSRSLTGPKPLFIIQACRGTELDGCIETDS GVDDDMACHKIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNS KDGSWFIQSLCAMLKQYADKLEFMHILTRVNRKV ATEFESFSFDATFHAKKQIPCIVSMLTKELYFYH		

[0328] 如本文所用,术语“半胱天冬酶-3”(包括其同义词)包括由细胞天然表达的半胱天冬酶-3的任何变体或异型体(例如,裂解的半胱天冬酶-3)。

[0329] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂使半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3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半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的表达)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%或至少约100%。

[0330] 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/或活性来降低半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因的表达。

[0331] 如从本公开中将显而易见的,与异常(例如,降低的)SIRT1蛋白和/或SIRT1基因水

平相关的任何疾病或疾患都可用本公开治疗。在一些方面,本公开可用于治疗与异常(例如,降低的)CD36蛋白和/或CD36基因水平相关的任何疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)PGC1- α 蛋白和/或PGC1- α 基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)LRRK2蛋白和/或LRRK2基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)NRG1蛋白和/或NRG1基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)STMN2蛋白和/或STMN2基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)VLDLR蛋白和/或VLDLR基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)NRXN1蛋白和/或NRXN1基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)GRIA4蛋白和/或GRIA4基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)NXPH1蛋白和/或NXPH1基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)PSD-95蛋白和/或PSD-95基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,降低的)突触素蛋白和/或突触素基因水平相关的疾病或疾患。在一些方面,本公开还可用于治疗与异常(例如,增加的)半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因水平相关的疾病或疾患。

[0332] 在一些方面,与此类蛋白质和/或基因的异常(例如,降低的或增加的)水平相关的疾病或疾患包括神经变性疾病或病症。如本文所用,术语“神经变性疾病或病症”是指由神经系统内,特别是脑神经元内的进行性病理变化引起的疾病或病症。在一些方面,神经系统的这种进行性破坏可导致身体(例如,共济失调)和/或精神(例如,痴呆)损伤。可用本发明治疗的神经变性疾病或病症的非限制性实例包括阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或它们的任何组合。可用本公开治疗的其它疾病或疾患包括但不限于自闭症谱系障碍、智力迟钝、癫痫发作、中风、脊髓损伤或它们的任何组合。

[0333] 在一些方面,可用本发明治疗的疾病或疾患包括阿尔茨海默氏病。在某些方面,阿尔茨海默氏病包括痴呆前阿尔茨海默氏病、早期阿尔茨海默氏病、中度阿尔茨海默氏病、晚期阿尔茨海默氏病、早发型家族性阿尔茨海默氏病、炎性阿尔茨海默氏病、非炎性阿尔茨海默氏病、皮层阿尔茨海默氏病、早发型阿尔茨海默氏病、迟发型阿尔茨海默氏病或它们的任何组合。

[0334] 在一些方面,可治疗的疾病或病症包括帕金森病(parkinsonism)。如本文所用,术语“帕金森病”是指导致帕金森氏病中所观察到的运动异常的组合的一组神经障碍。这种运动异常的非限制性实例包括震颤、缓慢运动(运动迟缓)、姿势不稳、姿势反射丧失、弯曲姿势、冻结现象(当双脚暂时“粘”在地面上时)、言语障碍、肌肉僵硬(强直)或它们的组合。在一些方面,帕金森病包括帕金森氏病、进行性核上性麻痹(PSP)、多系统萎缩症(MSA)、皮质基底变性(CBD)、正常压力脑积水(NSA)、血管性帕金森病(也称为脑血管病)、弥漫性路易体病、帕金森氏痴呆、X连锁肌张力障碍-帕金森病、继发性帕金森病(由环境病因,例如毒素、药物、脑炎后、脑肿瘤、头部外伤、正常压力脑积水引起)或它们的组合。

[0335] 在一些方面,可用本公开治疗的帕金森病是帕金森氏病。如本文所用,术语“帕金森氏病”(PD)是指导致运动和非运动表现(即,症状)并且特征在于黑质纹状体系统中多巴胺能神经元的广泛变性的神经变性病症。PD的运动和非运动表现的非限制性实例在本公开

的其它地方提供。蛋白病 (Proteinopathy) (α -突触核蛋白异常聚集) 是PD的标志。PD的其它示例性特征包括多巴胺能神经元损伤、线粒体功能障碍、神经炎症、蛋白质稳态 (例如, 受损蛋白质的自噬清除和细胞器神经胶质细胞功能障碍) 以及它们的组合。不受任一种理论的束缚, 在一些方面, 本公开的miR-485抑制剂可通过改善PD的这些特征中的一个或多个来治疗PD。

[0336] 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基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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- α 蛋白和/或PGC1- α 基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) LRRK2蛋白和/或LRRK2基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) NRG1蛋白和/或NRG1基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) STMN2蛋白和/或STMN2基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) VLDLR蛋白和/或VLDLR基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) NRXN1蛋白和/或NRXN1基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) GRIA4蛋白和/或GRIA4基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) NXPH1蛋白和/或NXPH1基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) PSD-95蛋白和/或PSD-95基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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) 突触素蛋白和/或突触素基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。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, 增加的) 半胱天冬酶-3蛋白和/或半胱天冬酶-3基因水平相关的疾病或疾患的一种或多种症状。此类症状的非限制性实例在下文描述。

[0337] 在一些方面, 施用本公开的miR-485抑制剂使受试者 (例如, 患有神经变性疾病) 中认知障碍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%。

[0338] 在一些方面, 施用本公开的miR-485抑制剂使受试者 (例如, 患有神经变性疾病) 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抑制剂使受试者 (例如, 患有神经变性疾病) 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%。

[0339] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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。

[0340] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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。

[0341] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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。

[0342] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)中的淀粉样蛋白 β (A β) 斑块负荷与参考(例如,施用前所述受试者中的淀粉样蛋白 β (A β) 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 β 斑块”是指淀粉样蛋白 β 的所有形式的异常沉积,包括一些淀粉样蛋白 β 肽的大聚集体和小缔合,并且可包括淀粉样蛋白 β 肽的任何变异。已知淀粉样蛋白 β (A β) 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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)中的淀粉样蛋白 β 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%。

[0343] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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”或“神经”再生。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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。

[0344] 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。

[0345] 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。

[0346] 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。

[0347] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂预防和/或抑制受试者(例如,患有神经变性疾病)中淀粉样蛋白 β 斑块负荷的发展。在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂延迟受试者(例如,患有神经变性疾病)中淀粉样蛋白 β 斑块负荷发展的开始。在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂降低受试者(例如,患有神经变性疾病)中淀粉样蛋白 β 斑块负荷发展的风险。

[0348] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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。

[0349] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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%。

[0350] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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,向受试者(例如,患有神经变性疾病)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- α 。在一些方面,炎症介质包括IL-1 β 。在一些方面,由神经胶质细胞产生的炎症介质包括TNF- α 和IL-1 β 两者。

[0351] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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(例如,阿尔茨海默氏病和帕金森氏病)相关。在一些方面,向受试者(例如,患有变性疾病)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。自噬的增加可通过本领域已知的任何合适的方法来测量。例如,在一些方面,可通过测量与自噬体生物发生相关的基因(例如,LC3B)的表达来观察自噬的增加。

[0352] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)中的 α -分泌酶活性增加(例如,通过增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达)。如本文所用,术语“ α -分泌酶”是指在其跨膜区裂解淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的蛋白水解酶家族。 α 分泌酶是ADAM(“解整合素和金属蛋白酶结构域”)家族的成员(例如,ADAM10),它们在细胞表面表达并锚定在细胞膜中。具体而言,当APP被 β 分泌酶和 γ 分泌酶加工时, α 分泌酶在产生阿尔

茨海默氏病相关肽淀粉样蛋白 β 的片段内裂解。因此,在一些方面, α -分泌酶裂解排除淀粉样蛋白 β 形成,并且被认为是APP加工中非淀粉样蛋白生成途径的一部分。在一些方面,向受试者(例如,患有神经变性疾病)施用本文公开的miR-485抑制剂使 α -分泌酶活性与参考(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。

[0353] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)中的 β -分泌酶1(BACE1)活性降低(例如,通过增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达)。如本文所用,术语“ β -分泌酶1”或“BACE1”是指主要在神经元中表达的酶。BACE1是在周围神经细胞中的髓鞘形成中重要的天冬氨酸蛋白酶。在一些方面,向受试者(例如,患有神经变性疾病)施用本文公开的miR-485抑制剂使BACE1活性与参考(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%。

[0354] 如本领域已知的,许多神经变性疾病表现出某些运动和/或非运动症状。例如,与帕金森氏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)、强直、姿势不稳、步态冻结、书写受损(写字过小症)、面部表情减少和不受控制的快速运动。与帕金森氏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。

[0355] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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。

[0356] 在一些方面,施用本公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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。

[0357] 在一些方面,施用本文公开的miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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。

[0358] 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/或改善受试者(例如,患有神经变性疾病)中的突触功能丧失。在一些方面,施用miR-485抑制剂使受试者(例如,患有神经变性疾病)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%。

[0359] 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。在某些方面,脑室内(ICV)施用miR-485抑制剂。在某些方面,静脉内施用miR-485抑制剂。

[0360] 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。

[0361] 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。

[0362] III. 可用于本公开的miRNA-485抑制剂

[0363] 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。

[0364] 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。

[0365] 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。

[0366] 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'-AGUCAUACACGGCUCUCCUCUC-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)。人成熟miR-485-3p和miR-485-5p与来自其它示例性哺乳动物物种的相应序列的序列比对在图5A和5B中提供。由于序列的相似性,在一些方面,本公开的miR-485抑制剂能够结合来自图5A和5B中所示的一种或多种物种的miR-485-3p和/或miR-485-5p。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。

[0367] 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。

[0368] 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。

[0369] 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。

[0370] 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。

[0371] 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。

[0372] 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。

[0373] 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。

[0374] 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。在一些方面,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。在一些方面,miR-485抑制剂的长度是22个核苷酸。

[0375] 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抑制剂包含选自由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。

[0376] 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)。

[0377] 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)、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:29) 或 AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC (SEQ ID NO:30)。

[0378] 在一些方面,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'-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)、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:89) 和 AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC (SEQ ID NO:90)。

[0379] 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)。在某些方面,miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28)。

[0380] 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

30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30中的任一个,以及在N末端的一种额外核酸和/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30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30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)。

[0381] 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。

[0382] III.a.经化学修饰的多核苷酸

[0383] 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”。

[0384] “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。

[0385] 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。

[0386] 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。

[0387] 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。

[0388] 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)。

[0389] 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。

[0390] 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。

[0391] 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。

[0392] 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%。

[0393] (i) 碱基修饰

[0394] 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(ψ)、2-硫尿苷(s2U)、1-甲基-假尿苷(m1 ψ)、1-乙基-假尿苷(e1 ψ)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。

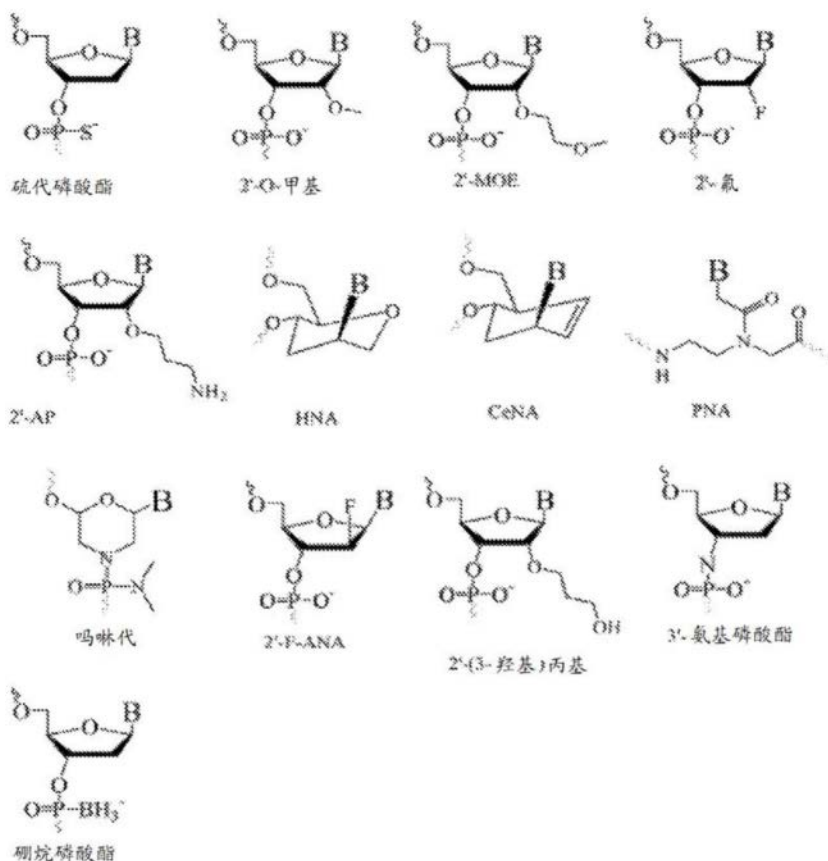
[0395] 在一些方面,对于特定修饰,对本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)进行均一修饰(例如,完全修饰,在整个序列中修饰)。例如,可用统一类型的碱基修饰,例如5-甲基-胞苷(m5C)均一修饰多核苷酸,这意味着多核苷酸序列中的所有胞嘧啶残基都被5-甲基-胞苷(m5C)置换。类似地,可通过用经修饰的核苷(如以上列出的那些中的任一者)置换针对序列中存在的任何类型的核苷残基均一地修饰多核苷酸。

[0396] 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。

[0397] (ii) 主链修饰

[0398] 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'-亚烷基磷酸酯、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、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、手性磷酸酯、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、次磷酸酯、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、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯以及硫羰基氨基磷酸酯。



[0399]

[0400] 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。

[0401] 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)。

[0402] 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。

[0403] (iii) 糖修饰

[0404] 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。

[0405] 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)。

[0406] 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)。

[0407] 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 α -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。

[0408] 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。

[0409] 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 β -D-氧基-LNA或 α -L-氧基-LNA)、氨基-LNA(如 β -D-氨基-LNA或 α -L-氨基-LNA)、硫代-LNA(如 β -D-硫代O-LNA或 α -L-硫代-LNA)、ENA(如 β -D-ENA或 α -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)。

[0410] 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;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。

[0411] 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。

[0412] IV. 载体和递送系统

[0413] 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。

[0414] 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。

[0415] 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)。

[0416] 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载体选自以下组成的组:AAV 1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、蛙AAV、蛇AAV以及它们的任何组合。

[0417] 在一些方面, AAV载体源自选自以下组成的组的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。

[0418] 在一些方面, AAV载体是源自选自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。

[0419] 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。

[0420] 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。

[0421] 在一些方面, AAV载体包含选自以下组成的组的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。

[0422] 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。

[0423] 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。

[0424] 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。

[0425] 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)。

[0426] 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。

[0427] 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

[0428] [WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (式I)

[0429] 或

[0430] [WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (式II)

[0431] 其中

[0432] WP是水溶性生物聚合物部分;

[0433] CC是带正电荷的载体部分;

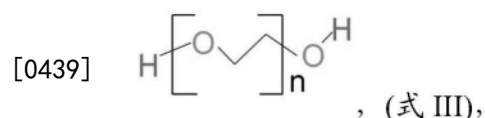
[0434] AM是佐剂部分;并且,

[0435] L1和L2独立地是任选的接头,并且

[0436] 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。

[0437] 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。

[0438] 在一些方面,水溶性聚合物包括聚(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(α -羟基酸)、聚(乙二醇)、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,水溶性聚合物包括聚乙二醇("PEG")、聚甘油或聚(丙二醇)("PPG")。在一些方面,水溶性聚合物包含:



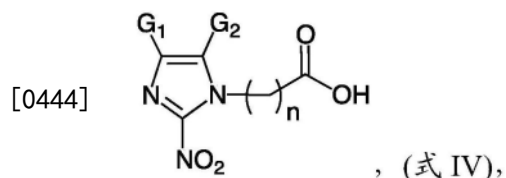
[0440] 其中n是1-1000。

[0441] 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。

[0442] 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。在一些方面,所述阳离子载体部分包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少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。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。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,所述阳离子载体部分包含约40个赖氨酸单体。

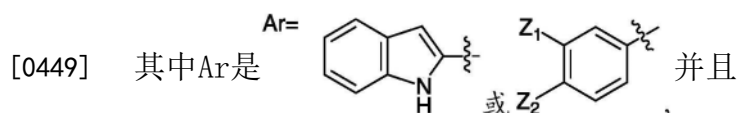
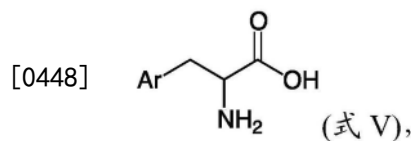
[0443] 在一些方面,所述佐剂部分能够调节免疫应答、炎症应答和/或组织微环境。在一些方面,所述佐剂部分包含咪唑衍生物、氨基酸、维生素或它们的任何组合。在一些方面,所述佐剂部分包含:



[0445] 其中G1和G2各自是H、芳族环或1-10烷基,或者G1和G2一起形成芳族环,并且其中n是1-10。

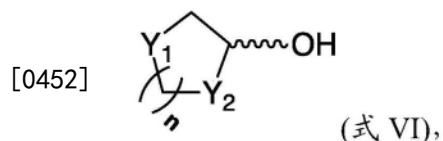
[0446] 在一些方面,所述佐剂部分包含硝基咪唑。在一些方面,所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼、奥硝唑、美格唑、阿扎硝唑、苄硝唑或它们的任何组合。在一些方面,所述佐剂部分包含氨基酸。

[0447] 在一些方面,所述佐剂部分包含



[0450] 其中Z1和Z2各自是H或OH。

[0451] 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:



[0453] 其中Y1和Y2各自是C、N、O或S,并且其中n是1或2。

[0454] 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。

[0455] 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个或至少约20个维生素B3。在一些方面,所述佐剂部分包含约10个维生素B3。

[0456] 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的佐剂部分。

[0457] 在一些方面,所述组合物包含(i)具有约100至约200个PEG单元的水溶性生物聚合物部分;(ii)具有胺基团的约30至约40个赖氨酸(例如,约32个赖氨酸);(iii)约15至20个赖氨酸,各自具有硫醇基团(例如,约16个赖氨酸,各自具有硫醇基团);以及(iv)与维生素B3融合的约30至40个赖氨酸(例如,约32个赖氨酸,各自与维生素B3融合)。在一些方面,所述组合物还包含与水溶性聚合物连接的靶向部分,例如LAT1靶向配体,例如苯丙氨酸。在一些方面,所述组合物中的硫醇基团形成二硫键。

[0458] 在一些方面,所述组合物包含(1)胶束,所述胶束包含(i)约100至约200个PEG单元;(ii)具有胺基团的约30至约40个赖氨酸(例如,约32个赖氨酸);(iii)约15至20个赖氨酸,各自具有硫醇基团(例如,约16个赖氨酸,各自具有硫醇基团)和(iv)与维生素B3融合的约30至40个赖氨酸(例如,约32个赖氨酸,各自与维生素B3融合),以及(2)miR485抑制剂(例如,SEQ ID NO:30),其中所述miR485抑制剂被包封在所述胶束内。在一些方面,所述组合物还包含与PEG单元连接的靶向部分,例如LAT1靶向配体,例如苯丙氨酸。在一些方面,所述胶束中的硫醇基团形成二硫键。

[0459] 本公开还提供了包含本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂,例如,SEQ ID NO:30)的胶束,其中所述miRNA抑制剂和递送剂彼此缔合。

[0460] 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。

[0461] 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2020年12月30日公布的PCT公布号WO2020/261227,所述公布以引用的方式整体并入本文。

[0462] V. 药物组合物

[0463] 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。

[0464] 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。

[0465] VI. 药盒

[0466] 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。

[0467] 通过说明而不是通过限制的方式提供以下实例。

[0468] 实施例

[0469] 实施例1:材料和方法

[0470] 除非另外提供,否则以下描述的实施例使用一种或多种以下材料和方法:

[0471] 人组织

[0472] 来自患有阿尔茨海默氏病(AD)的患者和来自对照的脑中央前回样品购自荷兰脑库。与这些患者和对照相关的信息如表1所示。

[0473] 小鼠

[0474] B6SJLF1/J (JAX#100012) 和五只家族性AD突变(5XFAD)转基因小鼠(#MMRRC#034848)购自The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)。5XFAD小鼠过表达具有瑞典(K670N、M671L)、佛罗里达(I716V)和伦敦(V717I)突变的突变型人淀粉样蛋白前体蛋白(APP),以及携带两个FAD突变(M146L和L286V)的突变型人早老蛋白1(PS1)。这些转基因受神经元中的Thy1启动子调控。5XFAD小鼠的基因型通过按照由杰克逊实验室提供的标准PCR条件对尾部DNA进行PCR分析来确认。混合基因型小鼠每笼圈养4至5只,12小时光照/12小时黑暗周期,并且随意进食和饮水。所有动物程序均根据建阳大学关于实验室动物护理和使用的指南进行。动物研究得到了建阳大学委员会(Konyang University Committee)的批准(许可证号:P-18-18-A-01)。

[0475] 6-羟基多巴胺(6-OHDA)小鼠(C57BL/6;8周龄;20-23g)获自KOATECH (Pyeongtaek, Korea)。将小鼠圈养在受控环境中,并随意提供食物和水。

[0476] 使用小鼠额叶皮层组织的下一代测序

[0477] NGS由Theragen Etx Bio Institute (Seoul, Republic of Korea, worldwideweb.theragenetex.com/kr/bio) 在NovaSeq 6000系统(Illumina)中进行。TruSeq Stranded mRNA文库试剂盒(Illumina)用于构建文库。之后,使用‘原始读数’处理数据以进行mRNA测序。使用STAR aligner v2.7.1将原始读与GRCm38.96 (NCBI)进行比对,以计算‘RSEM’表达值。Dobin等人, *Bioinformatics* 29(1):15-21 (2013)。执行作为默认选项的STAR比对器。由于每个样品的读数总数不同,因此通过TMM方法进行归一化。以相同方式处理了13个小鼠样品。所有数据可在GEO (基因表达综合数据库, worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) 中作为GSE142633获得。

[0478] 公共数据库使用、再分析和网络分析

[0479] 使用了来自Weinberg等人的结果以确认与认知障碍高度相关的miRNA。Weinberg等人, *Front Neurosci* 9:430 (2015)。图EV1中显示的100个基因是从Weinberg等人的表1中提取的。我们在Weinberg等人的结果中获取log2,对它们进行排序,并标记靶miRNA。“miRDB”用于搜索靶向特定基因的miRNA。Wong等人, *Nucleic Acids Res* 43:D146-52 (2015)。“基因卡”数据库用于搜索与疾病或生物学症状有关的基因。Rebhan等人, *Bioinformatics* 14(8):656-64 (1998),图EV2A中的结果显示2019年8月使用关键词“炎

症”、“淀粉样蛋白 β 降解”和“阿尔茨海默病”的搜索结果。我们使用R的“维恩图”包进行维恩图分析。Cytoscape (版本3.7.1)的“GeneMAINA” (版本3.5.1)包用于蛋白质与蛋白质相互作用分析。Franz等人, *Nucleic Acids Res* 46 (W1):W60-W64 (2018)。我们使用265个常见基因,包括hsa-miR-485-3p靶基因和阿尔茨海默病相关基因作为蛋白质相互作用分析的输入。其中,139个基因在没有邻近基因的情况下相互作用。此外,9个基因与脑神经系统疾病(包括AD)高度相关,并且同时在患者组或在痴呆小鼠模型中报告了低表达。

[0480] miR-485抑制剂的脑室内注射

[0481] miR485-3p反义寡核苷酸(ASO) (即,miR-485抑制剂) (AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC) (SEQ ID NO:30) 和对照寡核苷酸 (“miR-对照”) (CCTTCCCTGAAGGTTCTCCTT) (SEQ ID NO:61) 由Integrated DNA Technologies (USA) 合成。所有动物最初用氧气中的3%-5%异氟烷麻醉,并固定在立体定位架(JeongDo)上。对于脑室内(ICV)注射,使用体内jetPEI试剂(Polyplus)配制miR-485抑制剂或非靶向对照寡核苷酸。用10 μ L Hamilton注射器(26号钝针)以1.5 μ L/min注射用体内jetPEI试剂配制的miR-485抑制剂(1.5 μ g)或对照寡核苷酸。通过脑室内(ICV)将miR-485抑制剂和对照寡核苷酸以5 μ L的体积输注到10月龄5XFAD小鼠中。每周一次给予miR-485抑制剂或非靶向对照寡核苷酸持续2周。使用来自前囟的坐标鉴定脑室内(ICV)位置:AP=-0.2mm,L= $\pm$ 1.0mm,腹侧(V)=-2.5mm。

[0482] miR-485抑制剂的静脉内注射

[0483] 将miR485-3p反义寡核苷酸(ASO) (即miR-485抑制剂) (AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC) (SEQ ID NO:30) 或对照寡核苷酸 (“miR-对照”) (CCTTCCCTGAAGGTTCTCCTT) (SEQ ID NO:61) 负载到纳米颗粒中,所述纳米颗粒包含聚乙二醇化(PEG)壳、交联核和一个或多个脑靶标。在某些方面,将ASO被荧光标记(例如,Cy5.5)以允许使用体内成像进行跟踪。在注射胶束或ASO之前,拍摄荧光图像作为注射前图像。将负载ASO的纳米颗粒(25 μ g ASO)静脉内施用(尾静脉注射)至小鼠,并使用IVIS体内成像系统在所需时间拍摄小鼠的荧光图像。除非另有说明,否则小鼠接受单剂量的负载ASO的纳米颗粒。观察荧光图像长达16小时,并将负载ASO的胶束的时间依赖性荧光强度与注射裸ASO的小鼠进行比较。负载ASO的胶束和ASO的荧光图像被视为ASO的分布,并且比较两组的生物分布行为。

[0484] 所有动物最初用氧气中的3%-5%异氟烷麻醉并固定在立体定位架(JeongDo)上。对于脑室内(ICV)注射,使用体内jetPEI试剂(Polyplus)配制miR-485抑制剂或非靶向对照寡核苷酸。用10 μ L Hamilton注射器(26号钝针)以1.5 μ L/min注射用体内jetPEI试剂配制的miR-485抑制剂(1.5 μ g)或对照寡核苷酸。通过脑室内(ICV)将miR-485抑制剂和对照寡核苷酸以5 μ L的体积输注到10月龄5XFAD小鼠中。每周一次给予miR-485抑制剂或非靶向对照寡核苷酸持续2周。使用来自前囟的坐标鉴定脑室内(ICV)位置:AP=-0.2mm,L= $\pm$ 1.0mm,腹侧(V)=-2.5mm。

[0485] 神经胶质细胞和皮层神经元培养和转染

[0486] 从1至3日龄C57BL/6小鼠的大脑皮层培养小鼠原代混合神经胶质细胞。解剖大脑皮层并通过移液研磨成单细胞悬浮液。然后,将单细胞悬浮液涂铺到用0.05mg/ml聚D-赖氨酸(PDL)预先包被的6孔板中,并在补充有25mM葡萄糖、10% (vol/vol) 热灭活胎牛血清、2mM谷氨酰胺和1,000单位/mL青霉素-链霉素(P/S)的DMEM培养基中培养2周。从胚胎第17天的小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℃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70μm细胞过滤器 (SPL,93070)过滤,涂铺在培养板上,并在湿润5%CO₂孵育箱中保持在37℃。每3天更换培养基,然后在体外12-13天后,将细胞用于实验。使用TRANSIT-X2[®]转染试剂 (Mirus Bio) 用100nM miR对照、100nM has-miR485-3p模拟物或100nM miR-485抑制剂转染原代神经胶质细胞或皮层神经元。

[0487] 荧光素酶测定

[0488] 将含有miR-485-3p的靶位点的人SIRT1 3'-UTR通过PCR扩增从cDNA扩增并插入到psiCHECK2载体 (Promega,目录号C8021)中。使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen,目录号11668-027)用psiCHECK2-Sirt1-3'UTR野生型(WT)或psiCHECK2-Sirt1-3'UTR突变体(MT)和miR-485-3p共转染96孔板中的HEK293T细胞。48小时后收获细胞,并使用双重荧光素酶检测系统 (Promega,目录号E1910)来测量荧光素酶报告基因活性。一式三份进行三个独立实验。

[0489] 将含有miR-485-3p的靶位点的人CD36 3'-UTR通过PCR扩增从cDNA扩增并插入到pMir-靶标载体 (Addgene)中。使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen,目录号11668-027)用pMir-CD36-3'UTR WT或pMir-CD36-3'UTR MT和pRL-SV40载体 (Addgene)以及miR-485-3p共转染96孔板中的HEK293T细胞。24至48小时后收获细胞,并使用双重荧光素酶检测系统 (Promega,目录号E1910)来测量荧光素酶报告基因活性。一式三份进行三个独立实验。

[0490] 体外结合测定

[0491] 如下制备链霉亲和素磁珠 (Invitrogen,目录号11205D)用于体外结合测定。将珠(50μL)用500μL的1X B&W缓冲液(5mM Tris-HCl,pH 7.4;0.5mM EDTA;1M NaCl)洗涤五次。除去上清液后,将珠与500μL含有100μg酵母tRNA (Invitrogen,目录号AM7119)的1X B&W缓冲液一起在4℃下孵育2小时。将珠用500μL的1X B&W缓冲液洗涤两次,并在室温下与200μL含有400pmol生物素-miR485-3p的1X B&W缓冲液一起孵育10分钟。除去上清液,将珠用500μL的1X B&W缓冲液洗涤两次,并且用磁性立柱收集。将miRNA包被的珠与500μL含有1μg体外转录的靶mRNA的1X B&W缓冲液一起在4℃下孵育过夜。第二天,将珠用1ml 1X B&W缓冲液洗涤五次,然后重新悬浮在200μL不含RNA酶的水中。根据制造商的说明,用QiaZol裂解试剂 (Qiagen,目录号79306)提取结合的RNA。通过StepOnePlus实时PCR系统 (Applied Biosystems,REF:4376592)对提取的RNA进行定量。

[0492] 蛋白质印迹

[0493] 将脑组织、原代神经胶质细胞或皮层神经元细胞在冰上在含有蛋白酶/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)中均质化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:兔抗PGC-1α (Abcam,目录号ab54481,1:1000)、兔抗APP (Cell Signaling Technology,目录号2452,1:1000)、小鼠抗sAPPα (IBL,目录号11088,1:1000)、小鼠抗sAPPα (IBL,目录号10321,1:1000)、兔抗Adam10 (Abcam,目录号ab1997,1:100)、小鼠抗CTF (Biolegend,目录号SIG-39152,1:1000)、兔抗β-淀粉样蛋白(1-42) (Cell Signaling Technology,目录号14974,1:

1000)、兔抗BACE1 (Abcam, 目录号ab2077, 1:1000)、小鼠抗NeuN (Millipore, #MAB377, 1:1000)、兔抗裂解的半胱天冬酶3 (Cell Signaling Technology, 目录号9664, 1:1000)、小鼠抗GFAP (Merck, 目录号MAB360, 1:1000)、兔抗IL-1 β (abcam, 目录号9722, 1:1000)、兔抗NF-kB (p65) (Cell Signaling Technology, 目录号8242, 1:1000)、山羊抗Iba1 (Abcam, 目录号ab5076, 1:1000)、兔抗SIRT1 (Abcam, 目录号04-1557)、小鼠抗TNF- α (Santa Cruz, 目录号sc-52746)、抗肌动蛋白 (Santa Cruz, 目录号sc-47778)。使用增强的化学发光系统对结果进行可视化, 并通过光密度分析 (Image J软件, NIH) 进行定量。所有实验独立进行至少3次。

[0494] 为了测量脑组织中的酪氨酸羟化酶表达 (参见实施例15), 将脑组织在冰上在含有蛋白酶/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) 中均质化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: 兔抗酪氨酸羟化酶 (TH; 1:2000; Pel-Freez, Brown Beer, Wisconsin, USA) 和小鼠抗 β -肌动蛋白 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)。随后, 将膜与第二抗体在室温下孵育1小时, 且最后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。所有实验独立进行至少3次。

[0495] 可溶性和不溶性A β 提取

[0496] 将脑组织样品在冰上用含有蛋白酶/磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液均质化, 然后以12,000rpm离心15分钟。收集上清液。为了从脑组织中获得不溶性级分, 将脑裂解物的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 (pH7.5) + 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A β 。

[0497] 免疫组织化学

[0498] 对于免疫组织化学, 将注射了miR-485抑制剂或对照寡核苷酸的5XFAD脑切除、后固定并包埋在石蜡中。使用切片机切割穿过梗塞的冠状切片 (10- μ M厚) 并安装在载玻片上。除去石蜡, 并将切片用PBS-T洗涤, 并在10%牛血清白蛋白中封闭2小时。此后, 应用以下第一抗体: 纯化的小鼠抗 β -淀粉样蛋白, 1-16 (Biolegend, #803001, 1 μ g/ml)、兔抗 β -淀粉样蛋白 (1-42) (Cell Signaling Technology, #14974s, 1:100)、兔抗Iba-1 (Wako, #019-19741, 2 μ g/ml)、山羊抗Iba-1 (Abcam, #ab5076, 2 μ g/ml)、兔抗CD68 (Abcam, #ab125212, 1 μ g/ml)、兔抗GFAP (Abcam, #ab16997, 1:100)、小鼠抗GFAP (Millipore, #MAB360, 1:500)、大鼠抗CD36 (Abcam, #ab80080, 1:100)、小鼠抗TNF- α (Santa Cruz, #sc-52746, 1:100)、兔抗IL-1 β (Abcam, #ab9722, 1 μ g/ml)、兔抗裂解的半胱天冬酶-3 (Cell Signaling Technology, #9662S, 1:300)、小鼠抗NeuN (Millipore, #MAB377, 10 μ g/ml)。使用共聚焦显微镜 (Leica DMI8) 获得图像。使用ImageJ软件 (NIH) 相对于肌动蛋白对相对带强度进行归一化。

[0499] 硫黄素-S染色

[0500] 对于硫黄素-S (ThS) 染色, 将切成薄片的脑用过滤的1%硫黄素-S水溶液染色8分

钟。然后用80%、95%乙醇冲洗切片并用蒸馏水洗涤3次。之后,安装脑切片并让载玻片在黑暗中干燥过夜。图像是在Leica荧光显微镜上获取的。

[0501] AB¹⁻⁴²原纤维的制备

[0502] AB₁₋₄₂六氟异丙醛(HFIP)肽(#AS-64129)获自AnaSpec(Fremont, Ca, USA)。如前所述制备AB₁₋₄₂原纤维。Coraci等人, American J of Pathology 160(1):101-12(2002)。为了形成fAB合成AB₁₋₄₂, AB₁₋₄₂。将HFIP肽溶解在DMSO中至5mM的储备液浓度。然后将储备液在无血清DMEM中稀释至100μM,并在37℃下孵育72小时。通过SDS-PAGE确认纤维状AB(fAB)。

[0503] 体外吞噬作用测定(ELISA和免疫细胞化学)

[0504] 将BV2小胶质细胞(2x10⁵个)在6孔板中涂铺过夜。根据制造商的说明,将细胞使用TRANSIT-X2[®]转染试剂(Mirus Bio, 目录号MIR6000)转染,并用fAB处理4小时,最终浓度为1μM。适用时,将抗CD36抗体与fAB一起施加至培养基。4小时后,从BV2小胶质细胞中收集培养基。根据制造商的说明,通过人AB42ELISA试剂盒(Invitrogen, 目录号KHB3441)测量上清液中人AB(1-42)的水平。

[0505] 此外,通过荧光显微镜验证了胶质细胞吞噬作用。将盖玻片用聚-L-赖氨酸包被,之后在24孔板的孔中放置的每个盖玻片涂铺8x10⁴个原代神经胶质细胞过夜。根据制造商的说明,将原代神经胶质细胞使用TRANSIT-X2[®]转染试剂(Mirus Bio)转染,并在未标记的fAB中以1μM的最终浓度孵育4小时。在孵育四小时后,用冷PBS洗涤细胞。对于AB摄取测量,然后将原代神经胶质细胞用100%甲醇在-20℃下固定1小时,用PBS-T洗涤并在4℃下与小鼠抗β-淀粉样蛋白1-16、兔抗GFAP(abcam, #ab16997, 1:100)和兔抗Iba-1(Wako, #019-19741, 2 μg/ml)一起孵育。

[0506] FACS分析

[0507] 所有染色步骤在黑暗中进行并用BD Fc Block封闭。在4℃下使用以下抗体对原代神经胶质细胞进行染色:Alexa 488缀合的抗小鼠CD36(Biolegend, 目录号102607, 5 μg/ml)或异型体对照Ab(Biolegend, 目录号400923, 5 μg/ml) 30分钟。30分钟后,用FACS缓冲液(PBS+1%)洗涤细胞。用CellQuest(BD Bioscience)和FlowJo软件(Treestar)包分析数据。

[0508] 实时PCR

[0509] 使用小和大RNA分离试剂盒(Macherey Nagel, Dfiren)分离总RNA。使用miScript II RT试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)合成cDNA。为了分析,使用TOPREAL[™] qPCR 2X PreMIX(Enzynomics, Korea)在CFX连接系统(Bio-Rad)上通过TaqMan miRNA分析进行miR-485-3p的表达。使用SYBR green和Taq man探针对单独cDNA进行实时PCR测量,以使用Bio-Rad实时PCR系统测量双链DNA形成。引物是如下:探针:FAM-CGAGGTCGACTTCCTAGA-NFQ。(SEQ ID NO:51)miR-485-3p正向:5'-CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA-3'(SEQ ID NO:52);小鼠引物:肌动蛋白正向:5'-TCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'(SEQ ID NO:53),反向:5'-CAATGCCTGGGTACATGGTG-3'(SEQ ID NO:54);TNF正向:5'-CCAAGTGGAGGAGCAGCT-3'(SEQ ID NO:55),反向:5'-GACAAGGTACAACCCATCGG-3'(SEQ ID NO:56);IL-1β正向:5'-TTCGACACATGGGATAACGAGG-3'(SEQ ID NO:57),反向:5'-TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG-3'(SEQ ID NO:58);miR-16正向:5'-CAGCCTAGCAGCACGTAAAT-3'(SEQ ID NO:59);反向:5'-GAATCGAGCACCAGTTACG-3'(SEQ ID NO:60);miR-16水平用于归一化。通过2-ΔΔct方法分析相对基因表达。

[0510] ELISA (TNF- α 和IL-1 β)

[0511] 将原代混合神经胶质(2x 10⁵个)细胞涂铺在6孔板中过夜。用miR-485抑制剂小鼠 α -突触核蛋白PFF(聚集形式)以1 μ g/ml的最终浓度处理细胞18小时。18小时后,从原代混合神经胶质细胞中收集培养基。通过小鼠TNF- α ELISA试剂盒(R&D system,目录号MTA00B)和小鼠IL-1 β ELISA试剂盒(R&D system,目录号MLB00C)测量上清液中TNF- α 和IL-1 β 的水平。根据制造商的说明进行ELISA。

[0512] 行为测试(Y-迷宫和被动回避)

[0513] Y-迷宫由彼此相隔120°的三个黑色不透明的塑料臂(30cm×8cm×15cm)组成。将5XFAD小鼠置于中心并允许探索所有三个臂。记录臂进入次数和试验次数(偏移距离中心10cm,进入三个独立臂)以计算交替百分比。进入被定义为进入Y-形迷宫臂的所有三个附件。交替行为被定义为三元组(triad)次数除以臂进入次数减去2并乘以100。

[0514] 被动回避室被分成白色(明亮)和黑色(黑暗)隔室(41cm×21cm×30cm)。明亮隔室装有60W电灯。(黑暗)隔室的地板含有许多间隔5mm的(2-mm)不锈钢棒。测试进行了3天。第一天让小鼠在亮区适应5分钟。第二天是训练阶段。所述研究包括两个步骤。第一步将每只小鼠置于亮区,然后将其移动至暗区两次。第一步后一小时,将每只小鼠置于明亮隔室中。分隔两个隔室的门在30秒后打开,并且在小鼠进入黑暗隔室后,将门关闭,并通过网格地板传递足底电击(0.3mA/10g)3秒。如果小鼠超过5分钟没有进入暗区,则认为它已经学会避免,并且最多进行5次训练。训练试验后24小时,将小鼠置于亮室中进行测试。潜伏期被定义为在分隔两个隔室的门打开后,小鼠进入暗室所需的时间。小鼠进入暗区和退出至亮区的时间被定义为TDC(在黑暗隔室中花费的时间)。

[0515] 行为测试(转棒)

[0516] 将小鼠在转棒装置(3cm棒直径)上以10rpm的固定速度训练600秒,每天一次,连续3天。在300秒内以4-40rpm的恒定加速速率评估在棒上的表现。以60分钟间隔进行两次连续试验。

[0517] 行为测试(悬丝测试)

[0518] 对于运动协调的丝悬垂测试,将小鼠在2mm厚和55cm长的拉紧金属丝上进行测试。将定制的悬垂装置由60cm长的黑色聚苯乙烯盒组成,小鼠可跌落所述盒中。记录小鼠在悬垂后从丝上落下的潜伏期,测量每只小鼠3次试验中的最长悬垂时间。

[0519] 行为测试(爬杆测试)

[0520] 爬杆测试评估动物的敏捷性并且可以是运动迟缓的量度。将小鼠头朝上放置在表面粗糙的杆(直径8mm且高55cm)的顶部。表现被测量为每只小鼠从顶部到达地板所花费的总时间。在实际测试之前,将小鼠以5次试验/天进行训练,持续3天。每只小鼠的自发活动被评估为在6-OHDA和miR-485抑制剂静脉内施用后第6天进行的5次试验的平均值。

[0521] 行为测试(平衡木测试)

[0522] 小鼠在0.5cm宽、1m长的平衡木装置上。平衡木由50cm高的透明Plexiglas结构组成,跑道尽头具有暗休息箱。早上,将小鼠在横梁上训练3次,允许至少15分钟的试验间休息期。将小鼠放在黑暗休息箱中至少10秒,然后放回它们的家笼中。然后在训练阶段后至少2小时,在下午重新测试小鼠。在测试期间,记录小鼠表现。所述测试由三个试验组成,试验间休息期为至少10分钟。对于三个测试中的最后一个,手动计算总爪滑次数。对于SOD1G93A突

变型小鼠,在PBS或miR-485抑制剂注射后44或48天进行测试。

[0523] 数据分析

[0524] 所有数据均表示为平均值 $\pm$ SD。使用R (版本3.5.2) 分析NGS数据。使用非配对t检验确定针对两个不同组获得的值的统计显著性。使用GraphPad Prism 5或8 (GraphPad Software, La Jolla, CA) 进行统计测试。通过双因素Anova和非配对t检验分析两组之间的统计学显著性。通过非参数统计程序评估行为测试。

[0525] 实施例2:miR-485抑制剂的制备

[0526] (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。

[0527] 将N-(叔丁氧基羰基)-L-酪氨酸甲酯(Boc-Tyr-OMe) (0.5g, 1.69mmol) 和 K_2CO_3 (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°C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°C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°C下以12,000rpm离心。用去离子水洗涤沉淀并冻干。

[0528] (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)。

[0529] 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°C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。

[0530] 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°C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。

[0531] (b) 叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)(N_3 -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)。

[0532] 叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)通过Lys (TFA) -NCA与叠氮基-PEG (N_3 -PEG) 的开环聚合合成。简言之,将 N_3 -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_3 -PEG溶液中,并将反应混合物在37°C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。

[0533] 将 N_3 -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N₃-PEG-PLL粉末。

[0534] (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)(N₃-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。

[0535] 叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸/烟酰胺/巯基丙酰胺)(N₃-PEG-PLL(Nic/SH))在EDC/NHS存在下通过N₃-PEG-PLL和烟酸的化学改性合成。将N₃-PEG-PLL(372mg,25.8μmol)和烟酸(556.7mg,针对PEG-PLL的NH₂ 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N₃-PEG-PLL的NH₂ 1.5当量)添加至烟酸溶液中,并将NHS(334.2mg,针对PEG-PLL的NH₂ 1.5当量)逐步添加至混合物中。

[0536] 将反应混合物添加至N₃-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N₃-PEG-PLL(Nic)溶液后,将混合物溶液在37℃下搅拌4小时。

[0537] 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。

[0538] 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。

[0539] 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)。

[0540] 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N₃-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N₃-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CuSO₄·H₂O(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N₃-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(MWC0=7,000)中并用去离子水透析1天。冻干后获得最终产物。

[0541] (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。

[0542] 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,AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC;SEQ ID NO:30)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。

[0543] 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。

[0544] 在使用前将胶束(10 μ M的抗miRNA浓度)储存在4 $^{\circ}$ C。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%)。

[0545] 实施例3:对阿尔茨海默氏病中的SIRT1表达的分析

[0546] 先前的研究报告,人类AD患者的脑中SIRT1水平降低,并且这种降低影响了AD从早期至晚期的进展(Julien等人,2009;Lutz等人,2014)。为了开始评估本文公开的miR-485抑制剂的潜在治疗效果,评估了来自阿尔茨海默氏病(AD)患者的死后脑(中央前回)样品中的SIRT1表达。如图2A和2B所示,与正常人脑相比,AD患者脑中的SIRT1蛋白水平显著降低。

[0547] 为了证实上述结果,在已建立的AD动物模型(即,五只家族性AD突变(5XFAD)转基因小鼠)中评估了SIRT1表达。如图1C所示,与野生型对照动物相比,6月龄AD小鼠之间的SIRT1表达没有显著差异。然而,在11月龄AD小鼠中,SIRT1表达显著降低(参见图2C)。SIRT1表达随着5XFAD老龄小鼠逐渐降低(图2D)。

[0548] 上述结果证实了早期的研究并证明了SIRT1表达在AD中被下调,从而表明SIRT1可在AD发病机制中发挥作用。

[0549] 实施例4:对miR-485抑制剂调控miR485-3p表达的效力的分析

[0550] 为了鉴定能够调控SIRT1表达的潜在miRNA候选物,进一步分析了AD患者的脑样品中在样品中过表达的miRNA。如图3A所示,与正常健康组织相比,AD患者的中央前回组织中的miR485-3p表达显著更高。对于其它SIRT1相关miRNA,包括miR485-5p,没有观察到显著差异(参见图3B)。

[0551] 接下来,使用公开可用的算法(例如,Targetscan和miRbase程序),预测miR-485-3p在SIRT1的3'UTR中具有结合位点。为了证实,评估了人miR485-3p模拟物和抑制剂在小鼠中调控miR485-3p表达的能力。如图4所示,使用实时PCR分析,当用人miR485-3p抑制剂转染时,在小鼠原代皮层神经元中观察到miR485-3p表达的显著降低。

[0552] 此结果证实本文公开的miR485抑制剂可降低和/或抑制miR485-3p表达。

[0553] 实施例5:对SIRT1的miR-485抑制剂调控的分析

[0554] 为了解miR485-3p与SIRT1表达之间的关系,用以下之一转染小鼠原代皮层神经元:(i)人miR-对照,(ii)人miR485-3p,或(iii)miR485-3p抑制剂。然后,评估转染的细胞中SIRT1的表达。如图5A和5B所示,与miR-对照转染的神经元相比,在miR485-3p转染的原代皮层神经元中SIRT1蛋白表达降低。相比之下,用本文公开的miRNA抑制剂转染的原代皮层神经元表达显著更高水平的SIRT1蛋白。并且,如图5A和5B所示,SIRT1表达似乎与PGC-1 α 表达相关。

[0555] 这些结果证明本公开的miR485抑制剂可通过调控miR485-3p表达来增加SIRT1表达。结果进一步证明本文公开的miRNA抑制剂也可用于增加细胞中的PGC-1 α 蛋白表达。

[0556] 实施例6:对miR485-3p与SIRT1的结合的分析

[0557] 为了确认SIRT1上miR485-3p的靶位点,构建了含有潜在miR485-3p位点的野生型或突变序列的SIRT1 3'-UTR的荧光素酶报告基因质粒(参见图6A)。然后,用质粒转染

HEK293T细胞,并测量了转染细胞中的启动子活性。如图6B所示,野生型启动子活性显著降低,但突变体形式在miR485-3p转染的细胞中没有差异。

[0558] 接下来,使用体外结合测定评估了miR485-3p与SIRT1的3'UTR的物理结合。简言之,将链霉亲和素-miR483-3p包被的磁珠分别与SIRT1的体外转录的野生型3'UTR和突变型3'UTR一起孵育。洗脱结合的RNA并通过实时PCR定量。使用以下公式计算相对结合:相对结合 = $100 \times 2^{((\text{经调整的输出}) - (\text{Ct IP}))} / 100 \times 2^{((\text{经调整的输出}) - (\text{Ct WT}))}$ 。与野生型种子(即,miRNA所结合的位点)序列相比,在含有3'UTR的突变种子序列中,相对结合效率显著降低(参见图6C)。

[0559] 上述结果共同证明miR485-3p可直接靶向SIRT1的3'-UTR并且这种相互作用可负调控SIRT1表达。

[0560] 实施例7:miR-485抑制剂对β淀粉样蛋白(Aβ)斑块形成的影响的分析

[0561] 为了探索本文公开的miR-485抑制剂对阿尔茨海默氏病的潜在治疗益处,在10月龄5XFAD小鼠中评估了miR-485抑制剂对淀粉样蛋白斑形成和不溶性Aβ水平的影响。已经表明,5XFAD转基因小鼠在2个月时开始表现出淀粉样蛋白斑块沉积,并且随着AD进展,Aβ聚集到此类斑块中恶化。Eimer等人,Mol Neurodegener 8:2(2013);和Näslund等人,Proc Natl Acad Sci 91:8378-8382(1994)。

[0562] 简言之,用体内jetPEI试剂配制的miR-485抑制剂通过立体定位注射注射到动物的右侧脑室中。一周后动物接受第二次施用(参见图7A)。然后,使用6E10染色和硫黄素S使用免疫荧光显微镜对淀粉样蛋白斑块形成的数量进行定量。如图7B和7C所示,与用miR-对照处理的动物相比,用miR-485抑制剂处理的5XFAD动物中淀粉样蛋白斑块的数量显著减少,从而表明miR-485抑制剂可改善AD小鼠中的淀粉样蛋白负荷。

[0563] 为了进一步研究miR-485抑制剂对Aβ产生的影响,不溶性Aβ1-42、淀粉样蛋白前体蛋白(APP)和APP加工酶,包括α-分泌酶、ADAM(解整合素和金属蛋白酶)10和β-分泌酶BACE1的水平在来自不同处理组的AD小鼠的额叶皮层中进行了评估。

[0564] 如图7D和7E所示,与对照动物(即,用miR-对照处理)相比,用miR-485抑制剂处理的AD小鼠中不溶性Aβ1-42产生显著降低。与对照动物相比,经miR-485处理的动物还表现出额叶皮层中β-CTF和sAPPβ(即,BACE的主要产物)的水平降低(参见图7F和7G)。因此,在抑制剂处理的AD动物中BACE1的表达也降低。而且,证实了前面所示的结果(参见实施例4),用miR-485抑制剂处理的AD小鼠具有显著降低的SIRT1和PGC-1α蛋白水平。然而,一些测试的蛋白质不受miR-485施用的负调控。例如,来自不同处理组的动物之间的总APP水平没有显著差异(参见图7F和7G)。而且,对于Adam10和sAPPα蛋白,与对照动物相比,施用miR-485抑制剂显著增加了这些蛋白质的表达。

[0565] 上述结果证明,本文公开的miR-485抑制剂可调控不同的基因,并且由此减少体内Aβ产生和斑块形成。

[0566] 实施例8:miR-485抑制剂对Aβ斑块吞噬作用的影响的分析

[0567] 阿尔茨海默氏病是由Aβ产生与清除之间的不平衡引起的。先前的研究表明,神经胶质细胞介导AD脑中聚集的Aβ的清除和吞噬作用,其中它们有助于缓解AD。Ries等人,Front Aging Neurosci 8:160(2016)。因此,为了进一步探索神经胶质细胞在AD中的作用,使用Iba1和6E10抗体使用免疫组织化学分析在AD小鼠中评估了神经胶质细胞和Aβ斑块的共定位。

[0568] 如图8A-8D所示,在用miR-485抑制剂处理的AD小鼠中,AB斑块和神经胶质细胞的共定位显著更高。此外,向AD小鼠施用miR-485抑制剂持续增加了原代神经胶质细胞对AB斑块的摄取(参见图8E)。

[0569] 接下来,为了进一步评估神经胶质细胞对AB的吞噬和清除,使用CD68、6E10和Iba1共免疫染色定量具有内化AB斑块的CD68+小胶质细胞吞噬体的数量。CD68(一种溶酶体/内体相关膜糖蛋白家族的跨膜糖蛋白)充当碎片清除的清道夫受体。Yamada等人,Cell Mol Life Sci 54(7):628-40(1998)。

[0570] 如图8F和8G所示,与对照动物(即,用miR-对照处理)相比,在用miR-485抑制剂处理的AD小鼠中,淀粉样蛋白斑块周围的Iba1+小胶质细胞的聚集表现出弥漫性CD68分布。

[0571] 为了证实上述结果,通过在37℃下孵育AB单体(100μM)过夜、然后用细胞培养基稀释肽储备液来制备AB聚集体。然后,将原代神经胶质细胞用miR-485抑制剂转染,并用1μM纤维状淀粉样蛋白β(fAB)进一步处理4小时。与上述结果一致,与对照转染细胞相比,条件培养基中的AB水平在miR485-3p ASO转染的细胞中显著降低(图8H)。

[0572] 上述结果证明本文公开的miR-485抑制剂可增强小胶质细胞AB吞噬作用。

[0573] 实施例9:对CD36的miR-485抑制剂调控的分析

[0574] 如本文所述,CD36/SR-BII可有助于神经胶质细胞吞噬AB。使用公开可用的算法(参见实施例3),预测miR-485-3p在CD36的3'UTR中也具有结合位点。因此,为了评估本文公开的miR-485抑制剂是否也能够调控CD36表达,用miR-485抑制剂或miR-对照(如先前实施例中所述)处理AD小鼠,然后评估动物中CD36的表达。

[0575] 如图9A和9B所示,与对照动物相比,用miR-485抑制剂处理的AD小鼠表现出显著更高的CD36表达。此外,使用免疫组织化学,CD36表达在Iba-1阳性小胶质细胞中明显更高(图9C)。

[0576] 基于上述观察结果,接下来检查了用miR485-3p或miR-485抑制剂转染是否能够改变小鼠原代神经胶质细胞中的CD36表达。如图9D和9E所示,与miR-对照相比,CD36表达在miR485-3p转染的原代神经胶质细胞中显著降低。相比之下,用miR-485抑制剂转染的细胞表现出显著更高的CD36表达。

[0577] 上述结果证明本公开的miR-485抑制剂还可通过调控miR-485-3p的表达来增加CD36表达。

[0578] 实施例10:对miR485-3p与CD36的结合的分析

[0579] 为了确认CD36的3'-UTR内miR485-3p的靶位点,构建了含有潜在miR485-3p位点的野生型或突变序列的荧光素酶报告基因质粒。然后,用质粒转染HEK293T细胞,并测量了转染细胞中的启动子活性。如图10所示,野生型启动子活性显著降低,但突变形式在miR485-3p转染的细胞中没有差异。

[0580] 接下来,使用如实施例5中所述的体外结合测定评估了miR485-3p与SIRT1的3'UTR的物理结合。在含有3'UTR的突变体种子序列中,相对结合效率显著降低。

[0581] 上述结果共同证明miR485-3p可直接靶向CD36的3'-UTR并且这种相互作用可负调控CD36表达。

[0582] 实施例11:CD36调控对AB吞噬作用的影响的分析

[0583] 为了进一步评估CD36+神经胶质细胞对AB吞噬作用的作用,检查了CD36抑制性抗

体是否能够影响神经胶质细胞吞噬作用。简言之,用miR-485抑制剂或miR-对照转染原代神经胶质细胞。用CD36阻断抗体或对照IgG处理经转染的细胞,然后用1 μ M纤维状淀粉样蛋白 β (fA β) 处理4小时。ELISA测定用于确定从不同转染细胞收集的条件培养基中的A β 吞噬作用。

[0584] 如图11所示,与对照转染细胞相比,用miR-485抑制剂转染的细胞中A β 水平显著降低。然而,这种效应在用CD36阻断抗体处理的细胞中被显著消除。

[0585] 这些结果证实,本文公开的miR-485抑制剂可以miR485-3p依赖性方式调控CD36表达,并且因此能够影响A β 吞噬作用。

[0586] 实施例12:miR-485抑制剂对神经炎症的影响的分析

[0587] 已知AD与脑内的炎症相关,并且由fA β -刺激的神神经胶质分泌的炎症介质可导致神经元损失和认知减退。Cunningham等人, *J Neurosci* 25 (40) :9275-84 (2005)。因此,为了评估本文公开的miR-485抑制剂是否对神经炎症具有任何影响,用miR-485抑制剂或miR-对照转染原代神经胶质细胞,随后用1 μ M纤维状淀粉样蛋白 β (fA β) 处理。然后,检查细胞中SIRT1和不同炎症介质(即,NF- κ B、TNF- α 和IL-1 β) 的水平。

[0588] 如图12A和12B所示(并且与较早的数据一致-参见实施例4),在fA β 处理的原代神经胶质细胞中SIRT1表达显著降低,但是在用miR-485抑制剂转染的细胞中这种降低显著恢复。观察到的SIRT1表达与NF- κ B表达以及TNF- α 和IL-1 β 的表达水平相关(参见图12A和12B)。在用miR-485抑制剂转染的细胞中,这些炎症介质的水平显著降低,其似乎是剂量依赖性的(参见图12I和12J)。

[0589] 为了进一步表征miR-485抑制剂对神经炎症的影响,如前所述用miR-485抑制剂处理AD小鼠(参见实施例1)。然后,评估了Iba-1(即,激活的小胶质细胞标志物)和GFAP(即,激活的星形胶质细胞标志物)的表达模式。

[0590] 如图12C和12D所示,在用miR-485抑制剂处理的AD小鼠中,表达高水平Iba-1的小胶质细胞和表达高水平GFAP的星形胶质细胞显著减少。而且,如上在经转染的细胞情况下观察到的,如使用实时PCR、蛋白质印迹和免疫组织化学所测量,在miR-485抑制剂处理的动物中,NF- κ B、TNF- α 和IL-1 β 的表达水平也显著降低(参见图12E-12H)。

[0591] 上述结果证明,通过降低miR485-3p表达,本文公开的miR-485抑制剂可通过调节SIRT1/NF- κ B信号传导影响神经胶质细胞激活并减少促炎性细胞因子产生。

[0592] 实施例13:miR-485抑制剂对神经元损失和突触后的影响的分析

[0593] 如前所述,5XFAD转基因小鼠在2个月时开始表现出淀粉样蛋白斑块沉积,并且在9个月时表现出皮质层V中的神经元损失(参见实施例7)。5XFAD小鼠中的突触和神经元损失与A β 累积和神经炎症相关。Eimer等人, *Mol Neurodegener* 8:2 (2013)。鉴于来自先前实施例的结果(例如,用miR-485抑制剂调控SIRT1和CD36表达可控制AD小鼠中的A β 加工、吞噬作用和炎症),通过评估NeuN(一种神经元细胞标志物)和裂解的半胱天冬酶e-3来检查本文公开的miR-485抑制剂是否对神经元细胞死亡具有任何影响。

[0594] 基于蛋白质印迹分析,在miR-485抑制剂处理的动物的皮层区域中,NeuN的表达增加,而半胱天冬酶-3的蛋白质表达减少(参见图13A和13B)。然而,在相同条件下,在海马体中没有观察到这种效应。使用免疫组织化学观察到类似的结果(参见图13C和13D)。

[0595] 接下来,通过评估PSD-95表达来检查miR-485抑制剂对突触后的影响。如图13E和13F所示,与对照动物相比,在用miR-485抑制剂处理的AD小鼠的额叶皮层中PSD-95蛋白表

达显著更高。

[0596] 上述结果通过表明本文公开的miR-485抑制剂不仅可使神经元损失最小化、而且还增加突触后进一步证明了所述抑制剂对AD的治疗效果。

[0597] 实施例14:miR-485抑制剂对认知功能的影响的分析

[0598] 为了确定以上在实施例13中观察到的结果(即,增加的突触后和减少的神经元损失)是否与认知功能的改善相关,将AD小鼠再次用如在先前实施例中描述的miR-485抑制剂或miR-对照处理。然后,使用Y-迷宫和被动回避任务(PAT)在动物中评估认知功能,所述Y-迷宫和被动回避任务被广泛接受为用于评估空间工作记忆的行为范式。

[0599] 最后一次注射后两天,我们发现在miR-485抑制剂处理的小鼠中自发交替百分比显著增加。在对照与miR-485抑制剂处理的5XFAD之间臂进入总数没有显著差异,从而表明Y-迷宫中的一般运动和探索活动的水平没有改变(图14A)。此外,我们基于足底电击与自发偏好的特定环境背景(黑暗对比明亮)之间形成的关联,检查了被动回避任务中的联想记忆。在对照与miR-485抑制剂处理的5XFAD之间步入潜伏期相似。然而,经miR-485抑制剂处理的小鼠在接受电击后24小时在黑暗隔室中停留的潜伏期显著减少(图14B)。

[0600] 上述结果共同证明本文公开的miR-485抑制剂可调控(即,增加)参与神经变性疾病如AD的不同基因的表达。如上述实施例所示,此类基因包括SIRT1、CD36和PGC-1 α 。不受任一种理论的束缚,上述结果表明,通过调控这些基因的表达,本文公开的miR-485抑制剂可治疗AD的许多方面(例如,减少A β 产生和斑块形成,促进A β 斑块吞噬作用,减轻神经炎症,减少神经元损失,增加突触后,并改善认知功能)(参见图15)。

[0601] 实施例15:对miR-485抑制剂在体内调节SIRT1、PGC-1 α 和CD36表达的效力的分析

[0602] 为了进一步评估本文公开的miR-485抑制剂在调控SIRT1、PGC-1 α 和CD36表达中的效力,向野生型雄性Cr1:CD1(ICR)小鼠施用了(通过静脉内施用)单剂量(100 μ g/小鼠;5mg/kg)的miR-485抑制剂(参见实施例1),所述小鼠购自KOATECH(韩国)。对照动物接受了miR-对照(参见实施例1)。然后,在施用后的不同时间点处死动物,并使用蛋白质印迹评估脑皮层和海马体中SIRT1、PGC-1 α 和CD36的表达水平。

[0603] 如图16A-16C、17A-17C和18A-18B所示,单次施用miR-485抑制剂导致皮层和海马中SIRT1、PGC-1 α 和CD36表达的快速增加。对于SIRT1,在施用后约48小时在皮层中观察到峰值表达(相对于对照动物中的表达的大约300%增加)并且在施用后约24小时在海马体中观察到峰值表达(相对于对照的大约150%增加)(分别参见图16A和17A)。PGC-1 α 的峰值表达还在施用后约48小时在皮层中(相对于对照的大约100%增加)以及在施用后约24小时在海马体中(相对于对照的大约50%增加)观察到(分别参见图16B和17B)。对于CD36,观察到了类似的结果(参见图18A)。

[0604] 所述结果证实本文公开的miR-485抑制剂在调控SIRT1、PGC-1 α 和CD36表达中的效力。作为比较,小分子ApoE4先前已被证明对使体内SIRT1表达正常化具有积极作用。参见Campagna等人,Sci Rep 8(1):17574(2018年12月)。每天施用56天后(剂量为每天40mg/kg),海马体中SIRT1表达增加大约20%,但皮层中没有增加。使用本文公开的miR-485抑制剂(例如,SEQ ID NO:28),以低得多的剂量(即,5mg/kg)单次施用导致海马体和皮层中显著更大的SIRT1表达。

[0605] 实施例16:miR-485抑制剂对帕金森氏病的治疗效果的分析

[0606] 除了上面提供的实施例外,使用例如,Thiele等人,J Vis Exp.60:3234 (2012) 中描述的6-OHDA小鼠模型检查了本文公开的miR-485抑制剂对帕金森氏病的治疗效果,所述文献以引用的方式整体并入本文。具体而言,评估了miR-485抑制剂对多巴胺能变性的影响。单侧6-OHDA模型诱导部分纹状体病变,伴有进行性逆行黑质纹状体病理学,并允许基于与PD相关的行为和神经化学参数进行评估。

[0607] 简言之,在施用6-羟基多巴胺(6-OHDA)前大约30分钟,将小鼠腹膜内注射地昔帕明(在0.9%NaCl中25mg/kg),然后通过吸入蒸气Isotroy(Toikka Pharmaceuticals Limited,Gujarat,India)进行麻醉。将麻醉的小鼠置于立体定位架(JEUNG DO BIO&PLANT CO.,LTD,Seoul,Korea)中并以0.5 μ l/min的速率接受单侧注射6-OHDA(在溶解于0.9%NaCl中的0.02%抗坏血酸中5 μ g/ μ l;Sigma Aldrich)到右侧纹状体(相对于前囟,前后:+0.9mm;中间外侧:-2.2mm;背腹侧:-2.5mm),总剂量15 μ g/3 μ l。所有注射均使用连接至注射泵(Harvard Apparatus,Holliston,MA,USA)的Hamilton注射器(30S针头)进行。注射后,5分钟后缓慢拔出针头。

[0608] 在施用6-OHDA以在动物中诱导脑损伤后,一天后,动物通过静脉内施用(尾静脉注射)接受单剂量的miR-485抑制剂(50 μ g/头)(SEQ ID NO:30)或对照寡核苷酸(SEQ ID NO:61)。参见图23A。在miR-485抑制剂施用后第6天,使用以下一种或多种测试评估动物的运动功能:爬杆测试、转棒、悬丝测试和平衡木(参见实施例1)。在miR-485抑制剂施用后第9天,处死动物并通过使用蛋白质印迹测量酪氨酸羟化酶表达来评估miR-485抑制剂施用对脑组织的影响。还使用蛋白质印迹分析评估了miR-485抑制剂对神经炎症的影响。

[0609] 在图23B-23E中,如至少使用转棒(表现出跌落时间的潜伏期增加)、悬丝测试(表现出跌落时间的潜伏期增加)和平衡木(脚滑数量减少)所测量,用miR-485抑制剂处理的6-OHDA小鼠表现出改善的运动功能。miR-485抑制剂处理的动物还在黑质(SN)和纹状体(STR)中表现出更高的酪氨酸羟化酶表达(即,用于多巴胺能神经元的标志物),从而表明多巴胺神经元损伤减少(参见图23F-23I)。与对照动物相比,在miR-485抑制剂处理的动物的黑质中观察到IL-1 β 的表达显著降低(参见图23J和23K)。然而,miR-485抑制剂施用似乎不会显著影响Iba-1(激活的小胶质细胞标志物)、GFAP(激活的星形胶质细胞标志物)和TNF- α 表达。

[0610] 接下来,为了进一步评估miR-485抑制剂对帕金森氏病的治疗效果,将额外的6-OHDA小鼠用以下剂量之一的miR-485抑制剂的单次静脉内施用处理:2.5mg/kg或5mg/kg。用PBS或对照寡核苷酸处理的健康和6-OHDA小鼠用作对照。然后,在miR-485抑制剂施用后第6天,使用以下一种或多种测试再次评估动物的运动功能:爬杆测试、转棒、悬丝测试和平衡木(参见实施例1)。

[0611] 如图39A-39D所示,并且与先前数据一致,用任一剂量的miR-485抑制剂处理的动物表现出显著改善的运动功能。总的来说,此实施例中提供的结果表明,本文公开的miR-485抑制剂可改善与诸如帕金森氏病的疾病相关的神经元损伤(例如,减少多巴胺神经元损伤和/或减轻神经炎症),其进而可改善运动功能。

[0612] 实施例17:miR-485抑制剂对自噬的影响的分析

[0613] 如本文所述,自噬在长寿命蛋白质、蛋白质聚集体以及受损细胞器的适当降解中起重要作用,以维持细胞稳态。因此,为了评估本文公开的miR-485抑制剂是否对CNS细胞中

的自噬具有任何影响,用不同浓度的miR-485抑制剂与小鼠 α -突触核蛋白PFF的组合将原代皮层神经元和原代混合神经胶质细胞(聚集形式)(mPFF)(1 μ g/mL)处理24或48小时。然后,使用蛋白质印迹分析评估细胞中p62(一种将底物募集至自噬体的衔接分子)和LC3B(自噬体生物发生的标志物)的表达水平。

[0614] 如图24A和24B所示,对于所有测试的浓度,miR-485抑制剂对原代皮层神经元中的p62表达没有任何显著影响。然而,miR-485抑制剂处理导致mPFF处理的原代皮层神经元中LC3B表达的显著恢复。例如,在48小时,在仅用mPFF处理的原代皮层神经元中检测到最小LC3B表达(参见图24A,右侧凝胶,第2垂直泳道)。然而,随着miR-485抑制剂浓度的增加,LC3B的表达逐渐增加(参见图24A,右侧凝胶,第3、第4和第5垂直泳道)。在原代混合神经胶质细胞中观察到类似的结果(参见图24B)。

[0615] 为了证实上述结果,用不同剂量的miR-485抑制剂(0nM、50nM、100nM和300nM)转染BV2小胶质细胞,且随后用1 μ M最终浓度的纤维状淀粉样蛋白 β (α A β)处理24小时。然后,使用蛋白质印迹分析评估与自噬相关的不同蛋白质,即FOXO3a、LC3和p62的表达水平。如图40A-40D所示,在用miR-485抑制剂转染的细胞中,存在这些蛋白质的表达的剂量依赖性增加。

[0616] 上述结果共同证明本文公开的miR-485抑制剂可增强原代皮层神经元和神经胶质细胞中的自噬通量,其可用于治疗本文公开的神经营养疾病(例如,帕金森氏病和/或阿尔茨海默氏病)。

[0617] 实施例18:对miR-485抑制剂的安全性特征的分析

[0618] 为了评估miR-485抑制剂的体内施用是否会导致任何副作用,进行了单剂量毒性测试。简言之,以下列剂量之一向雄性和雌性大鼠施用miR-485抑制剂:(i) 0mg/kg (G1), (ii) 3.75mg/kg (G2), (iii) 7.5mg/kg (G3), 和 (iv) 15mg/kg (G4)。然后,在转移后的不同时间点在动物中观察体重、死亡、临床体征和病理学的任何异常。

[0619] 如图19A和19B所示,施用miR-485抑制剂(在所有测试的剂量下)似乎对雄性和雌性大鼠的体重没有任何异常影响。类似地,在任何经处理的动物中均未观察到死亡和病理学异常(参见图20A、20B、22A和22B)。至于可能的临床相关副作用(例如,NOA、充血(尾部)和水肿(面部、前肢或后肢)),在所有经处理的动物中,任何此类影响在施用后1天都消失了(参见图21A和21B)。

[0620] 总的来说,上述结果证明,本文公开的miR-485抑制剂不仅在调控SIRT1、PGC-1 α 和CD36的表达方面有效,而且在体内施用也是安全的。

[0621] 实施例19:通过miRNA病毒递送系统开发新的阿尔茨海默氏病动物模型

[0622] 为了进一步评估本文公开的miR-485抑制剂的治疗效果以及miR485-3p表达对阿尔茨海默氏病(AD)的作用,开发了新的动物模型。简言之,在构建新的AD动物模型时使用了一种或多种以下材料和方法:

[0623] 慢病毒转移质粒

[0624] 含有成熟小鼠miR-485-3p(例如,485-3p-lenti-mini-7-GFP-F)的pLenti-III-mir-GFP载体的序列是如下(miR-485-3p序列用大写字母注明):

[0625] Lenti-mir-GFP-克隆载体序列:

[0626] ttttggattgaagccaatatgataatgagggggtggagtttgtgacgtggcgcgggcggtgggaacgg
ggcggtgacgtagtagtggtggcggaagtgtgatgttgcaagtgtggcggaacacatgtaagcgacggatgtggca

aaagtgcagtttttgggtgtgcgccggtgtacacaggaagtgcacattttcgcgcggttttaggcggatgttgtagt
aaatttgggcgtaaccgagtaagatttggccattttcgcgggaaaactgaataagaggaagtgaatctgaataat
tttgtgttactcatagcgcgtaatacggcagacctcagcgctagattattgaagcatttatcagggttattgtctc
atgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgc
cacctgacgttaactataacggctcctaaggtagcgaaaaatgtagtcttatgcaatactctttagtcttgaacat
ggtaacgatgagtttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcacctgcatgccgattgggtggaagtaaggtgg
tacgatcgtgccttatttaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgca
gagatattgtatttaagtgcctagctcgatacataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagct
ctctggctaactaggggaaccactgcttaagcctcaataaagccttgcttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgct
ctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaaatctctagcagtgggcgccc
gaacagggcacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacg
gcaagaggcgagggggcgcgactgggtgagtacgcaaaaaattttagactagcggaggctagaaggagagagatgggt
gcgagagcgtcagttatagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaa
aaaatataaattaaaacatatagtagtggaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaa
acatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcat
tatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttttagacaa
gatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagccccgctgatcttcagacctggaggaggagata
tgagggacattggagaagtgaattatataaataaaagtagtaaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaag
gcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtggaataggagctttgttccttggttcttgggagcag
caggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtcttggtatagtgcagca
gcagaacaatttgcctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctcggggcatcaagcagctc
caggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaac
tcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaaatcacacgac
ctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccag
caagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaatt
ggctgttggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgcgtgactttc
tatagtgaatagagtttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacctccaacccccgaggggacccgac
aggcccgaaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgac
ggatatcgaaagcttgggattcgaatttaaaagaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtag
acataatagcaacagacatacaaaactaaagaactacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcggggtttttcg
aacctaggggttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgcccattga
cgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacg
gtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaggtacgccccatttgacgtcaatgacggtaaa
tgccccgcctggcattatgccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgttttagtcat
cgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttcca
agtctccacccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaaca
actccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaa
ccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaagaaccgagtttaaaactccctatcagt
gatagagatctccctatcagtgatagagagctagaatctagaggtaccgccaccatgggtgagcaagggcgaggagc

tgttcaccggggtggtgcccaccttggtcgagctggacggcgacgtaaaccggccacaagttcagcgtgtccggcga
ggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctgg
cccacctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgttcagccgtaccccgaccacatgaagcagcacgact
tcttcaagtcgcccattgcccgaaggctacgtccaggagcgaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagac
ccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacacctggtgaaccgcacatcgagctgaagggcacgacttcaaggaggac
ggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaaga
acggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagca
gaacacccccatcgggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcgcccctgagcaaa
gacccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgcccgggatcactctcggcattggacg
agctgtacaagtgaggtaccgatctgaattcatagctagccctgcaggtctagactcgagGTCATACAGGCTCT
CCTCTCTgcccgcgagtcgagtaccatacgacgtcccagactacgcttgagtttaaacacgcgtggtgtggaaa
gtccccaggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcattctcaattagtcagcaaccaggtgtggaaagtc
ccaggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcattctcaattagtcagcaaccatagtcgcccccctaactc
cgccccatccccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatggctgactaattttttttatattatgc
agaggccgaggccgcctcgccctctgagctattccagaagtagtgaggaggttttttggaggccatgaccgagta
caagcccacggtgcgcctcgccaccgcgacgacgtccctcggggcgtacgcacctcgccgccggttcgcccac
taccgccccacgcgccacaccgtggaccgccgacgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttctctca
cgcgctcgggctcgacatcggaaggtgtgggtcgcgacgacggcgccggtggcggtctggaccacgccgga
gagcgtcgaagcggggcggtgttcgcccagatcgggccgcgcatggccgagttgagcggttccccggtggccgcg
cagcaacagatggaagggtcctggcgccgcaccggcccaaggagccccgctggttctggccaccgtcggcgtct
cgccccgaccaccagggaagggtctgggcagcgccgtcgtgctccccggagtggaggcgccgagcgcgccgggt
gcccgccttcttgagacctccgccccgcaacctcccccttctacgagcggctcggttcaccgtcaccgccgac
gtcgaggtgcccgaaggaccgcgacactggtgcatgaccgcgaagcccggtgcctgaacgcgttccggaaatcaac
ctctggattacaaaatttgtaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgc
tgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgatggctttcattttctcctccttgataaatcctggttg
ctgtctctttatgaggagttgtggccgttgctcaggcaacgtggcggtggtgtgcactgtgttgctgacgcaacc
ccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggc
ggaactcatcgccgcctgccttgcccgtgctggacaggggtcggtgttgggcactgacaattccgtggtgttg
tcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgct
acgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcgccctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtct
cgcttccgcccagacgagtcggatctcccttggggcgccctccccgctgtccggatggaagggttaattcact
cccaacgaatacaagatctgctttttgcttgactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctc
tggttaactaggaaccactgtttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgctctg
ttgtgtgactctggttaactagagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaaattctagcagtagtagttcatg
tcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgaaggaacttgtttattgcagct
tataatggtttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagttgtg
gtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggcatctatgtcgggtgcggagaaagaggtaatgaaatgg
cattatgggtattatgggtctgcattaatgaatcggccaacgatccccggtgtgaaataccgcacagatgcgtaagg
agaaaataccgcacatcaggcgtcttccgcttctcgtcactgactcgtgcgctcggtcgttcggctgcggcgag

cggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagc
aaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggtttttccataggctccgccccctgac
gagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttcccc
ctggaagctccctcgtagcgtctcctgttccgacctgcccgttacccgataacctgtccgcctttctcccttcggg
aagcgtggcgcttttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgt
gtgcacgaaccccccggttcagcccgcgctgccccttatccggtaactatcgctcttgagtccaacccggtaagac
acgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagtt
cttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatatttggtatctgcgctctgctgaagccagttacc
ttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaaccacccgctggtagcgggtggtttttttgtttgcaagc
agcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggctctgacgctcagtgga
cgaaaactcacgttaagggtttttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaa
tgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcac
ctatctcagcgatctgtctatcttctggtcatccatagttgacctgactccccgtcggtgtagataactacgatacggga
gggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaata
aaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgcctccatccagctctattaattggt
gccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgccgaacggttggtgaaaaaggatcttcacctagatc
cttttccagtagaaaggcagtcgcgagaaacgggtgctgaccccgatgaatgtcagctactgggctatctggacaa
gggaaaacgcaagcgcaaagagaaagcaggtagcttgacgtgggcttacatggcgatagctagactgggcgggtttt
atggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgccctcttggttaagggtgggaagccctgcaaagtaaactgg
atggcttttctcgccccaaggatctgatggcgaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgtttc
gcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttggttgagagaggctattcggctatgactgggc
acaacagacaatcggtctgctctgatgcccgcgtgttccggctgtcagcgcaggggccccgggttctttttgtcaag
accgacctgtccgggtgcccgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtaggtggccacgacgggcgttc
cttgccgcagctgtgctcgacgttgctactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcagga
tctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcccgggctgcatacgctt
gatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggtatggaagccggctc
ttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgccgacccgaactgttcgccaggctcaaggcgag
catgcccgcagggcaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgc
ttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcgaccgctatcaggacatagcgttggttaccgctgata
ttgctgaagagcttgccggcgaatgggtgaccttctcgtgctttacggtatcgccgtcccgattcgcagcg
catcgcttctatcgcttcttgacgagttcttctgaattttgttaaaattttgttaaatcagctcatttttta
ccaataggccgaaatcggaacatcccttataaatcaaaagaatagaccgcgatagggttgagtgttgttccagtt
tggaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaaggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcc
cactacgtgaaccatcacccaaatcaagtttttgcggtcgaggtgccgtaaagctctaaatcggaaccctaaagg
gagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcg
ggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgcgcgttaatgcgccgtaca
ggcgcgctccattcgccattcaggatcgaattaattcttaattaacatcatcaataatatacctt (SEQ ID NO:
122)

[0627] 在293T细胞中产生慢病毒

[0628] 将HEK 293T细胞平铺在10cm组织培养板中,直到它们达到70%-80%的汇合度(例如,在10ml的DMEM完全生长培养基中 3×10^6 个细胞)。在转染病毒DNA前两小时,从293T细胞中除去培养基并用5ml的DMEM生长培养基替代。将TransIT®-Lenti试剂(Mirus Bio,目录号6600、6603、6604、6605、6606和6610)加热至室温并轻轻涡旋。将1ml的Opti-MEM减血清培养基置于无菌管中。将10ug的pMDLg/pRRE包装质粒(Addgene,质粒#12251)、5ug的pRSV-REV包装质粒(Addgene,质粒#12253)、2.5ug的pMD2.G包膜质粒(Addgene,质粒#12259)和2.5ug的485-3p-lenti-mini-7-GFP-F质粒(上文论述)在单独无菌管中合并,充分混合,并转移至含有Opti-MEM减血清培养基的管中。将35ul的TransIT®-Lenti试剂添加至稀释液中并在室温下孵育20分钟以形成转染复合物。TransIT®-Lenti试剂:将DNA复合物(如上制备)逐滴分布至含有293T细胞的10-cm培养板中。在慢病毒收获前,将转染的细胞培养物在37℃下在5% CO2中孵育72小时。

[0629] 72小时孵育后,将细胞在无菌管中以6000RPM离心15分钟。将含有病毒的上清液以29000RPM超离心2小时以获得含有病毒的团块。将团块在冷PBS中以1:1000稀释,并将等分试样储存在-80℃。

[0630] 病毒滴定

[0631] 为了确定病毒制剂的滴度,将293T细胞以每孔 4×10^5 个细胞涂铺在DMEM完全生长培养基中的6孔组织培养板中。第二天,在每个孔中留下大约1mL的生长培养基,并将1μL慢病毒构建体(对照载体或包含miR-485-3p和GFP的载体)和聚凝胺(8μg/mL)添加至单个孔中。将慢病毒构建体在添加前进行连续稀释(1、0.1和0.01)。孵育六小时后,用新鲜培养基更换培养基。然后,48小时后,用温热PBS洗涤细胞,用胰蛋白酶消化,并通过流式细胞术(BD Accuri C6 plus)分析GFP表达。

[0632] 动物

[0633] 小鼠(野生型;雄性;C57BL/6J;6周龄)购自Dae Han Bio Link Co Ltd (Chungju-si, Republic of Korea)。接受手术和行为实验的小鼠在单个笼中饲养,以消除由其它雄性攻击引起的身体损伤和心理焦虑。在12小时光照/12小时黑暗循环环境中随意提供水和食物。

[0634] 在慢病毒对照载体(没有miR-485-3p)和lenti-mir485-3p载体注射到脑中的小鼠中,在手术后定期检查外观和体重的任何身体异常。所有行为实验均在光照期进行,并且每组中的所有小鼠都在相同条件下进行测试。

[0635] 体内慢病毒载体注射和组织制备

[0636] 使用麻醉剂(2,2,2-三溴乙醇(250mg/kg腹膜内;Sigma-Aldrich,目录号75-80-9))通过腹膜内注射使6周龄小鼠麻醉。使用立体定位手术设备和Hamilton注射器700系列,将慢病毒载体注射到海马体中的齿状回和CA1区域(AP=-2mm,L=±1.5mm,腹侧(V)=-2.7和-2.0mm)中。每个部位的病毒体积是1.5ul,注射流速是0.2ul/min,并且注射后剩余时间是15分钟。手术后,检查麻醉恢复过程和体重以观察是否存在因手术引起的健康问题。

[0637] 行为实验完成后,将小鼠麻醉,通过心脏灌注处死,并且小心取出大脑并在4℃下在4%多聚甲醛中后固定4小时,然后在4℃下在30%蔗糖/0.1M PBS中冷冻保存约48小时。将脑包埋在OCT化合物(Tissue-Tek®, Sakura, Inc., 目录号4583)中并使用Leica CM1860低温恒温器(Leica Microsystems)在-22℃下矢状地切成40μm厚的切片。在病毒GFP图像的情

况下,将细胞核用DAPI (1:500;Invitrogen,目录号D 3571) 染色并用硬质抗褪色培养基固定。使用共聚焦显微镜 (Leica DMI8) 获得图像。

[0638] 行为测试

[0639] 小鼠行为实验按以下顺序进行:(i) 旷场试验,(ii) Y-迷宫,(iii) 新物体识别测试,和(iv) 被动回避测试。(参见例如,图26)。当一个行为实验完成后,进行下一个实验,恢复期为2天。使用智能3.0视频跟踪系统 (Panlab,worldwideweb.harvardapparatus.com/smart-video-tracking-system) 分析不包括被动回避的行为实验。

[0640] (i) 旷场试验

[0641] 将小鼠置于白色哑光室 (450mm x450mm x450mm) 的中心并允许自由移动30分钟。进行了数字视频跟踪。通过分析以cm为增量的总距离,测量了30分钟的基础运动,并记录了中心距离(在中心区中行进的距离) (cm) 和在整个区域中移动的总距离 (cm)。中心距离除以总距离x100被计算为中心区活动(%)。中心距离-总距离比率可用作焦虑相关反应的指标。

[0642] (ii) Y-迷宫

[0643] Y-迷宫由三个彼此成120°的白色哑光塑料臂 (65mm x400mm x130mm) 组成。将小鼠置于中心并允许自由移动8分钟并探索所有三个臂。记录臂进入次数和试验次数(偏移距离中心10cm,进入三个独立臂)以计算交替百分比。进入被定义为进入Y-形迷宫臂的所有三个附件。交替行为被定义为三元组次数除以臂进入次数减去2并乘以100。

[0644] (iii) 新物体识别测试

[0645] 将小鼠置于白色哑光室 (450mm x450mm x450mm) 的中心,并在第一天(第1天) 允许自由移动5分钟以适应空间。24小时后(第2天),将两个相同的物体放置在室的第一和第四四分之一,并且让小鼠自由移动10分钟,以了解两个物体(A和A) 和空间。测量短期记忆1小时后,将两个物体中的一个更改为不同的形状和颜色(A和B),并测量关于新物体的好奇心(戳鼻子的次数)。对于长期记忆测量,在24小时后(第3天) 和3周后(第24天),将两个物体中的一个更改为不同的形状和颜色(例如,A和C至A和D),并且测量和分析关于新物体戳鼻子的次数。通过分析各组关于新的和熟悉的物体戳鼻子的次数对结果进行比较,并用以下公式计算辨别指数:[(新-熟悉)/(新+熟悉)]。

[0646] (iv) 被动回避测试

[0647] 被动回避测试如实施例1中所描述进行。

[0648] 细胞培养

[0649] 小鼠原代神经元细胞培养

[0650] 如例如Seibenhener ML.等人,J Vis Exp., (65):3634 (2012) 中所述,从对应于18.5天龄胚胎的小鼠的头部分离包括海马体的皮层并进行原代培养。在DIV的第8天(体外天数),使用聚凝胺用485-3p-lenti-mini-7-GFP-F慢病毒载体或慢病毒对照载体(不含miR-485-3p) 转导神经元细胞,并在30小时后观察到GFP表达。在确认细胞被正确感染后,如上所述在使用4%多聚甲醛固定后进行免疫细胞化学(30小时后)(参见例如,体内慢病毒载体注射和组织制备)。

[0651] 小鼠原代神经胶质细胞培养

[0652] 处死1日龄的出生后小鼠,并培养混合神经胶质细胞。在DIV的第10天(体外天数) 分离小胶质细胞,并在DIV的第11天分离星形胶质细胞以制备神经胶质细胞培养物,如例如

Lian H.等人,Bio Protoc,6(21):e1989(2016)中所述。在DIV的第14天,使用聚凝胺用485-3p-lenti-mini-7-GFP-F慢病毒载体或慢病毒对照载体(不含miR-485-3p)转导神经胶质细胞,并在30小时后观察到GFP表达。在确认细胞被正确感染后,如上所述在使用4%多聚甲醛固定后进行免疫细胞化学(参见例如,体内慢病毒载体注射和组织制备)。

[0653] 人细胞系

[0654] 使用聚凝胺用485-3p-lenti-mini-7-GFP-F慢病毒载体或慢病毒对照载体(不含miR-485-3p)转导源自中枢神经系统(CNS)皮层的人小胶质细胞原代细胞、永生化人星形胶质细胞和胎儿SV40细胞,并在24小时后观察到GFP表达。在确认细胞被正确感染后,如上所述在使用4%多聚甲醛固定后进行免疫细胞化学(参见例如,体内慢病毒载体注射和组织制备)。

[0655] 疾病诱导

[0656] CA1已知为在AD疾病发作中起重要作用的脑的一部分。据信AD的病理从为海马体的CA1与脑下脚之间边界的远端CA1开始,并且进行至CA2。参见例如,Arjun V.Masurkar,J Alzheimers Dis Parkinsonism,8(1):412(2018)。因此,为了抑制海马体齿状回中的神经发生并诱导CA1中的病理,选择两个区域作为过表达miR-485-3p的靶位点。

[0657] 啮齿动物海马体中的神经回路由兴奋性三突触途径(内嗅皮层(EC)-齿状回(DG)-CA3-CA1-EC)组成。参见例如,Wei D.等人,Nat Rev Neurosci,11:339-350(2010)。所述实验被设计为投射至包括CA3-CA1在内的整个海马体区域。如果仅选择一个坐标注射慢病毒载体,则认为在整个海马体中表达miR-485-3p会有限制。因此,设置了注射坐标,以便将慢病毒载体注射到后部海马体中,并且病毒感染的神经元可投射至前部海马体中。

[0658] 对小鼠海马体DG和CA1进行每半球2点注射(总共4点)(图25A)含有lenti-miR485-3p GFP-F的载体。如图25B所示,在前部海马体和后部海马体两者的齿状回和CA1中存在显著GFP表达。此结果证明,使用上述方法,miR-485-3p成功地在小鼠海马中广泛过表达。

[0659] 实施例20:通过miR485-3p过表达观察认知相关的行为变化

[0660] 接下来,观察了miR485-3p过表达对认知、学习和记忆相关的行为变化的影响。简言之,在miR485-3p过表达约一个月后,如图26中所描述进行实施例19中描述的不同行为测试如。

[0661] 旷场试验

[0662] 通过旷场试验(以测量基本运动和焦虑相关反应的变化),与对照组相比,注射了lenti-miR485-3p载体的小鼠组的运动(总行进距离)没有显著差异(图27A)。当在两组之间评估中心区活动(即,在旷场运动场的中心部分中花费的时间量;中心时间的增加被认为指示焦虑样活动)时,观察到了类似的结果(图27B)。因此,小鼠海马体中miR485-3p的过表达不影响运动和情绪相关(例如焦虑)功能。

[0663] Y-迷宫测试

[0664] 如本文所述(例如,实施例14和实施例19),Y-迷宫测试是评估空间工作记忆的行为实验。所述测试是基于正常啮齿动物喜欢探索新环境的概念(例如,正常小鼠通常更喜欢从以前访问过的臂导航至Y-迷宫装置的新臂,而不是返回至以前访问过的臂)。为了执行这个动作,涉及到不同的脑区域,如海马体、隔膜、基底前脑和前额叶皮层。因此,Y-迷宫测试可用于评估任何这些不同脑区域的正常功能。

[0665] 如所观察到的,在对照组与miR485-3p过表达组之间的总臂进入数(图28A)没有统计学上显著的差异。类似地,在不同动物之间交替行为(即,正常小鼠将选择与其所来自的臂不同的臂的概念)也是可比的(图28B)。这些结果表明,在miR-485过表达后,Y-迷宫中的一般运动和探索活动的水平没有改变。

[0666] 新物体识别测试

[0667] 如本文所述(例如,实施例19),新物体识别测试是经常用于啮齿动物模型中以评估物体识别记忆中的可能缺陷的行为测试。此测试是基于小鼠的特性来寻找与对熟悉物体相比好奇心更高的新物体,并测量短期和长期记忆。

[0668] 与对照组(即,海马体中没有miR485-3p过表达)相比,来自实验组的小鼠(即,海马体中miR485-3p过表达)确实在它们短期(在物体识别训练后1小时;参见图29B和29E)和长期(在物体识别训练后24小时(参见图29C和29F)和3周(参见图29D和29G))识别物体的能力方面表现出统计学上显著的损害。来自对照组的动物能够区分新和旧物体,并对探索新物体表现出更大的兴趣。相比之下,具有miR485-3p过表达的小鼠无法区分新和旧物体。这些结果表明,海马体中miR485-3p的过表达对短期和长期记忆的形成均具有有害影响。

[0669] 被动回避测试

[0670] 如本文所述,被动回避测试是恐惧动机测试。它测试小鼠识别和了解环境的能力,以避免出现厌恶刺激(如足底电击)的环境(即,联想记忆)。

[0671] 如图30所示,在对照组和miR485-3p过表达组的进入潜伏期时间值方面没有显著差异。此数据证明,小鼠海马体中miR485-3p的过表达对恐惧获得没有任何明显影响。

[0672] 总的来说,上述结果证明,海马体内miR-485的过表达损害短期和长期记忆,与在许多AD患者中观察到的相似。上述结果还表明,本文公开的miR-485抑制剂可用于改善AD患者的某些认知功能(例如,短期和长期记忆)(例如,通过降低不同脑区内miR-485的表达)。

[0673] 实施例21:miR-485-3p过表达对神经细胞的影响

[0674] 为了观察通过上述miR485-3p过表达(例如,实施例20)诱导的认知衰退是否是由海马体内的细胞变化引起,用如实施例19中所述的lenti-miR485-3p(实验组)或lenti-对照载体(对照组)转导神经细胞(参见图31A)。

[0675] 图31B示出,与lenti-对照组相比,淀粉样蛋白 β 在过表达miR485-3p的细胞中增加并累积。在实验组中未感染病毒的细胞中也观察到了淀粉样蛋白 β ,从而证明淀粉样蛋白 β 的神经元至神经元扩散。与lenti-对照组相比,还观察到被称为AD的神经病理学标志的截短tau蛋白在miR485-3p过表达组中增加(图32)。此外,在转导以过表达miR485-3p的神经元中,PSD-95(一种调控NMDA和AMPA受体两者的突触分布和活性的重要支架蛋白;参见图33A)和突触素(被认为通过调控膜预融合在从突触小泡释放神经递质中起作用;参见图33B)两者的表达也显著降低。不受任一种理论束缚,在一些方面,认为miR485-3p过表达可通过增加神经元淀粉样蛋白 β 表达、诱导tau病变、削弱突触发生和/或增加神经元细胞死亡而不利地影响神经细胞命运(参见图34)。

[0676] 接下来,为了评估miR485-3p的过表达是否也能够影响其它神经细胞,如实施例19中所述,用lenti-miR485-3p或lenti-对照载体转导小鼠原代星形胶质细胞和小胶质细胞(参见图35A)。通过Iba-1(图35B)(一种从小鼠全脑分离的小胶质细胞的细胞特异性标志物)和GFAP(图36A)(星形胶质细胞的细胞特异性标志物)的表达和对每种细胞的特征和GFP

信号的观察证实慢病毒感染。在小胶质细胞(图35C和图37C)和星形胶质细胞(图36B和图38B)中,由于miR485-3p过表达,裂解的半胱天冬酶3增加。这些结果证明,miR485-3p不仅直接损伤神经元,而且引起神经胶质细胞的神经胶质增生,其在神经炎症和突触稳态中起主要作用。

[0677] 以上在实施例19-21中描述的结果进一步证明miR485-3p表达在阿尔茨海默氏病诱导中具有的作用。不受任一种理论束缚,通过降低和/或抑制miR485-3p的表达,本文所述的miR-485抑制剂可以是用于治疗各种神经变性疾病和病症如阿尔茨海默氏病的有用治疗剂。

[0678] ***

[0679] 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。

[0680] 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。

[0681] 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。

[0682] 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。

[0683] 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> 用于基因上调的miRNA-485抑制剂
<130> 4366.014PC04/C-K/DKC
<150> US 62/971,767
<151> 2020-02-07
<150> US 62/989,486
<151> 2020-03-13
<150> US 63/047,155
<151> 2020-07-01
<150> US 63/064,314
<151> 2020-08-11
<160> 122
<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 guguauga 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> 智人 (Homo sapiens)

<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 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
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
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
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
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										
<210> 32															
<211> 561															
<212> PRT															
<213> 智人 (Homo sapiens)															
<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	320
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	400
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	480
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	560

Ser

<210> 33

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 33

agaggcuggc cgugaugaauc uc 22

<210> 34

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> miR-485-3p

<400> 34

agucacacac ggcucuccuc uc 22

<210> 35

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> miR-485-5p

<400> 35

agaggcuggc cgugaugaauc uc 22

<210> 36

<211> 472

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 36

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	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> 智人(Homo sapiens)																		
<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> 智人(Homo sapiens)		
<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> 智人 (Homo sapiens)

<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> 智人(Homo sapiens)
 <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				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 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
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> 智人(Homo sapiens)

<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          240
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

```

<210> 42

<211> 803

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 42

```

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 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
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
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
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
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> 智人 (Homo sapiens)					
<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
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
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
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 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
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> 智人(Homo sapiens)															
<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

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 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
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 Leu Phe Leu		
275		
<210> 46		
<211> 138		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 46		
Met Asp Glu Gly Tyr Phe Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln Pro		
1	5	10
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
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> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 47		
Met Ala Trp Asp Met Cys Asn Gln Asp Ser Glu Ser Val Trp Ser Asp		
1	5	10
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	240
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
<210> 48			
<211> 671			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 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
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
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
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
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
625 630 635 640
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

<210> 49

<211> 7

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 49

ucauaca 7

<210> 50

<211> 7

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 50

gaggcug 7

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 51
cgaggtcgac ttcctaga 18
<210> 52
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 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 gagtcccga 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> 寡核苷酸
<400> 62
tgtatga 7
<210> 63
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 63
gtgtatga 8
<210> 64
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 64
cgtgtatga 9
<210> 65
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 65
ccgtgtatga 10

<210> 66
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 66
gccgtgtatg a 11
<210> 67
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 67
agccgtgtat ga 12
<210> 68
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 68
gagccgtgta tga 13
<210> 69
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 69
agagccgtgt atga 14
<210> 70
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 70

gagagccgtg tatga 15

<210> 71

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 71

ggagagccgt gtatga 16

<210> 72

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 72

aggagagccg tgtatga 17

<210> 73

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 73

gaggagagcc gtgtatga 18

<210> 74

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 74

agaggagagc cgtgtatga 19

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 75
gagaggagag ccgtgtatga 20
<210> 76
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 76
tgtatgac 8
<210> 77
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 77
gtgtatgac 9
<210> 78
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 78
cgtgtatgac 10
<210> 79
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 79
ccgtgtatga c 11
<210> 80
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>

<223> 寡核苷酸
<400> 80
gccgtgtatg ac 12
<210> 81
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 81
agccgtgtat gac 13
<210> 82
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 82
gagccgtgta tgac 14
<210> 83
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 83
agagccgtgt atgac 15
<210> 84
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 84
gagagccgtg tatgac 16
<210> 85
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 85
ggagagccgt gtatgac 17
<210> 86
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 86
aggagagccg tgtatgac 18
<210> 87
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 87
gaggagagcc gtgtatgac 19
<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 88
agaggagagc cgtgtatgac 20
<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 寡核苷酸
<400> 89
gagaggagag ccgtgtatga c 21
<210> 90
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 90

agagaggaga gccgtgtatg ac 22

<210> 91

<211> 640

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRG1异型体1

<400> 91

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

210	215	220
Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln		
225	230	235
Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Ile Ala Leu Leu Val Val		240
	245	250
Gly Ile Met Cys Val Val Ala Tyr Cys Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys		255
	260	265
Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser Leu Arg Ser Glu Arg Asn Asn		270
	275	280
Met Met Asn Ile Ala Asn Gly Pro His His Pro Asn Pro Pro Pro Glu		285
	290	295
Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val Ser Lys Asn Val Ile Ser Ser		300
305	310	315
Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Thr Ser Phe Ser Thr Ser His		320
	325	330
Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr Thr Val Thr Gln Thr Pro Ser		335
	340	345
His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu Ser Ile Leu Ser Glu Ser His		350
	355	360
Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu Asn Ser Arg His Ser Ser Pro		365
	370	375
Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Thr Gly Gly Pro Arg Glu		380
385	390	395
Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg		400
	405	410
Asp Ser Pro His Ser Glu Arg Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala		415
	420	425
Arg Met Ser Pro Val Asp Phe His Thr Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro		430
	435	440
Pro Ser Glu Met Ser Pro Pro Val Ser Ser Met Thr Val Ser Met Pro		445
	450	455
Ser Met Ala Val Ser Pro Phe Met Glu Glu Glu Arg Pro Leu Leu Leu		460
465	470	475
Val Thr Pro Pro Arg Leu Arg Glu Lys Lys Phe Asp His His Pro Gln		480
	485	490
Gln Phe Ser Ser Phe His His Asn Pro Ala His Asp Ser Asn Ser Leu		495
	500	505
Pro Ala Ser Pro Leu Arg Ile Val Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Thr Thr		510
	515	520
		525

Gln Glu Tyr Glu Pro Ala Gln Glu Pro Val Lys Lys Leu Ala Asn Ser
 530 535 540
 Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys Pro Asn Gly His Ile Ala Asn Arg Leu
 545 550 555 560
 Glu Val Asp Ser Asn Thr Ser Ser Gln Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu
 565 570 575
 Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly Glu Asp Thr Pro Phe Leu Gly Ile Gln
 580 585 590
 Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ala Thr Pro Ala Phe Arg Leu Ala
 595 600 605
 Asp Ser Arg Thr Asn Pro Ala Gly Arg Phe Ser Thr Gln Glu Glu Ile
 610 615 620
 Gln Ala Arg Leu Ser Ser Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val
 625 630 635 640
 <210> 92
 <211> 648
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> NRG1异型体2
 <400> 92
 Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser
 20 25 30
 Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala
 35 40 45
 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser
 50 55 60
 Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys
 65 70 75 80
 Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu
 85 90 95
 Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys
 100 105 110
 Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr
 115 120 125
 Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu
 130 135 140

Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr
145					150					155					160
Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr
				165					170					175	
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn
			180					185					190		
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr
		195					200					205			
Leu	Cys	Lys	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Thr	Glu	Asn
	210					215					220				
Val	Pro	Met	Lys	Val	Gln	Asn	Gln	Glu	Lys	His	Leu	Gly	Ile	Glu	Phe
225					230					235					240
Ile	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly
			245						250					255	
Ile	Cys	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Met	Cys	Val	Val	Ala	Tyr
			260					265					270		
Cys	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu	His	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln
		275					280					285			
Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn	Met	Met	Asn	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro
	290					295					300				
His	His	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Gln	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr
305					310					315					320
Val	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	Glu	His	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	Ala
			325						330					335	
Glu	Thr	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	His	His	Ser
			340					345					350		
Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	His	Ser	Trp	Ser	Asn	Gly	His	Thr
		355					360					365			
Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Ser	Val	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Val
	370					375					380				
Glu	Asn	Ser	Arg	His	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu
385					390					395					400
Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu	Cys	Asn	Ser	Phe	Leu	Arg	His	Ala
			405						410					415	
Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Arg	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	Tyr
		420						425					430		
Val	Ser	Ala	Met	Thr	Thr	Pro	Ala	Arg	Met	Ser	Pro	Val	Asp	Phe	His
		435					440					445			
Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Pro	Pro	Ser	Glu	Met	Ser	Pro	Pro	Val

450	455	460
Ser Ser Met Thr Val	Ser Met Pro Ser Met Ala Val	Ser Pro Phe Met
465	470	475
Glu Glu Glu Arg Pro	Leu Leu Leu Val Thr Pro Pro Arg	Leu Arg Glu
485	490	495
Lys Lys Phe Asp His	His Pro Gln Gln Phe Ser Ser Phe His	His Asn
500	505	510
Pro Ala His Asp Ser	Asn Ser Leu Pro Ala Ser Pro Leu Arg	Ile Val
515	520	525
Glu Asp Glu Glu Tyr	Glu Thr Thr Gln Glu Tyr Glu Pro Ala Gln	Glu
530	535	540
Pro Val Lys Lys Leu	Ala Asn Ser Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys	Pro
545	550	555
Asn Gly His Ile Ala	Asn Arg Leu Glu Val Asp Ser Asn Thr Ser	Ser
565	570	575
Gln Ser Ser Asn Ser	Glu Ser Glu Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly Glu	
580	585	590
Asp Thr Pro Phe Leu	Gly Ile Gln Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu	
595	600	605
Ala Thr Pro Ala Phe	Arg Leu Ala Asp Ser Arg Thr Asn Pro Ala Gly	
610	615	620
Arg Phe Ser Thr Gln	Glu Glu Ile Gln Ala Arg Leu Ser Ser Val Ile	
625	630	635
Ala Asn Gln Asp Pro	Ile Ala Val	
645		

<210> 93

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRG1异型体3

<400> 93

Met Ser Glu Arg Lys	Glu Gly Arg Gly Lys	Gly Lys Gly Lys Lys
1	5	10
Glu Arg Gly Ser Gly	Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly	Ser Gln Ser
20	25	30
Pro Ala Leu Pro Pro	Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser	Ala
35	40	45
Ala Gly Ser Lys Leu	Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser	

50	55	60
Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys		
65	70	75
Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu		
85	90	95
Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys		
100	105	110
Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr		
115	120	125
Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu		
130	135	140
Gly Ala Tyr Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr		
145	150	155
Glu Gly Ala Asn Thr Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr		
165	170	175
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn		
180	185	190
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr		
195	200	205
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn		
210	215	220
Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln		
225	230	235
Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Ile Ala Leu Leu Val Val		
245	250	255
Gly Ile Met Cys Val Val Ala Tyr Cys Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys		
260	265	270
Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser Leu Arg Ser Glu Arg Asn Asn		
275	280	285
Met Met Asn Ile Ala Asn Gly Pro His His Pro Asn Pro Pro Pro Glu		
290	295	300
Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val Ser Lys Asn Val Ile Ser Ser		
305	310	315
Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Thr Ser Phe Ser Thr Ser His		
325	330	335
Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr Thr Val Thr Gln Thr Pro Ser		
340	345	350
His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu Ser Ile Leu Ser Glu Ser His		
355	360	365

Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu Asn Ser Arg His Ser Ser Pro
 370 375 380
 Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Thr Gly Gly Pro Arg Glu
 385 390 395 400
 Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg
 405 410 415
 Asp Ser Pro His Ser Glu Arg His Asn Leu Ile Ala Glu Leu Arg Arg
 420 425 430
 Asn Lys Ala His Arg Ser Lys Cys Met Gln Ile Gln Leu Ser Ala Thr
 435 440 445
 His Leu Arg Ser Ser Ser Ile Pro His Leu Gly Phe Ile Leu
 450 455 460

<210> 94

<211> 247

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRG1异型体4

<400> 94

Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser
 20 25 30
 Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala
 35 40 45
 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser
 50 55 60
 Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys
 65 70 75 80
 Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu
 85 90 95
 Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys
 100 105 110
 Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr
 115 120 125
 Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu
 130 135 140
 Gly Ala Tyr Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr
 145 150 155 160

Glu Gly Ala Asn Thr Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr
 165 170 175
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 180 185 190
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 195 200 205
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 210 215 220
 Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Ser Ala Gln Met Ser Leu Leu
 225 230 235 240
 Val Ile Ala Ala Lys Thr Thr
 245

<210> 95

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRG1异型体6

<400> 95

Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser
 20 25 30
 Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala
 35 40 45
 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser
 50 55 60
 Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys
 65 70 75 80
 Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu
 85 90 95
 Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys
 100 105 110
 Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr
 115 120 125
 Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu
 130 135 140
 Gly Ala Tyr Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr
 145 150 155 160

Glu Gly Ala Asn Thr Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr		
165	170	175
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn		
180	185	190
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr		
195	200	205
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr		
210	215	220
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Ala		
225	230	235
240		
Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Ile		
245	250	255
Ala Leu Leu Val Val Gly Ile Met Cys Val Val Ala Tyr Cys Lys Thr		
260	265	270
Lys Lys Gln Arg Lys Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser Leu Arg		
275	280	285
Ser Glu Arg Asn Asn Met Met Asn Ile Ala Asn Gly Pro His His Pro		
290	295	300
Asn Pro Pro Pro Glu Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val Ser Lys		
305	310	315
320		
Asn Val Ile Ser Ser Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Thr Ser		
325	330	335
Phe Ser Thr Ser His Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr Thr Val		
340	345	350
Thr Gln Thr Pro Ser His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu Ser Ile		
355	360	365
Leu Ser Glu Ser His Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu Asn Ser		
370	375	380
Arg His Ser Ser Pro Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Thr		
385	390	395
400		
Gly Gly Pro Arg Glu Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr		
405	410	415
Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Ser Pro His Ser Glu Arg Tyr Val Ser Ala		
420	425	430
Met Thr Thr Pro Ala Arg Met Ser Pro Val Asp Phe His Thr Pro Ser		
435	440	445
Ser Pro Lys Ser Pro Pro Ser Glu Met Ser Pro Pro Val Ser Ser Met		
450	455	460
Thr Val Ser Met Pro Ser Met Ala Val Ser Pro Phe Met Glu Glu Glu		

465	470	475	480
Arg Pro Leu Leu Leu Val Thr Pro Pro Arg Leu Arg Glu Lys Lys Phe			
	485	490	495
Asp His His Pro Gln Gln Phe Ser Ser Phe His His Asn Pro Ala His			
	500	505	510
Asp Ser Asn Ser Leu Pro Ala Ser Pro Leu Arg Ile Val Glu Asp Glu			
	515	520	525
Glu Tyr Glu Thr Thr Gln Glu Tyr Glu Pro Ala Gln Glu Pro Val Lys			
	530	535	540
Lys Leu Ala Asn Ser Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys Pro Asn Gly His			
545	550	555	560
Ile Ala Asn Arg Leu Glu Val Asp Ser Asn Thr Ser Ser Gln Ser Ser			
	565	570	575
Asn Ser Glu Ser Glu Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly Glu Asp Thr Pro			
	580	585	590
Phe Leu Gly Ile Gln Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ala Thr Pro			
	595	600	605
Ala Phe Arg Leu Ala Asp Ser Arg Thr Asn Pro Ala Gly Arg Phe Ser			
	610	615	620
Thr Gln Glu Glu Ile Gln Ala Arg Leu Ser Ser Val Ile Ala Asn Gln			
625	630	635	640
Asp Pro Ile Ala Val			
	645		

<210> 96

<211> 637

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRG1异型体7

<400> 96

Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys			
1	5	10	15
Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser			
	20	25	30
Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala			
	35	40	45
Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser			
	50	55	60
Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys			

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

Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Thr Gly Gly Pro Arg Glu Cys Asn Ser			
385	390	395	400
Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Ser Pro			
	405	410	415
His Ser Glu Arg Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala Arg Met Ser			
	420	425	430
Pro Val Asp Phe His Thr Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro Pro Ser Glu			
	435	440	445
Met Ser Pro Pro Val Ser Ser Met Thr Val Ser Met Pro Ser Met Ala			
	450	455	460
Val Ser Pro Phe Met Glu Glu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Val Thr Pro			
465	470	475	480
Pro Arg Leu Arg Glu Lys Lys Phe Asp His His Pro Gln Gln Phe Ser			
	485	490	495
Ser Phe His His Asn Pro Ala His Asp Ser Asn Ser Leu Pro Ala Ser			
	500	505	510
Pro Leu Arg Ile Val Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Thr Thr Gln Glu Tyr			
	515	520	525
Glu Pro Ala Gln Glu Pro Val Lys Lys Leu Ala Asn Ser Arg Arg Ala			
	530	535	540
Lys Arg Thr Lys Pro Asn Gly His Ile Ala Asn Arg Leu Glu Val Asp			
545	550	555	560
Ser Asn Thr Ser Ser Gln Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu Thr Glu Asp			
	565	570	575
Glu Arg Val Gly Glu Asp Thr Pro Phe Leu Gly Ile Gln Asn Pro Leu			
	580	585	590
Ala Ala Ser Leu Glu Ala Thr Pro Ala Phe Arg Leu Ala Asp Ser Arg			
	595	600	605
Thr Asn Pro Ala Gly Arg Phe Ser Thr Gln Glu Glu Ile Gln Ala Arg			
	610	615	620
Leu Ser Ser Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val			
625	630	635	

<210> 97

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRG1异型体8

<400> 97

Met	Ser	Glu	Arg	Lys	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
1				5					10					15	
Glu	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	Lys	Pro	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser
				20					25					30	
Pro	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala
				35					40					45	
Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser
				50					55					60	
Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys
65					70					75					80
Asn	Lys	Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu
				85					90					95	
Leu	Arg	Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys
				100					105					110	
Lys	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr
				115					120					125	
Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu
				130					135					140	
Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr
145					150					155					160
Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr
				165					170					175	
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn
				180					185					190	
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr
				195					200					205	
Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr
				210					215					220	
Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser	Thr	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Pro
225					230					235					240
Glu															
<210>	98														
<211>	422														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	NRG1异型体9														
<400>	98														
Met	Arg	Trp	Arg	Arg	Ala	Pro	Arg	Arg	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Arg

1	5	10	15
Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu			
20	25	30	
Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala			
35	40	45	
Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser			
50	55	60	
Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala			
65	70	75	80
Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala			
85	90	95	
Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly			
100	105	110	
Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro			
115	120	125	
Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro			
130	135	140	
Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr			
145	150	155	160
Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys			
165	170	175	
Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala			
180	185	190	
Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe			
195	200	205	
Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg			
210	215	220	
Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val			
225	230	235	240
Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu			
245	250	255	
Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys			
260	265	270	
Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn			
275	280	285	
Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln			
290	295	300	
Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala			
305	310	315	320

Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp
 325 330 335
 Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr
 340 345 350
 Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
 355 360 365
 Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser
 370 375 380
 Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp
 385 390 395 400
 Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro
 405 410 415
 Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 420

<210> 99

<211> 296

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRG1异型体10

<400> 99

Met Glu Ile Tyr Ser Pro Asp Met Ser Glu Val Ala Ala Glu Arg Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Ser Thr Gln Leu Ser Ala Asp Pro Ser Leu Asp Gly Leu
 20 25 30
 Pro Ala Ala Glu Asp Met Pro Glu Pro Gln Thr Glu Asp Gly Arg Thr
 35 40 45
 Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala Val Pro Cys Cys Ala Cys Leu Glu Ala
 50 55 60
 Glu Arg Leu Arg Gly Cys Leu Asn Ser Glu Lys Ile Cys Ile Val Pro
 65 70 75 80
 Ile Leu Ala Cys Leu Val Ser Leu Cys Leu Cys Ile Ala Gly Leu Lys
 85 90 95
 Trp Val Phe Val Asp Lys Ile Phe Glu Tyr Asp Ser Pro Thr His Leu
 100 105 110
 Asp Pro Gly Gly Leu Gly Gln Asp Pro Ile Ile Ser Leu Asp Ala Thr
 115 120 125
 Ala Ala Ser Ala Val Trp Val Ser Ser Glu Ala Tyr Thr Ser Pro Val
 130 135 140

Ser	Arg	Ala	Gln	Ser	Glu	Ser	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Gly	Asp
145					150				155						160
Lys	Ala	Val	Val	Ser	Phe	Glu	Pro	Ser	Ala	Ala	Pro	Thr	Pro	Lys	Asn
				165					170					175	
Arg	Ile	Phe	Ala	Phe	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Phe	Pro
			180					185					190		
Ser	Pro	Thr	Arg	Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Thr	Pro	Lys	Ser	Ala	Thr	Gln
		195				200					205				
Pro	Gln	Thr	Thr	Glu	Thr	Asn	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Ser	Thr
	210					215				220					
Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys
225					230				235						240
Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp
				245					250					255	
Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr
			260					265					270		
Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser
		275					280					285			
Thr	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Pro	Glu								
	290					295									

<210> 100

<211> 590

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRG1异型体11

<400> 100

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

Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn															
100								105						110	
Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala															
115								120						125	
Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val															
130								135						140	
Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu															
145								150						155	160
Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys															
165								170						175	
His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg															
180								185						190	
Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Ile Ala Leu Leu Val Val Gly Ile															
195								200						205	
Met Cys Val Val Ala Tyr Cys Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys Lys Leu															
210								215						220	
His Asp Arg Leu Arg Gln Ser Leu Arg Ser Glu Arg Asn Asn Met Met															
225								230						235	240
Asn Ile Ala Asn Gly Pro His His Pro Asn Pro Pro Pro Glu Asn Val															
245								250						255	
Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val Ser Lys Asn Val Ile Ser Ser Glu His															
260								265						270	
Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Thr Ser Phe Ser Thr Ser His Tyr Thr															
275								280						285	
Ser Thr Ala His His Ser Thr Thr Val Thr Gln Thr Pro Ser His Ser															
290								295						300	
Trp Ser Asn Gly His Thr Glu Ser Ile Leu Ser Glu Ser His Ser Val															
305								310						315	320
Ile Val Met Ser Ser Val Glu Asn Ser Arg His Ser Ser Pro Thr Gly															
325								330						335	
Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Thr Gly Gly Pro Arg Glu Cys Asn															
340								345						350	
Ser Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Ser															
355								360						365	
Pro His Ser Glu Arg Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala Arg Met															
370								375						380	
Ser Pro Val Asp Phe His Thr Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro Pro Ser															
385								390						395	400
Glu Met Ser Pro Pro Val Ser Ser Met Thr Val Ser Met Pro Ser Met															

405																410																415																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Met	Glu	Glu	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Val	Thr																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							</

 $\langle 210 \rangle$ 101 $\langle 211 \rangle$ 420

⟨212⟩ PRT

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 NRG1异型体12

 $\langle 400 \rangle$ 101

Met	Ser	Glu	Arg	Lys	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
1				5					10					15	
Glu	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	Lys	Pro	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser
			20					25					30		
Pro	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala
		35					40					45			
Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys

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

Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Thr Gly Gly Pro Arg Glu Cys Asn Ser
 385 390 395 400
 Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Ser Pro
 405 410 415
 His Ser Glu Arg
 420

<210> 102

<211> 179

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> STMN2异型体1

<400> 102

Met Ala Lys Thr Ala Met Ala Tyr Lys Glu Lys Met Lys Glu Leu Ser
 1 5 10 15
 Met Leu Ser Leu Ile Cys Ser Cys Phe Tyr Pro Glu Pro Arg Asn Ile
 20 25 30
 Asn Ile Tyr Thr Tyr Asp Asp Met Glu Val Lys Gln Ile Asn Lys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gly Gln Ala Phe Glu Leu Ile Leu Lys Pro Pro Ser Pro Ile
 50 55 60
 Ser Glu Ala Pro Arg Thr Leu Ala Ser Pro Lys Lys Lys Asp Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Glu Glu Ile Gln Lys Lys Leu Glu Ala Ala Glu Glu Arg Arg Lys
 85 90 95
 Ser Gln Glu Ala Gln Val Leu Lys Gln Leu Ala Glu Lys Arg Glu His
 100 105 110
 Glu Arg Glu Val Leu Gln Lys Ala Leu Glu Glu Asn Asn Asn Phe Ser
 115 120 125
 Lys Met Ala Glu Glu Lys Leu Ile Leu Lys Met Glu Gln Ile Lys Glu
 130 135 140
 Asn Arg Glu Ala Asn Leu Ala Ala Ile Ile Glu Arg Leu Gln Glu Lys
 145 150 155 160
 Glu Arg His Ala Ala Glu Val Arg Arg Asn Lys Glu Leu Gln Val Glu
 165 170 175

Leu Ser Gly

<210> 103

<211> 187

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> STMN2异型体2

<400> 103

Met	Ala	Lys	Thr	Ala	Met	Ala	Tyr	Lys	Glu	Lys	Met	Lys	Glu	Leu	Ser
1				5					10					15	
Met	Leu	Ser	Leu	Ile	Cys	Ser	Cys	Phe	Tyr	Pro	Glu	Pro	Arg	Asn	Ile
			20					25					30		
Asn	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Asp	Met	Glu	Val	Lys	Gln	Ile	Asn	Lys	Arg
		35					40					45			
Ala	Ser	Gly	Gln	Ala	Phe	Glu	Leu	Ile	Leu	Lys	Pro	Pro	Ser	Pro	Ile
	50					55				60					
Ser	Glu	Ala	Pro	Arg	Thr	Leu	Ala	Ser	Pro	Lys	Lys	Lys	Asp	Leu	Ser
65				70					75					80	
Leu	Glu	Glu	Ile	Gln	Lys	Lys	Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Arg	Arg	Lys
			85					90					95		
Ser	Gln	Glu	Ala	Gln	Val	Leu	Lys	Gln	Leu	Ala	Glu	Lys	Arg	Glu	His
		100						105					110		
Glu	Arg	Glu	Val	Leu	Gln	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Asn	Asn	Asn	Phe	Ser
	115						120				125				
Lys	Met	Ala	Glu	Glu	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Met	Glu	Gln	Ile	Lys	Glu
	130					135					140				
Asn	Arg	Glu	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Ile	Ile	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Lys
145				150						155				160	
Leu	Val	Lys	Phe	Ile	Ser	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Ser	Ile	Glu	Ser	Gln
			165					170					175		
Phe	Leu	Glu	Leu	Gln	Arg	Glu	Gly	Glu	Lys	Gln					
		180						185							

<210> 104

<211> 1477

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> NRXN1- α 异型体1a

<400> 104

Met	Gly	Thr	Ala	Leu	Leu	Gln	Arg	Gly	Gly	Cys	Phe	Leu	Leu	Cys	Leu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Cys	Trp	Ala	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Glu
			20					25					30		

Phe	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Gln	Trp	Thr	Arg	Phe	Pro	Lys	Trp	Asn	Ala
35				40				45							
Cys	Cys	Glu	Ser	Glu	Met	Ser	Phe	Gln	Leu	Lys	Thr	Arg	Ser	Ala	Arg
50				55				60							
Gly	Leu	Val	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asp	Glu	Gly	Phe	Cys	Asp	Phe	Leu	Glu
65				70				75				80			
Leu	Ile	Leu	Thr	Arg	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	Phe	Ser	Ile	Phe
				85				90				95			
Cys	Ala	Glu	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Ala	Asp	Thr	Pro	Val	Asn	Asp	Gly
100				105				110							
Ala	Trp	His	Ser	Val	Arg	Ile	Arg	Arg	Gln	Phe	Arg	Asn	Thr	Thr	Leu
115				120				125							
Phe	Ile	Asp	Gln	Val	Glu	Ala	Lys	Trp	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Lys	Arg
130				135				140							
Arg	Asp	Met	Thr	Val	Phe	Ser	Gly	Leu	Phe	Val	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro
145				150				155				160			
Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Val	Arg	Glu
				165				170				175			
Arg	Glu	Pro	Phe	Lys	Gly	Trp	Ile	Arg	Asp	Val	Arg	Val	Asn	Ser	Ser
180				185				190							
Gln	Val	Leu	Pro	Val	Asp	Ser	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Asp	Asp	Glu	Pro
195				200				205							
Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Cys	Glu	Ala	Gly	Glu	Glu	Gly	Glu
210				215				220							
Gly	Gly	Val	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Val	Cys	Ser	Val	Val	Asp	Asp	Gln
225				230				235				240			
Ala	Val	Cys	Asp	Cys	Ser	Arg	Thr	Gly	Phe	Arg	Gly	Lys	Asp	Cys	Ser
				245				250				255			
Gln	Glu	Asp	Asn	Asn	Val	Glu	Gly	Leu	Ala	His	Leu	Met	Met	Gly	Asp
260				265				270							
Gln	Gly	Lys	Ser	Lys	Gly	Lys	Glu	Glu	Tyr	Ile	Ala	Thr	Phe	Lys	Gly
275				280				285							
Ser	Glu	Tyr	Phe	Cys	Tyr	Asp	Leu	Ser	Gln	Asn	Pro	Ile	Gln	Ser	Ser
290				295				300							
Ser	Asp	Glu	Ile	Thr	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Leu	Gln	Arg	Asn	Gly	Leu
305				310				315				320			
Met	Leu	His	Thr	Gly	Lys	Ser	Ala	Asp	Tyr	Val	Asn	Leu	Ala	Leu	Lys
				325				330				335			
Asn	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Val	Ile	Asn	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Glu

340	345	350
Ala Leu Val Glu Pro Val Asn Gly Lys Phe Asn Asp Asn Ala Trp His		
355	360	365
Asp Val Lys Val Thr Arg Asn Leu Arg Gln His Ser Gly Ile Gly His		
370	375	380
Ala Met Val Thr Ile Ser Val Asp Gly Ile Leu Thr Thr Thr Gly Tyr		
385	390	395
Thr Gln Glu Asp Tyr Thr Met Leu Gly Ser Asp Asp Phe Phe Tyr Val		
405	410	415
Gly Gly Ser Pro Ser Thr Ala Asp Leu Pro Gly Ser Pro Val Ser Asn		
420	425	430
Asn Phe Met Gly Cys Leu Lys Glu Val Val Tyr Lys Asn Asn Asp Val		
435	440	445
Arg Leu Glu Leu Ser Arg Leu Ala Lys Gln Gly Asp Pro Lys Met Lys		
450	455	460
Ile His Gly Val Val Ala Phe Lys Cys Glu Asn Val Ala Thr Leu Asp		
465	470	475
Pro Ile Thr Phe Glu Thr Pro Glu Ser Phe Ile Ser Leu Pro Lys Trp		
485	490	495
Asn Ala Lys Lys Thr Gly Ser Ile Ser Phe Asp Phe Arg Thr Thr Glu		
500	505	510
Pro Asn Gly Leu Ile Leu Phe Ser His Gly Lys Pro Arg His Gln Lys		
515	520	525
Asp Ala Lys His Pro Gln Met Ile Lys Val Asp Phe Phe Ala Ile Glu		
530	535	540
Met Leu Asp Gly His Leu Tyr Leu Leu Leu Asp Met Gly Ser Gly Thr		
545	550	555
Ile Lys Ile Lys Ala Leu Leu Lys Lys Val Asn Asp Gly Glu Trp Tyr		
565	570	575
His Val Asp Phe Gln Arg Asp Gly Arg Ser Gly Thr Ile Ser Val Asn		
580	585	590
Thr Leu Arg Thr Pro Tyr Thr Ala Pro Gly Glu Ser Glu Ile Leu Asp		
595	600	605
Leu Asp Asp Glu Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Pro Glu Asn Lys Ala Gly		
610	615	620
Leu Val Phe Pro Thr Glu Val Trp Thr Ala Leu Leu Asn Tyr Gly Tyr		
625	630	635
Val Gly Cys Ile Arg Asp Leu Phe Ile Asp Gly Gln Ser Lys Asp Ile		
645	650	655

Arg	Gln	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Ser	Thr	Ala	Gly	Val	Lys	Pro	Ser	Cys
660				665				670							
Ser	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys	Pro	Cys	Leu	Ser	Asn	Pro	Cys	Lys	Asn	Asn
675				680				685							
Gly	Met	Cys	Arg	Asp	Gly	Trp	Asn	Arg	Tyr	Val	Cys	Asp	Cys	Ser	Gly
690				695				700							
Thr	Gly	Tyr	Leu	Gly	Arg	Ser	Cys	Glu	Arg	Glu	Ala	Thr	Val	Leu	Ser
705				710				715				720			
Tyr	Asp	Gly	Ser	Met	Phe	Met	Lys	Ile	Gln	Leu	Pro	Val	Val	Met	His
725				730				735							
Thr	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Ser	Leu	Arg	Phe	Arg	Ser	Gln	Arg	Ala	Tyr
740				745				750							
Gly	Ile	Leu	Met	Ala	Thr	Thr	Ser	Arg	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Arg
755				760				765							
Leu	Glu	Leu	Asp	Ala	Gly	Arg	Val	Lys	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	Asp	Cys
770				775				780							
Ile	Arg	Ile	Asn	Cys	Asn	Ser	Ser	Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Leu	Phe	Ala
785				790				795				800			
Gly	Tyr	Asn	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	Trp	His	Thr	Val	Arg	Val	Val	Arg
805				810				815							
Arg	Gly	Lys	Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Asp	Gln	Gln	Ala	Met	Thr
820				825				830							
Gly	Gln	Met	Ala	Gly	Asp	His	Thr	Arg	Leu	Glu	Phe	His	Asn	Ile	Glu
835				840				845							
Thr	Gly	Ile	Ile	Thr	Glu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Asn
850				855				860							
Phe	Ile	Gly	His	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Phe	Asn	Gly	Met	Ala	Tyr	Ile
865				870				875				880			
Asp	Leu	Cys	Lys	Asn	Gly	Asp	Ile	Asp	Tyr	Cys	Glu	Leu	Asn	Ala	Arg
885				890				895							
Phe	Gly	Phe	Arg	Asn	Ile	Ile	Ala	Asp	Pro	Val	Thr	Phe	Lys	Thr	Lys
900				905				910							
Ser	Ser	Tyr	Val	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Gln	Ala	Tyr	Thr	Ser	Met	His
915				920				925							
Leu	Phe	Phe	Gln	Phe	Lys	Thr	Thr	Ser	Leu	Asp	Gly	Leu	Ile	Leu	Tyr
930				935				940							
Asn	Ser	Gly	Asp	Gly	Asn	Asp	Phe	Ile	Val	Val	Glu	Leu	Val	Lys	Gly
945				950				955				960			
Tyr	Leu	His	Tyr	Val	Phe	Asp	Leu	Gly	Asn	Gly	Ala	Asn	Leu	Ile	Lys

965						970						975					
Gly	Ser	Ser	Asn	Lys	Pro	Leu	Asn	Asp	Asn	Gln	Trp	His	Asn	Val	Met		
980						985						990					
Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	His	Thr	Val	Lys	Ile	Asp	Thr	Lys		
995						1000						1005					
Ile	Thr	Thr	Gln	Ile	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Asn	Leu	Asp	Leu	Lys			
1010						1015						1020					
Ser	Asp	Leu	Tyr	Ile	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Glu	Thr	Tyr	Lys	Ser			
1025						1030						1035					
Leu	Pro	Lys	Leu	Val	His	Ala	Lys	Glu	Gly	Phe	Gln	Gly	Cys	Leu			
1040						1045						1050					
Ala	Ser	Val	Asp	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Ile	Ser	Asp			
1055						1060						1065					
Ala	Leu	Phe	Cys	Asn	Gly	Gln	Ile	Glu	Arg	Gly	Cys	Glu	Gly	Pro			
1070						1075						1080					
Ser	Thr	Thr	Cys	Gln	Glu	Asp	Ser	Cys	Ser	Asn	Gln	Gly	Val	Cys			
1085						1090						1095					
Leu	Gln	Gln	Trp	Asp	Gly	Phe	Ser	Cys	Asp	Cys	Ser	Met	Thr	Ser			
1100						1105						1110					
Phe	Ser	Gly	Pro	Leu	Cys	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Phe			
1115						1120						1125					
Ser	Lys	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Thr	Tyr	Lys	Trp	Pro	Pro	Asn	Asp			
1130						1135						1140					
Arg	Pro	Ser	Thr	Arg	Ala	Asp	Arg	Leu	Ala	Ile	Gly	Phe	Ser	Thr			
1145						1150						1155					
Val	Gln	Lys	Glu	Ala	Val	Leu	Val	Arg	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly			
1160						1165						1170					
Leu	Gly	Asp	Tyr	Leu	Glu	Leu	His	Ile	His	Gln	Gly	Lys	Ile	Gly			
1175						1180						1185					
Val	Lys	Phe	Asn	Val	Gly	Thr	Asp	Asp	Ile	Ala	Ile	Glu	Glu	Ser			
1190						1195						1200					
Asn	Ala	Ile	Ile	Asn	Asp	Gly	Lys	Tyr	His	Val	Val	Arg	Phe	Thr			
1205						1210						1215					
Arg	Ser	Gly	Gly	Asn	Ala	Thr	Leu	Gln	Val	Asp	Ser	Trp	Pro	Val			
1220						1225						1230					
Ile	Glu	Arg	Tyr	Pro	Ala	Gly	Arg	Gln	Leu	Thr	Ile	Phe	Asn	Ser			
1235						1240						1245					
Gln	Ala	Thr	Ile	Ile	Ile	Gly	Gly	Lys	Glu	Gln	Gly	Gln	Pro	Phe			
1250						1255						1260					

Gln Gly Gln Leu Ser Gly Leu Tyr Tyr Asn Gly Leu Lys Val Leu			
1265	1270	1275	
Asn Met Ala Ala Glu Asn Asp Ala Asn Ile Ala Ile Val Gly Asn			
1280	1285	1290	
Val Arg Leu Val Gly Glu Val Pro Ser Ser Met Thr Thr Glu Ser			
1295	1300	1305	
Thr Ala Thr Ala Met Gln Ser Glu Met Ser Thr Ser Ile Met Glu			
1310	1315	1320	
Thr Thr Thr Thr Leu Ala Thr Ser Thr Ala Arg Arg Gly Lys Pro			
1325	1330	1335	
Pro Thr Lys Glu Pro Ile Ser Gln Thr Thr Asp Asp Ile Leu Val			
1340	1345	1350	
Ala Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asp Asp Glu Asp Ile Asp Pro Cys			
1355	1360	1365	
Glu Pro Ser Ser Gly Gly Leu Ala Asn Pro Thr Arg Ala Gly Gly			
1370	1375	1380	
Arg Glu Pro Tyr Pro Gly Ser Ala Glu Val Ile Arg Glu Ser Ser			
1385	1390	1395	
Ser Thr Thr Gly Met Val Val Gly Ile Val Ala Ala Ala Ala Leu			
1400	1405	1410	
Cys Ile Leu Ile Leu Leu Tyr Ala Met Tyr Lys Tyr Arg Asn Arg			
1415	1420	1425	
Asp Glu Gly Ser Tyr His Val Asp Glu Ser Arg Asn Tyr Ile Ser			
1430	1435	1440	
Asn Ser Ala Gln Ser Asn Gly Ala Val Val Lys Glu Lys Gln Pro			
1445	1450	1455	
Ser Ser Ala Lys Ser Ser Asn Lys Asn Lys Lys Asn Lys Asp Lys			
1460	1465	1470	
Glu Tyr Tyr Val			
1475			
<210> 105			
<211> 1496			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> NRXN1- α 异型体2a			
<400> 105			
Met Gly Thr Ala Leu Leu Gln Arg Gly Gly Cys Phe Leu Leu Cys Leu			
1	5	10	15

Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Cys	Trp	Ala	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Glu	
20					25					30						
Phe	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Gln	Trp	Thr	Arg	Phe	Pro	Lys	Trp	Asn	Ala	
35					40					45						
Cys	Cys	Glu	Ser	Glu	Met	Ser	Phe	Gln	Leu	Lys	Thr	Arg	Ser	Ala	Arg	
50					55					60						
Gly	Leu	Val	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asp	Glu	Gly	Phe	Cys	Asp	Phe	Leu	Glu	
65					70					75					80	
Leu	Ile	Leu	Thr	Arg	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	Phe	Ser	Ile	Phe	
85					90					95						
Cys	Ala	Glu	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Ala	Asp	Thr	Pro	Val	Asn	Asp	Gly	
100					105					110						
Ala	Trp	His	Ser	Val	Arg	Ile	Arg	Arg	Gln	Phe	Arg	Asn	Thr	Thr	Leu	
115					120					125						
Phe	Ile	Asp	Gln	Val	Glu	Ala	Lys	Trp	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Lys	Arg	
130					135					140						
Arg	Asp	Met	Thr	Val	Phe	Ser	Gly	Leu	Phe	Val	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	
145					150					155					160	
Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Val	Arg	Glu	
165					170					175						
Arg	Glu	Pro	Phe	Lys	Gly	Trp	Ile	Arg	Asp	Val	Arg	Val	Asn	Ser	Ser	
180					185					190						
Gln	Val	Leu	Pro	Val	Asp	Ser	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Asp	Asp	Glu	Pro	
195					200					205						
Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Cys	Glu	Ala	Gly	Glu	Glu	Gly	Glu	
210					215					220						
Gly	Gly	Val	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Val	Cys	Ser	Val	Val	Asp	Asp	Gln	
225					230					235					240	
Ala	Val	Cys	Asp	Cys	Ser	Arg	Thr	Gly	Phe	Arg	Gly	Lys	Asp	Cys	Ser	
245					250					255						
Gln	Glu	Asp	Asn	Asn	Val	Glu	Gly	Leu	Ala	His	Leu	Met	Met	Gly	Asp	
260					265					270						
Gln	Gly	Lys	Ser	Lys	Gly	Lys	Glu	Glu	Tyr	Ile	Ala	Thr	Phe	Lys	Gly	
275					280					285						
Ser	Glu	Tyr	Phe	Cys	Tyr	Asp	Leu	Ser	Gln	Asn	Pro	Ile	Gln	Ser	Ser	
290					295					300						
Ser	Asp	Glu	Ile	Thr	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Leu	Gln	Arg	Asn	Gly	Leu	
305					310					315					320	
Met	Leu	His	Thr	Gly	Lys	Ser	Ala	Asp	Tyr	Val	Asn	Leu	Ala	Leu	Lys	

	325		330		335
Asn Gly Ala Val Ser Leu Val Ile	Asn Leu Gly Ser Gly Ala Phe Glu				
340	345		350		
Ala Leu Val Glu Pro Val Asn Gly Lys Phe Asn Asp Asn Ala Trp His					
355	360		365		
Asp Val Lys Val Thr Arg Asn Leu Arg Gln Val Thr Ile Ser Val Asp					
370	375		380		
Gly Ile Leu Thr Thr Thr Gly Tyr Thr Gln Glu Asp Tyr Thr Met Leu					
385	390		395		400
Gly Ser Asp Asp Phe Phe Tyr Val Gly Gly Ser Pro Ser Thr Ala Asp					
405	410		415		
Leu Pro Gly Ser Pro Val Ser Asn Asn Phe Met Gly Cys Leu Lys Glu					
420	425		430		
Val Val Tyr Lys Asn Asn Asp Val Arg Leu Glu Leu Ser Arg Leu Ala					
435	440		445		
Lys Gln Gly Asp Pro Lys Met Lys Ile His Gly Val Val Ala Phe Lys					
450	455		460		
Cys Glu Asn Val Ala Thr Leu Asp Pro Ile Thr Phe Glu Thr Pro Glu					
465	470		475		480
Ser Phe Ile Ser Leu Pro Lys Trp Asn Ala Lys Lys Thr Gly Ser Ile					
485	490		495		
Ser Phe Asp Phe Arg Thr Thr Glu Pro Asn Gly Leu Ile Leu Phe Ser					
500	505		510		
His Gly Lys Pro Arg His Gln Lys Asp Ala Lys His Pro Gln Met Ile					
515	520		525		
Lys Val Asp Phe Phe Ala Ile Glu Met Leu Asp Gly His Leu Tyr Leu					
530	535		540		
Leu Leu Asp Met Gly Ser Gly Thr Ile Lys Ile Lys Ala Leu Leu Lys					
545	550		555		560
Lys Val Asn Asp Gly Glu Trp Tyr His Val Asp Phe Gln Arg Asp Gly					
565	570		575		
Arg Ser Gly Thr Ile Ser Val Asn Thr Leu Arg Thr Pro Tyr Thr Ala					
580	585		590		
Pro Gly Glu Ser Glu Ile Leu Asp Leu Asp Asp Glu Leu Tyr Leu Gly					
595	600		605		
Gly Leu Pro Glu Asn Lys Ala Gly Leu Val Phe Pro Thr Glu Val Trp					
610	615		620		
Thr Ala Leu Leu Asn Tyr Gly Tyr Val Gly Cys Ile Arg Asp Leu Phe					
625	630		635		640

Ile	Asp	Gly	Gln	Ser	Lys	Asp	Ile	Arg	Gln	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Ser
				645				650				655			
Thr	Ala	Gly	Val	Lys	Pro	Ser	Cys	Ser	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys	Pro	Cys
				660				665				670			
Leu	Ser	Asn	Pro	Cys	Lys	Asn	Asn	Gly	Met	Cys	Arg	Asp	Gly	Trp	Asn
				675				680				685			
Arg	Tyr	Val	Cys	Asp	Cys	Ser	Gly	Thr	Gly	Tyr	Leu	Gly	Arg	Ser	Cys
				690				695				700			
Glu	Arg	Glu	Ala	Thr	Val	Leu	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Met	Phe	Met	Lys
705				710				715				720			
Ile	Gln	Leu	Pro	Val	Val	Met	His	Thr	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Ser	Leu
				725				730				735			
Arg	Phe	Arg	Ser	Gln	Arg	Ala	Tyr	Gly	Ile	Leu	Met	Ala	Thr	Thr	Ser
				740				745				750			
Arg	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Arg	Leu	Glu	Leu	Asp	Ala	Gly	Arg	Val
				755				760				765			
Lys	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	Asp	Cys	Ile	Arg	Ile	Asn	Cys	Asn	Ser	Ser
				770				775				780			
Lys	Gly	Pro	Glu	Thr	Leu	Phe	Ala	Gly	Tyr	Asn	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu
785				790				795				800			
Trp	His	Thr	Val	Arg	Val	Val	Arg	Arg	Gly	Lys	Ser	Leu	Lys	Leu	Thr
				805				810				815			
Val	Asp	Asp	Gln	Gln	Ala	Met	Thr	Gly	Gln	Met	Ala	Gly	Asp	His	Thr
				820				825				830			
Arg	Leu	Glu	Phe	His	Asn	Ile	Glu	Thr	Gly	Ile	Ile	Thr	Glu	Arg	Arg
				835				840				845			
Tyr	Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Asn	Phe	Ile	Gly	His	Leu	Gln	Ser	Leu
				850				855				860			
Thr	Phe	Asn	Gly	Met	Ala	Tyr	Ile	Asp	Leu	Cys	Lys	Asn	Gly	Asp	Ile
865				870				875				880			
Asp	Tyr	Cys	Glu	Leu	Asn	Ala	Arg	Phe	Gly	Phe	Arg	Asn	Ile	Ile	Ala
				885				890				895			
Asp	Pro	Val	Thr	Phe	Lys	Thr	Lys	Ser	Ser	Tyr	Val	Ala	Leu	Ala	Thr
				900				905				910			
Leu	Gln	Ala	Tyr	Thr	Ser	Met	His	Leu	Phe	Phe	Gln	Phe	Lys	Thr	Thr
				915				920				925			
Ser	Leu	Asp	Gly	Leu	Ile	Leu	Tyr	Asn	Ser	Gly	Asp	Gly	Asn	Asp	Phe
930				935				940							
Ile	Val	Val	Glu	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Leu	His	Tyr	Val	Phe	Asp	Leu

945	950	955	960
Gly Asn Gly Ala Asn Leu Ile Lys Gly Ser Ser Asn Lys Pro Leu Asn			
	965	970	975
Asp Asn Gln Trp His Asn Val Met Ile Ser Arg Asp Thr Ser Asn Leu			
	980	985	990
His Thr Val Lys Ile Asp Thr Lys Ile Thr Thr Gln Ile Thr Ala Gly			
	995	1000	1005
Ala Arg Asn Leu Asp Leu Lys Ser Asp Leu Tyr Ile Gly Gly Val			
1010	1015	1020	
Ala Lys Glu Thr Tyr Lys Ser Leu Pro Lys Leu Val His Ala Lys			
1025	1030	1035	
Glu Gly Phe Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val Asp Leu Asn Gly Arg			
1040	1045	1050	
Leu Pro Asp Leu Ile Ser Asp Ala Leu Phe Cys Asn Gly Gln Ile			
1055	1060	1065	
Glu Arg Gly Cys Glu Gly Pro Ser Thr Thr Cys Gln Glu Asp Ser			
1070	1075	1080	
Cys Ser Asn Gln Gly Val Cys Leu Gln Gln Trp Asp Gly Phe Ser			
1085	1090	1095	
Cys Asp Cys Ser Met Thr Ser Phe Ser Gly Pro Leu Cys Asn Asp			
1100	1105	1110	
Pro Gly Thr Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly Gly Gly Gln Ile Thr			
1115	1120	1125	
Tyr Lys Trp Pro Pro Asn Asp Arg Pro Ser Thr Arg Ala Asp Arg			
1130	1135	1140	
Leu Ala Ile Gly Phe Ser Thr Val Gln Lys Glu Ala Val Leu Val			
1145	1150	1155	
Arg Val Asp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Asp Tyr Leu Glu Leu His			
1160	1165	1170	
Ile His Gln Gly Lys Ile Gly Val Lys Phe Asn Val Gly Thr Asp			
1175	1180	1185	
Asp Ile Ala Ile Glu Glu Ser Asn Ala Ile Ile Asn Asp Gly Lys			
1190	1195	1200	
Tyr His Val Val Arg Phe Thr Arg Ser Gly Gly Asn Ala Thr Leu			
1205	1210	1215	
Gln Val Asp Ser Trp Pro Val Ile Glu Arg Tyr Pro Ala Gly Asn			
1220	1225	1230	
Asn Asp Asn Glu Arg Leu Ala Ile Ala Arg Gln Arg Ile Pro Tyr			
1235	1240	1245	

Arg Leu Gly Arg Val Val Asp Glu Trp Leu Leu Asp Lys Gly Arg		
1250	1255	1260
Gln Leu Thr Ile Phe Asn Ser Gln Ala Thr Ile Ile Ile Gly Gly		
1265	1270	1275
Lys Glu Gln Gly Gln Pro Phe Gln Gly Gln Leu Ser Gly Leu Tyr		
1280	1285	1290
Tyr Asn Gly Leu Lys Val Leu Asn Met Ala Ala Glu Asn Asp Ala		
1295	1300	1305
Asn Ile Ala Ile Val Gly Asn Val Arg Leu Val Gly Glu Val Pro		
1310	1315	1320
Ser Ser Met Thr Thr Glu Ser Thr Ala Thr Ala Met Gln Ser Glu		
1325	1330	1335
Met Ser Thr Ser Ile Met Glu Thr Thr Thr Thr Leu Ala Thr Ser		
1340	1345	1350
Thr Ala Arg Arg Gly Lys Pro Pro Thr Lys Glu Pro Ile Ser Gln		
1355	1360	1365
Thr Thr Asp Asp Ile Leu Val Ala Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asp		
1370	1375	1380
Asp Glu Asp Ile Asp Pro Cys Glu Pro Ser Ser Ala Asn Pro Thr		
1385	1390	1395
Arg Ala Gly Gly Arg Glu Pro Tyr Pro Gly Ser Ala Glu Val Ile		
1400	1405	1410
Arg Glu Ser Ser Ser Thr Thr Gly Met Val Val Gly Ile Val Ala		
1415	1420	1425
Ala Ala Ala Leu Cys Ile Leu Ile Leu Leu Tyr Ala Met Tyr Lys		
1430	1435	1440
Tyr Arg Asn Arg Asp Glu Gly Ser Tyr His Val Asp Glu Ser Arg		
1445	1450	1455
Asn Tyr Ile Ser Asn Ser Ala Gln Ser Asn Gly Ala Val Val Lys		
1460	1465	1470
Glu Lys Gln Pro Ser Ser Ala Lys Ser Ser Asn Lys Asn Lys Lys		
1475	1480	1485
Asn Lys Asp Lys Glu Tyr Tyr Val		
1490	1495	
<210> 106		
<211> 1547		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		

<223> NRXN1- α 异型体3a

<400> 106

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

290	295	300
Asp Gln Gly Lys Ser Lys Gly Lys Glu Glu Tyr Ile Ala Thr Phe Lys		
305	310	315
Gly Ser Glu Tyr Phe Cys Tyr Asp Leu Ser Gln Asn Pro Ile Gln Ser		320
	325	330
Ser Ser Asp Glu Ile Thr Leu Ser Phe Lys Thr Leu Gln Arg Asn Gly		335
	340	345
Leu Met Leu His Thr Gly Lys Ser Ala Asp Tyr Val Asn Leu Ala Leu		350
	355	360
Lys Asn Gly Ala Val Ser Leu Val Ile Asn Leu Gly Ser Gly Ala Phe		365
370	375	380
Glu Ala Leu Val Glu Pro Val Asn Gly Lys Phe Asn Asp Asn Ala Trp		
385	390	395
His Asp Val Lys Val Thr Arg Asn Leu Arg Gln His Ser Gly Ile Gly		400
	405	410
His Ala Met Val Asn Lys Leu His Cys Ser Val Thr Ile Ser Val Asp		415
	420	425
Gly Ile Leu Thr Thr Thr Gly Tyr Thr Gln Glu Asp Tyr Thr Met Leu		430
435	440	445
Gly Ser Asp Asp Phe Phe Tyr Val Gly Gly Ser Pro Ser Thr Ala Asp		
450	455	460
Leu Pro Gly Ser Pro Val Ser Asn Asn Phe Met Gly Cys Leu Lys Glu		
465	470	475
Val Val Tyr Lys Asn Asn Asp Val Arg Leu Glu Leu Ser Arg Leu Ala		480
	485	490
Lys Gln Gly Asp Pro Lys Met Lys Ile His Gly Val Val Ala Phe Lys		495
	500	505
Cys Glu Asn Val Ala Thr Leu Asp Pro Ile Thr Phe Glu Thr Pro Glu		510
	515	520
Ser Phe Ile Ser Leu Pro Lys Trp Asn Ala Lys Lys Thr Gly Ser Ile		525
530	535	540
Ser Phe Asp Phe Arg Thr Thr Glu Pro Asn Gly Leu Ile Leu Phe Ser		
545	550	555
His Gly Lys Pro Arg His Gln Lys Asp Ala Lys His Pro Gln Met Ile		560
	565	570
Lys Val Asp Phe Phe Ala Ile Glu Met Leu Asp Gly His Leu Tyr Leu		575
	580	585
Leu Leu Asp Met Gly Ser Gly Thr Ile Lys Ile Lys Ala Leu Leu Lys		590
595	600	605

Lys Val Asn Asp Gly Glu Trp Tyr His Val Asp Phe Gln Arg Asp Gly		
610	615	620
Arg Ser Gly Thr Ile Ser Val Asn Thr Leu Arg Thr Pro Tyr Thr Ala		
625	630	635 640
Pro Gly Glu Ser Glu Ile Leu Asp Leu Asp Asp Glu Leu Tyr Leu Gly		
645	650	655
Gly Leu Pro Glu Asn Lys Ala Gly Leu Val Phe Pro Thr Glu Val Trp		
660	665	670
Thr Ala Leu Leu Asn Tyr Gly Tyr Val Gly Cys Ile Arg Asp Leu Phe		
675	680	685
Ile Asp Gly Gln Ser Lys Asp Ile Arg Gln Met Ala Glu Val Gln Ser		
690	695	700
Thr Ala Gly Val Lys Pro Ser Cys Ser Lys Glu Thr Ala Lys Pro Cys		
705	710	715 720
Leu Ser Asn Pro Cys Lys Asn Asn Gly Met Cys Arg Asp Gly Trp Asn		
725	730	735
Arg Tyr Val Cys Asp Cys Ser Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Ser Cys		
740	745	750
Glu Arg Glu Ala Thr Val Leu Ser Tyr Asp Gly Ser Met Phe Met Lys		
755	760	765
Ile Gln Leu Pro Val Val Met His Thr Glu Ala Glu Asp Val Ser Leu		
770	775	780
Arg Phe Arg Ser Gln Arg Ala Tyr Gly Ile Leu Met Ala Thr Thr Ser		
785	790	795 800
Arg Asp Ser Ala Asp Thr Leu Arg Leu Glu Leu Asp Ala Gly Arg Val		
805	810	815
Lys Leu Thr Val Asn Leu Asp Cys Ile Arg Ile Asn Cys Asn Ser Ser		
820	825	830
Lys Gly Pro Glu Thr Leu Phe Ala Gly Tyr Asn Leu Asn Asp Asn Glu		
835	840	845
Trp His Thr Val Arg Val Val Arg Arg Gly Lys Ser Leu Lys Leu Thr		
850	855	860
Val Asp Asp Gln Gln Ala Met Thr Gly Gln Met Ala Gly Asp His Thr		
865	870	875 880
Arg Leu Glu Phe His Asn Ile Glu Thr Gly Ile Ile Thr Glu Arg Arg		
885	890	895
Tyr Leu Ser Ser Val Pro Ser Asn Phe Ile Gly His Leu Gln Ser Leu		
900	905	910
Thr Phe Asn Gly Met Ala Tyr Ile Asp Leu Cys Lys Asn Gly Asp Ile		

915	920	925
Asp Tyr Cys Glu Leu Asn Ala Arg Phe Gly Phe Arg Asn Ile Ile Ala		
930	935	940
Asp Pro Val Thr Phe Lys Thr Lys Ser Ser Tyr Val Ala Leu Ala Thr		
945	950	955
Leu Gln Ala Tyr Thr Ser Met His Leu Phe Phe Gln Phe Lys Thr Thr		
965	970	975
Ser Leu Asp Gly Leu Ile Leu Tyr Asn Ser Gly Asp Gly Asn Asp Phe		
980	985	990
Ile Val Val Glu Leu Val Lys Gly Tyr Leu His Tyr Val Phe Asp Leu		
995	1000	1005
Gly Asn Gly Ala Asn Leu Ile Lys Gly Ser Ser Asn Lys Pro Leu		
1010	1015	1020
Asn Asp Asn Gln Trp His Asn Val Met Ile Ser Arg Asp Thr Ser		
1025	1030	1035
Asn Leu His Thr Val Lys Ile Asp Thr Lys Ile Thr Thr Gln Ile		
1040	1045	1050
Thr Ala Gly Ala Arg Asn Leu Asp Leu Lys Ser Asp Leu Tyr Ile		
1055	1060	1065
Gly Gly Val Ala Lys Glu Thr Tyr Lys Ser Leu Pro Lys Leu Val		
1070	1075	1080
His Ala Lys Glu Gly Phe Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val Asp Leu		
1085	1090	1095
Asn Gly Arg Leu Pro Asp Leu Ile Ser Asp Ala Leu Phe Cys Asn		
1100	1105	1110
Gly Gln Ile Glu Arg Gly Cys Glu Gly Pro Ser Thr Thr Cys Gln		
1115	1120	1125
Glu Asp Ser Cys Ser Asn Gln Gly Val Cys Leu Gln Gln Trp Asp		
1130	1135	1140
Gly Phe Ser Cys Asp Cys Ser Met Thr Ser Phe Ser Gly Pro Leu		
1145	1150	1155
Cys Asn Asp Pro Gly Thr Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly Gly Gly		
1160	1165	1170
Gln Ile Thr Tyr Lys Trp Pro Pro Asn Asp Arg Pro Ser Thr Arg		
1175	1180	1185
Ala Asp Arg Leu Ala Ile Gly Phe Ser Thr Val Gln Lys Glu Ala		
1190	1195	1200
Val Leu Val Arg Val Asp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Asp Tyr Leu		
1205	1210	1215

Glu Leu His Ile His Gln Gly Lys Ile Gly Val Lys Phe Asn Val		
1220	1225	1230
Gly Thr Asp Asp Ile Ala Ile Glu Glu Ser Asn Ala Ile Ile Asn		
1235	1240	1245
Asp Gly Lys Tyr His Val Val Arg Phe Thr Arg Ser Gly Gly Asn		
1250	1255	1260
Ala Thr Leu Gln Val Asp Ser Trp Pro Val Ile Glu Arg Tyr Pro		
1265	1270	1275
Ala Gly Asn Asn Asp Asn Glu Arg Leu Ala Ile Ala Arg Gln Arg		
1280	1285	1290
Ile Pro Tyr Arg Leu Gly Arg Val Val Asp Glu Trp Leu Leu Asp		
1295	1300	1305
Lys Gly Arg Gln Leu Thr Ile Phe Asn Ser Gln Ala Thr Ile Ile		
1310	1315	1320
Ile Gly Gly Lys Glu Gln Gly Gln Pro Phe Gln Gly Gln Leu Ser		
1325	1330	1335
Gly Leu Tyr Tyr Asn Gly Leu Lys Val Leu Asn Met Ala Ala Glu		
1340	1345	1350
Asn Asp Ala Asn Ile Ala Ile Val Gly Asn Val Arg Leu Val Gly		
1355	1360	1365
Glu Val Pro Ser Ser Met Thr Thr Glu Ser Thr Ala Thr Ala Met		
1370	1375	1380
Gln Ser Glu Met Ser Thr Ser Ile Met Glu Thr Thr Thr Thr Leu		
1385	1390	1395
Ala Thr Ser Thr Ala Arg Arg Gly Lys Pro Pro Thr Lys Glu Pro		
1400	1405	1410
Ile Ser Gln Thr Thr Asp Asp Ile Leu Val Ala Ser Ala Glu Cys		
1415	1420	1425
Pro Ser Asp Asp Glu Asp Ile Asp Pro Cys Glu Pro Ser Ser Gly		
1430	1435	1440
Gly Leu Ala Asn Pro Thr Arg Ala Gly Gly Arg Glu Pro Tyr Pro		
1445	1450	1455
Gly Ser Ala Glu Val Ile Arg Glu Ser Ser Ser Thr Thr Gly Met		
1460	1465	1470
Val Val Gly Ile Val Ala Ala Ala Ala Leu Cys Ile Leu Ile Leu		
1475	1480	1485
Leu Tyr Ala Met Tyr Lys Tyr Arg Asn Arg Asp Glu Gly Ser Tyr		
1490	1495	1500
His Val Asp Glu Ser Arg Asn Tyr Ile Ser Asn Ser Ala Gln Ser		

1505	1510	1515
Asn Gly Ala Val Val Lys Glu Lys Gln Pro Ser Ser Ala Lys Ser		
1520	1525	1530
Ser Asn Lys Asn Lys Lys Asn Lys Asp Lys Glu Tyr Tyr Val		
1535	1540	1545
<210> 107		
<211> 139		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>		
<223> NRXN1- α 异型体4a		
<400> 107		
Met Asp Met Arg Trp His Cys Glu Asn Ser Gln Thr Thr Asp Asp Ile		
1 5 10 15		
Leu Val Ala Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asp Asp Glu Asp Ile Asp Pro		
20 25 30		
Cys Glu Pro Ser Ser Ala Asn Pro Thr Arg Ala Gly Gly Arg Glu Pro		
35 40 45		
Tyr Pro Gly Ser Ala Glu Val Ile Arg Glu Ser Ser Ser Thr Thr Gly		
50 55 60		
Met Val Val Gly Ile Val Ala Ala Ala Leu Cys Ile Leu Ile Leu		
65 70 75 80		
Leu Tyr Ala Met Tyr Lys Tyr Arg Asn Arg Asp Glu Gly Ser Tyr His		
85 90 95		
Val Asp Glu Ser Arg Asn Tyr Ile Ser Asn Ser Ala Gln Ser Asn Gly		
100 105 110		
Ala Val Val Lys Glu Lys Gln Pro Ser Ser Ala Lys Ser Ser Asn Lys		
115 120 125		
Asn Lys Lys Asn Lys Asp Lys Glu Tyr Tyr Val		
130 135		
<210> 108		
<211> 472		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>		
<223> NRXN1- β 异型体1b		
<400> 108		
Met Tyr Gln Arg Met Leu Arg Cys Gly Ala Glu Leu Gly Ser Pro Gly		
1 5 10 15		

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Arg Leu Ala		
20	25	30
Leu Leu Trp Ile Val Pro Leu Thr Leu Ser Gly Leu Leu Gly Val Ala		
35	40	45
Trp Gly Ala Ser Ser Leu Gly Ala His His Ile His His Phe His Gly		
50	55	60
Ser Ser Lys His His Ser Val Pro Ile Ala Ile Tyr Arg Ser Pro Ala		
65	70	75
Ser Leu Arg Gly Gly His Ala Gly Thr Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly		
85	90	95
Gly Gly Gln Ile Thr Tyr Lys Trp Pro Pro Asn Asp Arg Pro Ser Thr		
100	105	110
Arg Ala Asp Arg Leu Ala Ile Gly Phe Ser Thr Val Gln Lys Glu Ala		
115	120	125
Val Leu Val Arg Val Asp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Asp Tyr Leu Glu		
130	135	140
Leu His Ile His Gln Gly Lys Ile Gly Val Lys Phe Asn Val Gly Thr		
145	150	155
Asp Asp Ile Ala Ile Glu Glu Ser Asn Ala Ile Ile Asn Asp Gly Lys		
165	170	175
Tyr His Val Val Arg Phe Thr Arg Ser Gly Gly Asn Ala Thr Leu Gln		
180	185	190
Val Asp Ser Trp Pro Val Ile Glu Arg Tyr Pro Ala Gly Asn Asn Asp		
195	200	205
Asn Glu Arg Leu Ala Ile Ala Arg Gln Arg Ile Pro Tyr Arg Leu Gly		
210	215	220
Arg Val Val Asp Glu Trp Leu Leu Asp Lys Gly Arg Gln Leu Thr Ile		
225	230	235
Phe Asn Ser Gln Ala Thr Ile Ile Ile Gly Gly Lys Glu Gln Gly Gln		
245	250	255
Pro Phe Gln Gly Gln Leu Ser Gly Leu Tyr Tyr Asn Gly Leu Lys Val		
260	265	270
Leu Asn Met Ala Ala Glu Asn Asp Ala Asn Ile Ala Ile Val Gly Asn		
275	280	285
Val Arg Leu Val Gly Glu Val Pro Ser Ser Met Thr Thr Glu Ser Thr		
290	295	300
Ala Thr Ala Met Gln Ser Glu Met Ser Thr Ser Ile Met Glu Thr Thr		
305	310	315
Thr Thr Leu Ala Thr Ser Thr Ala Arg Arg Gly Lys Pro Pro Thr Lys		

	325		330		335
Glu Pro Ile Ser Gln Thr Thr Asp Asp Ile Leu Val Ala Ser Ala Glu					
	340		345		350
Cys Pro Ser Asp Asp Glu Asp Ile Asp Pro Cys Glu Pro Ser Ser Gly					
	355		360		365
Gly Leu Ala Asn Pro Thr Arg Ala Gly Gly Arg Glu Pro Tyr Pro Gly					
	370		375		380
Ser Ala Glu Val Ile Arg Glu Ser Ser Ser Thr Thr Gly Met Val Val					
385		390		395	400
Gly Ile Val Ala Ala Ala Ala Leu Cys Ile Leu Ile Leu Leu Tyr Ala					
	405		410		415
Met Tyr Lys Tyr Arg Asn Arg Asp Glu Gly Ser Tyr His Val Asp Glu					
	420		425		430
Ser Arg Asn Tyr Ile Ser Asn Ser Ala Gln Ser Asn Gly Ala Val Val					
	435		440		445
Lys Glu Lys Gln Pro Ser Ser Ala Lys Ser Ser Asn Lys Asn Lys Lys					
	450		455		460
Asn Lys Asp Lys Glu Tyr Tyr Val					
465		470			
<210> 109					
<211> 442					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> NRXN1-β异型体3b					
<400> 109					
Met Tyr Gln Arg Met Leu Arg Cys Gly Ala Glu Leu Gly Ser Pro Gly					
1	5		10		15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Arg Leu Ala					
	20		25		30
Leu Leu Trp Ile Val Pro Leu Thr Leu Ser Gly Leu Leu Gly Val Ala					
	35		40		45
Trp Gly Ala Ser Ser Leu Gly Ala His His Ile His His Phe His Gly					
	50		55		60
Ser Ser Lys His His Ser Val Pro Ile Ala Ile Tyr Arg Ser Pro Ala					
65		70		75	80
Ser Leu Arg Gly Gly His Ala Gly Thr Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly					
	85		90		95
Gly Gly Gln Ile Thr Tyr Lys Trp Pro Pro Asn Asp Arg Pro Ser Thr					

100	105	110
Arg Ala Asp Arg Leu Ala Ile Gly Phe Ser Thr Val Gln Lys Glu Ala		
115	120	125
Val Leu Val Arg Val Asp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Asp Tyr Leu Glu		
130	135	140
Leu His Ile His Gln Gly Lys Ile Gly Val Lys Phe Asn Val Gly Thr		
145	150	155
Asp Asp Ile Ala Ile Glu Glu Ser Asn Ala Ile Ile Asn Asp Gly Lys		
165	170	175
Tyr His Val Val Arg Phe Thr Arg Ser Gly Gly Asn Ala Thr Leu Gln		
180	185	190
Val Asp Ser Trp Pro Val Ile Glu Arg Tyr Pro Ala Gly Arg Gln Leu		
195	200	205
Thr Ile Phe Asn Ser Gln Ala Thr Ile Ile Ile Gly Gly Lys Glu Gln		
210	215	220
Gly Gln Pro Phe Gln Gly Gln Leu Ser Gly Leu Tyr Tyr Asn Gly Leu		
225	230	235
Lys Val Leu Asn Met Ala Ala Glu Asn Asp Ala Asn Ile Ala Ile Val		
245	250	255
Gly Asn Val Arg Leu Val Gly Glu Val Pro Ser Ser Met Thr Thr Glu		
260	265	270
Ser Thr Ala Thr Ala Met Gln Ser Glu Met Ser Thr Ser Ile Met Glu		
275	280	285
Thr Thr Thr Thr Leu Ala Thr Ser Thr Ala Arg Arg Gly Lys Pro Pro		
290	295	300
Thr Lys Glu Pro Ile Ser Gln Thr Thr Asp Asp Ile Leu Val Ala Ser		
305	310	315
Ala Glu Cys Pro Ser Asp Asp Glu Asp Ile Asp Pro Cys Glu Pro Ser		
325	330	335
Ser Gly Gly Leu Ala Asn Pro Thr Arg Ala Gly Gly Arg Glu Pro Tyr		
340	345	350
Pro Gly Ser Ala Glu Val Ile Arg Glu Ser Ser Ser Thr Thr Gly Met		
355	360	365
Val Val Gly Ile Val Ala Ala Ala Ala Leu Cys Ile Leu Ile Leu Leu		
370	375	380
Tyr Ala Met Tyr Lys Tyr Arg Asn Arg Asp Glu Gly Ser Tyr His Val		
385	390	395
Asp Glu Ser Arg Asn Tyr Ile Ser Asn Ser Ala Gln Ser Asn Gly Ala		
405	410	415

Val Val Lys Glu Lys Gln Pro Ser Ser Ala Lys Ser Ser Asn Lys Asn
 420 425 430
 Lys Lys Asn Lys Asp Lys Glu Tyr Tyr Val
 435 440
 <210> 110
 <211> 2527
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> LRKK2蛋白
 <400> 110
 Met Ala Ser Gly Ser Cys Gln Gly Cys Glu Glu Asp Glu Glu Thr Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Ile Val Arg Leu Asn Asn Val Gln Glu Gly Lys Gln Ile
 20 25 30
 Glu Thr Leu Val Gln Ile Leu Glu Asp Leu Leu Val Phe Thr Tyr Ser
 35 40 45
 Glu Arg Ala Ser Lys Leu Phe Gln Gly Lys Asn Ile His Val Pro Leu
 50 55 60
 Leu Ile Val Leu Asp Ser Tyr Met Arg Val Ala Ser Val Gln Gln Val
 65 70 75 80
 Gly Trp Ser Leu Leu Cys Lys Leu Ile Glu Val Cys Pro Gly Thr Met
 85 90 95
 Gln Ser Leu Met Gly Pro Gln Asp Val Gly Asn Asp Trp Glu Val Leu
 100 105 110
 Gly Val His Gln Leu Ile Leu Lys Met Leu Thr Val His Asn Ala Ser
 115 120 125
 Val Asn Leu Ser Val Ile Gly Leu Lys Thr Leu Asp Leu Leu Leu Thr
 130 135 140
 Ser Gly Lys Ile Thr Leu Leu Ile Leu Asp Glu Glu Ser Asp Ile Phe
 145 150 155 160
 Met Leu Ile Phe Asp Ala Met His Ser Phe Pro Ala Asn Asp Glu Val
 165 170 175
 Gln Lys Leu Gly Cys Lys Ala Leu His Val Leu Phe Glu Arg Val Ser
 180 185 190
 Glu Glu Gln Leu Thr Glu Phe Val Glu Asn Lys Asp Tyr Met Ile Leu
 195 200 205
 Leu Ser Ala Leu Thr Asn Phe Lys Asp Glu Glu Glu Ile Val Leu His
 210 215 220

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

530	535	540
Leu Val Leu Ala Ala	Leu Asn Arg Phe Ile Gly Asn Pro Gly Ile Gln	
545	550	555
Lys Cys Gly Leu Lys Val Ile Ser Ser Ile Val His Phe Pro Asp Ala		560
	565	570
Leu Glu Met Leu Ser Leu Glu Gly Ala Met Asp Ser Val Leu His Thr		575
	580	585
Leu Gln Met Tyr Pro Asp Asp Gln Glu Ile Gln Cys Leu Gly Leu Ser		590
	595	600
Leu Ile Gly Tyr Leu Ile Thr Lys Lys Asn Val Phe Ile Gly Thr Gly		605
610	615	620
His Leu Leu Ala Lys Ile Leu Val Ser Ser Leu Tyr Arg Phe Lys Asp		
625	630	635
Val Ala Glu Ile Gln Thr Lys Gly Phe Gln Thr Ile Leu Ala Ile Leu		640
	645	650
Lys Leu Ser Ala Ser Phe Ser Lys Leu Leu Val His His Ser Phe Asp		655
	660	665
Leu Val Ile Phe His Gln Met Ser Ser Asn Ile Met Glu Gln Lys Asp		670
675	680	685
Gln Gln Phe Leu Asn Leu Cys Cys Lys Cys Phe Ala Lys Val Ala Met		
690	695	700
Asp Asp Tyr Leu Lys Asn Val Met Leu Glu Arg Ala Cys Asp Gln Asn		
705	710	715
Asn Ser Ile Met Val Glu Cys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Asp Ala Asn		720
	725	730
Gln Ala Lys Glu Gly Ser Ser Leu Ile Cys Gln Val Cys Glu Lys Glu		735
	740	745
Ser Ser Pro Lys Leu Val Glu Leu Leu Leu Asn Ser Gly Ser Arg Glu		750
	755	760
Gln Asp Val Arg Lys Ala Leu Thr Ile Ser Ile Gly Lys Gly Asp Ser		765
770	775	780
Gln Ile Ile Ser Leu Leu Leu Arg Arg Leu Ala Leu Asp Val Ala Asn		
785	790	795
Asn Ser Ile Cys Leu Gly Gly Phe Cys Ile Gly Lys Val Glu Pro Ser		800
	805	810
Trp Leu Gly Pro Leu Phe Pro Asp Lys Thr Ser Asn Leu Arg Lys Gln		815
	820	825
Thr Asn Ile Ala Ser Thr Leu Ala Arg Met Val Ile Arg Tyr Gln Met		830
835	840	845

Lys Ser Ala Val Glu Glu Gly Thr Ala Ser Gly Ser Asp Gly Asn Phe		
850	855	860
Ser Glu Asp Val Leu Ser Lys Phe Asp Glu Trp Thr Phe Ile Pro Asp		
865	870	875
Ser Ser Met Asp Ser Val Phe Ala Gln Ser Asp Asp Leu Asp Ser Glu		
	885	890
Gly Ser Glu Gly Ser Phe Leu Val Lys Lys Lys Ser Asn Ser Ile Ser		
	900	905
Val Gly Glu Phe Tyr Arg Asp Ala Val Leu Gln Arg Cys Ser Pro Asn		
	915	920
Leu Gln Arg His Ser Asn Ser Leu Gly Pro Ile Phe Asp His Glu Asp		
	930	935
Leu Leu Lys Arg Lys Arg Lys Ile Leu Ser Ser Asp Asp Ser Leu Arg		
945	950	955
Ser Ser Lys Leu Gln Ser His Met Arg His Ser Asp Ser Ile Ser Ser		
	965	970
Leu Ala Ser Glu Arg Glu Tyr Ile Thr Ser Leu Asp Leu Ser Ala Asn		
	980	985
Glu Leu Arg Asp Ile Asp Ala Leu Ser Gln Lys Cys Cys Ile Ser Val		
	995	1000
His Leu Glu His Leu Glu Lys Leu Glu Leu His Gln Asn Ala Leu		
	1010	1015
Thr Ser Phe Pro Gln Gln Leu Cys Glu Thr Leu Lys Ser Leu Thr		
	1025	1030
His Leu Asp Leu His Ser Asn Lys Phe Thr Ser Phe Pro Ser Tyr		
	1040	1045
Leu Leu Lys Met Ser Cys Ile Ala Asn Leu Asp Val Ser Arg Asn		
	1055	1060
Asp Ile Gly Pro Ser Val Val Leu Asp Pro Thr Val Lys Cys Pro		
	1070	1075
Thr Leu Lys Gln Phe Asn Leu Ser Tyr Asn Gln Leu Ser Phe Val		
	1085	1090
Pro Glu Asn Leu Thr Asp Val Val Glu Lys Leu Glu Gln Leu Ile		
	1100	1105
Leu Glu Gly Asn Lys Ile Ser Gly Ile Cys Ser Pro Leu Arg Leu		
	1115	1120
Lys Glu Leu Lys Ile Leu Asn Leu Ser Lys Asn His Ile Ser Ser		
	1130	1135
Leu Ser Glu Asn Phe Leu Glu Ala Cys Pro Lys Val Glu Ser Phe		
		1140

1145	1150	1155
Ser Ala Arg Met Asn Phe	Leu Ala Ala Met Pro	Phe Leu Pro Pro
1160	1165	1170
Ser Met Thr Ile Leu Lys	Leu Ser Gln Asn Lys	Phe Ser Cys Ile
1175	1180	1185
Pro Glu Ala Ile Leu Asn	Leu Pro His Leu Arg	Ser Leu Asp Met
1190	1195	1200
Ser Ser Asn Asp Ile Gln	Tyr Leu Pro Gly Pro	Ala His Trp Lys
1205	1210	1215
Ser Leu Asn Leu Arg Glu	Leu Leu Phe Ser His	Asn Gln Ile Ser
1220	1225	1230
Ile Leu Asp Leu Ser Glu	Lys Ala Tyr Leu Trp	Ser Arg Val Glu
1235	1240	1245
Lys Leu His Leu Ser His	Asn Lys Leu Lys Glu	Ile Pro Pro Glu
1250	1255	1260
Ile Gly Cys Leu Glu Asn	Leu Thr Ser Leu Asp	Val Ser Tyr Asn
1265	1270	1275
Leu Glu Leu Arg Ser Phe	Pro Asn Glu Met Gly	Lys Leu Ser Lys
1280	1285	1290
Ile Trp Asp Leu Pro Leu	Asp Glu Leu His Leu	Asn Phe Asp Phe
1295	1300	1305
Lys His Ile Gly Cys Lys	Ala Lys Asp Ile Ile	Arg Phe Leu Gln
1310	1315	1320
Gln Arg Leu Lys Lys Ala	Val Pro Tyr Asn Arg	Met Lys Leu Met
1325	1330	1335
Ile Val Gly Asn Thr Gly	Ser Gly Lys Thr Thr	Leu Leu Gln Gln
1340	1345	1350
Leu Met Lys Thr Lys Lys	Ser Asp Leu Gly Met	Gln Ser Ala Thr
1355	1360	1365
Val Gly Ile Asp Val Lys	Asp Trp Pro Ile Gln	Ile Arg Asp Lys
1370	1375	1380
Arg Lys Arg Asp Leu Val	Leu Asn Val Trp Asp	Phe Ala Gly Arg
1385	1390	1395
Glu Glu Phe Tyr Ser Thr	His Pro His Phe Met	Thr Gln Arg Ala
1400	1405	1410
Leu Tyr Leu Ala Val Tyr	Asp Leu Ser Lys Gly	Gln Ala Glu Val
1415	1420	1425
Asp Ala Met Lys Pro Trp	Leu Phe Asn Ile Lys	Ala Arg Ala Ser
1430	1435	1440

Ser Ser Pro Val Ile Leu Val Gly Thr His Leu Asp Val Ser Asp		
1445	1450	1455
Glu Lys Gln Arg Lys Ala Cys Met Ser Lys Ile Thr Lys Glu Leu		
1460	1465	1470
Leu Asn Lys Arg Gly Phe Pro Ala Ile Arg Asp Tyr His Phe Val		
1475	1480	1485
Asn Ala Thr Glu Glu Ser Asp Ala Leu Ala Lys Leu Arg Lys Thr		
1490	1495	1500
Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn Phe Lys Ile Arg Asp Gln Leu Val		
1505	1510	1515
Val Gly Gln Leu Ile Pro Asp Cys Tyr Val Glu Leu Glu Lys Ile		
1520	1525	1530
Ile Leu Ser Glu Arg Lys Asn Val Pro Ile Glu Phe Pro Val Ile		
1535	1540	1545
Asp Arg Lys Arg Leu Leu Gln Leu Val Arg Glu Asn Gln Leu Gln		
1550	1555	1560
Leu Asp Glu Asn Glu Leu Pro His Ala Val His Phe Leu Asn Glu		
1565	1570	1575
Ser Gly Val Leu Leu His Phe Gln Asp Pro Ala Leu Gln Leu Ser		
1580	1585	1590
Asp Leu Tyr Phe Val Glu Pro Lys Trp Leu Cys Lys Ile Met Ala		
1595	1600	1605
Gln Ile Leu Thr Val Lys Val Glu Gly Cys Pro Lys His Pro Lys		
1610	1615	1620
Gly Ile Ile Ser Arg Arg Asp Val Glu Lys Phe Leu Ser Lys Lys		
1625	1630	1635
Arg Lys Phe Pro Lys Asn Tyr Met Ser Gln Tyr Phe Lys Leu Leu		
1640	1645	1650
Glu Lys Phe Gln Ile Ala Leu Pro Ile Gly Glu Glu Tyr Leu Leu		
1655	1660	1665
Val Pro Ser Ser Leu Ser Asp His Arg Pro Val Ile Glu Leu Pro		
1670	1675	1680
His Cys Glu Asn Ser Glu Ile Ile Ile Arg Leu Tyr Glu Met Pro		
1685	1690	1695
Tyr Phe Pro Met Gly Phe Trp Ser Arg Leu Ile Asn Arg Leu Leu		
1700	1705	1710
Glu Ile Ser Pro Tyr Met Leu Ser Gly Arg Glu Arg Ala Leu Arg		
1715	1720	1725
Pro Asn Arg Met Tyr Trp Arg Gln Gly Ile Tyr Leu Asn Trp Ser		

1730	1735	1740
Pro Glu Ala Tyr Cys Leu	Val Gly Ser Glu Val	Leu Asp Asn His
1745	1750	1755
Pro Glu Ser Phe Leu Lys	Ile Thr Val Pro Ser	Cys Arg Lys Gly
1760	1765	1770
Cys Ile Leu Leu Gly Gln	Val Val Asp His Ile	Asp Ser Leu Met
1775	1780	1785
Glu Glu Trp Phe Pro Gly	Leu Leu Glu Ile Asp	Ile Cys Gly Glu
1790	1795	1800
Gly Glu Thr Leu Leu Lys	Lys Trp Ala Leu Tyr	Ser Phe Asn Asp
1805	1810	1815
Gly Glu Glu His Gln Lys	Ile Leu Leu Asp Asp	Leu Met Lys Lys
1820	1825	1830
Ala Glu Glu Gly Asp Leu	Leu Val Asn Pro Asp	Gln Pro Arg Leu
1835	1840	1845
Thr Ile Pro Ile Ser Gln	Ile Ala Pro Asp Leu	Ile Leu Ala Asp
1850	1855	1860
Leu Pro Arg Asn Ile Met	Leu Asn Asn Asp Glu	Leu Glu Phe Glu
1865	1870	1875
Gln Ala Pro Glu Phe Leu	Leu Gly Asp Gly Ser	Phe Gly Ser Val
1880	1885	1890
Tyr Arg Ala Ala Tyr Glu	Gly Glu Glu Val Ala	Val Lys Ile Phe
1895	1900	1905
Asn Lys His Thr Ser Leu	Arg Leu Leu Arg Gln	Glu Leu Val Val
1910	1915	1920
Leu Cys His Leu His His	Pro Ser Leu Ile Ser	Leu Leu Ala Ala
1925	1930	1935
Gly Ile Arg Pro Arg Met	Leu Val Met Glu Leu	Ala Ser Lys Gly
1940	1945	1950
Ser Leu Asp Arg Leu Leu	Gln Gln Asp Lys Ala	Ser Leu Thr Arg
1955	1960	1965
Thr Leu Gln His Arg Ile	Ala Leu His Val Ala	Asp Gly Leu Arg
1970	1975	1980
Tyr Leu His Ser Ala Met	Ile Ile Tyr Arg Asp	Leu Lys Pro His
1985	1990	1995
Asn Val Leu Leu Phe Thr	Leu Tyr Pro Asn Ala	Ala Ile Ile Ala
2000	2005	2010
Lys Ile Ala Asp Tyr Gly	Ile Ala Gln Tyr Cys	Cys Arg Met Gly
2015	2020	2025

Ile Lys Thr Ser Glu Gly Thr Pro Gly Phe Arg Ala Pro Glu Val		
2030	2035	2040
Ala Arg Gly Asn Val Ile Tyr Asn Gln Gln Ala Asp Val Tyr Ser		
2045	2050	2055
Phe Gly Leu Leu Leu Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Gly Gly Arg Ile		
2060	2065	2070
Val Glu Gly Leu Lys Phe Pro Asn Glu Phe Asp Glu Leu Glu Ile		
2075	2080	2085
Gln Gly Lys Leu Pro Asp Pro Val Lys Glu Tyr Gly Cys Ala Pro		
2090	2095	2100
Trp Pro Met Val Glu Lys Leu Ile Lys Gln Cys Leu Lys Glu Asn		
2105	2110	2115
Pro Gln Glu Arg Pro Thr Ser Ala Gln Val Phe Asp Ile Leu Asn		
2120	2125	2130
Ser Ala Glu Leu Val Cys Leu Thr Arg Arg Ile Leu Leu Pro Lys		
2135	2140	2145
Asn Val Ile Val Glu Cys Met Val Ala Thr His His Asn Ser Arg		
2150	2155	2160
Asn Ala Ser Ile Trp Leu Gly Cys Gly His Thr Asp Arg Gly Gln		
2165	2170	2175
Leu Ser Phe Leu Asp Leu Asn Thr Glu Gly Tyr Thr Ser Glu Glu		
2180	2185	2190
Val Ala Asp Ser Arg Ile Leu Cys Leu Ala Leu Val His Leu Pro		
2195	2200	2205
Val Glu Lys Glu Ser Trp Ile Val Ser Gly Thr Gln Ser Gly Thr		
2210	2215	2220
Leu Leu Val Ile Asn Thr Glu Asp Gly Lys Lys Arg His Thr Leu		
2225	2230	2235
Glu Lys Met Thr Asp Ser Val Thr Cys Leu Tyr Cys Asn Ser Phe		
2240	2245	2250
Ser Lys Gln Ser Lys Gln Lys Asn Phe Leu Leu Val Gly Thr Ala		
2255	2260	2265
Asp Gly Lys Leu Ala Ile Phe Glu Asp Lys Thr Val Lys Leu Lys		
2270	2275	2280
Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Leu Asn Ile Gly Asn Val Ser Thr		
2285	2290	2295
Pro Leu Met Cys Leu Ser Glu Ser Thr Asn Ser Thr Glu Arg Asn		
2300	2305	2310
Val Met Trp Gly Gly Cys Gly Thr Lys Ile Phe Ser Phe Ser Asn		

2315	2320	2325
Asp Phe Thr Ile Gln Lys	Leu Ile Glu Thr Arg Thr Ser Gln Leu	
2330	2335	2340
Phe Ser Tyr Ala Ala Phe	Ser Asp Ser Asn Ile Ile Thr Val Val	
2345	2350	2355
Val Asp Thr Ala Leu Tyr	Ile Ala Lys Gln Asn Ser Pro Val Val	
2360	2365	2370
Glu Val Trp Asp Lys Lys	Thr Glu Lys Leu Cys Gly Leu Ile Asp	
2375	2380	2385
Cys Val His Phe Leu Arg	Glu Val Met Val Lys Glu Asn Lys Glu	
2390	2395	2400
Ser Lys His Lys Met Ser	Tyr Ser Gly Arg Val Lys Thr Leu Cys	
2405	2410	2415
Leu Gln Lys Asn Thr Ala	Leu Trp Ile Gly Thr Gly Gly Gly His	
2420	2425	2430
Ile Leu Leu Leu Asp Leu	Ser Thr Arg Arg Leu Ile Arg Val Ile	
2435	2440	2445
Tyr Asn Phe Cys Asn Ser	Val Arg Val Met Met Thr Ala Gln Leu	
2450	2455	2460
Gly Ser Leu Lys Asn Val	Met Leu Val Leu Gly Tyr Asn Arg Lys	
2465	2470	2475
Asn Thr Glu Gly Thr Gln	Lys Gln Lys Glu Ile Gln Ser Cys Leu	
2480	2485	2490
Thr Val Trp Asp Ile Asn	Leu Pro His Glu Val Gln Asn Leu Glu	
2495	2500	2505
Lys His Ile Glu Val Arg	Lys Glu Leu Ala Glu Lys Met Arg Arg	
2510	2515	2520
Thr Ser Val Glu		
2525		
<210> 111		
<211> 873		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>		
<223> VLDLR长异型体		
<400> 111		
Met Gly Thr Ser Ala Leu Trp Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Cys		
1	5	10
Trp Ala Pro Arg Glu Ser Gly Ala Thr Gly Thr Gly Arg Lys Ala Lys		

20	25	30
Cys Glu Pro Ser Gln Phe Gln	Cys Thr Asn Gly Arg Cys	Ile Thr Leu
35	40	45
Leu Trp Lys Cys Asp Gly Asp	Glu Asp Cys Val Asp Gly	Ser Asp Glu
50	55	60
Lys Asn Cys Val Lys Lys Thr	Cys Ala Glu Ser Asp Phe	Val Cys Asn
65	70	75
Asn Gly Gln Cys Val Pro Ser	Arg Trp Lys Cys Asp Gly	Asp Pro Asp
85	90	95
Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu	Ser Pro Glu Gln Cys His	Met Arg Thr
100	105	110
Cys Arg Ile His Glu Ile Ser	Cys Gly Ala His Ser Thr	Gln Cys Ile
115	120	125
Pro Val Ser Trp Arg Cys Asp	Gly Glu Asn Asp Cys Asp	Ser Gly Glu
130	135	140
Asp Glu Glu Asn Cys Gly Asn	Ile Thr Cys Ser Pro Asp	Glu Phe Thr
145	150	155
Cys Ser Ser Gly Arg Cys Ile	Ser Arg Asn Phe Val Cys	Asn Gly Gln
165	170	175
Asp Asp Cys Ser Asp Gly Ser	Asp Glu Leu Asp Cys Ala	Pro Pro Thr
180	185	190
Cys Gly Ala His Glu Phe Gln	Cys Ser Thr Ser Ser Cys	Ile Pro Ile
195	200	205
Ser Trp Val Cys Asp Asp Asp	Ala Asp Cys Ser Asp Gln	Ser Asp Glu
210	215	220
Ser Leu Glu Gln Cys Gly Arg	Gln Pro Val Ile His Thr	Lys Cys Pro
225	230	235
Ala Ser Glu Ile Gln Cys Gly	Ser Gly Glu Cys Ile His	Lys Lys Trp
245	250	255
Arg Cys Asp Gly Asp Pro Asp	Cys Lys Asp Gly Ser Asp	Glu Val Asn
260	265	270
Cys Pro Ser Arg Thr Cys Arg	Pro Asp Gln Phe Glu Cys	Glu Asp Gly
275	280	285
Ser Cys Ile His Gly Ser Arg	Gln Cys Asn Gly Ile Arg	Asp Cys Val
290	295	300
Asp Gly Ser Asp Glu Val Asn	Cys Lys Asn Val Asn Gln	Cys Leu Gly
305	310	315
Pro Gly Lys Phe Lys Cys Arg	Ser Gly Glu Cys Ile Asp	Ile Ser Lys
325	330	335

Val Cys Asn Gln Glu Gln Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Leu		
340	345	350
Lys Glu Cys His Ile Asn Glu Cys Leu Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser		
355	360	365
His Ile Cys Lys Asp Leu Val Ile Gly Tyr Glu Cys Asp Cys Ala Ala		
370	375	380
Gly Phe Glu Leu Ile Asp Arg Lys Thr Cys Gly Asp Ile Asp Glu Cys		
385	390	395
Gln Asn Pro Gly Ile Cys Ser Gln Ile Cys Ile Asn Leu Lys Gly Gly		
405	410	415
Tyr Lys Cys Glu Cys Ser Arg Gly Tyr Gln Met Asp Leu Ala Thr Gly		
420	425	430
Val Cys Lys Ala Val Gly Lys Glu Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg		
435	440	445
Arg Asp Ile Arg Lys Ile Gly Leu Glu Arg Lys Glu Tyr Ile Gln Leu		
450	455	460
Val Glu Gln Leu Arg Asn Thr Val Ala Leu Asp Ala Asp Ile Ala Ala		
465	470	475
Gln Lys Leu Phe Trp Ala Asp Leu Ser Gln Lys Ala Ile Phe Ser Ala		
485	490	495
Ser Ile Asp Asp Lys Val Gly Arg His Val Lys Met Ile Asp Asn Val		
500	505	510
Tyr Asn Pro Ala Ala Ile Ala Val Asp Trp Val Tyr Lys Thr Ile Tyr		
515	520	525
Trp Thr Asp Ala Ala Ser Lys Thr Ile Ser Val Ala Thr Leu Asp Gly		
530	535	540
Thr Lys Arg Lys Phe Leu Phe Asn Ser Asp Leu Arg Glu Pro Ala Ser		
545	550	555
Ile Ala Val Asp Pro Leu Ser Gly Phe Val Tyr Trp Ser Asp Trp Gly		
565	570	575
Glu Pro Ala Lys Ile Glu Lys Ala Gly Met Asn Gly Phe Asp Arg Arg		
580	585	590
Pro Leu Val Thr Ala Asp Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp		
595	600	605
Leu Ile Lys Ser Arg Leu Tyr Trp Leu Asp Ser Lys Leu His Met Leu		
610	615	620
Ser Ser Val Asp Leu Asn Gly Gln Asp Arg Arg Ile Val Leu Lys Ser		
625	630	635
Leu Glu Phe Leu Ala His Pro Leu Ala Leu Thr Ile Phe Glu Asp Arg		

	645		650		655
Val Tyr Trp Ile Asp Gly Glu Asn Glu Ala Val Tyr Gly Ala Asn Lys					
	660		665		670
Phe Thr Gly Ser Glu Leu Ala Thr Leu Val Asn Asn Leu Asn Asp Ala					
	675		680		685
Gln Asp Ile Ile Val Tyr His Glu Leu Val Gln Pro Ser Gly Lys Asn					
	690		695		700
Trp Cys Glu Glu Asp Met Glu Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys Leu					
705		710		715	720
Pro Ala Pro Gln Ile Asn Asp His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ser Cys					
	725		730		735
Pro Ser Gly Tyr Asn Val Glu Glu Asn Gly Arg Asp Cys Gln Ser Thr					
	740		745		750
Ala Thr Thr Val Thr Tyr Ser Glu Thr Lys Asp Thr Asn Thr Thr Glu					
	755		760		765
Ile Ser Ala Thr Ser Gly Leu Val Pro Gly Gly Ile Asn Val Thr Thr					
	770		775		780
Ala Val Ser Glu Val Ser Val Pro Pro Lys Gly Thr Ser Ala Ala Trp					
785		790		795	800
Ala Ile Leu Pro Leu Leu Leu Val Met Ala Ala Val Gly Gly Tyr					
	805		810		815
Leu Met Trp Arg Asn Trp Gln His Lys Asn Met Lys Ser Met Asn Phe					
	820		825		830
Asp Asn Pro Val Tyr Leu Lys Thr Thr Glu Glu Asp Leu Ser Ile Asp					
	835		840		845
Ile Gly Arg His Ser Ala Ser Val Gly His Thr Tyr Pro Ala Ile Ser					
	850		855		860
Val Val Ser Thr Asp Asp Asp Leu Ala					
865		870			
<210> 112					
<211> 845					
<212> PRT					
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)					
<220>					
<223> VLDLR短异型体					
<400> 112					
Met Gly Thr Ser Ala Leu Trp Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Cys					
1		5		10	15
Trp Ala Pro Arg Glu Ser Gly Ala Thr Gly Thr Gly Arg Lys Ala Lys					

20	25	30
Cys Glu Pro Ser Gln Phe Gln	Cys Thr Asn Gly Arg Cys	Ile Thr Leu
35	40	45
Leu Trp Lys Cys Asp Gly Asp	Glu Asp Cys Val Asp Gly	Ser Asp Glu
50	55	60
Lys Asn Cys Val Lys Lys Thr	Cys Ala Glu Ser Asp Phe	Val Cys Asn
65	70	75
Asn Gly Gln Cys Val Pro Ser	Arg Trp Lys Cys Asp Gly	Asp Pro Asp
85	90	95
Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu	Ser Pro Glu Gln Cys His	Met Arg Thr
100	105	110
Cys Arg Ile His Glu Ile Ser	Cys Gly Ala His Ser Thr	Gln Cys Ile
115	120	125
Pro Val Ser Trp Arg Cys Asp	Gly Glu Asn Asp Cys Asp	Ser Gly Glu
130	135	140
Asp Glu Glu Asn Cys Gly Asn	Ile Thr Cys Ser Pro Asp	Glu Phe Thr
145	150	155
Cys Ser Ser Gly Arg Cys Ile	Ser Arg Asn Phe Val Cys	Asn Gly Gln
165	170	175
Asp Asp Cys Ser Asp Gly Ser	Asp Glu Leu Asp Cys Ala	Pro Pro Thr
180	185	190
Cys Gly Ala His Glu Phe Gln	Cys Ser Thr Ser Ser Cys	Ile Pro Ile
195	200	205
Ser Trp Val Cys Asp Asp Asp	Ala Asp Cys Ser Asp Gln	Ser Asp Glu
210	215	220
Ser Leu Glu Gln Cys Gly Arg	Gln Pro Val Ile His Thr	Lys Cys Pro
225	230	235
Ala Ser Glu Ile Gln Cys Gly	Ser Gly Glu Cys Ile His	Lys Lys Trp
245	250	255
Arg Cys Asp Gly Asp Pro Asp	Cys Lys Asp Gly Ser Asp	Glu Val Asn
260	265	270
Cys Pro Ser Arg Thr Cys Arg	Pro Asp Gln Phe Glu Cys	Glu Asp Gly
275	280	285
Ser Cys Ile His Gly Ser Arg	Gln Cys Asn Gly Ile Arg	Asp Cys Val
290	295	300
Asp Gly Ser Asp Glu Val Asn	Cys Lys Asn Val Asn Gln	Cys Leu Gly
305	310	315
Pro Gly Lys Phe Lys Cys Arg	Ser Gly Glu Cys Ile Asp	Ile Ser Lys
325	330	335

Val Cys Asn Gln Glu Gln Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Leu		
340	345	350
Lys Glu Cys His Ile Asn Glu Cys Leu Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser		
355	360	365
His Ile Cys Lys Asp Leu Val Ile Gly Tyr Glu Cys Asp Cys Ala Ala		
370	375	380
Gly Phe Glu Leu Ile Asp Arg Lys Thr Cys Gly Asp Ile Asp Glu Cys		
385	390	395
Gln Asn Pro Gly Ile Cys Ser Gln Ile Cys Ile Asn Leu Lys Gly Gly		
405	410	415
Tyr Lys Cys Glu Cys Ser Arg Gly Tyr Gln Met Asp Leu Ala Thr Gly		
420	425	430
Val Cys Lys Ala Val Gly Lys Glu Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg		
435	440	445
Arg Asp Ile Arg Lys Ile Gly Leu Glu Arg Lys Glu Tyr Ile Gln Leu		
450	455	460
Val Glu Gln Leu Arg Asn Thr Val Ala Leu Asp Ala Asp Ile Ala Ala		
465	470	475
Gln Lys Leu Phe Trp Ala Asp Leu Ser Gln Lys Ala Ile Phe Ser Ala		
485	490	495
Ser Ile Asp Asp Lys Val Gly Arg His Val Lys Met Ile Asp Asn Val		
500	505	510
Tyr Asn Pro Ala Ala Ile Ala Val Asp Trp Val Tyr Lys Thr Ile Tyr		
515	520	525
Trp Thr Asp Ala Ala Ser Lys Thr Ile Ser Val Ala Thr Leu Asp Gly		
530	535	540
Thr Lys Arg Lys Phe Leu Phe Asn Ser Asp Leu Arg Glu Pro Ala Ser		
545	550	555
Ile Ala Val Asp Pro Leu Ser Gly Phe Val Tyr Trp Ser Asp Trp Gly		
565	570	575
Glu Pro Ala Lys Ile Glu Lys Ala Gly Met Asn Gly Phe Asp Arg Arg		
580	585	590
Pro Leu Val Thr Ala Asp Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp		
595	600	605
Leu Ile Lys Ser Arg Leu Tyr Trp Leu Asp Ser Lys Leu His Met Leu		
610	615	620
Ser Ser Val Asp Leu Asn Gly Gln Asp Arg Arg Ile Val Leu Lys Ser		
625	630	635
Leu Glu Phe Leu Ala His Pro Leu Ala Leu Thr Ile Phe Glu Asp Arg		

	645		650		655
Val Tyr Trp Ile Asp Gly Glu Asn Glu Ala Val Tyr Gly Ala Asn Lys					
	660		665		670
Phe Thr Gly Ser Glu Leu Ala Thr Leu Val Asn Asn Leu Asn Asp Ala					
	675		680		685
Gln Asp Ile Ile Val Tyr His Glu Leu Val Gln Pro Ser Gly Lys Asn					
	690		695		700
Trp Cys Glu Glu Asp Met Glu Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys Leu					
705		710		715	720
Pro Ala Pro Gln Ile Asn Asp His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ser Cys					
	725		730		735
Pro Ser Gly Tyr Asn Val Glu Glu Asn Gly Arg Asp Cys Gln Arg Ile					
	740		745		750
Asn Val Thr Thr Ala Val Ser Glu Val Ser Val Pro Pro Lys Gly Thr					
	755		760		765
Ser Ala Ala Trp Ala Ile Leu Pro Leu Leu Leu Leu Val Met Ala Ala					
	770		775		780
Val Gly Gly Tyr Leu Met Trp Arg Asn Trp Gln His Lys Asn Met Lys					
785		790		795	800
Ser Met Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Leu Lys Thr Thr Glu Glu Asp					
	805		810		815
Leu Ser Ile Asp Ile Gly Arg His Ser Ala Ser Val Gly His Thr Tyr					
	820		825		830
Pro Ala Ile Ser Val Val Ser Thr Asp Asp Asp Leu Ala					
	835		840		845
<210> 113					
<211> 902					
<212> PRT					
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)					
<220>					
<223> GRIA4异型体1					
<400> 113					
Met Arg Ile Ile Ser Arg Gln Ile Val Leu Leu Phe Ser Gly Phe Trp					
1	5		10		15
Gly Leu Ala Met Gly Ala Phe Pro Ser Ser Val Gln Ile Gly Gly Leu					
	20		25		30
Phe Ile Arg Asn Thr Asp Gln Glu Tyr Thr Ala Phe Arg Leu Ala Ile					
	35		40		45
Phe Leu His Asn Thr Ser Pro Asn Ala Ser Glu Ala Pro Phe Asn Leu					

50	55	60
Val Pro His Val Asp Asn Ile Glu Thr Ala Asn Ser Phe Ala Val Thr		
65	70	75
Asn Ala Phe Cys Ser Gln Tyr Ser Arg Gly Val Phe Ala Ile Phe Gly		80
	85	90
Leu Tyr Asp Lys Arg Ser Val His Thr Leu Thr Ser Phe Cys Ser Ala		95
	100	105
Leu His Ile Ser Leu Ile Thr Pro Ser Phe Pro Thr Glu Gly Glu Ser		110
	115	120
Gln Phe Val Leu Gln Leu Arg Pro Ser Leu Arg Gly Ala Leu Leu Ser		125
	130	135
Leu Leu Asp His Tyr Glu Trp Asn Cys Phe Val Phe Leu Tyr Asp Thr		140
145	150	155
Asp Arg Gly Tyr Ser Ile Leu Gln Ala Ile Met Glu Lys Ala Gly Gln		160
	165	170
Asn Gly Trp His Val Ser Ala Ile Cys Val Glu Asn Phe Asn Asp Val		175
	180	185
Ser Tyr Arg Gln Leu Leu Glu Glu Leu Asp Arg Arg Gln Glu Lys Lys		190
	195	200
Phe Val Ile Asp Cys Glu Ile Glu Arg Leu Gln Asn Ile Leu Glu Gln		205
	210	215
Ile Val Ser Val Gly Lys His Val Lys Gly Tyr His Tyr Ile Ile Ala		220
225	230	235
Asn Leu Gly Phe Lys Asp Ile Ser Leu Glu Arg Phe Ile His Gly Gly		240
	245	250
Ala Asn Val Thr Gly Phe Gln Leu Val Asp Phe Asn Thr Pro Met Val		255
	260	265
Ile Lys Leu Met Asp Arg Trp Lys Lys Leu Asp Gln Arg Glu Tyr Pro		270
	275	280
Gly Ser Glu Thr Pro Pro Lys Tyr Thr Ser Ala Leu Thr Tyr Asp Gly		285
	290	295
Val Leu Val Met Ala Glu Thr Phe Arg Ser Leu Arg Arg Gln Lys Ile		300
305	310	315
Asp Ile Ser Arg Arg Gly Asn Ala Gly Asp Cys Leu Ala Asn Pro Ala		320
	325	330
Ala Pro Trp Gly Gln Gly Ile Asp Met Glu Arg Thr Leu Lys Gln Val		335
	340	345
Arg Ile Gln Gly Leu Thr Gly Asn Val Gln Phe Asp His Tyr Gly Arg		350
	355	360
		365

Arg	Val	Asn	Tyr	Thr	Met	Asp	Val	Phe	Glu	Leu	Lys	Ser	Thr	Gly	Pro	
370						375					380					
Arg	Lys	Val	Gly	Tyr	Trp	Asn	Asp	Met	Asp	Lys	Leu	Val	Leu	Ile	Gln	
385					390					395					400	
Asp	Val	Pro	Thr	Leu	Gly	Asn	Asp	Thr	Ala	Ala	Ile	Glu	Asn	Arg	Thr	
			405						410					415		
Val	Val	Val	Thr	Thr	Ile	Met	Glu	Ser	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Lys	Lys	
			420						425					430		
Asn	His	Glu	Met	Phe	Glu	Gly	Asn	Asp	Lys	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Cys	Val	
		435					440						445			
Asp	Leu	Ala	Ser	Glu	Ile	Ala	Lys	His	Ile	Gly	Ile	Lys	Tyr	Lys	Ile	
450						455							460			
Ala	Ile	Val	Pro	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ala	Arg	Asp	Ala	Asp	Thr	Lys	
465					470					475					480	
Ile	Trp	Asn	Gly	Met	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Tyr	Gly	Lys	Ala	Glu	Ile	
			485						490					495		
Ala	Ile	Ala	Pro	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Val	Ile	Asp	
			500						505					510		
Phe	Ser	Lys	Pro	Phe	Met	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Ile	Met	Ile	Lys	Lys	
		515					520						525			
Pro	Gln	Lys	Ser	Lys	Pro	Gly	Val	Phe	Ser	Phe	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	
530						535							540			
Tyr	Glu	Ile	Trp	Met	Cys	Ile	Val	Phe	Ala	Tyr	Ile	Gly	Val	Ser	Val	
545					550					555					560	
Val	Leu	Phe	Leu	Val	Ser	Arg	Phe	Ser	Pro	Tyr	Glu	Trp	His	Thr	Glu	
			565						570					575		
Glu	Pro	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Ser	Asp	Gln	Pro	Pro	Asn	Glu	
			580						585					590		
Phe	Gly	Ile	Phe	Asn	Ser	Leu	Trp	Phe	Ser	Leu	Gly	Ala	Phe	Met	Gln	
		595					600						605			
Gln	Gly	Cys	Asp	Ile	Ser	Pro	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	
610						615							620			
Gly	Val	Trp	Trp	Phe	Phe	Thr	Leu	Ile	Ile	Ile	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ala	
625					630					635					640	
Asn	Leu	Ala	Ala	Phe	Leu	Thr	Val	Glu	Arg	Met	Val	Ser	Pro	Ile	Glu	
			645						650					655		
Ser	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Lys	Gln	Thr	Glu	Ile	Ala	Tyr	Gly	Thr	Leu	
		660							665					670		
Asp	Ser	Gly	Ser	Thr	Lys	Glu	Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Lys	Ile	Ala	Val	

<210> 114
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> GRIA4异型体2
 <400> 114
 Met Arg Ile Ile Ser Arg Gln Ile Val Leu Leu Phe Ser Gly Phe Trp
 1 5 10 15
 Gly Leu Ala Met Gly Ala Phe Pro Ser Ser Val Gln Ile Gly Gly Leu

			20				25				30					
Phe	Ile	Arg	Asn	Thr	Asp	Gln	Glu	Tyr	Thr	Ala	Phe	Arg	Leu	Ala	Ile	
			35				40				45					
Phe	Leu	His	Asn	Thr	Ser	Pro	Asn	Ala	Ser	Glu	Ala	Pro	Phe	Asn	Leu	
			50				55				60					
Val	Pro	His	Val	Asp	Asn	Ile	Glu	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	Ala	Val	Thr	
65							70				75				80	
Asn	Ala	Phe	Cys	Ser	Gln	Tyr	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Ala	Ile	Phe	Gly	
			85				90				95					
Leu	Tyr	Asp	Lys	Arg	Ser	Val	His	Thr	Leu	Thr	Ser	Phe	Cys	Ser	Ala	
			100				105				110					
Leu	His	Ile	Ser	Leu	Ile	Thr	Pro	Ser	Phe	Pro	Thr	Glu	Gly	Glu	Ser	
			115				120				125					
Gln	Phe	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Leu	Ser	
130							135				140					
Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Glu	Trp	Asn	Cys	Phe	Val	Phe	Leu	Tyr	Asp	Thr	
145							150				155				160	
Asp	Arg	Gly	Tyr	Ser	Ile	Leu	Gln	Ala	Ile	Met	Glu	Lys	Ala	Gly	Gln	
			165				170				175					
Asn	Gly	Trp	His	Val	Ser	Ala	Ile	Cys	Val	Glu	Asn	Phe	Asn	Asp	Val	
			180				185				190					
Ser	Tyr	Arg	Gln	Leu	Leu	Glu	Glu	Leu	Asp	Arg	Arg	Gln	Glu	Lys	Lys	
195							200				205					
Phe	Val	Ile	Asp	Cys	Glu	Ile	Glu	Arg	Leu	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Gln	
210							215				220					
Ile	Val	Ser	Val	Gly	Lys	His	Val	Lys	Gly	Tyr	His	Tyr	Ile	Ile	Ala	
225							230				235				240	
Asn	Leu	Gly	Phe	Lys	Asp	Ile	Ser	Leu	Glu	Arg	Phe	Ile	His	Gly	Gly	
			245				250				255					
Ala	Asn	Val	Thr	Gly	Phe	Gln	Leu	Val	Asp	Phe	Asn	Thr	Pro	Met	Val	
			260				265				270					
Ile	Lys	Leu	Met	Asp	Arg	Trp	Lys	Lys	Leu	Asp	Gln	Arg	Glu	Tyr	Pro	
275							280				285					
Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Pro	Lys	Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Gly	
290							295				300					
Val	Leu	Val	Met	Ala	Glu	Thr	Phe	Arg	Ser	Leu	Arg	Arg	Gln	Lys	Ile	
305							310				315				320	
Asp	Ile	Ser	Arg	Arg	Gly	Asn	Ala	Gly	Asp	Cys	Leu	Ala	Asn	Pro	Ala	
			325				330				335					

Ala	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Ile	Asp	Met	Glu	Arg	Thr	Leu	Lys	Gln	Val	
			340			345						350				
Arg	Ile	Gln	Gly	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Gln	Phe	Asp	His	Tyr	Gly	Arg	
			355			360						365				
Arg	Val	Asn	Tyr	Thr	Met	Asp	Val	Phe	Glu	Leu	Lys	Ser	Thr	Gly	Pro	
			370			375						380				
Arg	Lys	Val	Gly	Tyr	Trp	Asn	Asp	Met	Asp	Lys	Leu	Val	Leu	Ile	Gln	
385						390						395			400	
Asp	Val	Pro	Thr	Leu	Gly	Asn	Asp	Thr	Ala	Ala	Ile	Glu	Asn	Arg	Thr	
			405						410						415	
Val	Val	Val	Thr	Thr	Ile	Met	Pro	Leu	Met	Lys	Asn	Pro	Ile	Leu	Arg	
			420						425						430	

Asn

⟨210⟩ 115

<211> 271

<212> PRT

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

⟨223⟩ NXPH1

〈400〉 115

Met	Gln	Ala	Ala	Cys	Trp	Tyr	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Gln	Pro	Thr	Val
1				5					10					15	
Tyr	Leu	Val	Thr	Cys	Ala	Asn	Leu	Thr	Asn	Gly	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu
			20					25					30		
Leu	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Leu	Lys	His	Ile	Trp	Thr	Glu
		35					40					45			
Ser	Ser	Lys	Asp	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Leu	Leu	Ser	Gln	Thr	Phe	Arg
	50					55					60				
Gly	Lys	Glu	Asn	Asp	Thr	Asp	Leu	Asp	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Pro	Glu
65					70					75					80
Pro	Tyr	Ser	Glu	Gln	Asp	Leu	Trp	Asp	Trp	Leu	Arg	Asn	Ser	Thr	Asp
				85					90					95	
Leu	Gln	Glu	Pro	Arg	Pro	Arg	Ala	Lys	Arg	Arg	Pro	Ile	Val	Lys	Thr
			100					105					110		
Gly	Lys	Phe	Lys	Lys	Met	Phe	Gly	Trp	Gly	Asp	Phe	His	Ser	Asn	Ile
		115					120					125			
Lys	Thr	Val	Lys	Leu	Asn	Leu	Leu	Ile	Thr	Gly	Lys	Ile	Val	Asp	His
	130					135					140				
Gly	Asn	Gly	Thr	Phe	Ser	Val	Tyr	Phe	Arg	His	Asn	Ser	Thr	Gly	Gln

145	150	155	160
Gly Asn Val Ser Val Ser Leu Val Pro Pro Thr Lys Ile Val Glu Phe			
	165	170	175
Asp Leu Ala Gln Gln Thr Val Ile Asp Ala Lys Asp Ser Lys Ser Phe			
	180	185	190
Asn Cys Arg Ile Glu Tyr Glu Lys Val Asp Lys Ala Thr Lys Asn Thr			
	195	200	205
Leu Cys Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Thr Cys Tyr Gln Glu Gln Thr Gln			
	210	215	220
Ser His Val Ser Trp Leu Cys Ser Lys Pro Phe Lys Val Ile Cys Ile			
225	230	235	240
Tyr Ile Ser Phe Tyr Ser Thr Asp Tyr Lys Leu Val Gln Lys Val Cys			
	245	250	255
Pro Asp Tyr Asn Tyr His Ser Asp Thr Pro Tyr Phe Pro Ser Gly			
	260	265	270
<210> 116			
<211> 724			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<220>			
<223> PSD-95异型体1			
<400> 116			
Met Asp Cys Leu Cys Ile Val Thr Thr Lys Lys Tyr Arg Tyr Gln Asp			
1	5	10	15
Glu Asp Thr Pro Pro Leu Glu His Ser Pro Ala His Leu Pro Asn Gln			
	20	25	30
Ala Asn Ser Pro Pro Val Ile Val Asn Thr Asp Thr Leu Glu Ala Pro			
	35	40	45
Gly Tyr Glu Leu Gln Val Asn Gly Thr Glu Gly Glu Met Glu Tyr Glu			
	50	55	60
Glu Ile Thr Leu Glu Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala			
65	70	75	80
Gly Gly Thr Asp Asn Pro His Ile Gly Asp Asp Pro Ser Ile Phe Ile			
	85	90	95
Thr Lys Ile Ile Pro Gly Gly Ala Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Arg			
	100	105	110
Val Asn Asp Ser Ile Leu Phe Val Asn Glu Val Asp Val Arg Glu Val			
	115	120	125
Thr His Ser Ala Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Ile Val			

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

Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Phe	Arg	Phe	Gly	Asp	Val	Leu	His	Val	Ile	Asp
450						455					460				
Ala	Ser	Asp	Glu	Glu	Trp	Trp	Gln	Ala	Arg	Arg	Val	His	Ser	Asp	Ser
465					470					475				480	
Glu	Thr	Asp	Asp	Ile	Gly	Phe	Ile	Pro	Ser	Lys	Arg	Arg	Val	Glu	Arg
				485					490					495	
Arg	Glu	Trp	Ser	Arg	Leu	Lys	Ala	Lys	Asp	Trp	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly
			500					505					510		
Ser	Gln	Gly	Arg	Glu	Asp	Ser	Val	Leu	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Thr	Gln
		515					520						525		
Met	Glu	Val	His	Tyr	Ala	Arg	Pro	Ile	Ile	Ile	Leu	Gly	Pro	Thr	Lys
		530				535						540			
Asp	Arg	Ala	Asn	Asp	Asp	Leu	Leu	Ser	Glu	Phe	Pro	Asp	Lys	Phe	Gly
545					550					555				560	
Ser	Cys	Val	Pro	His	Thr	Thr	Arg	Pro	Lys	Arg	Glu	Tyr	Glu	Ile	Asp
				565					570					575	
Gly	Arg	Asp	Tyr	His	Phe	Val	Ser	Ser	Arg	Glu	Lys	Met	Glu	Lys	Asp
			580						585					590	
Ile	Gln	Ala	His	Lys	Phe	Ile	Glu	Ala	Gly	Gln	Tyr	Asn	Ser	His	Leu
		595					600							605	
Tyr	Gly	Thr	Ser	Val	Gln	Ser	Val	Arg	Glu	Val	Ala	Glu	Gln	Gly	Lys
	610					615					620				
His	Cys	Ile	Leu	Asp	Val	Ser	Ala	Asn	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Gln	Ala
625					630					635				640	
Ala	His	Leu	His	Pro	Ile	Ala	Ile	Phe	Ile	Arg	Pro	Arg	Ser	Leu	Glu
				645					650					655	
Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Asn	Lys	Arg	Ile	Thr	Glu	Glu	Gln	Ala	Arg	Lys
		660						665					670		
Ala	Phe	Asp	Arg	Ala	Thr	Lys	Leu	Glu	Gln	Glu	Phe	Thr	Glu	Cys	Phe
		675					680					685			
Ser	Ala	Ile	Val	Glu	Gly	Asp	Ser	Phe	Glu	Glu	Ile	Tyr	His	Lys	Val
		690				695						700			
Lys	Arg	Val	Ile	Glu	Asp	Leu	Ser	Gly	Pro	Tyr	Ile	Trp	Val	Pro	Ala
705					710					715				720	
Arg	Glu	Arg	Leu												
<210>	117														
<211>	767														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														

<220>

<223> PSD-95异型体2

<400> 117

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

Pro Ser Asn Ala Tyr Leu Ser Asp Ser Tyr Ala Pro Pro Asp Ile Thr		
290	295	300
Thr Ser Tyr Ser Gln His Leu Asp Asn Glu Ile Ser His Ser Ser Tyr		
305	310	315 320
Leu Gly Thr Asp Tyr Pro Thr Ala Met Thr Pro Thr Ser Pro Arg Arg		
	325	330 335
Tyr Ser Pro Val Ala Lys Asp Leu Leu Gly Glu Glu Asp Ile Pro Arg		
	340	345 350
Glu Pro Arg Arg Ile Val Ile His Arg Gly Ser Thr Gly Leu Gly Phe		
	355	360 365
Asn Ile Val Gly Gly Glu Asp Gly Glu Gly Ile Phe Ile Ser Phe Ile		
	370	375 380
Leu Ala Gly Gly Pro Ala Asp Leu Ser Gly Glu Leu Arg Lys Gly Asp		
385	390	395 400
Gln Ile Leu Ser Val Asn Gly Val Asp Leu Arg Asn Ala Ser His Glu		
	405	410 415
Gln Ala Ala Ile Ala Leu Lys Asn Ala Gly Gln Thr Val Thr Ile Ile		
	420	425 430
Ala Gln Tyr Lys Pro Glu Glu Tyr Ser Arg Phe Glu Ala Lys Ile His		
	435	440 445
Asp Leu Arg Glu Gln Leu Met Asn Ser Ser Leu Gly Ser Gly Thr Ala		
450	455	460
Ser Leu Arg Ser Asn Pro Lys Arg Gly Phe Tyr Ile Arg Ala Leu Phe		
465	470	475 480
Asp Tyr Asp Lys Thr Lys Asp Cys Gly Phe Leu Ser Gln Ala Leu Ser		
	485	490 495
Phe Arg Phe Gly Asp Val Leu His Val Ile Asp Ala Ser Asp Glu Glu		
	500	505 510
Trp Trp Gln Ala Arg Arg Val His Ser Asp Ser Glu Thr Asp Asp Ile		
	515	520 525
Gly Phe Ile Pro Ser Lys Arg Arg Val Glu Arg Arg Glu Trp Ser Arg		
	530	535 540
Leu Lys Ala Lys Asp Trp Gly Ser Ser Ser Gly Ser Gln Gly Arg Glu		
545	550	555 560
Asp Ser Val Leu Ser Tyr Glu Thr Val Thr Gln Met Glu Val His Tyr		
	565	570 575
Ala Arg Pro Ile Ile Ile Leu Gly Pro Thr Lys Asp Arg Ala Asn Asp		
	580	585 590
Asp Leu Leu Ser Glu Phe Pro Asp Lys Phe Gly Ser Cys Val Pro His		

	85		90		95
Ile Pro Gly Gly Ala Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Arg Val Asn Asp					
100		105		110	
Ser Ile Leu Phe Val Asn Glu Val Asp Val Arg Glu Val Thr His Ser					
115		120		125	
Ala Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Ile Val Arg Leu Tyr					
130		135		140	
Val Met Arg Arg Lys Pro Pro Ala Glu Lys Val Met Glu Ile Lys Leu					
145		150		155	
Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly Val Gly					
165		170		175	
Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val Thr Lys Ile Ile					
180		185		190	
Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Arg Leu Gln Ile Gly Asp Lys					
195		200		205	
Ile Leu Ala Val Asn Ser Val Gly Leu Glu Asp Val Met His Glu Asp					
210		215		220	
Ala Val Ala Ala Leu Lys Asn Thr Tyr Asp Val Val Tyr Leu Lys Val					
225		230		235	
Ala Lys Pro Ser Asn Ala Tyr Leu Ser Asp Ser Tyr Ala Pro Pro Asp					
245		250		255	
Ile Thr Thr Ser Tyr Ser Gln His Leu Asp Asn Glu Ile Ser His Ser					
260		265		270	
Ser Tyr Leu Gly Thr Asp Tyr Pro Thr Ala Met Thr Pro Thr Ser Pro					
275		280		285	
Arg Arg Tyr Ser Pro Val Ala Lys Asp Leu Leu Gly Glu Glu Asp Ile					
290		295		300	
Pro Arg Glu Pro Arg Arg Ile Val Ile His Arg Gly Ser Thr Gly Leu					
305		310		315	
Gly Phe Asn Ile Val Gly Gly Glu Asp Gly Glu Gly Ile Phe Ile Ser					
325		330		335	
Phe Ile Leu Ala Gly Gly Pro Ala Asp Leu Ser Gly Glu Leu Arg Lys					
340		345		350	
Gly Asp Gln Ile Leu Ser Val Asn Gly Val Asp Leu Arg Asn Ala Ser					
355		360		365	
His Glu Gln Ala Ala Ile Ala Leu Lys Asn Ala Gly Gln Thr Val Thr					
370		375		380	
Ile Ile Ala Gln Tyr Lys Pro Glu Glu Tyr Ser Arg Phe Glu Ala Lys					
385		390		395	
				400	

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

705	710	715	720
<210> 119			
<211> 313			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 突触素异型体1			
<400> 119			
Met Leu Leu Leu Ala Asp Met Asp Val Val Asn Gln Leu Val Ala Gly			
1	5	10	15
Gly Gln Phe Arg Val Val Lys Glu Pro Leu Gly Phe Val Lys Val Leu			
	20	25	30
Gln Trp Val Phe Ala Ile Phe Ala Phe Ala Thr Cys Gly Ser Tyr Ser			
	35	40	45
Gly Glu Leu Gln Leu Ser Val Asp Cys Ala Asn Lys Thr Glu Ser Asp			
	50	55	60
Leu Ser Ile Glu Val Glu Phe Glu Tyr Pro Phe Arg Leu His Gln Val			
65	70	75	80
Tyr Phe Asp Ala Pro Thr Cys Arg Gly Gly Thr Thr Lys Val Phe Leu			
	85	90	95
Val Gly Asp Tyr Ser Ser Ser Ala Glu Phe Phe Val Thr Val Ala Val			
	100	105	110
Phe Ala Phe Leu Tyr Ser Met Gly Ala Leu Ala Thr Tyr Ile Phe Leu			
	115	120	125
Gln Asn Lys Tyr Arg Glu Asn Asn Lys Gly Pro Met Leu Asp Phe Leu			
	130	135	140
Ala Thr Ala Val Phe Ala Phe Met Trp Leu Val Ser Ser Ser Ala Trp			
145	150	155	160
Ala Lys Gly Leu Ser Asp Val Lys Met Ala Thr Asp Pro Glu Asn Ile			
	165	170	175
Ile Lys Glu Met Pro Val Cys Arg Gln Thr Gly Asn Thr Cys Lys Glu			
	180	185	190
Leu Arg Asp Pro Val Thr Ser Gly Leu Asn Thr Ser Val Val Phe Gly			
	195	200	205
Phe Leu Asn Leu Val Leu Trp Val Gly Asn Leu Trp Phe Val Phe Lys			
	210	215	220
Glu Thr Gly Trp Ala Ala Pro Phe Leu Arg Ala Pro Pro Gly Ala Pro			
225	230	235	240
Glu Lys Gln Pro Ala Pro Gly Asp Ala Tyr Gly Asp Ala Gly Tyr Gly			

	245		250		255
Gln Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro	Gln Asp Ser Tyr Gly Pro Gln Gly				
260	265		270		
Gly Tyr Gln Pro Asp Tyr Gly Gln Pro Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly					
275	280		285		
Tyr Gly Pro Gln Gly Asp Tyr Gly Gln Gln Gly Tyr Gly Pro Gln Gly					
290	295		300		
Ala Pro Thr Ser Phe Ser Asn Gln Met					
305	310				
<210> 120					
<211> 193					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> 突触素异型体2					
<400> 120					
Ala Leu Ala Thr Tyr Ile Phe Leu Gln Asn Lys Tyr Arg Glu Asn Asn					
1	5		10		15
Lys Gly Pro Met Leu Asp Phe Leu Ala Thr Ala Val Phe Ala Phe Met					
20	25		30		
Trp Leu Val Ser Ser Ser Ala Trp Ala Lys Gly Leu Ser Asp Val Lys					
35	40		45		
Met Ala Thr Asp Pro Glu Asn Ile Ile Lys Glu Met Pro Val Cys Arg					
50	55		60		
Gln Thr Gly Asn Thr Cys Lys Glu Leu Arg Asp Pro Val Thr Ser Gly					
65	70		75		80
Leu Asn Thr Ser Val Val Phe Gly Phe Leu Asn Leu Val Leu Trp Val					
85	90		95		
Gly Asn Leu Trp Phe Val Phe Lys Glu Thr Gly Trp Ala Ala Pro Phe					
100	105		110		
Leu Arg Ala Pro Pro Gly Ala Pro Glu Lys Gln Pro Ala Pro Gly Asp					
115	120		125		
Ala Tyr Gly Asp Ala Gly Tyr Gly Gln Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro					
130	135		140		
Gln Asp Ser Tyr Gly Pro Gln Gly Gly Tyr Gln Pro Asp Tyr Gly Gln					
145	150		155		160
Pro Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Gly Pro Gln Gly Asp Tyr Gly					
165	170		175		
Gln Gln Gly Tyr Gly Pro Gln Gly Ala Pro Thr Ser Phe Ser Asn Gln					

180	185	190
Met		
<210> 121		
<211> 277		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 半胱天冬酶-3		
<400> 121		
Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu		
1 5 10 15		
Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser		
20 25 30		
Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile		
35 40 45		
Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg		
50 55 60		
Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn		
65 70 75 80		
Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile		
85 90 95		
Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser		
100 105 110		
Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe		
115 120 125		
Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg		
130 135 140		
Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile		
145 150 155 160		
Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser		
165 170 175		
Gly Val Asp Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp		
180 185 190		
Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn		
195 200 205		
Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys		
210 215 220		
Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn		
225 230 235 240		

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
 245 250 255
 His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
 260 265 270
 Leu Tyr Phe Tyr His
 275

<210> 122

<211> 8873

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> pLenti-III-mir-GFP载体

<400> 122

```

ttttggattg aagccaatat gataatgagg ggggtggagtt tgtgacgtgg cgcggggcgt 60
gggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg atgttgcaag tgtggcgga 120
cacatgtaag cgacggatgt ggcaaaagt acgttttttg tgtgcgccgg tgtacacagg 180
aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgttgtagt aaatttgggc gtaaccgagt 240
aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa gtgaaatctg aataattttg 300
tgttactcat agcgcgtaat acggcagacc tcagcgctag attattgaag catttatcag 360
ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 420
gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtta actataacgg tcctaaggta 480
gcgaaaatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 540
caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtag 600
tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 660
gaattgccgc attgcagaga tattgtattt aagtgcctag ctcgatacat aaacgggtct 720
ctctgggttag accagatctg agcctgggag ctctctggct aactaggga cccactgctt 780
aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgcct caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac 840
tctggtaact agagatccct cagaccctt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc 900
gcccgaacag ggacttgaaa gcgaaaggga aaccagagga gctctctcga cgcaggactc 960
ggcttgctga agcgcgcacg gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgcaaaaa 1020
ttttgactag cggaggctag aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg 1080
ggagaattag atcgcgatgg gaaaaaattc ggttaaggcc aggggggaaag aaaaaatata 1140
aattaaaaca tatagtatgg gcaagcagg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc 1200
tgttagaaac atcagaaggc ttagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga 1260
caggatcaga agaacttaga tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc 1320
aaaggataga gataaaagac accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca 1380
aaagtaagac caccgcacag caagcccgt gatcttcaga cctggaggag gagatatgag 1440
ggacattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa aaattgaacc attaggagta 1500
gcacccacca aggcaaagag aagagtgtgt cagagagaaa aaagagcagt gggaatagga 1560

```

gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggcgcagc gtcaatgacg 1620
 ctgacggtag aggccagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa caatttgctg 1680
 agggctattg aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat caagcagctc 1740
 caggcaagaa tcctggctgt ggaaagatac ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg 1800
 ggttgctctg gaaaactcat ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat 1860
 aaatctcttg aacagatttg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag agaaattaac 1920
 aattacacaa gcttaataca ctcccttaatt gaagaatcgc aaaaccagca agaaaagaat 1980
 gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattgggt taacataaca 2040
 aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatatagtag gaggcttgggt aggtttaaga 2100
 atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc accattatcg 2160
 tttcagaccc acctcccaac cccgagggga ccgacaggc ccgaaggaat agaagaagaa 2220
 ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acgcatctcg acggtatcga 2280
 aagcttggga ttcgaaatta aaagaaaagg ggggattggg gggtacagtg caggggaaag 2340
 aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa ctacaaaaac aaattacaaa 2400
 aattcaaaat tttcgggttt ttcgaaacta gggttccgcg ttacataact tacggtaaat 2460
 ggcccgctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt 2520
 cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa 2580
 actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc 2640
 aatgacggta aatggccgcg ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct 2700
 acttggcagt acatctacgt ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt 2760
 acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctattg 2820
 acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgctgtaaca 2880
 actccgcccc attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca 2940
 gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgtgtt tttgacctcc 3000
 atagaagaac cgagtttaaa ctccctatca gtgatagaga tctccctatc agtgatagag 3060
 agctagaatc tagaggtagc gccaccatgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg 3120
 tggtgcccac cctggctcag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg 3180
 gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgacctt gaagttcatc tgcaccaccg 3240
 gcaagctgcc cgtgccctgg cccacctcg tgaccacctt gacctacggc gtgcagtgtt 3300
 tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag 3360
 gctacgtcca ggagcgcacc atctttctca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg 3420
 aggtgaagtt cgagggcgac accctgggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca 3480
 aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct 3540
 atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca 3600
 tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcccgcac actaccagca gaacaccccc atcggcgacg 3660
 gccccgtgct gctgcccgcac aaccactacc tgagcaccca gtccgccttg agcaaagacc 3720
 ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc 3780
 tcggcatgga cgagctgtac aagtgaggtt ccgatatcga attcatagct agccctgcag 3840
 gtctagactc gaggtcatac acggctctcc tctctgcggc cgcagtcgag taccatacag 3900

acgtcccaga ctacgcttga gtttaaacac gcgtggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 3960
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccagggtg tggaaagtcc 4020
 ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata 4080
 gtcccccccc taactccgcc catccccgcc ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg 4140
 ccccatggct gactaatattt ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc ggcctctgag 4200
 ctattccaga agtagtgagg aggctttttt ggaggccatg accgagtaca agcccacggt 4260
 gcgcctcgcc acccgcgacg acgtccctcg ggccgtacgc accctcgccg ccgcgttcgc 4320
 cgactacccc gccacgcgcc acaccgtgga cccggaccgc cacatcgagc gggtcaccga 4380
 gctgcaagaa ctcttcctca cgcgcgtcgg gctcgacatc ggcaagggtg gggtcgcgga 4440
 cgacggcgcc gcggtggcgg tctggaccac gccggagagc gtcgaagcgg gggcggtgtt 4500
 cgccgagatc ggcccgcgca tggccgagtt gagcggttcc cggctggccg cgcagcaaca 4560
 gatggaaggg ctcttggcgc cgcaccggcc caaggagccc gcgtggttcc tggccaccgt 4620
 cggcgtctcg cccgaccacc agggcaaggg tctgggcagc gccgtcgtgc tccccggagt 4680
 ggaggcggcc gagcgcgccg gggtgccccg ctctctggag acctccgcgc cccgcaacct 4740
 ccccttctac gagcggctcg gcttcaccgt caccgccgac gtcgaggtgc ccgaaggacc 4800
 gcgcacctgg tgcattgacc gcaagcccgg tgcctgaacg cgttccgga atcaacctct 4860
 ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc cttttacgct 4920
 atgtggatac gctgctttaa tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgta tggctttcat 4980
 tttctctccc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagttgt ggcccgttgt 5040
 caggcaacgt ggctggtgt gcaactgtgt tgctgacga acccccactg gttggggcat 5100
 tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac tttcgtttc cccctcccta ttgccacggc 5160
 ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgtg ctggacaggg gctcggctgt tgggactga 5220
 caattccgtg gtgtgtcgg ggaagctgac gtcctttcca tggctgctcg cctgtgttgc 5280
 cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca atccagcgga 5340
 ccttccttcc cgcgccctgc tgccggctct gcggcctctt ccgctctcg ccttcgccct 5400
 cagacgagtc ggatctccct ttgggcccgc tccccgctg tccgatgga agggctaatt 5460
 cactcccaac gaatacaaga tctgctttt gcttgactg ggtctctctg gtagaccag 5520
 atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac tgcttaagcc tcaataaagc 5580
 ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg taactagaga 5640
 tccctcagac ccttttagtc agtgtgaaa attctagcag tagtagttca tgtcatctta 5700
 ttattcagta ttataactt gcaaagaaat gaatatcaga gagtgagagg aacttgttta 5760
 ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 5820
 ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct 5880
 ggcatctatg tcgggtgcgg agaaagaggt aatgaaatgg cattatgggt attatgggtc 5940
 tgcattaatg aatcggccaa cgatccccgt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa 6000
 aataccgcat caggcgtct tccgttccct cgctcactga ctcgctgcgc tcggctgttc 6060
 ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 6120
 gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 6180
 aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 6240

gacgctcaag tcagagggtgg cgaaacccga caggactata aagataaccag gcgtttcccc 6300
ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgtcc gcttaccgga tacctgtccg 6360
cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt 6420
cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagccccgacc 6480
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc 6540
cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 6600
agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtatth ggtatctgcg 6660
ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa 6720
ccaccgtgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag 6780
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact 6840
cacgttaagg gattttggct atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa 6900
attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt 6960
accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag 7020
ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca 7080
gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc 7140
agccagccgg aagggccgag cgcagaagt gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt 7200
ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg 7260
ttgttgaaaa aggatcttca cctagatcct tttcacgtag aaagccagtc cgcagaaacg 7320
gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc 7380
aaagagaaaag caggtagctt gcagtgggct tacatggcga tagctagact gggcggtttt 7440
atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctggttaagg ttgggaagcc 7500
ctgcaaagta aactggatgg ctttctcgcc gccaaaggat tgatggcgca ggggatcaag 7560
ctctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc 7620
aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat 7680
cggctgctct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgag gggcgcccgg ttctttttgt 7740
caagaccgac ctgtccgggt ccctgaatga actgcaagac gaggcagcgc ggctatcgtg 7800
gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag 7860
ggactggctg ctattgggag aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc 7920
tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc 7980
tacctgcca ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcgatgga 8040
agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga 8100
actgttcgcc aggtcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacctatgg 8160
cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg 8220
tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc 8280
tgaagagctt ggccggcaat gggctgaccg cttctcgtg ctttacggtg tcgccgtcc 8340
cgattcgcag cgcacgcct tctatcgctt tcttgacgag ttcttctgaa ttttgtaaa 8400
atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggaac atcccttata 8460
aatcaaaaga atagaccgcg atagggttga gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac 8520
tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc 8580

cactacgtga accatcaccc aaatcaagtt ttttgcggtc gagtgccgt aaagctctaa 8640
atcggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg 8700
cgagaaagga aggggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg 8760
tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgcgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtccat 8820
tcgccattca ggatcgaatt aattcttaat taacatcatc aataatatac ctt 8873

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)

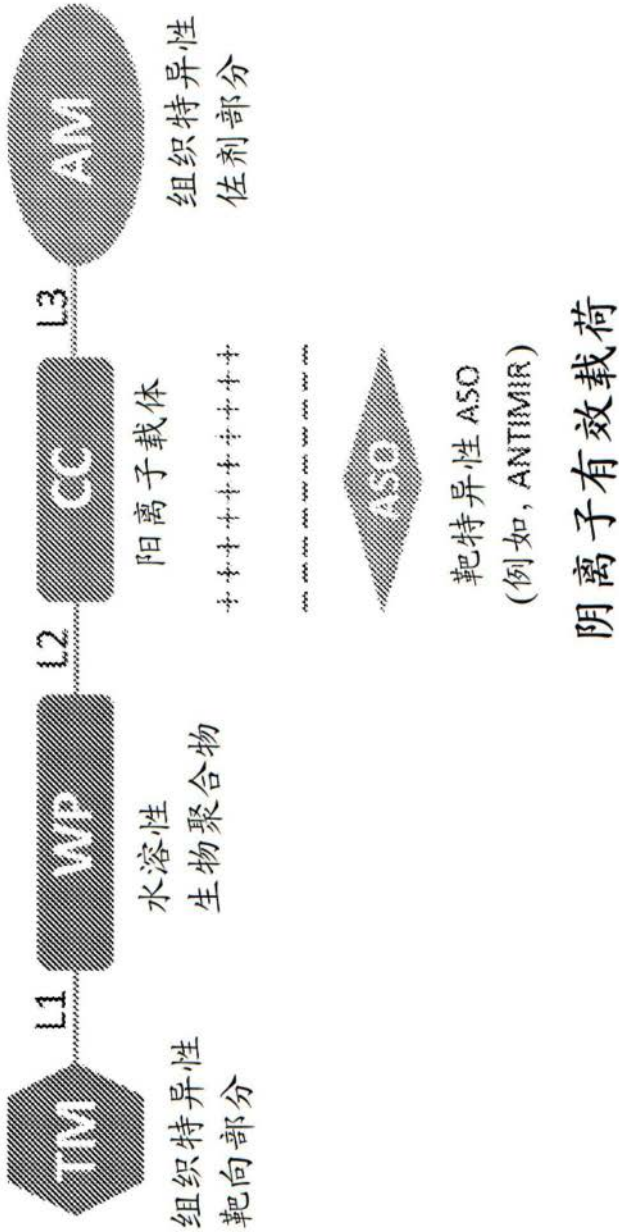


图1

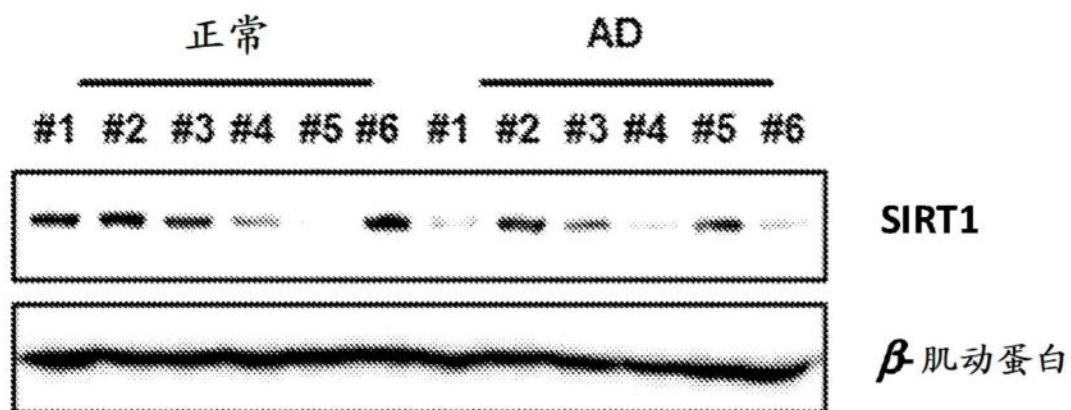


图2A

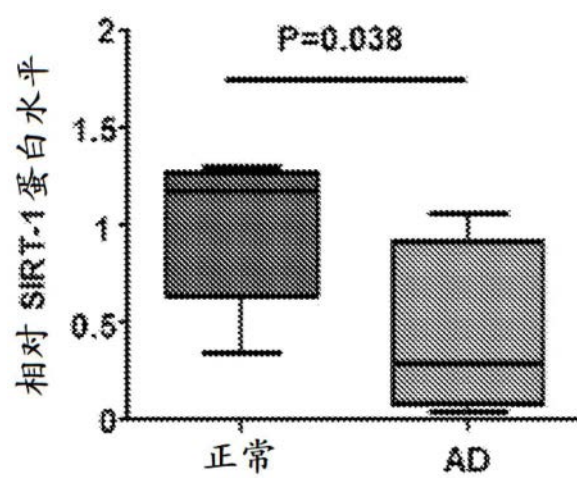


图2B

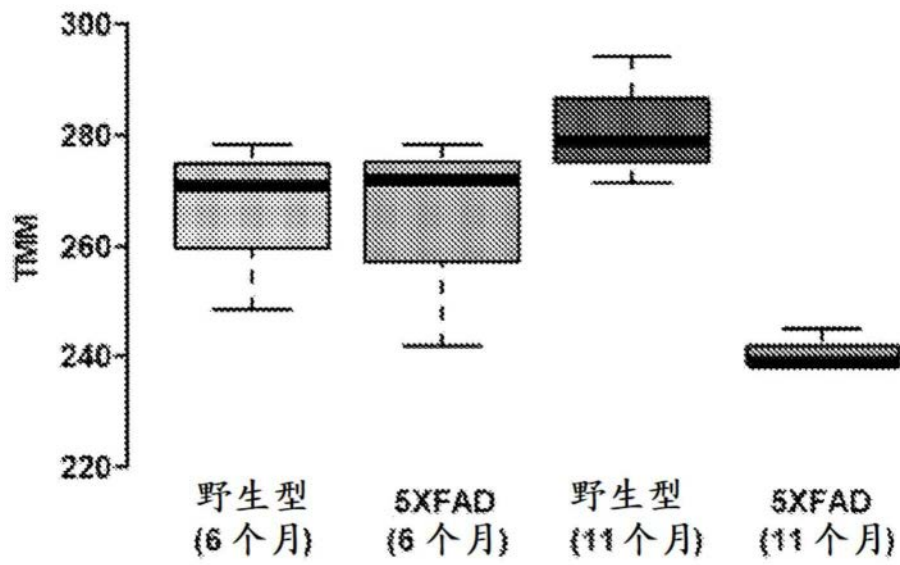


图2C

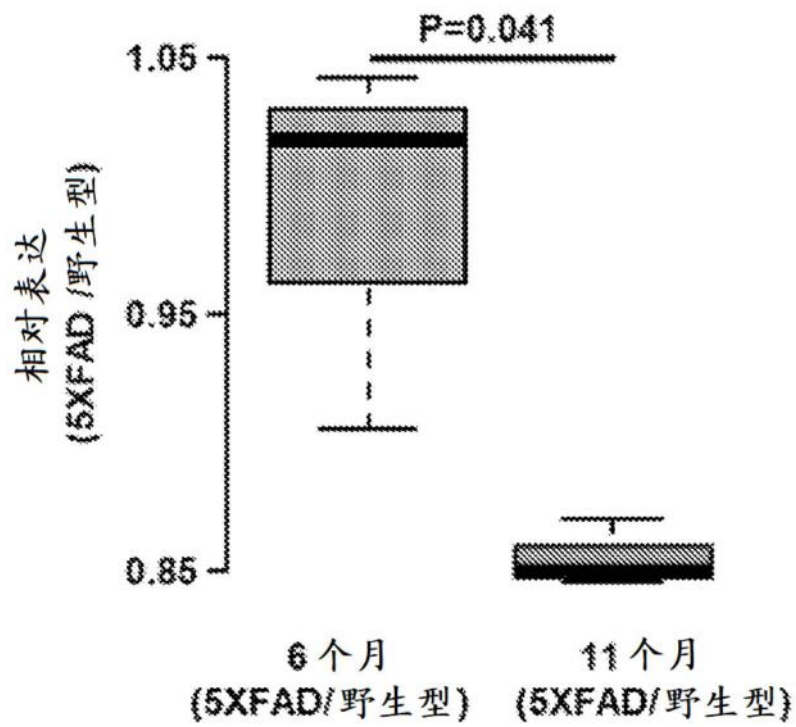


图2D

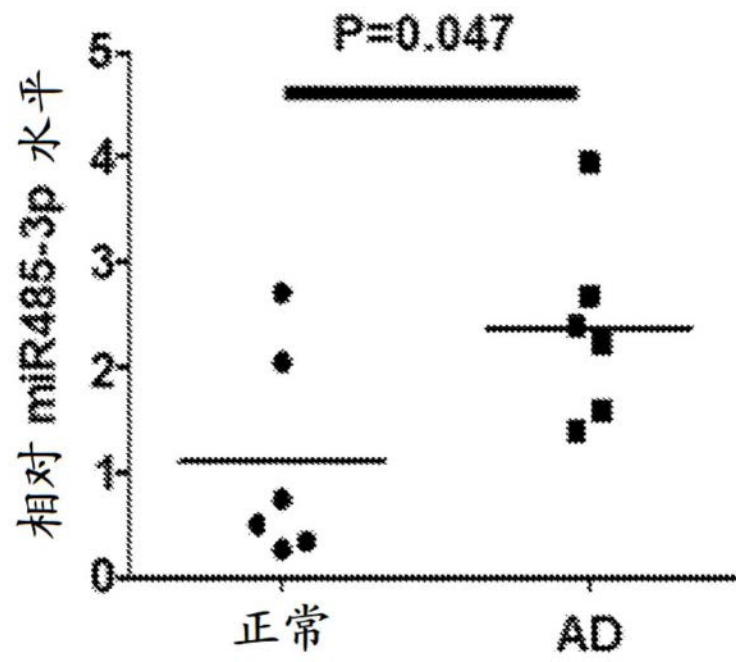


图3A

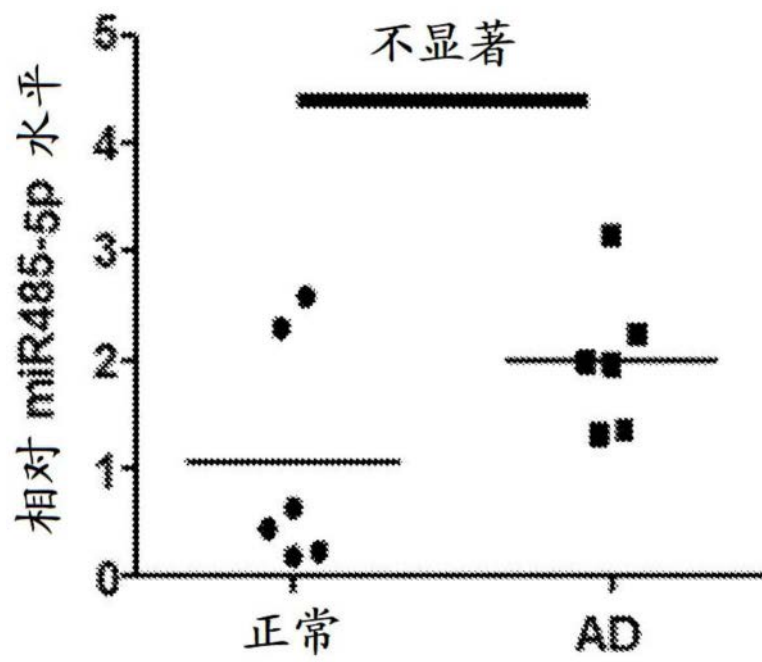


图3B

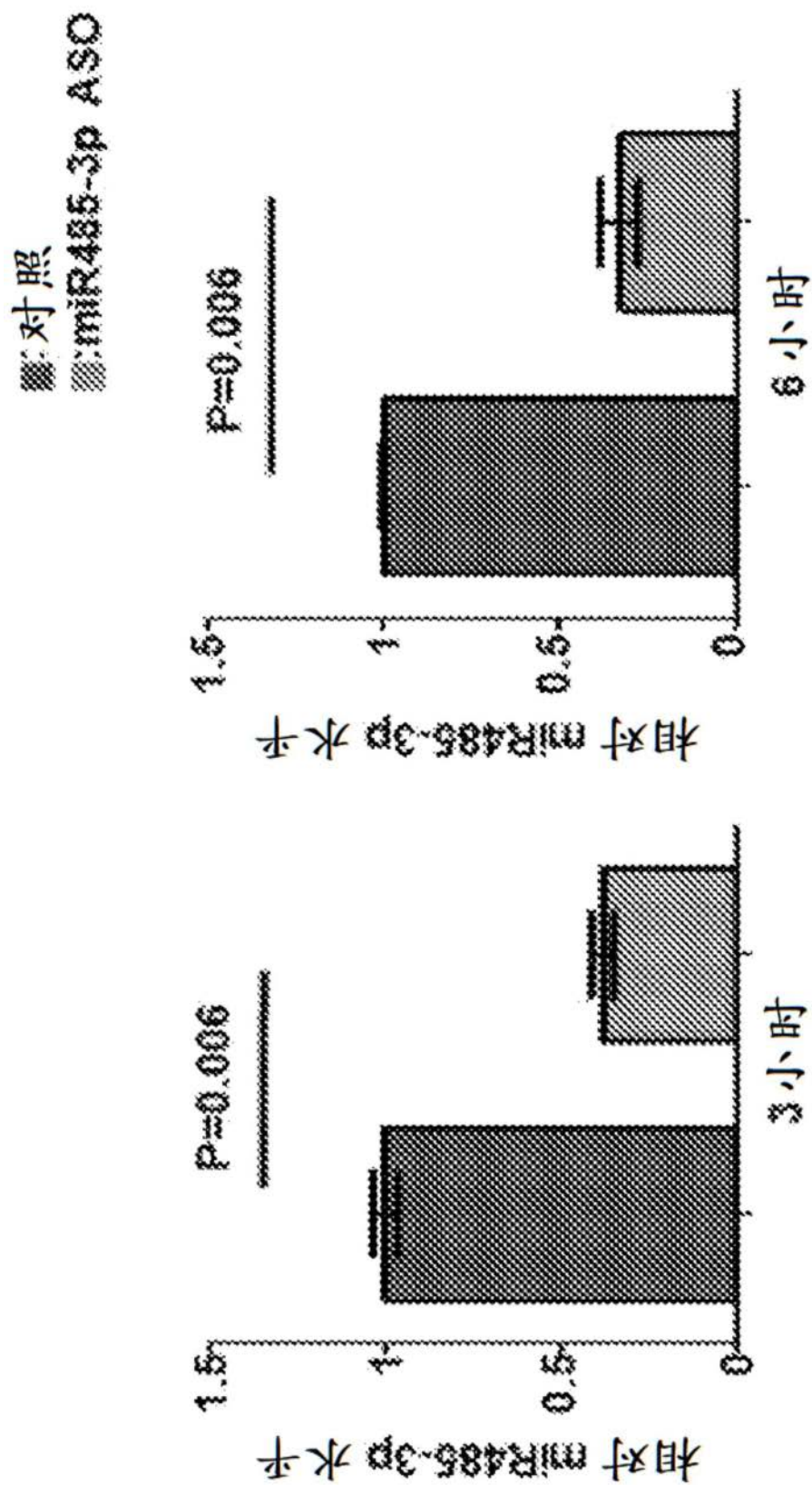


图4

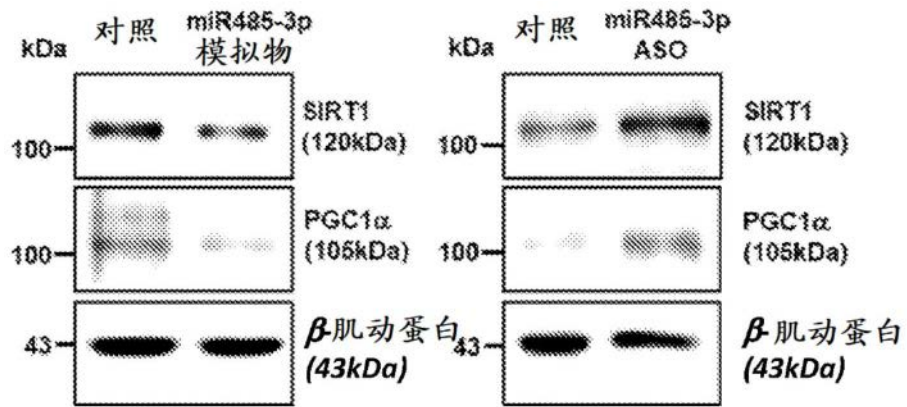


图5A

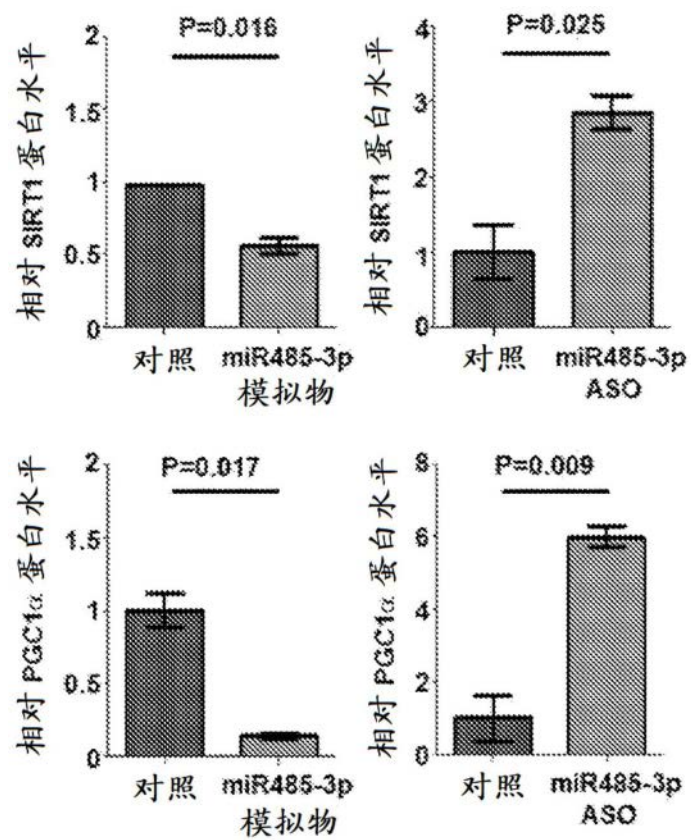


图5B

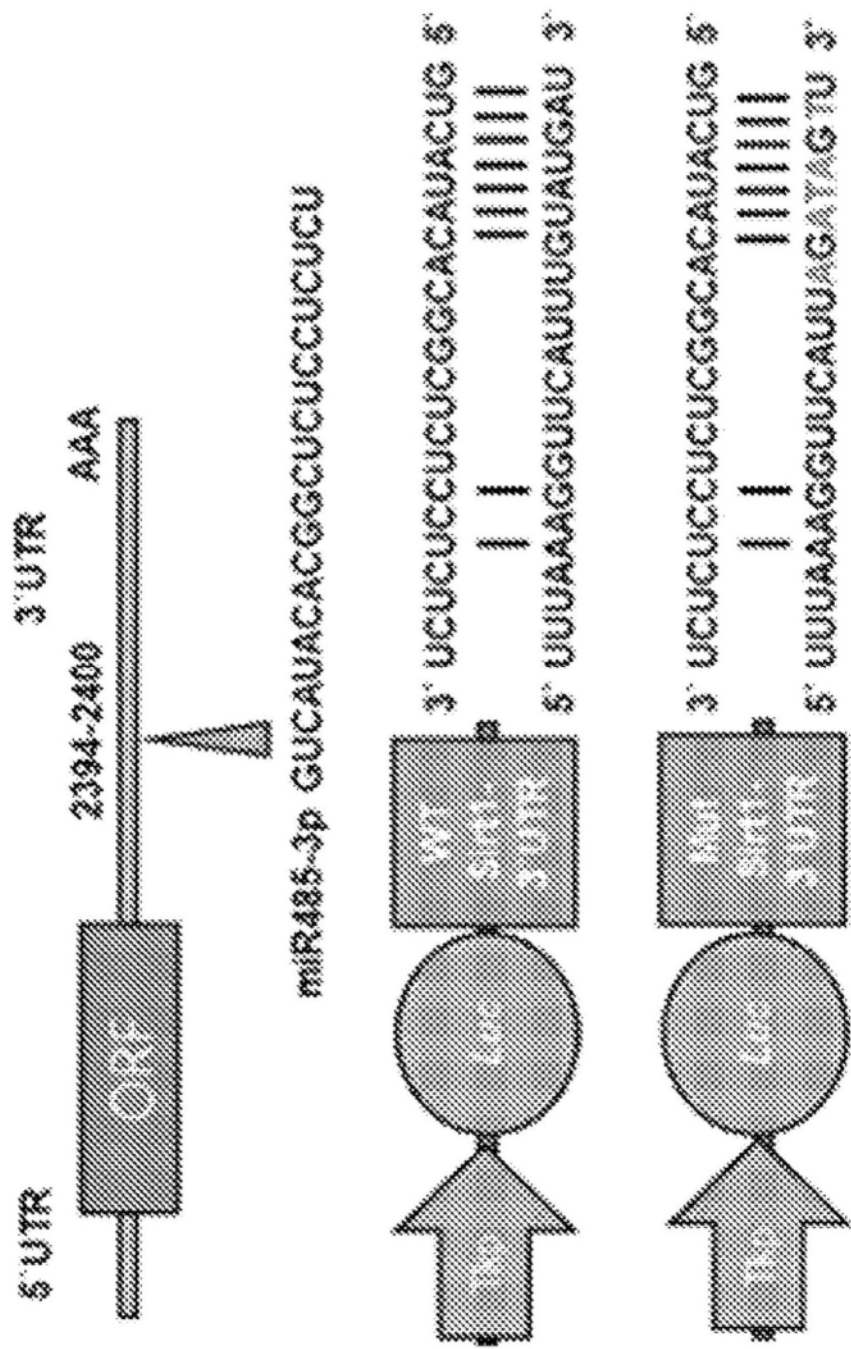


图6A

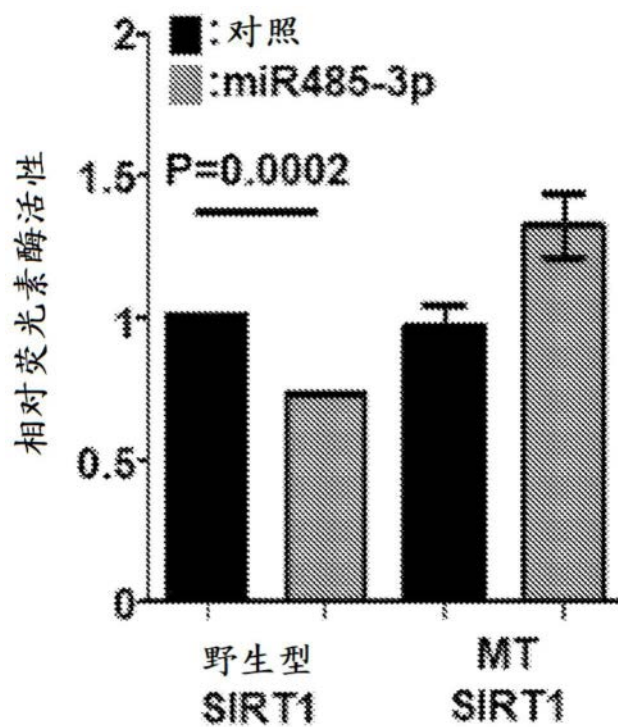


图6B

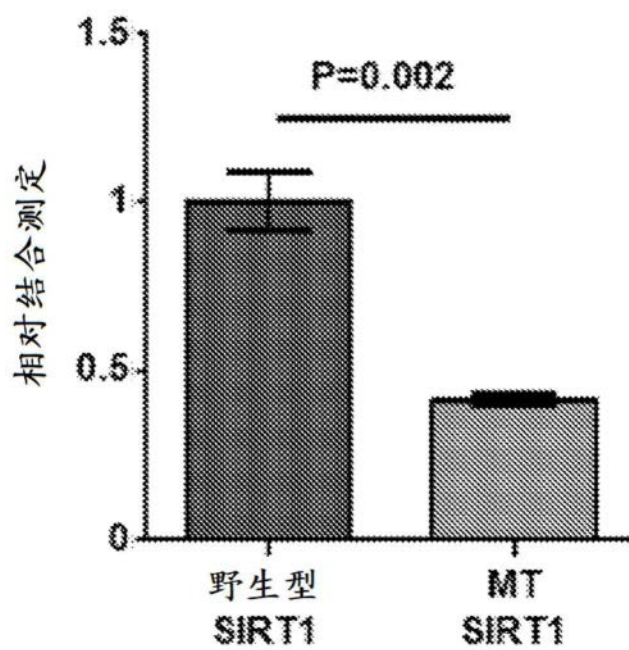


图6C

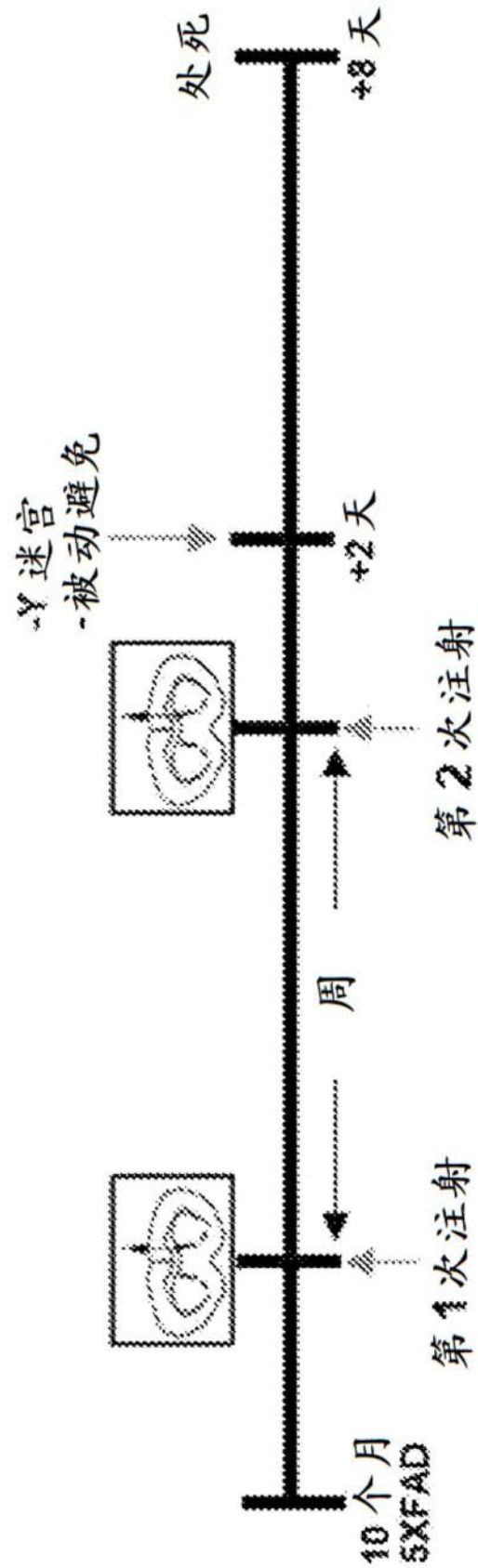


图7A

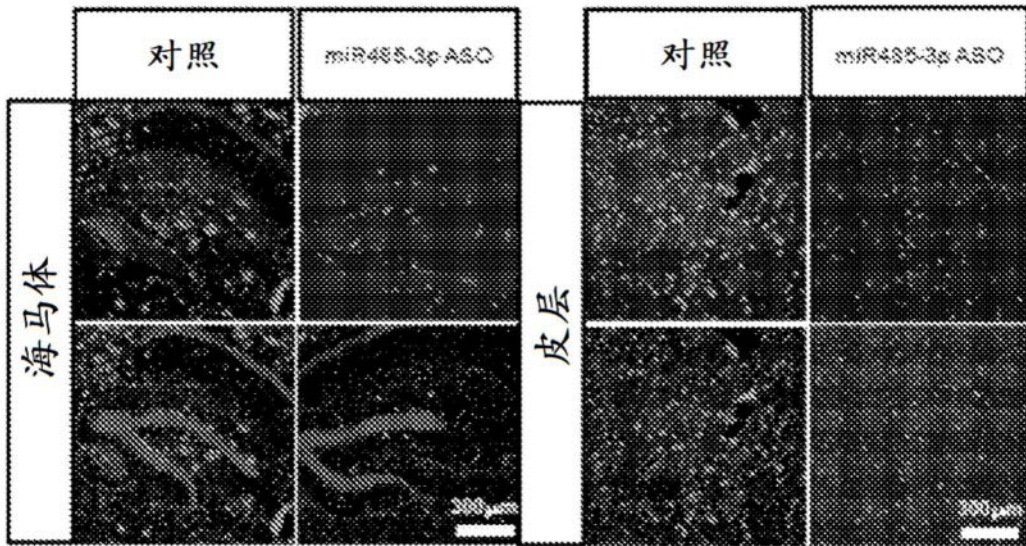


图7B

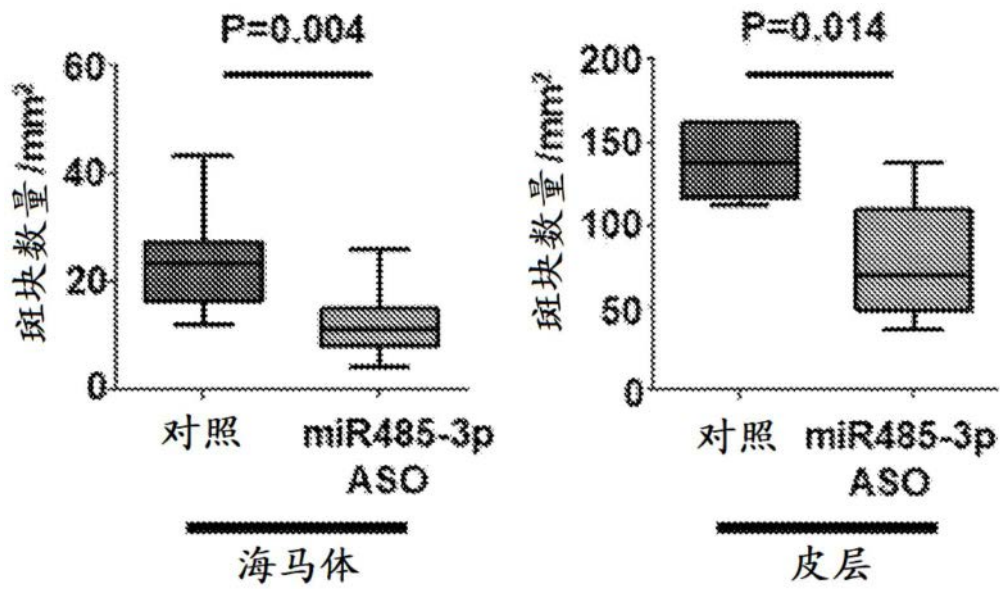


图7C

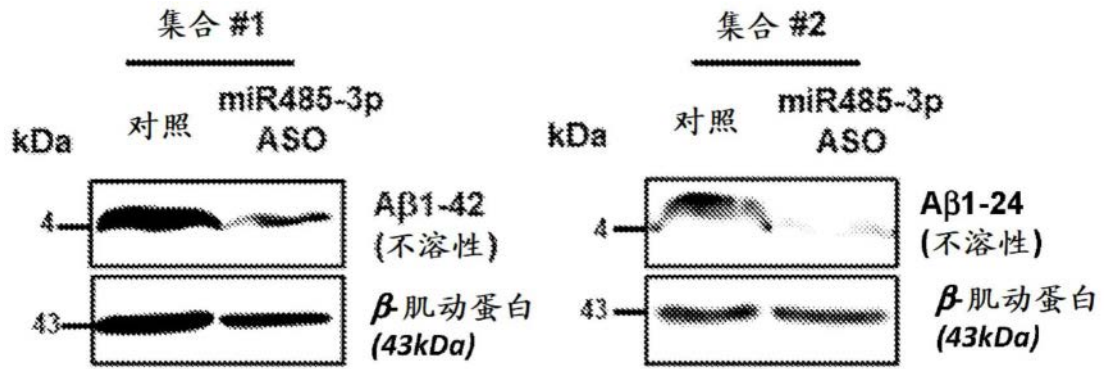


图7D

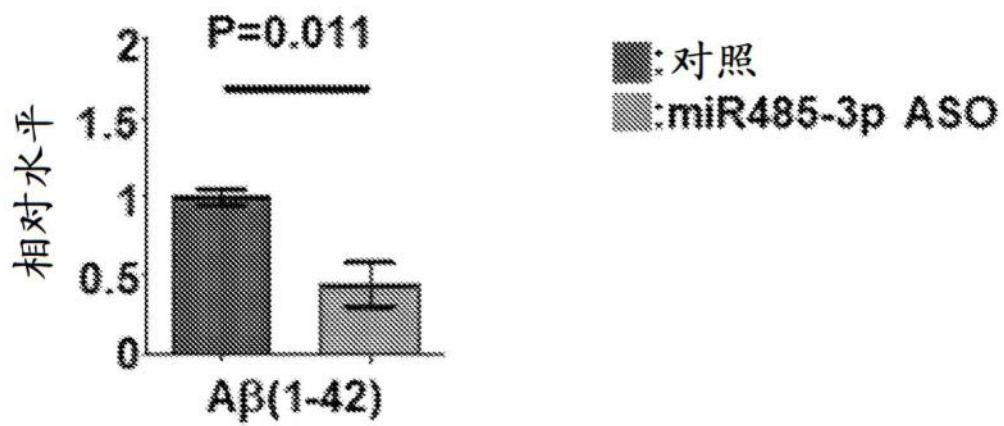


图7E

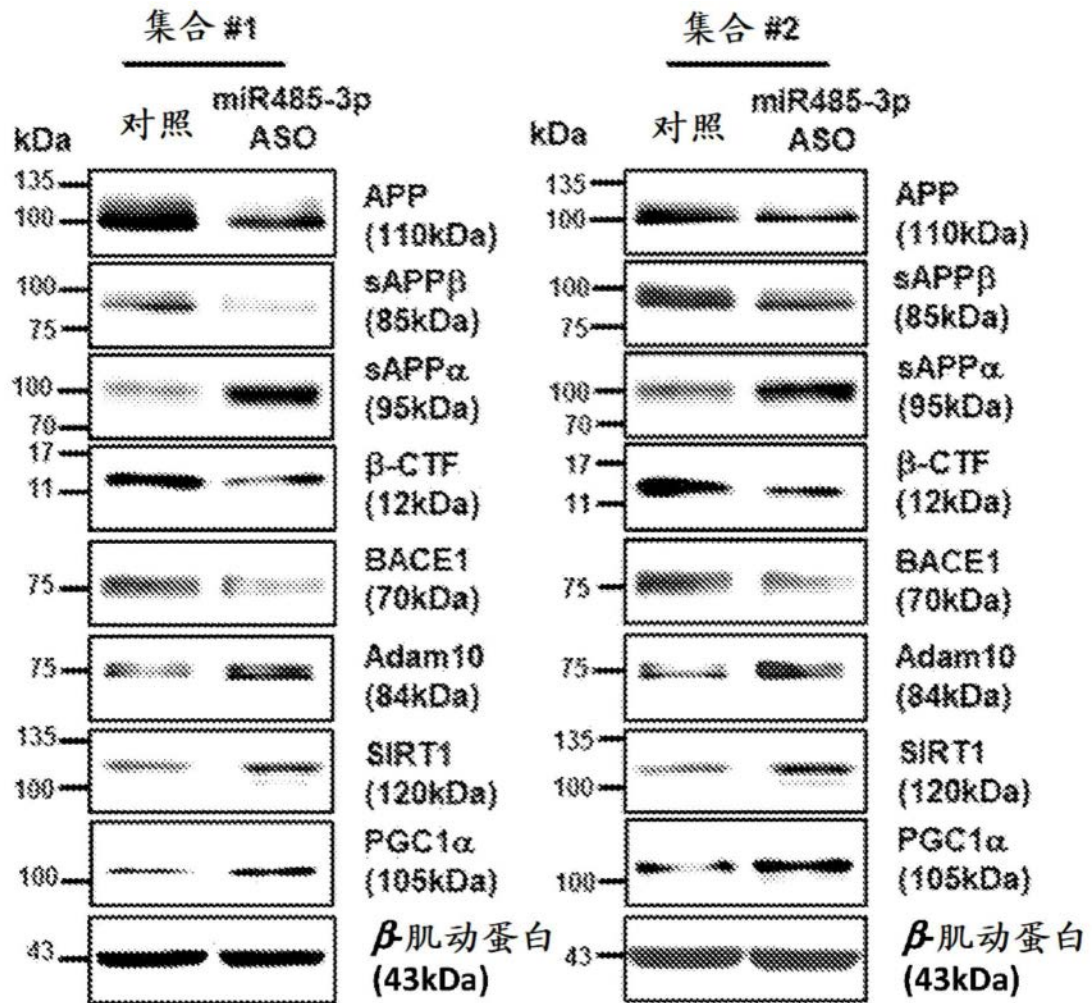


图7F

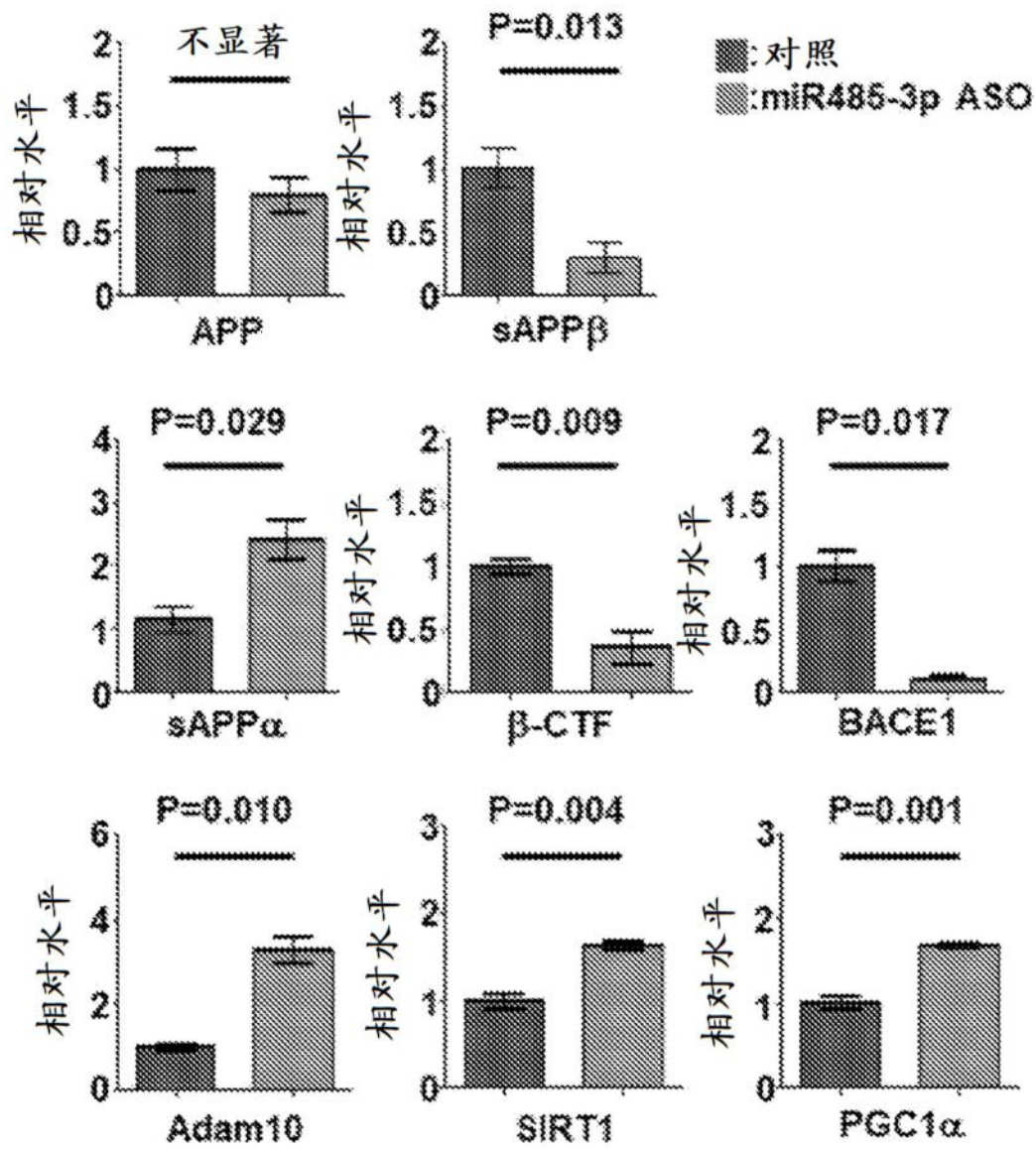


图7G

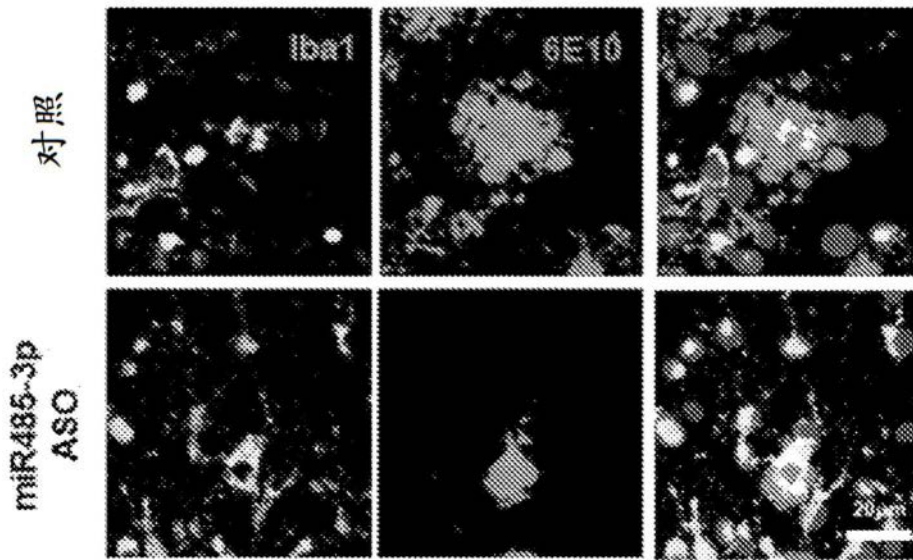


图8A

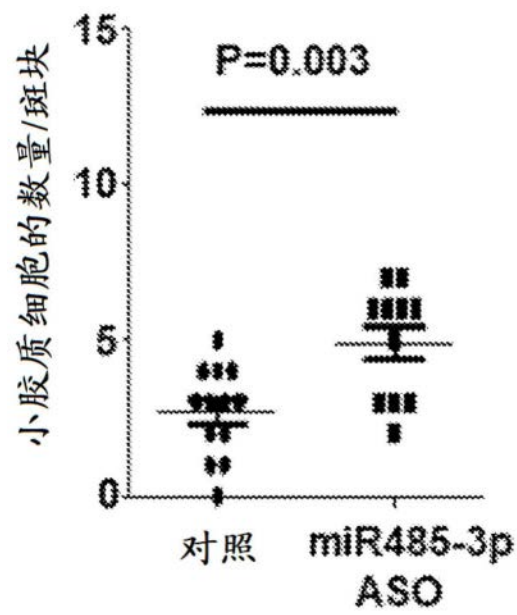


图8B

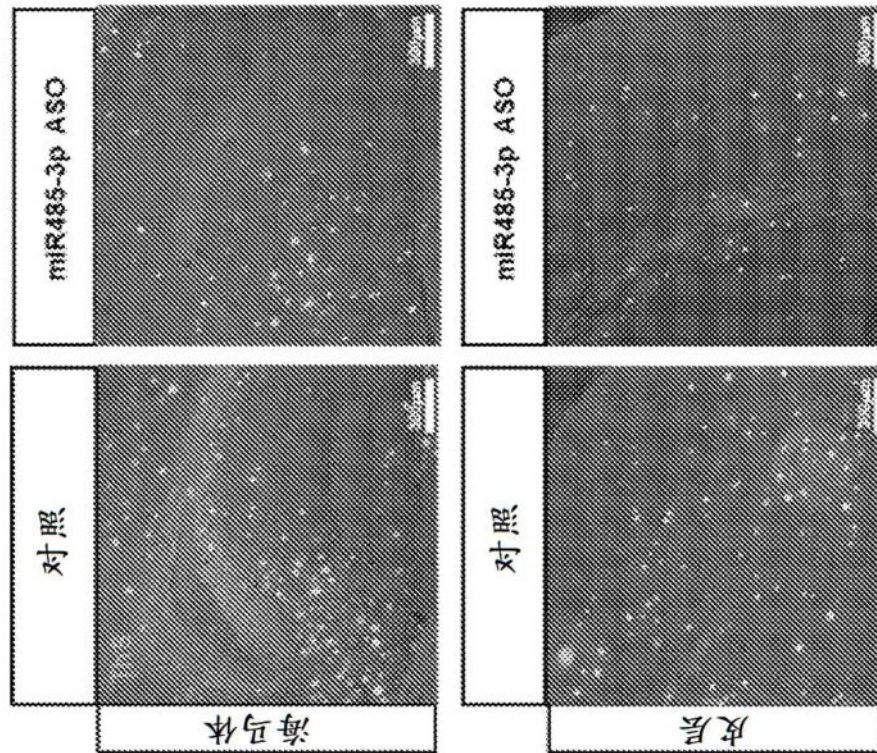


图8C

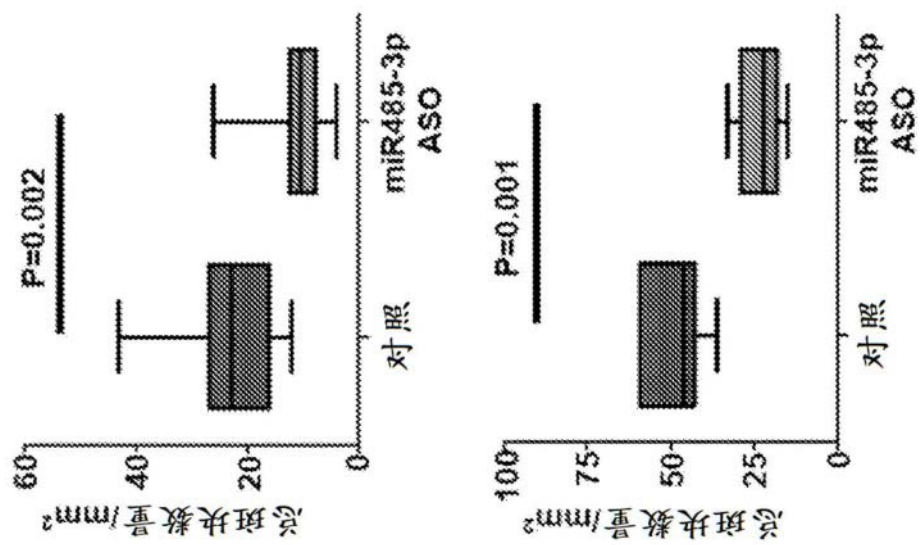


图8D

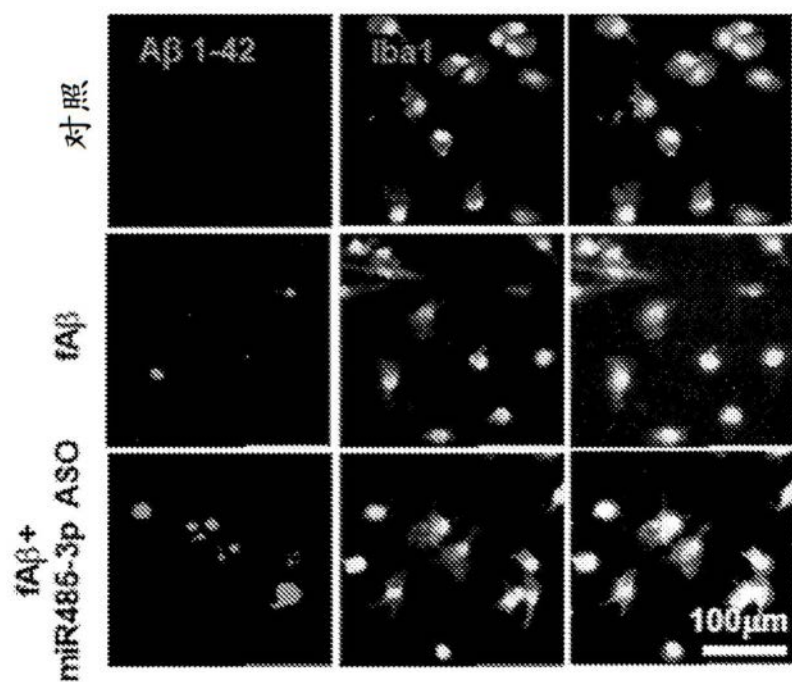


图8E

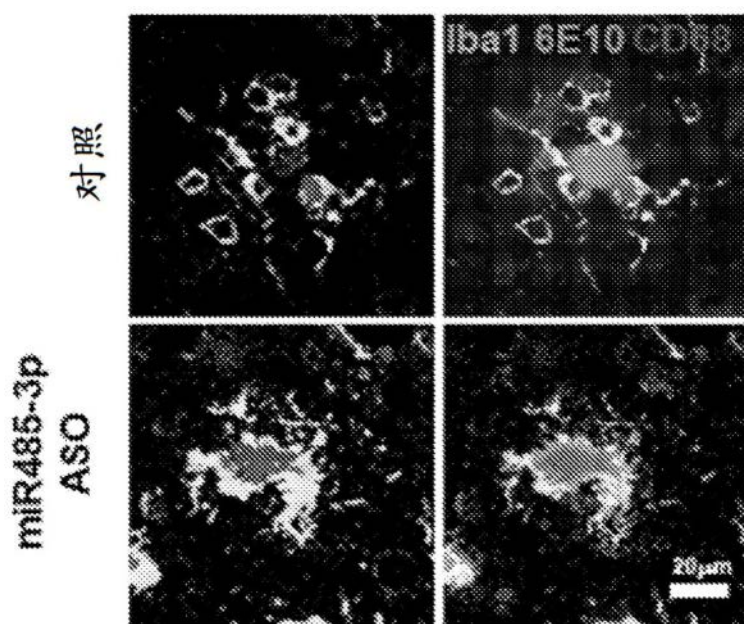


图8F

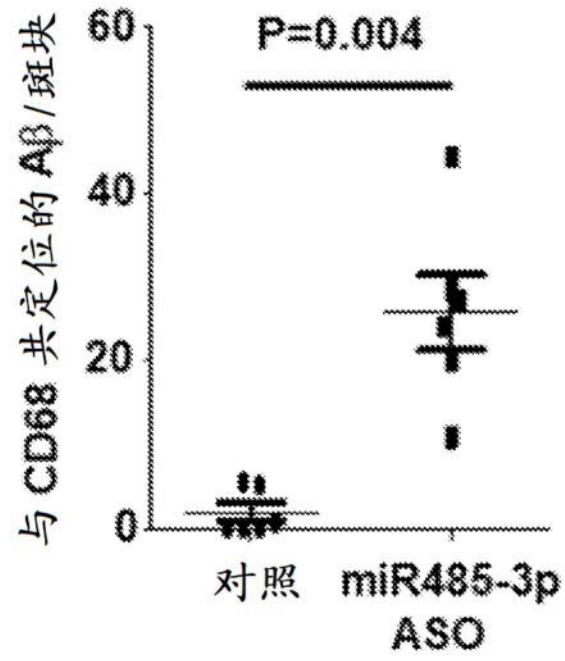


图8G

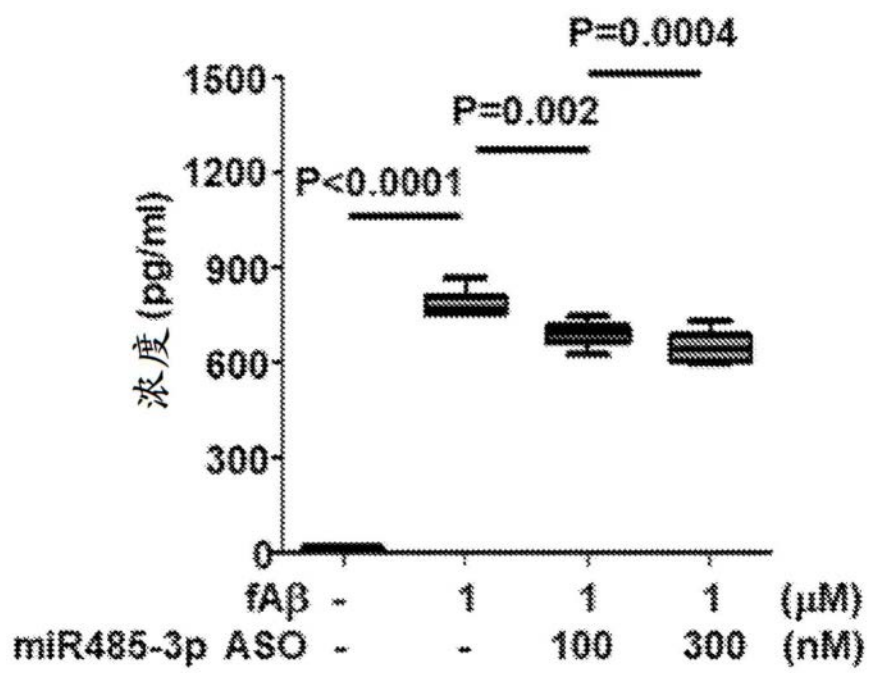


图8H

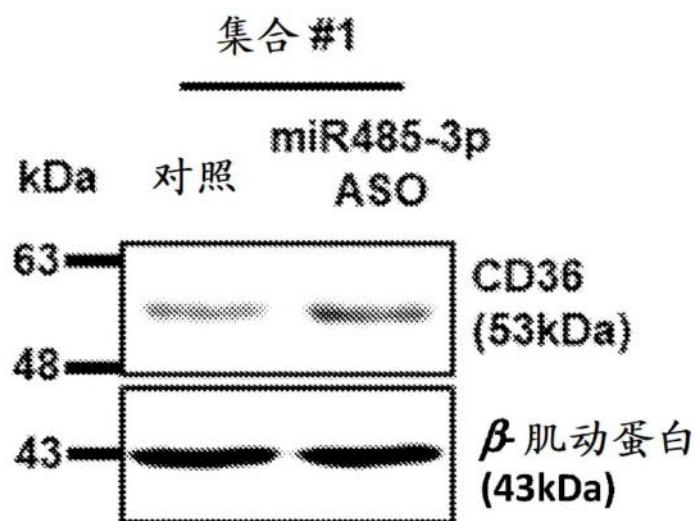


图9A

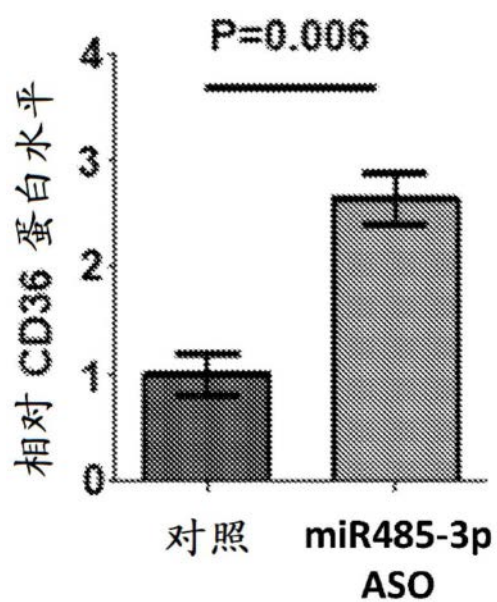


图9B

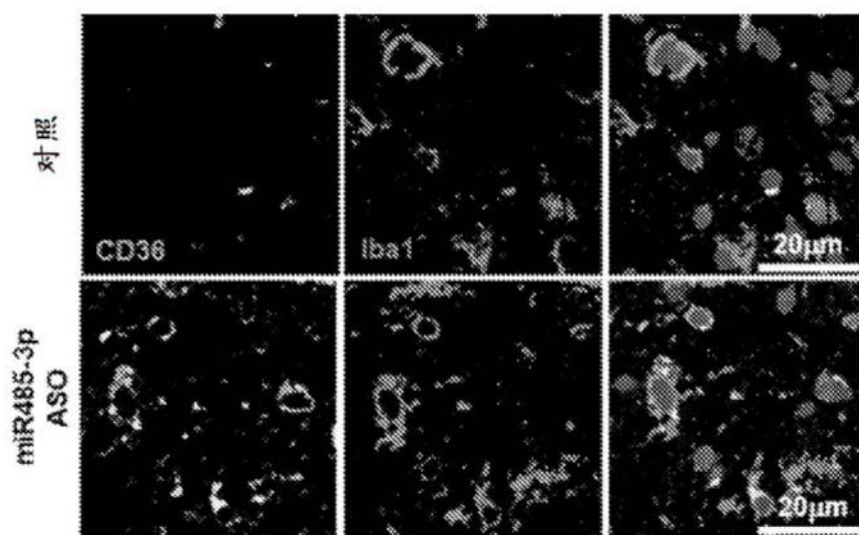


图9C

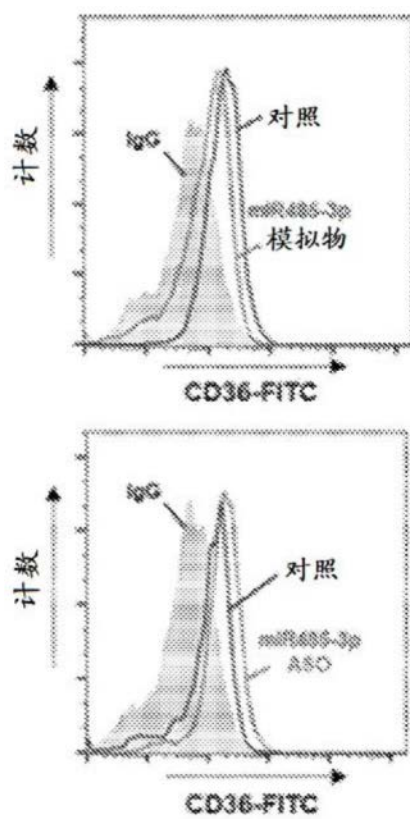


图9D

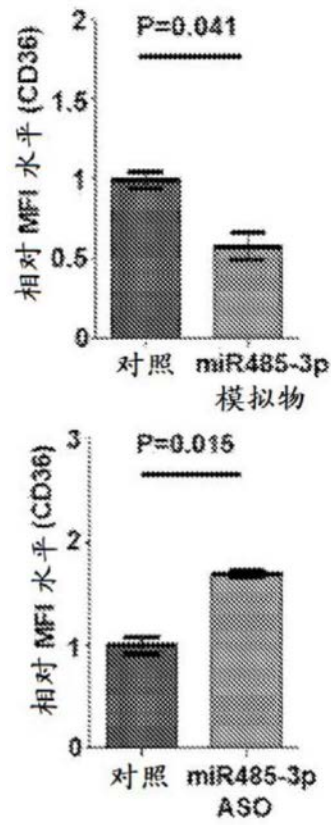


图9E

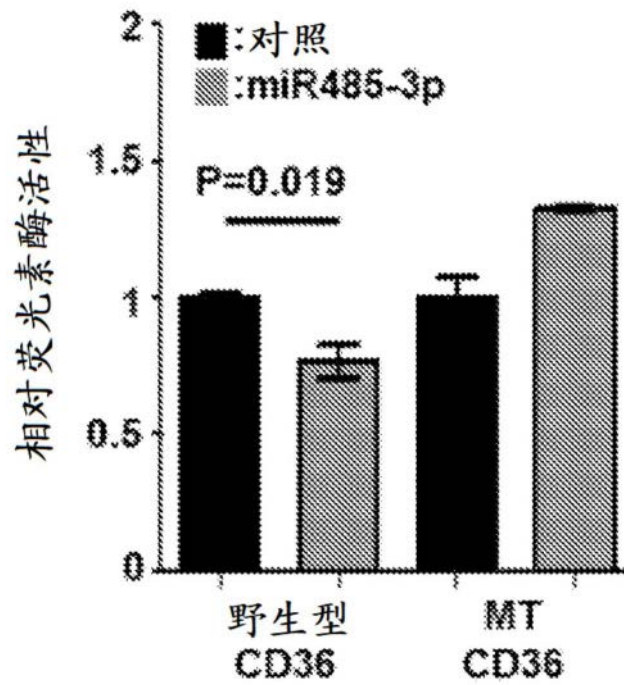


图10

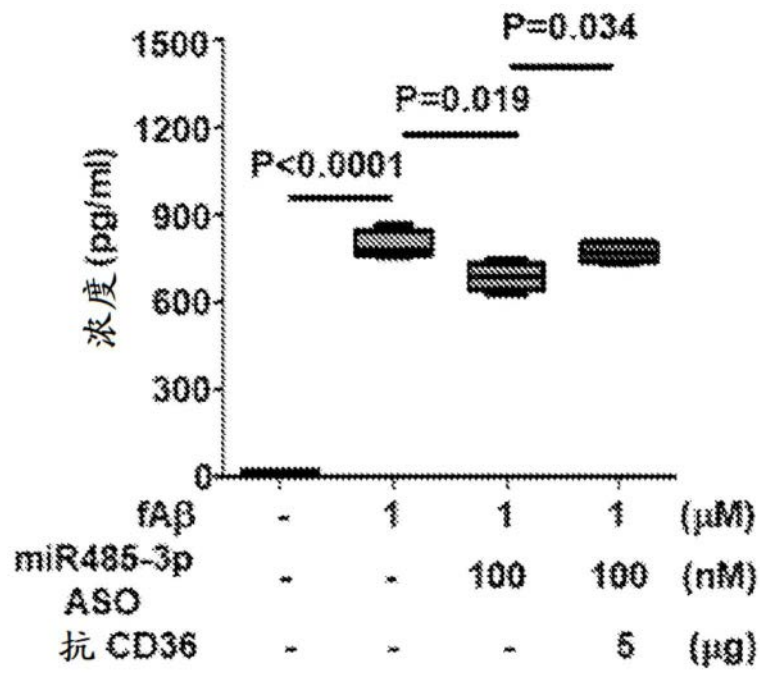


图11

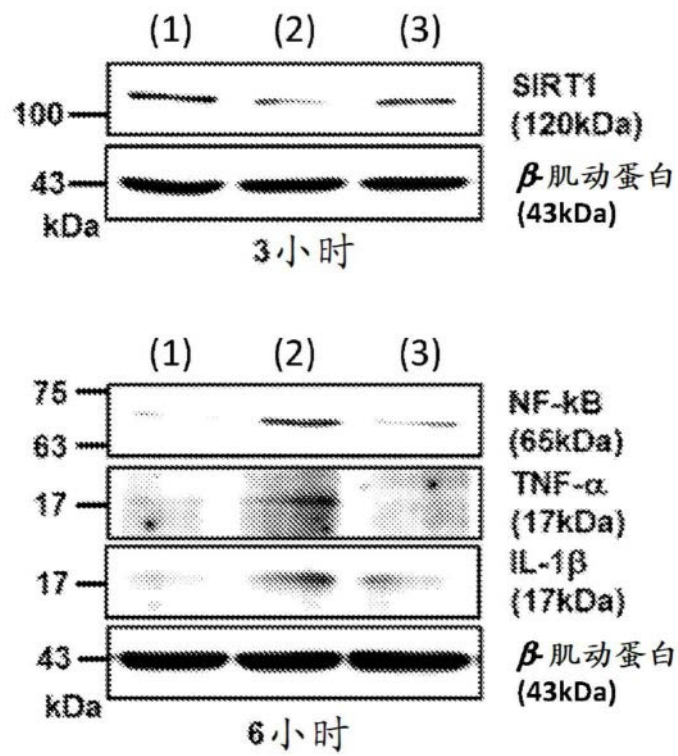


图12A

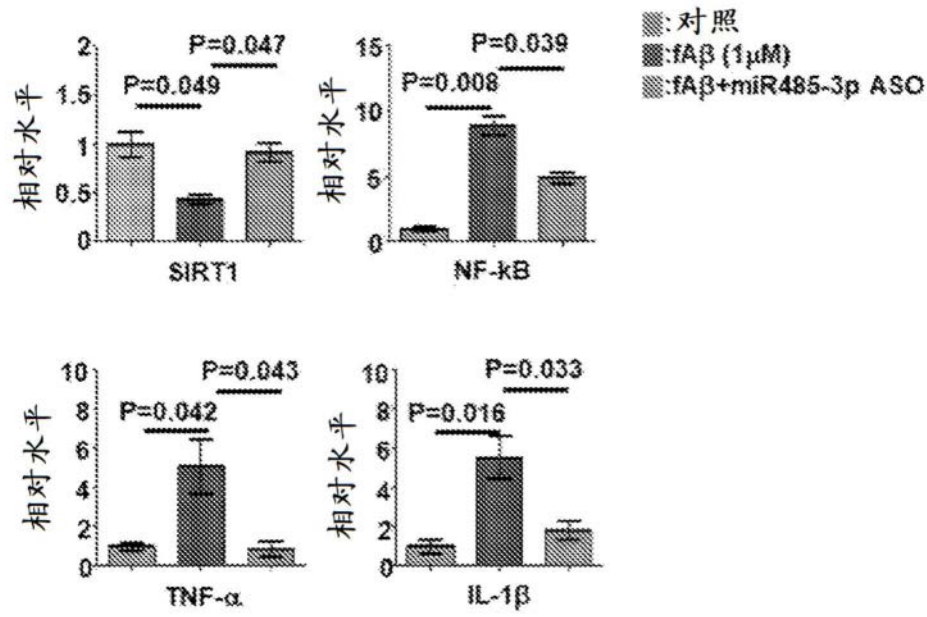


图12B

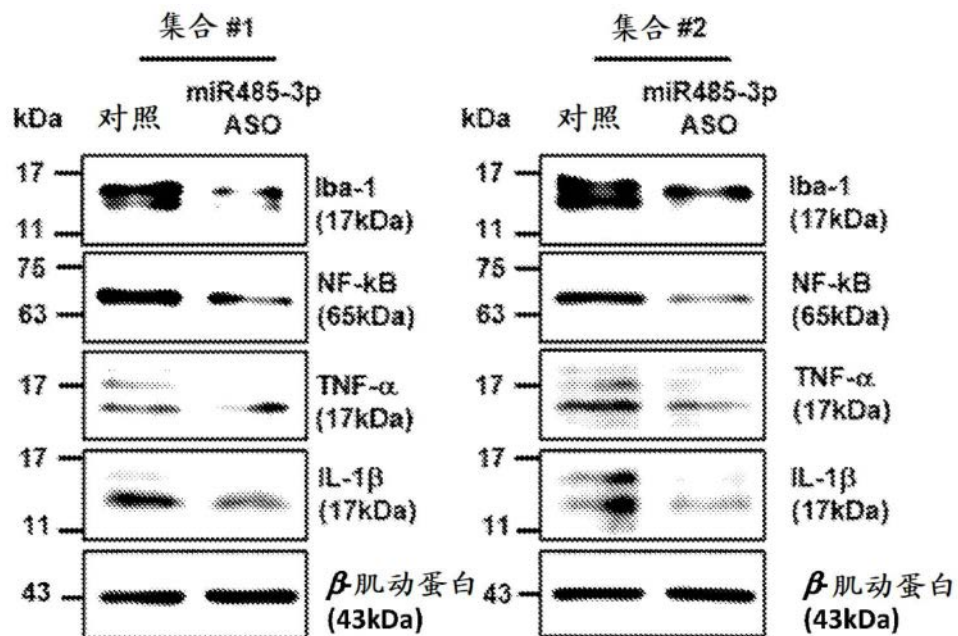


图12C

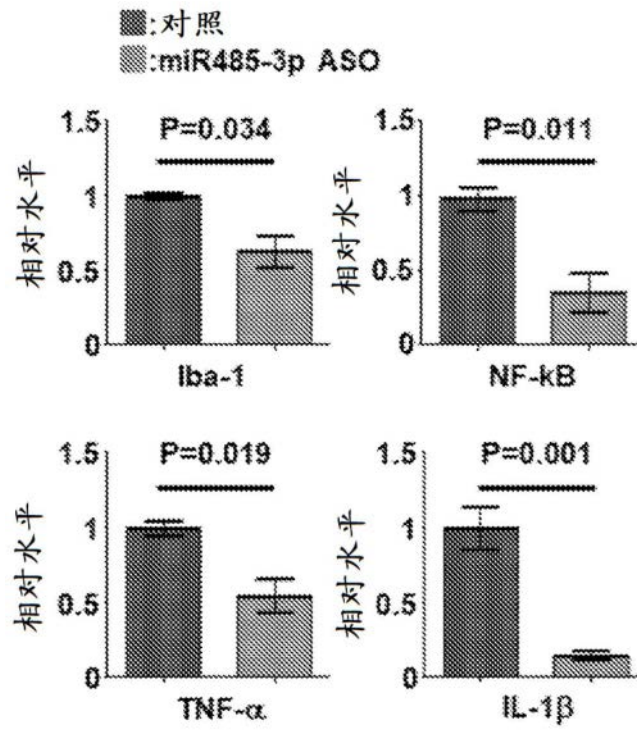


图12D

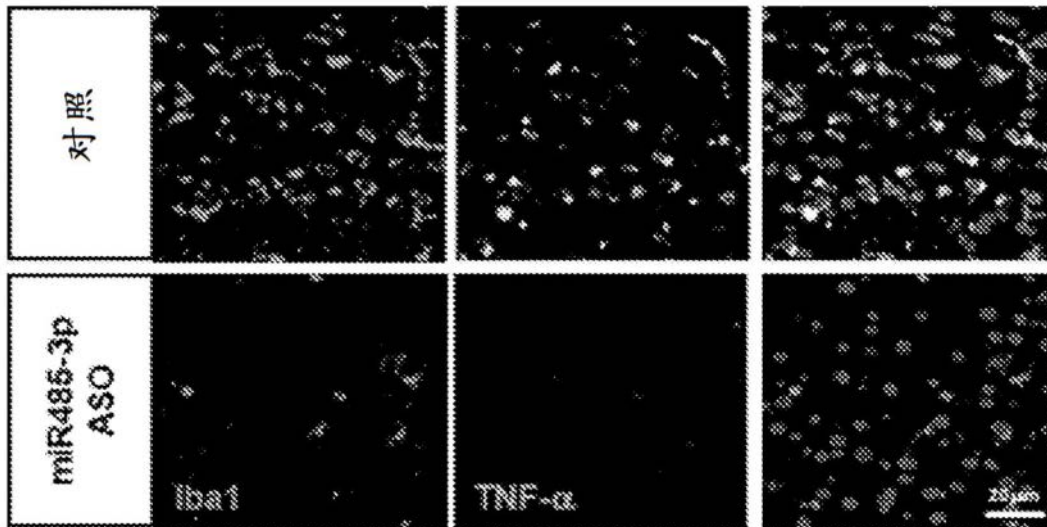


图12E

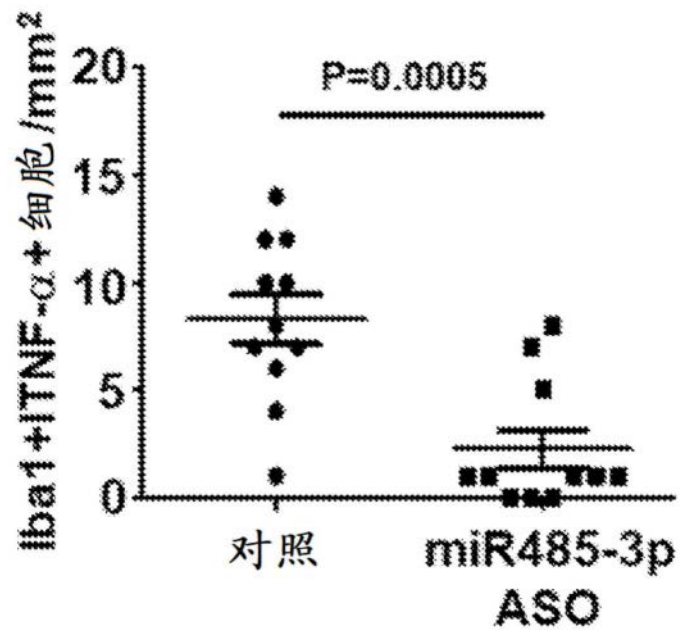


图12F

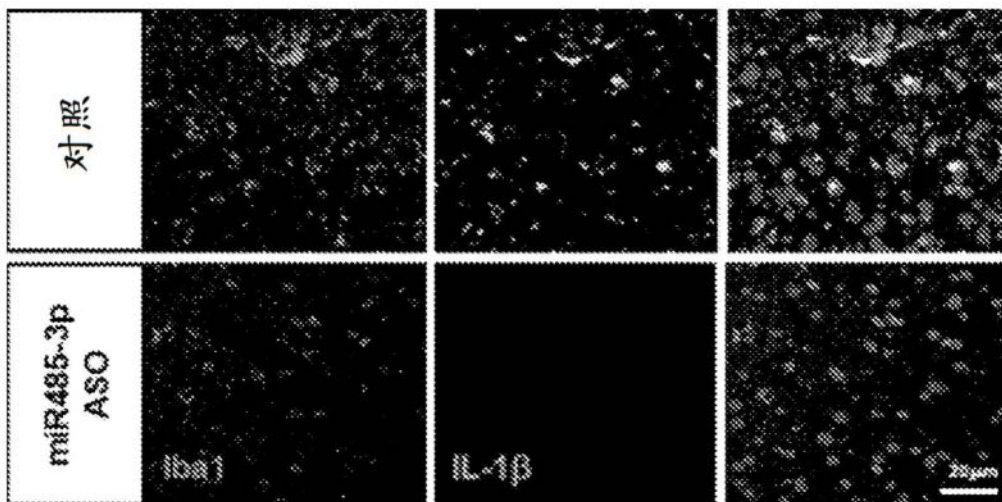


图12G

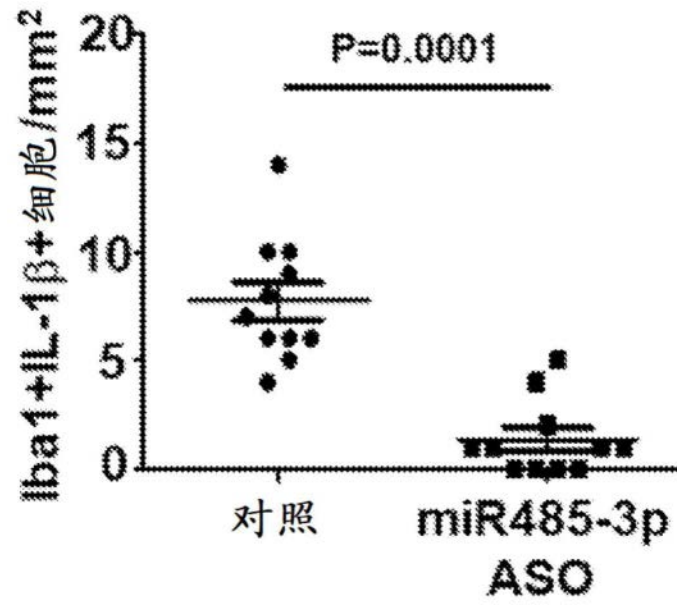


图12H

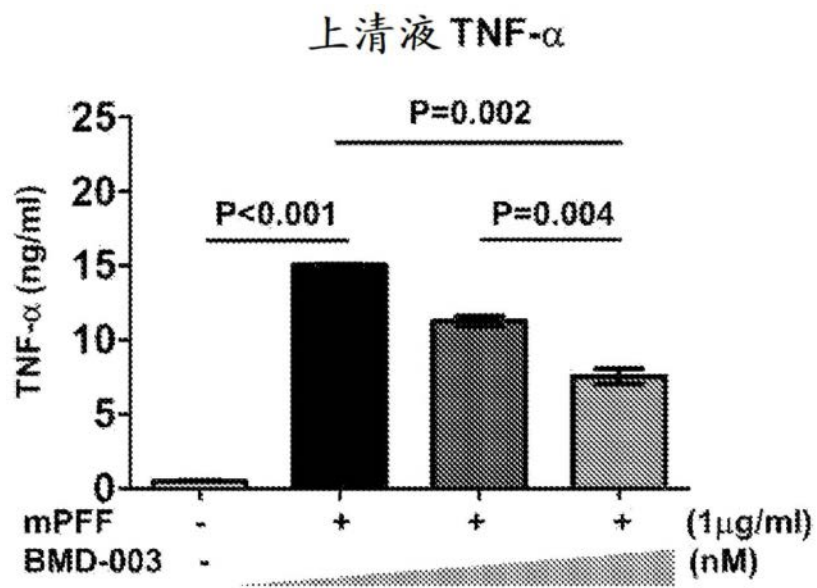


图12I

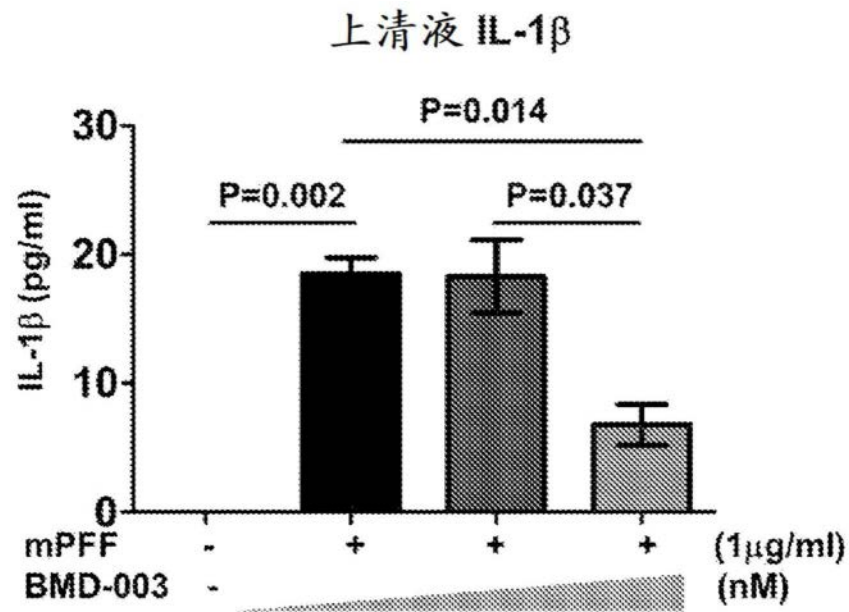


图12J

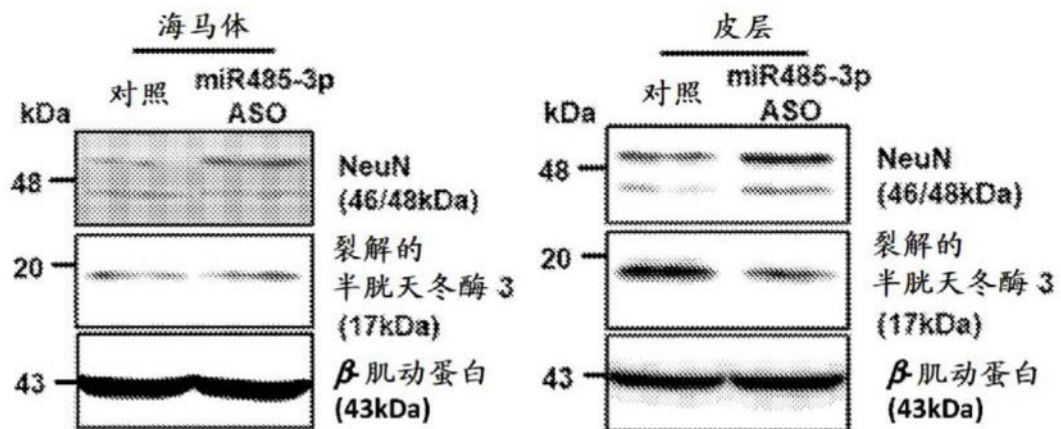


图13A

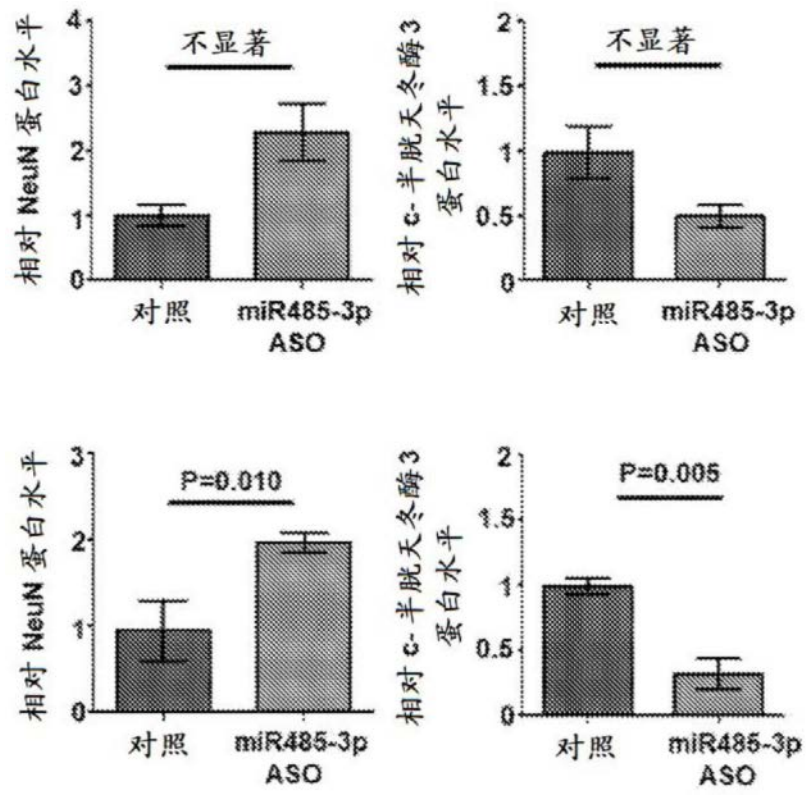


图13B

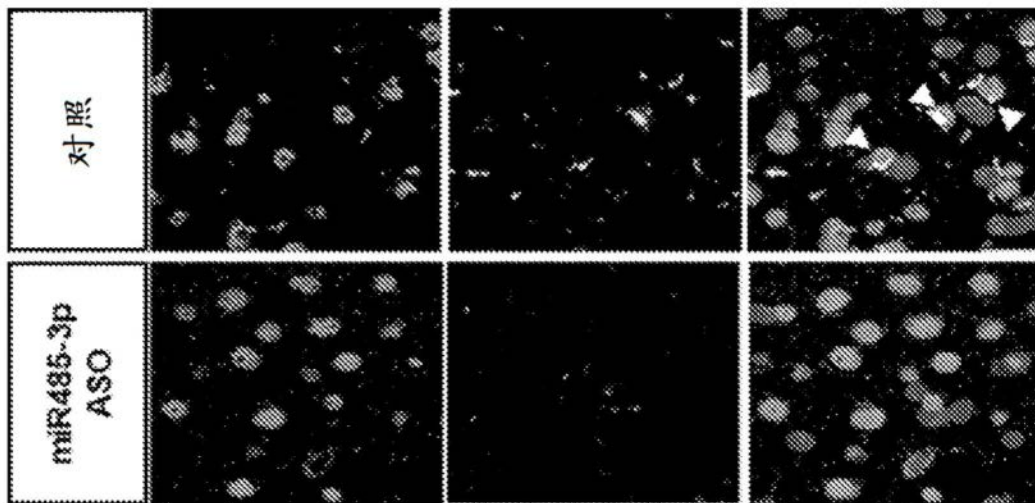


图13C

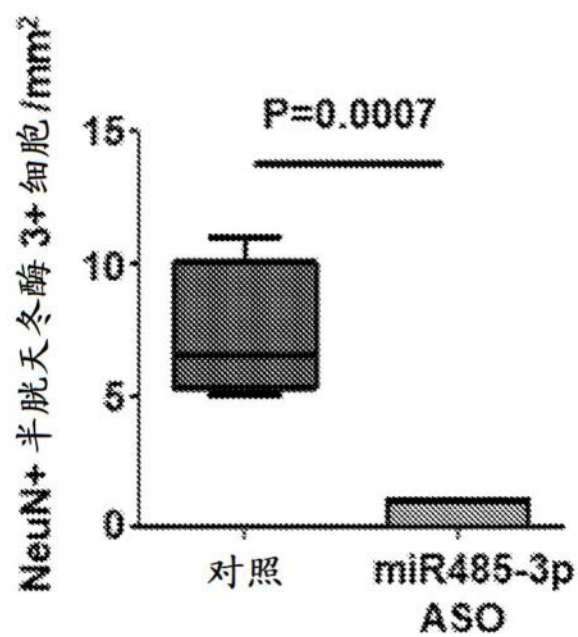


图13D

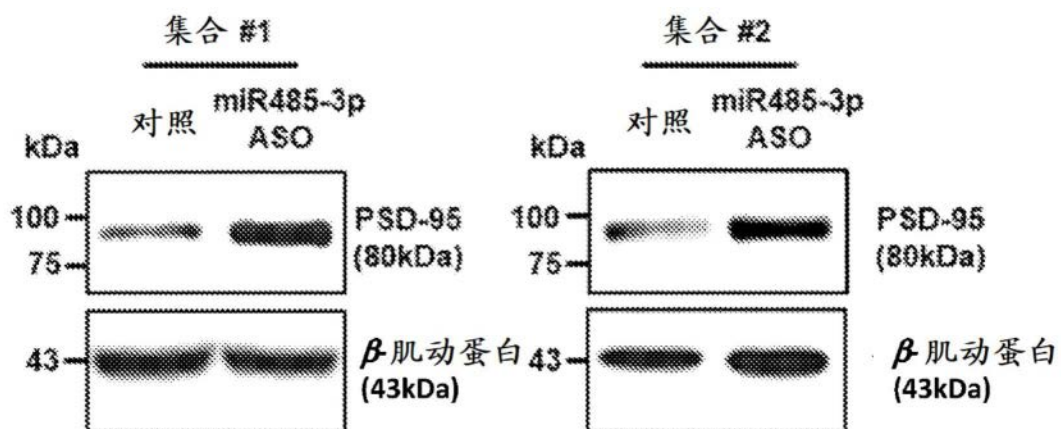


图13E

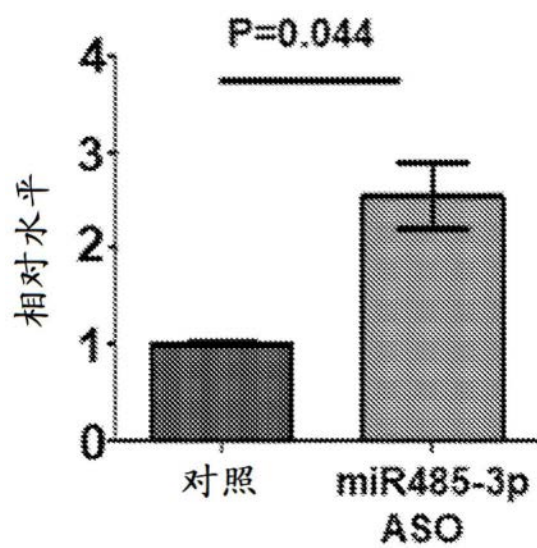


图13F

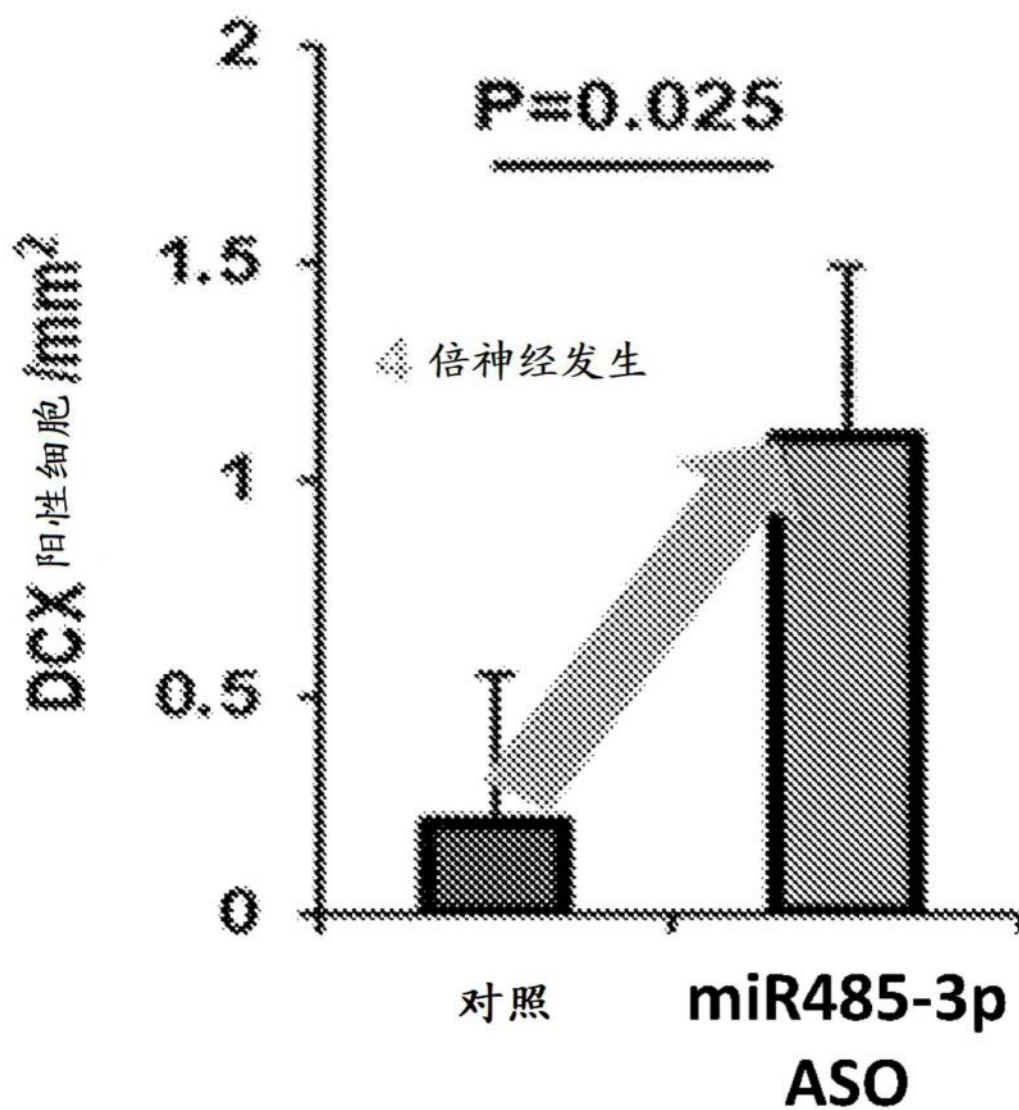


图13G

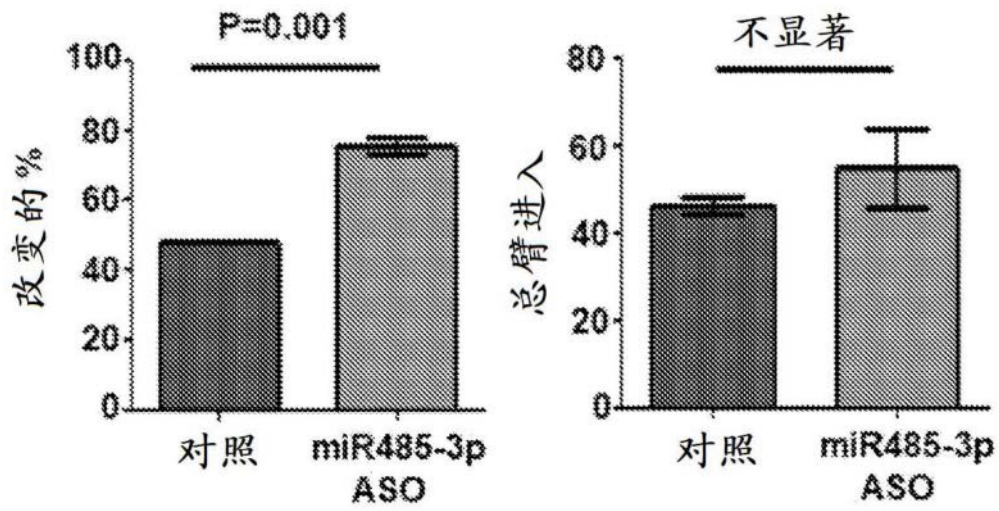


图14A

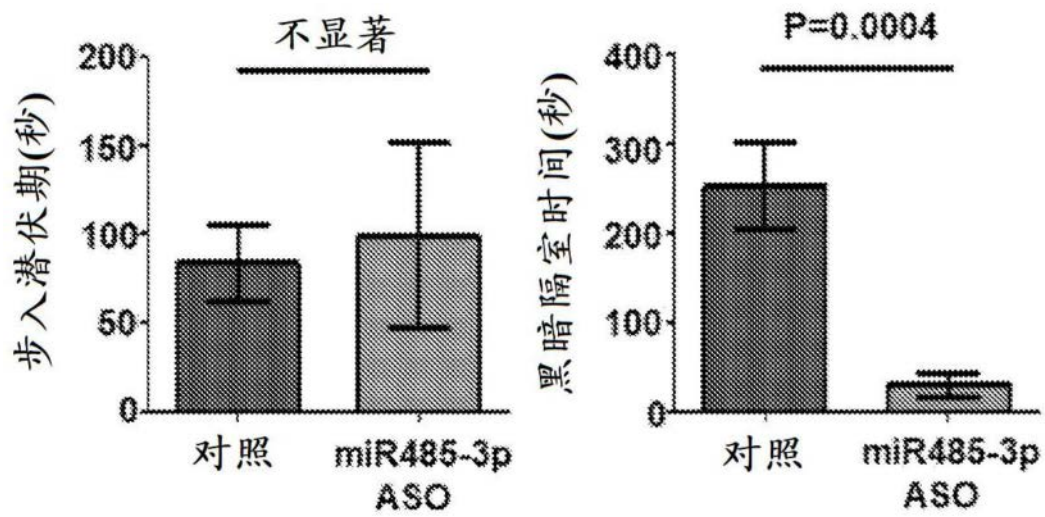


图14B

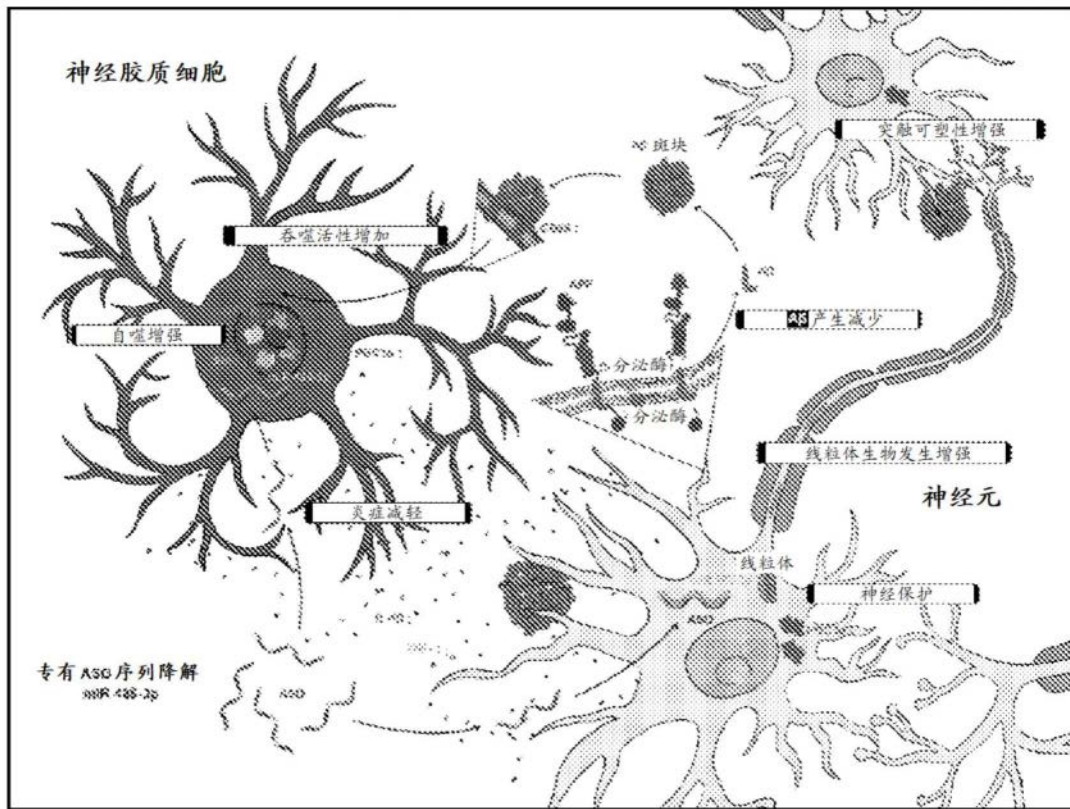


图15

在皮层中

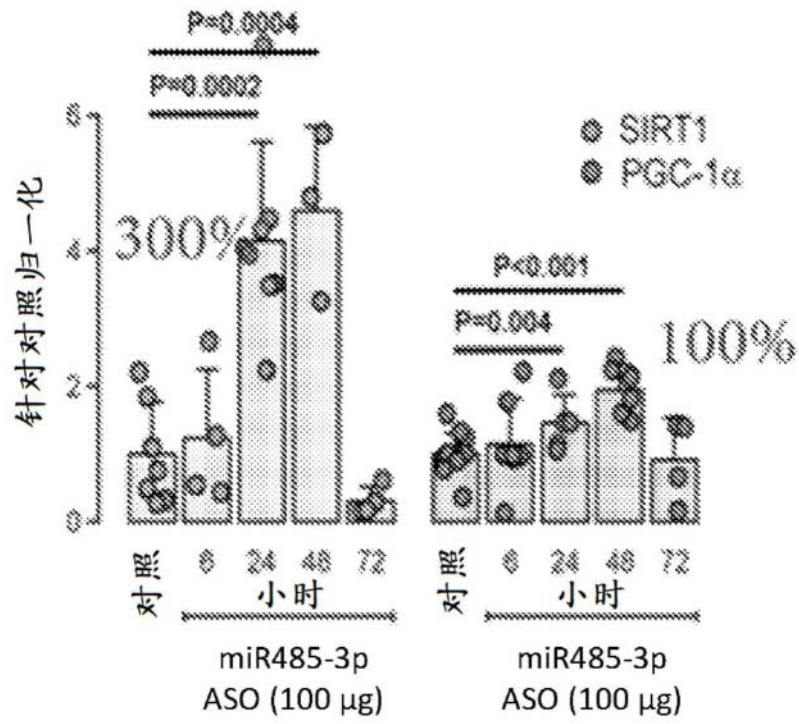


图16A

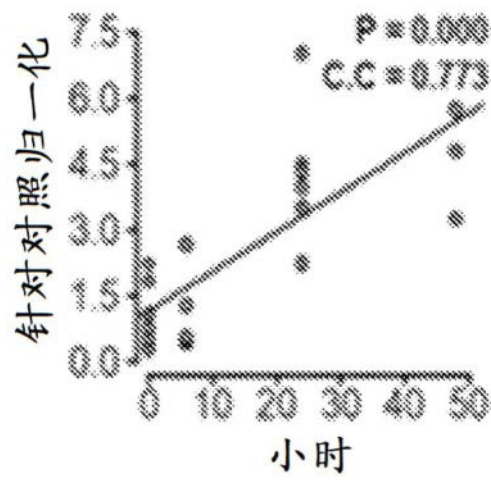


图16B

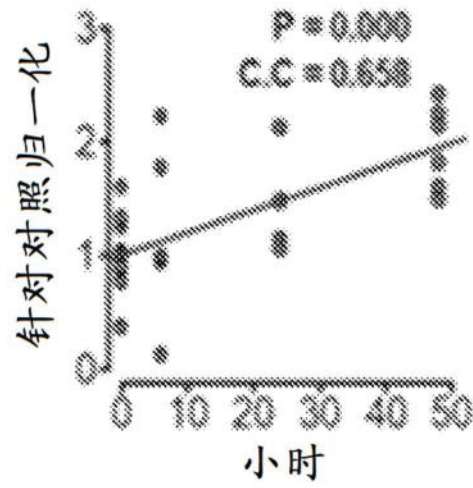


图16C

在海马体中

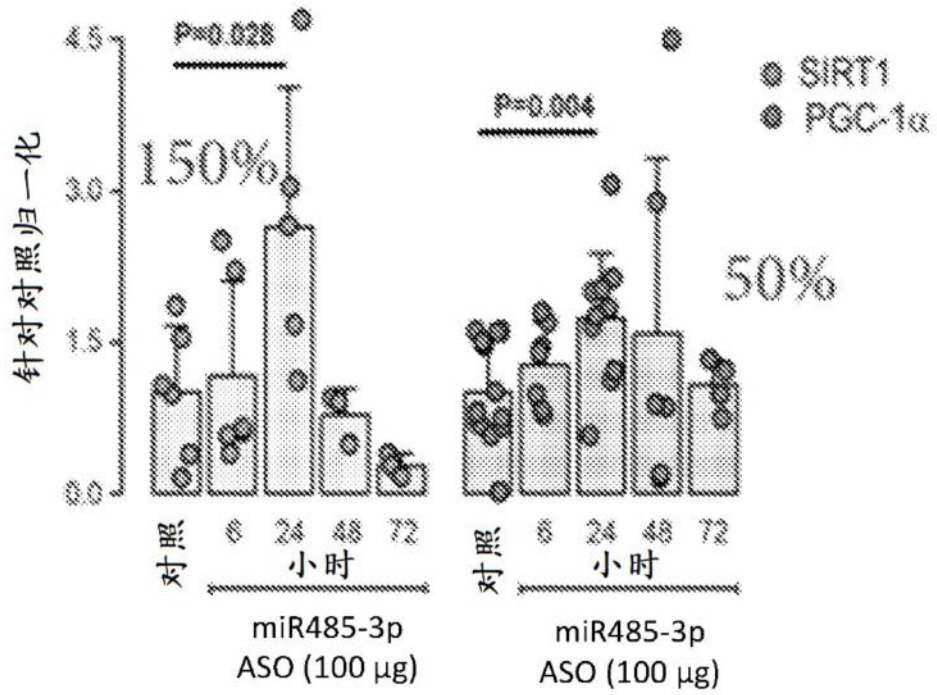


图17A

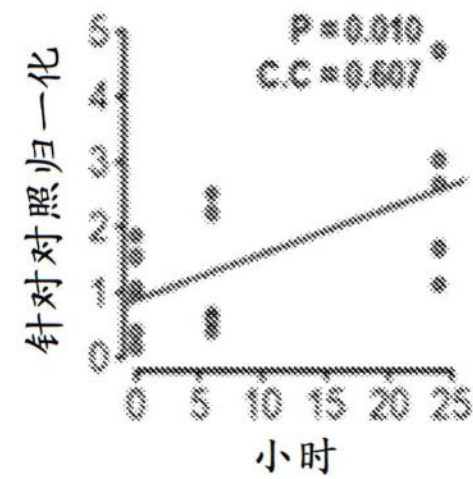


图17B

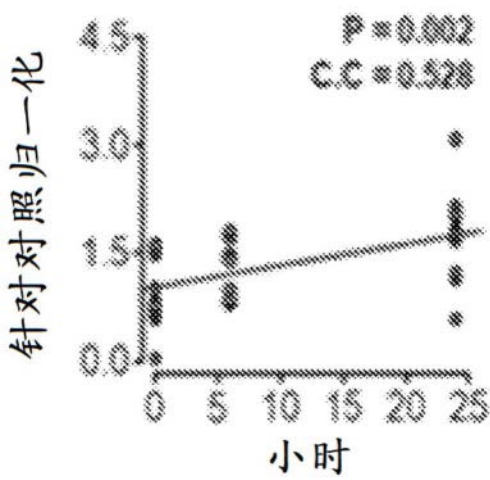


图17C

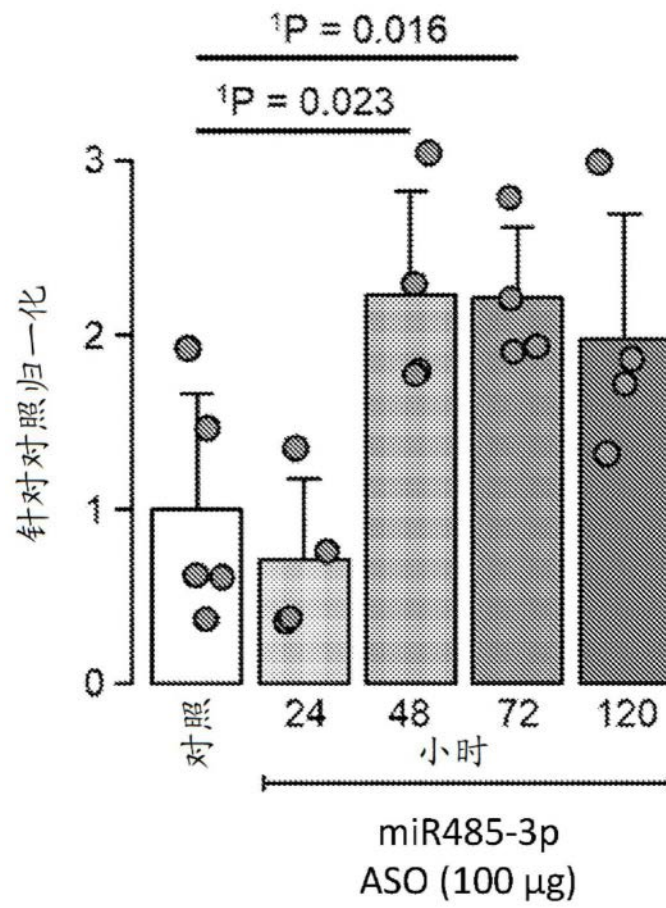


图18A

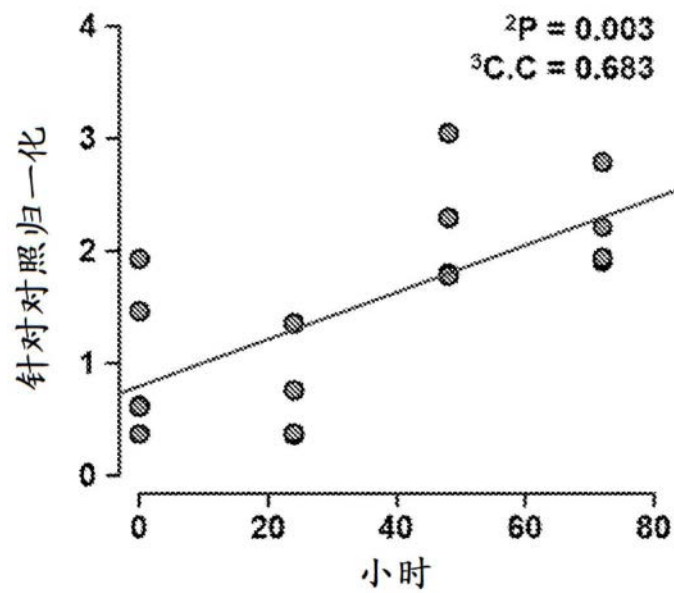


图18B

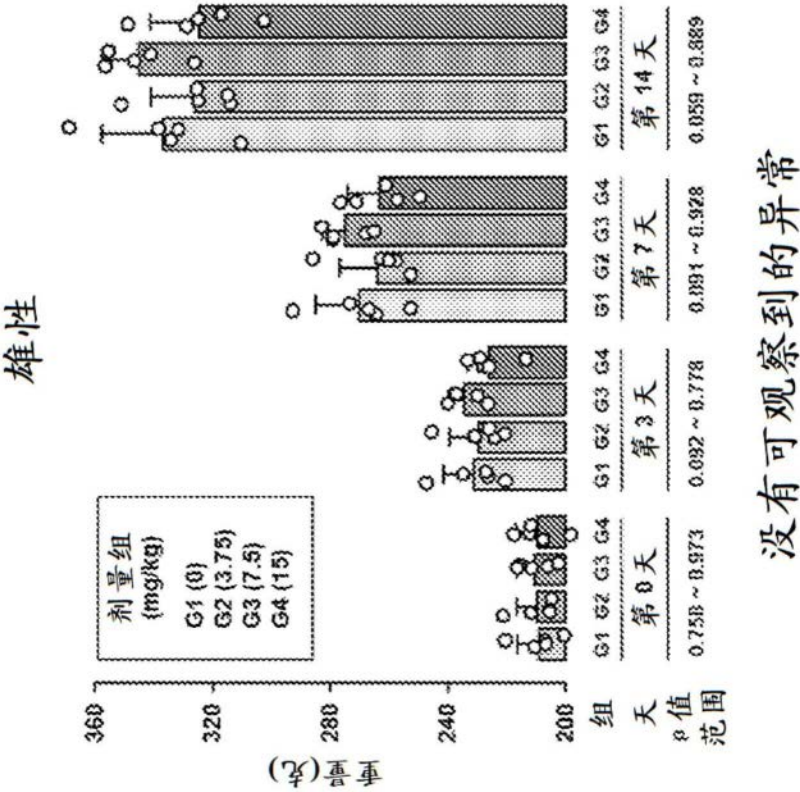


图19A

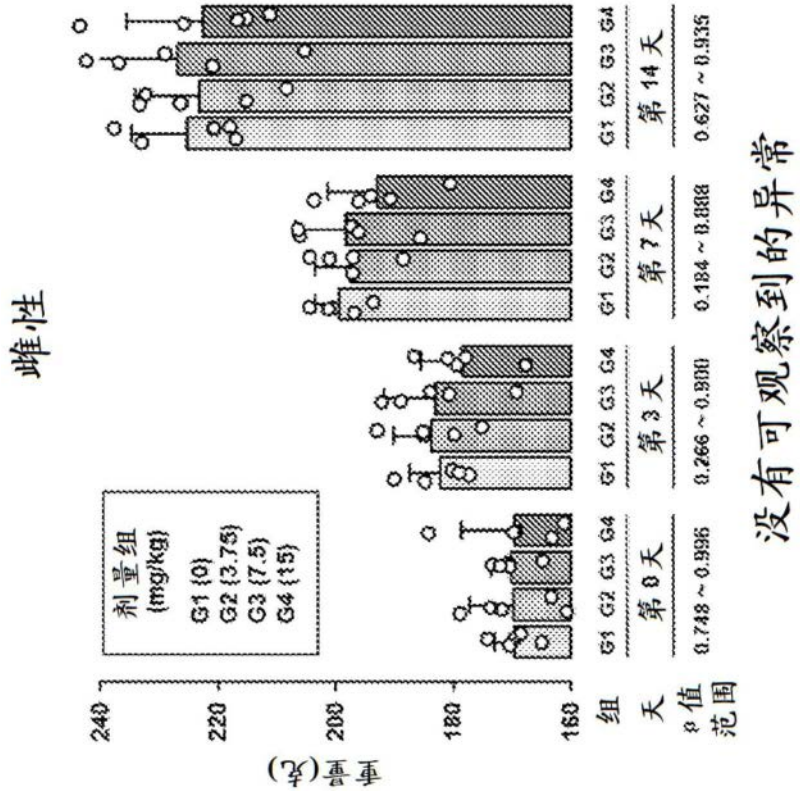


图19B

性别	组/剂量 (mg/kg)	动物的 数量	给药后天数														死亡率	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
雄性	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
	G2 3.75	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
	G3 7.5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
	G4 15	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5

图20A

性别	组/剂量 (mg/kg)	动物的 数量	给药后天数														死亡率	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
雌性	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	G2 3.75	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	G3 7.5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	G4 15	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%

图20B

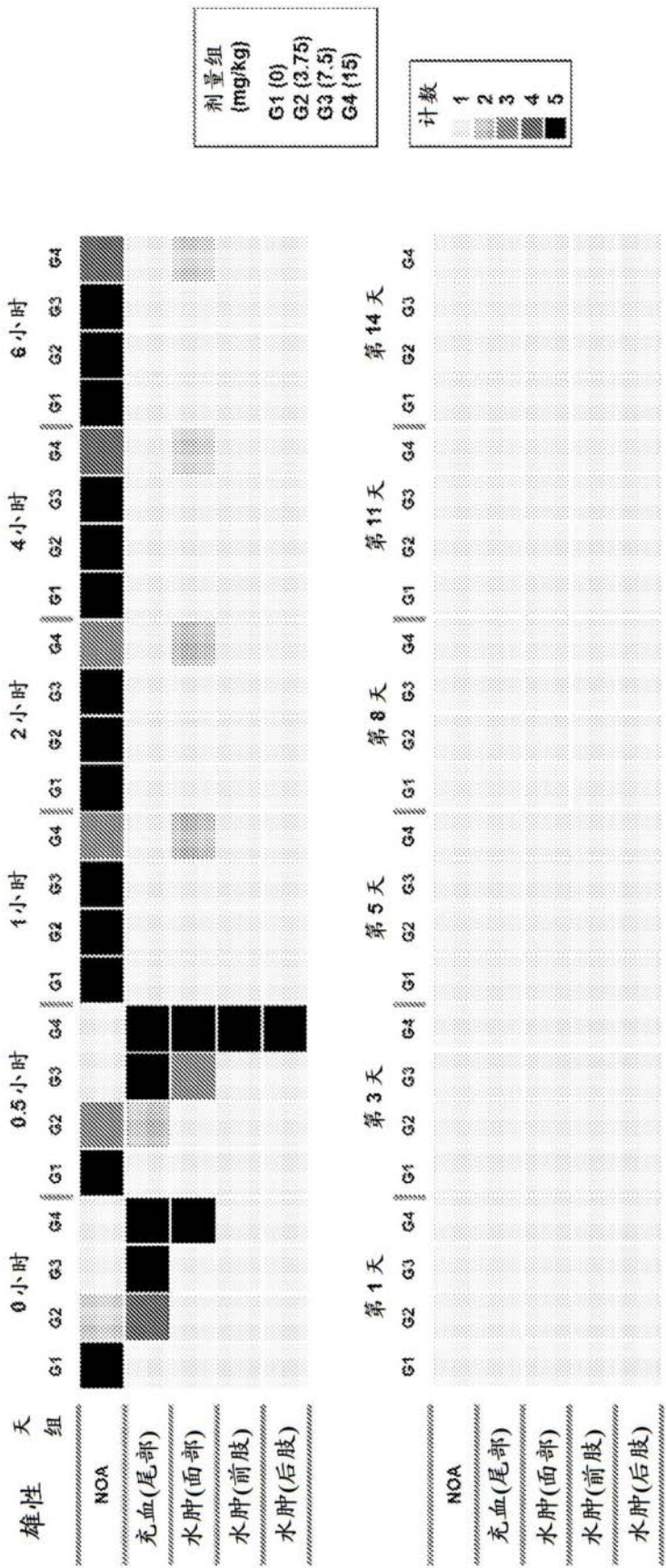


图21A

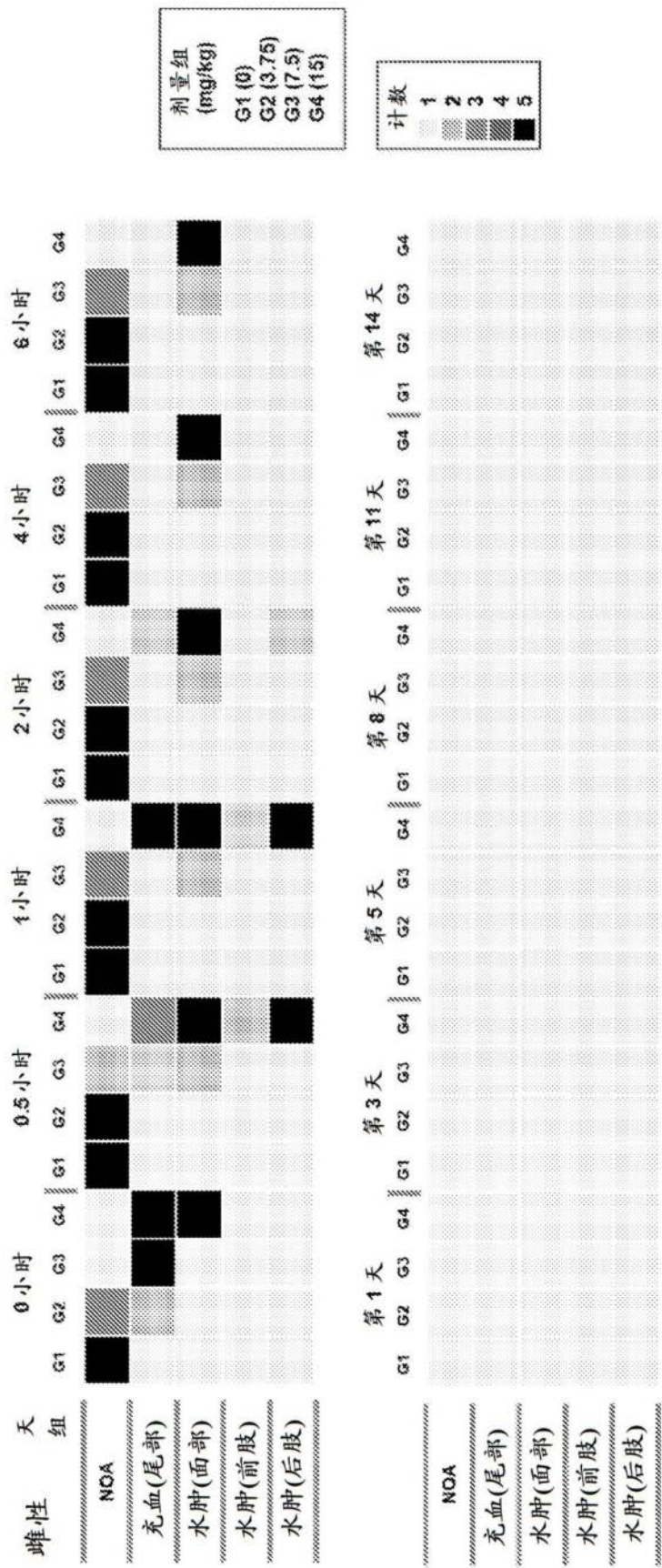


图21B

雄性	组			
	1	2	3	4
动物的数量	5	5	5	5
检查的数量	5	5	5	5
没有注意到的发现	5	5	5	5

图22A

雌性	组			
	1	2	3	4
动物的数量	5	5	5	5
检查的数量	5	5	5	5
没有注意到的发现	5	5	5	5

图22B

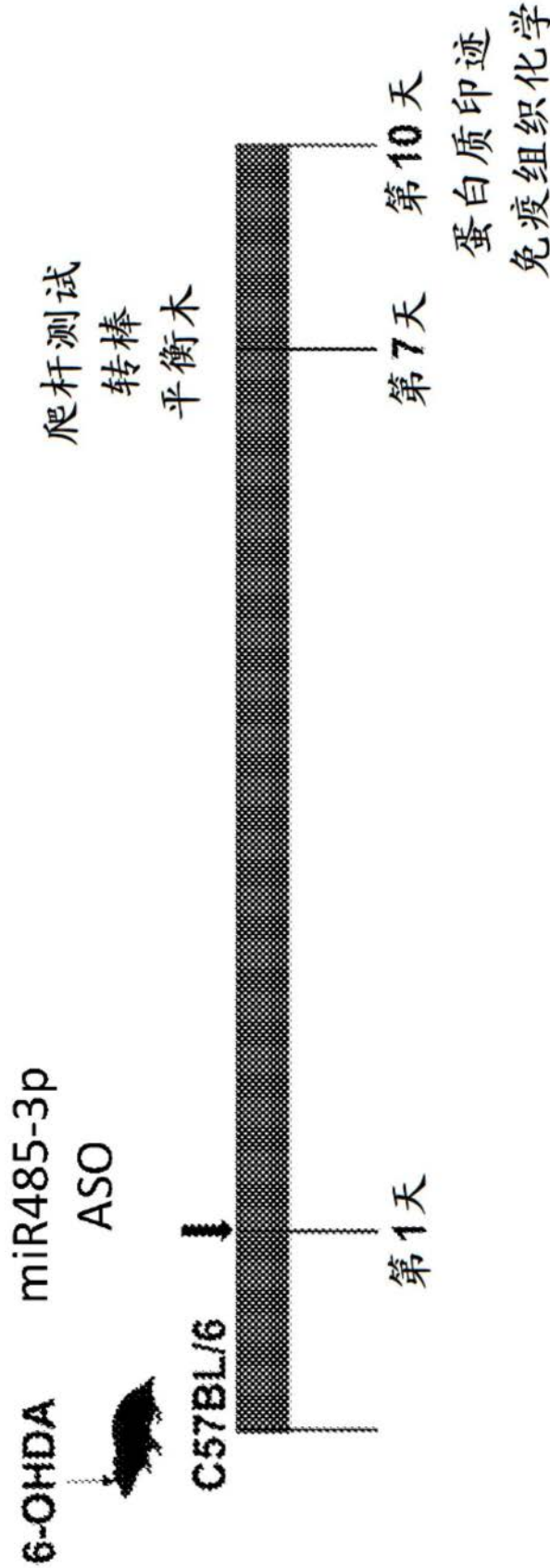


图23A

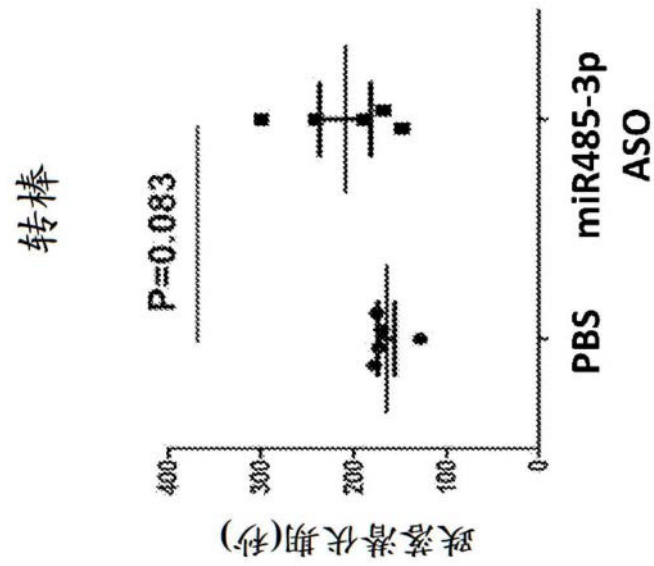


图23B

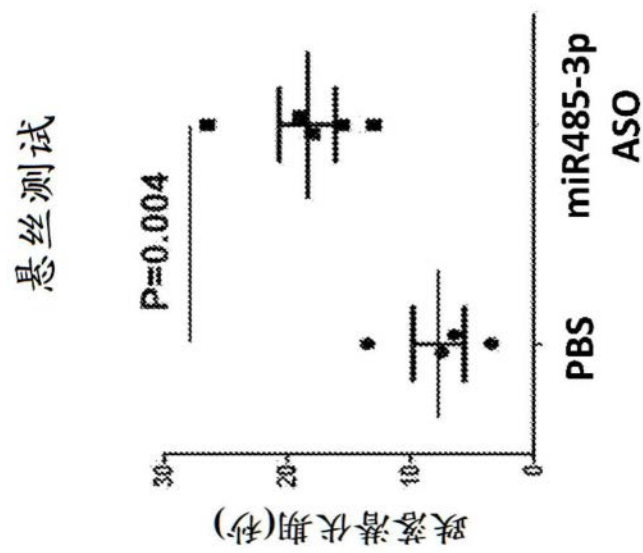


图23C

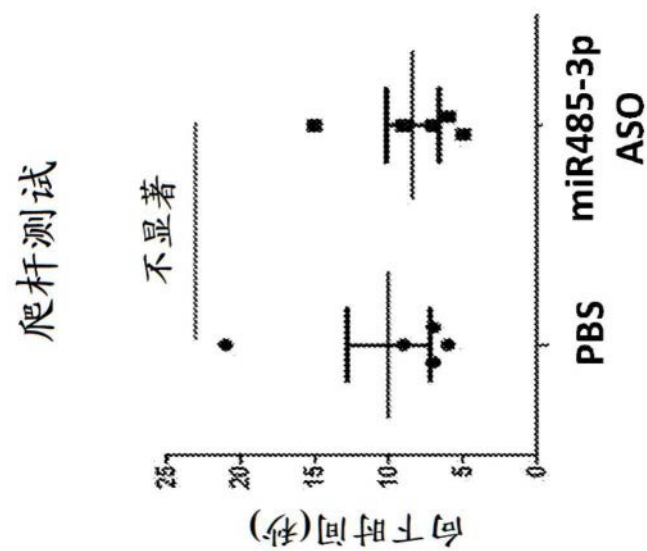


图23D

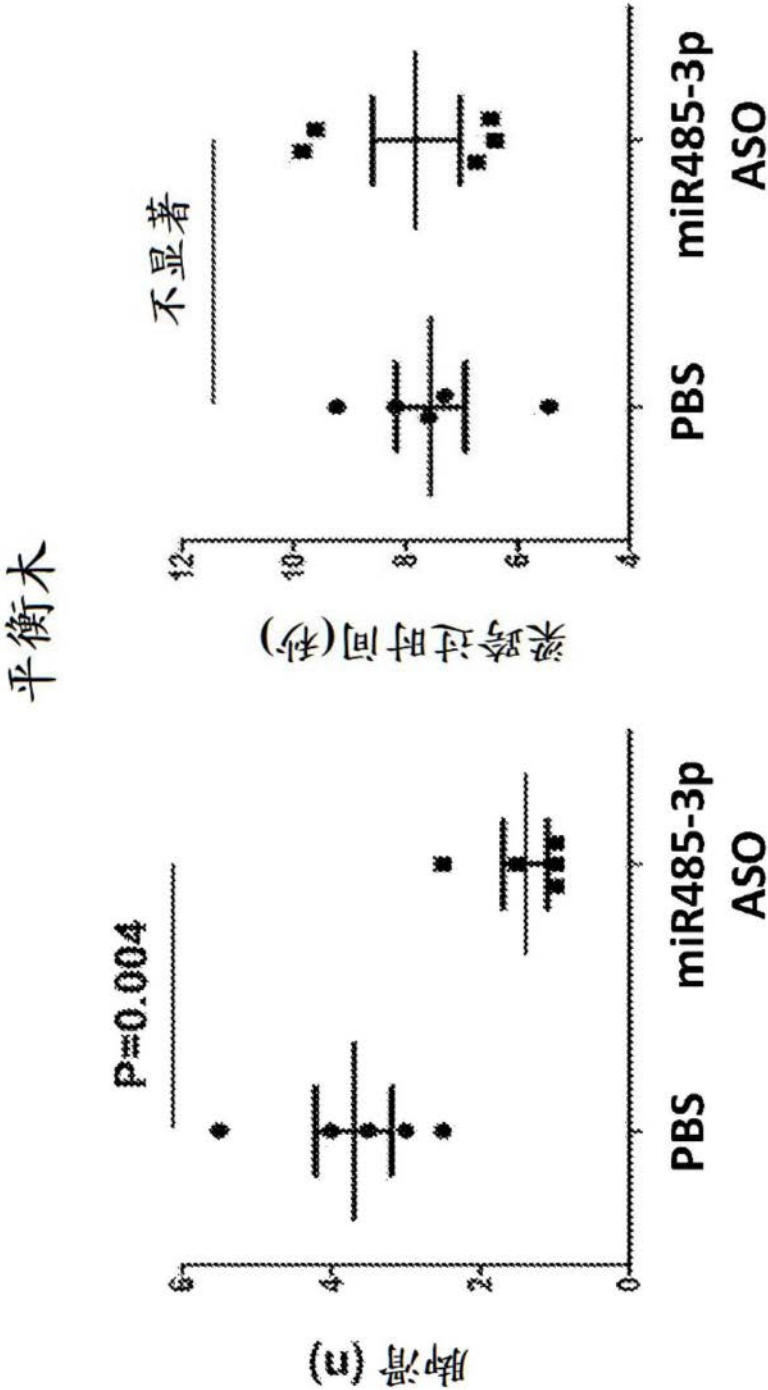


图23E

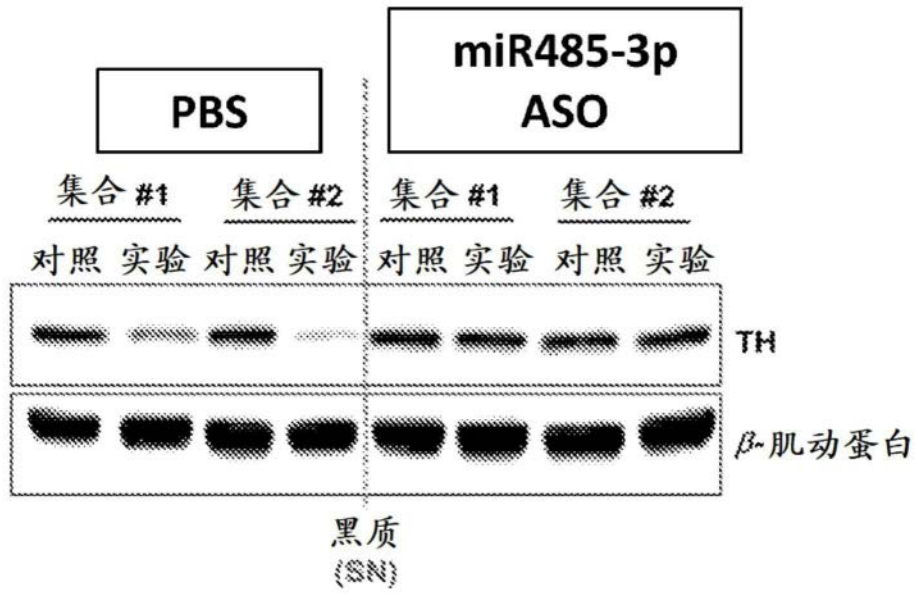


图23F

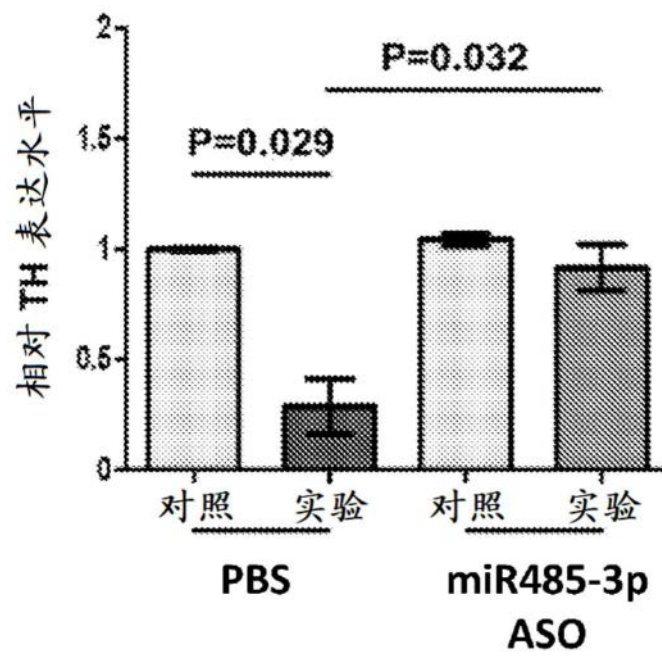


图23G

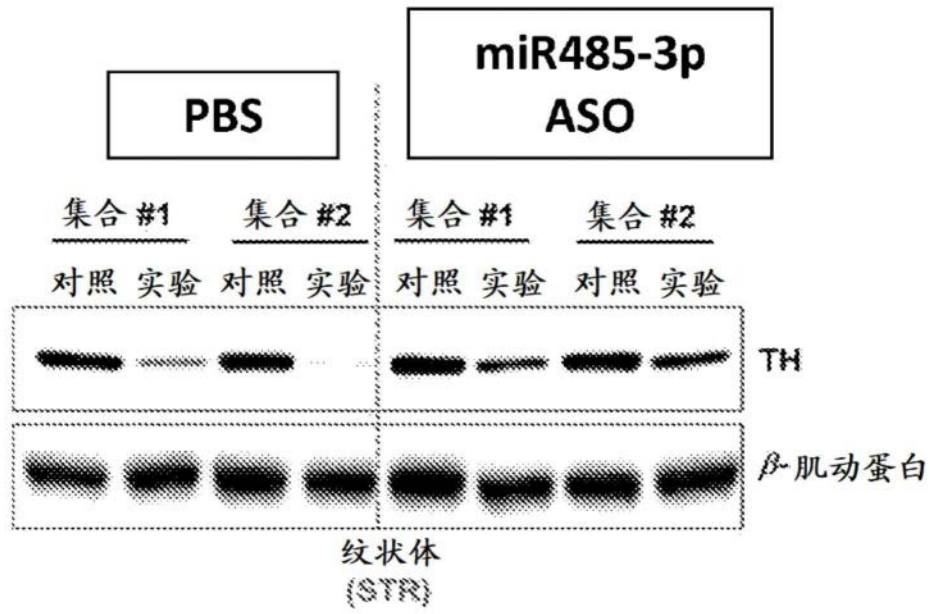


图23H

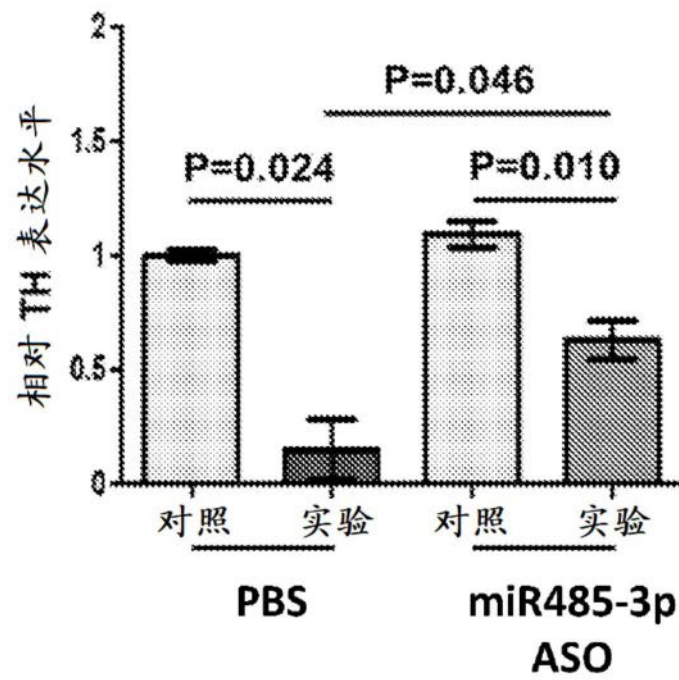


图23I

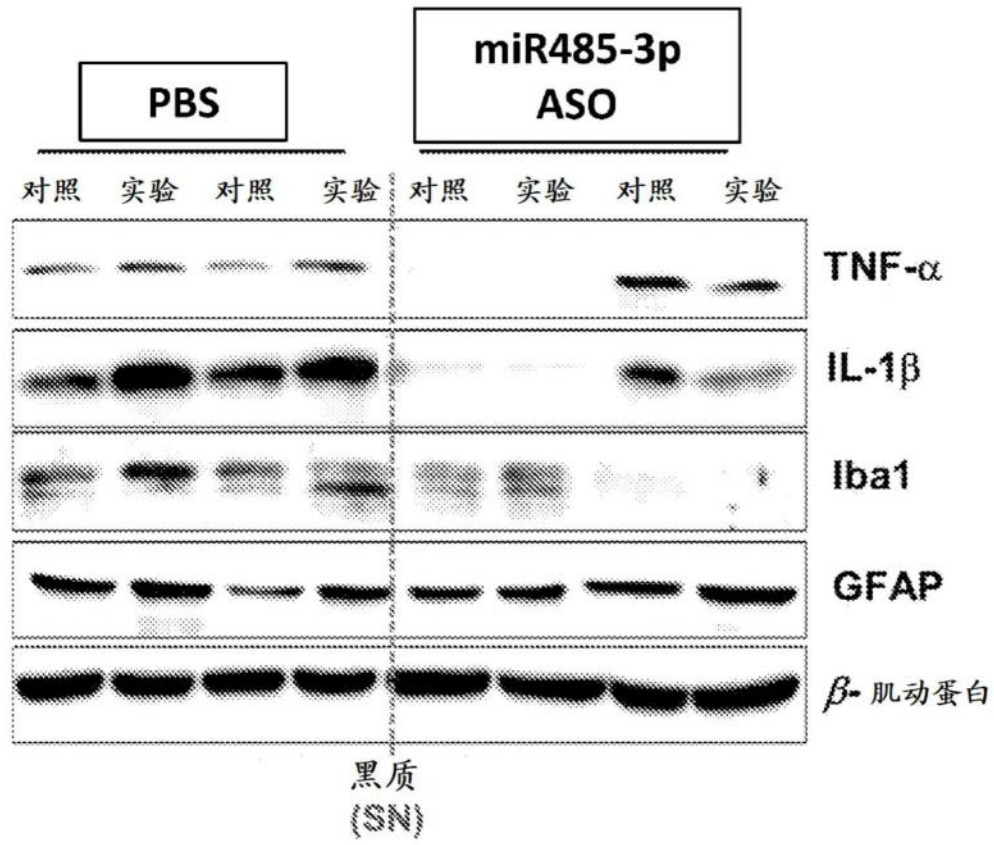


图23J

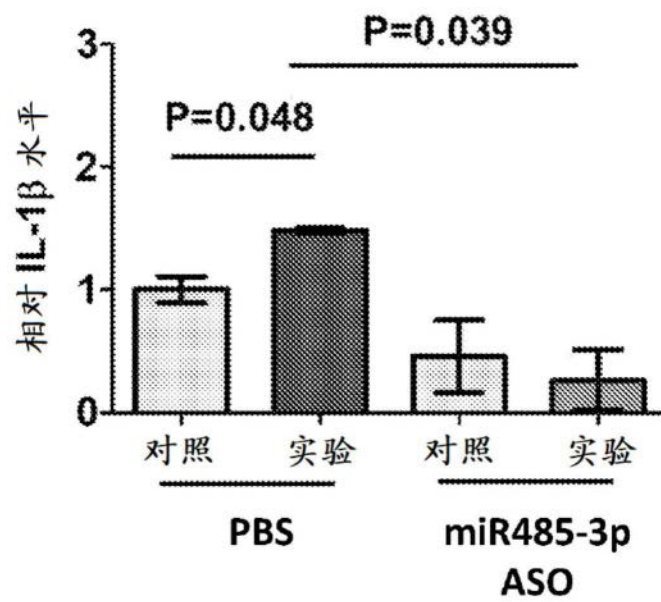


图23K

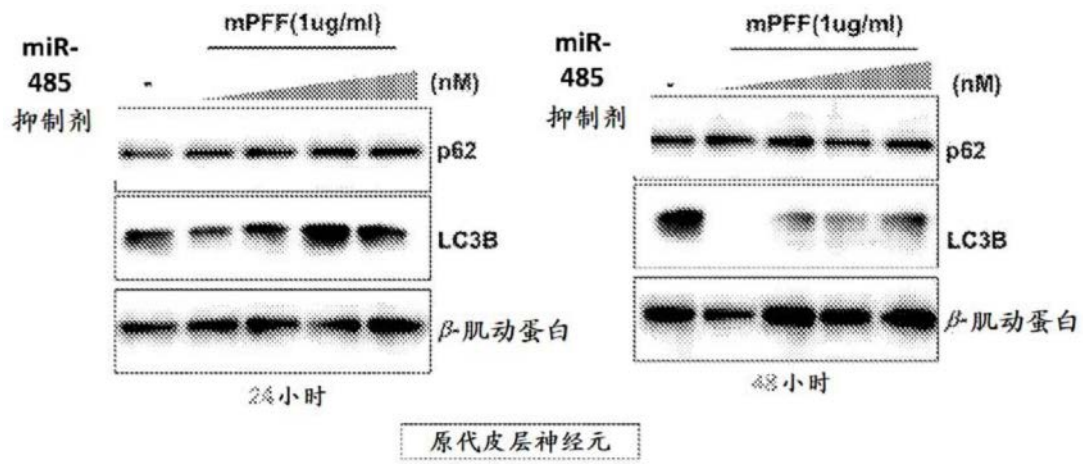


图24A

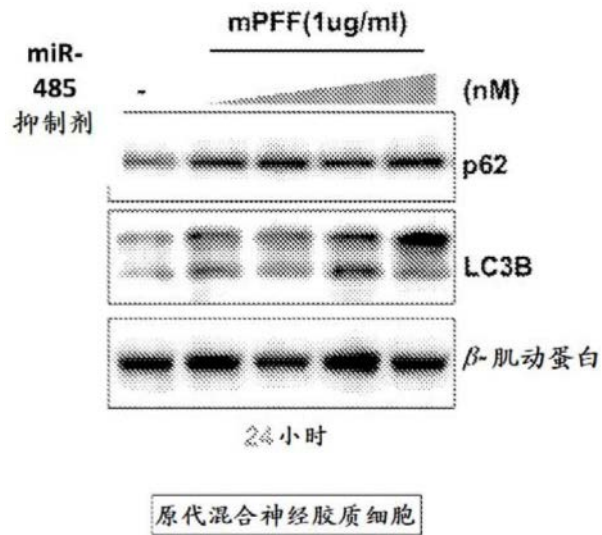


图24B

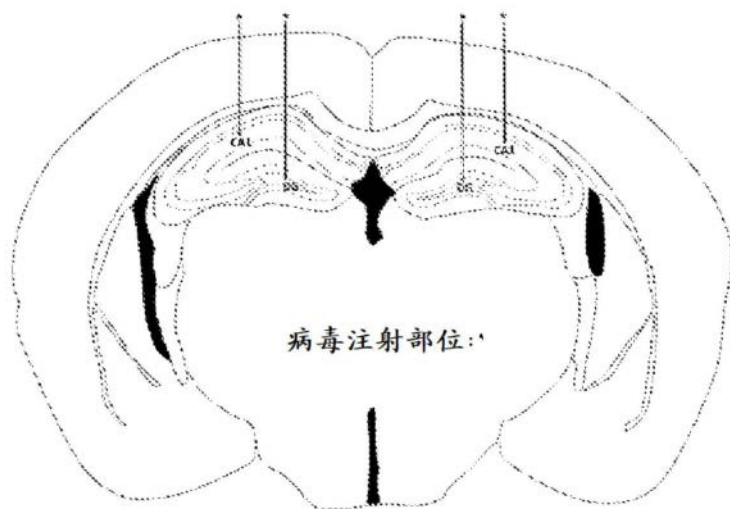


图25A

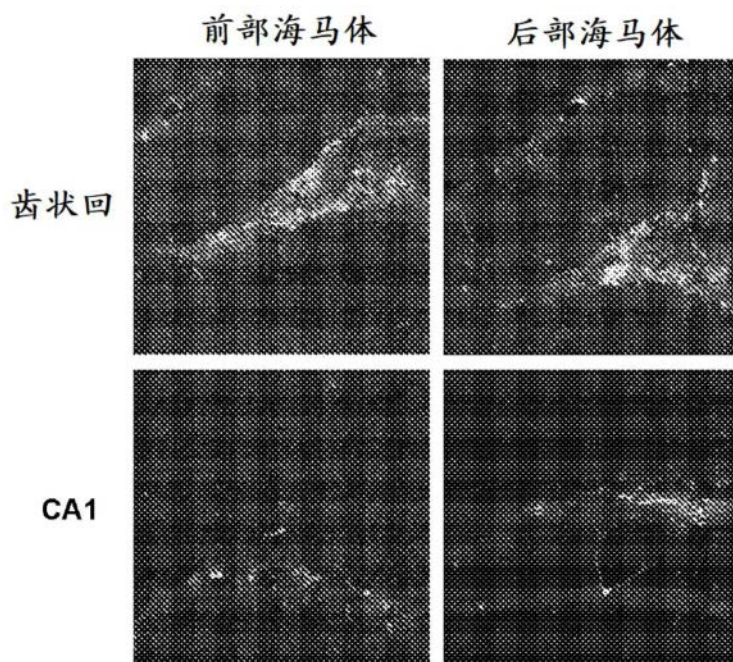


图25B

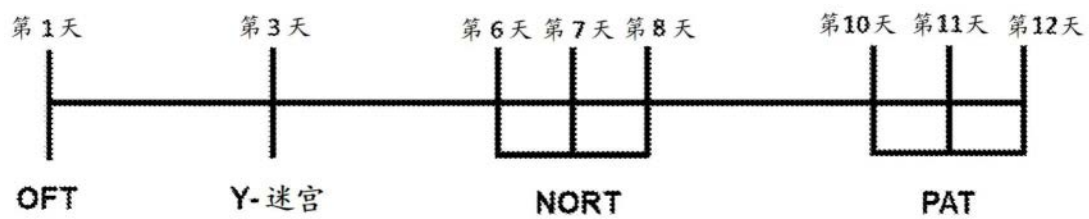


图26

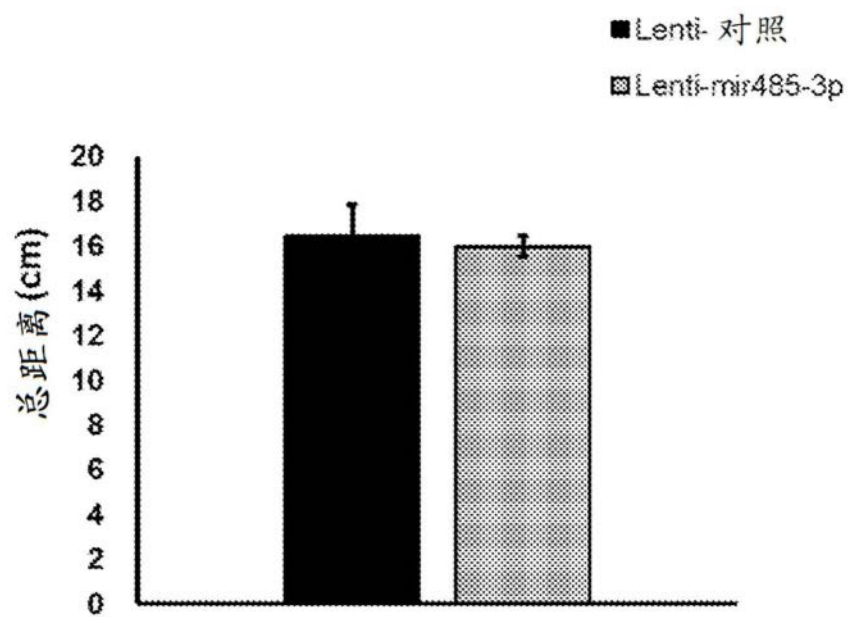


图27A

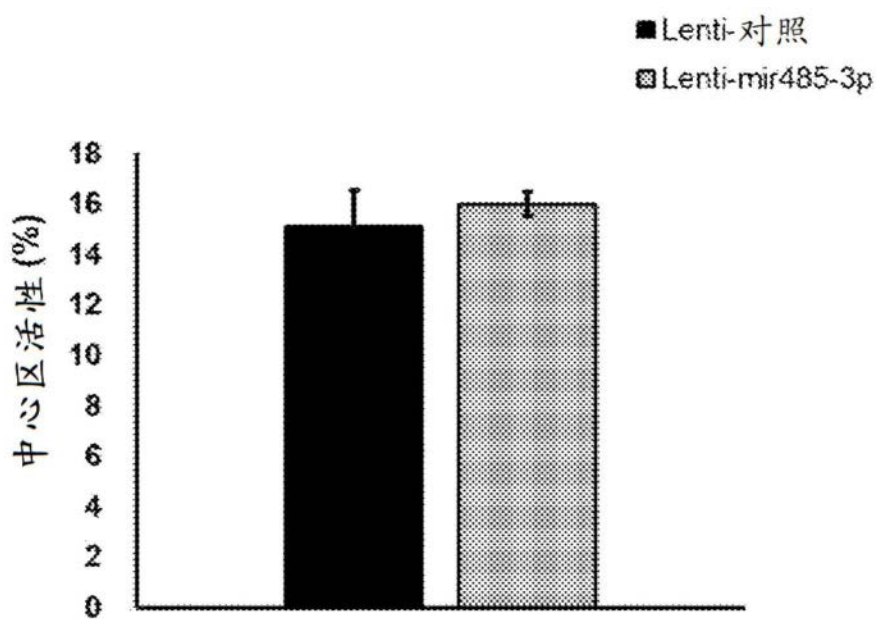


图27B

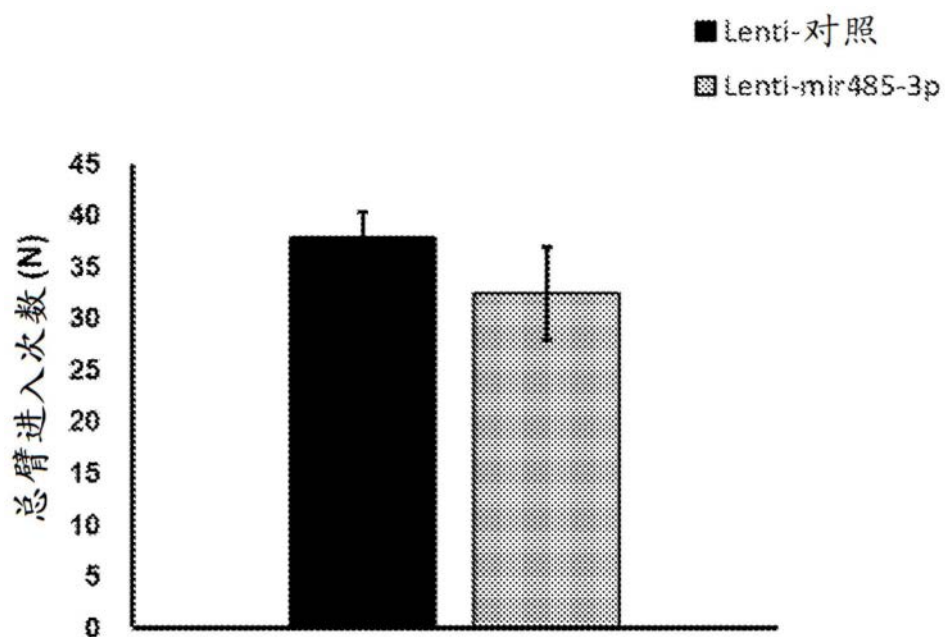


图28A

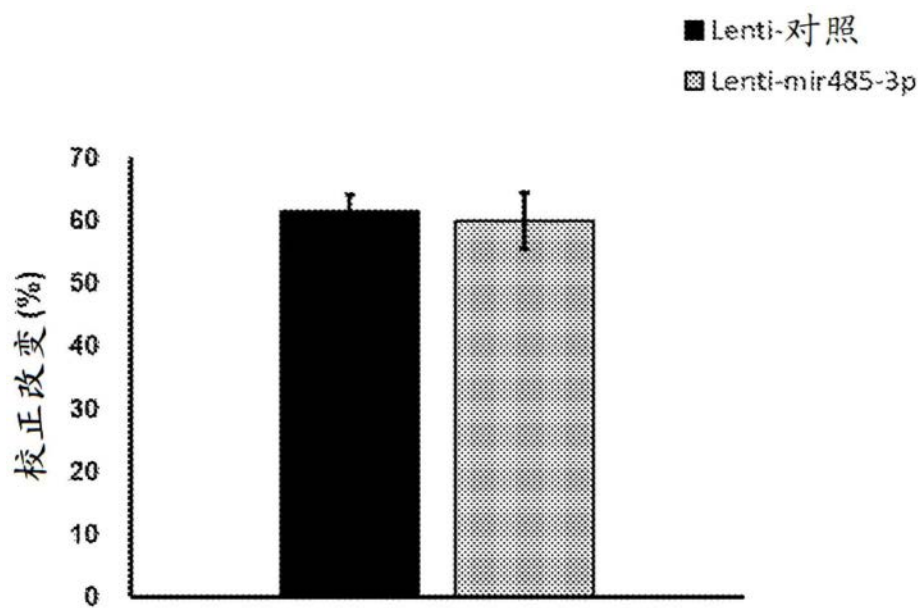


图28B

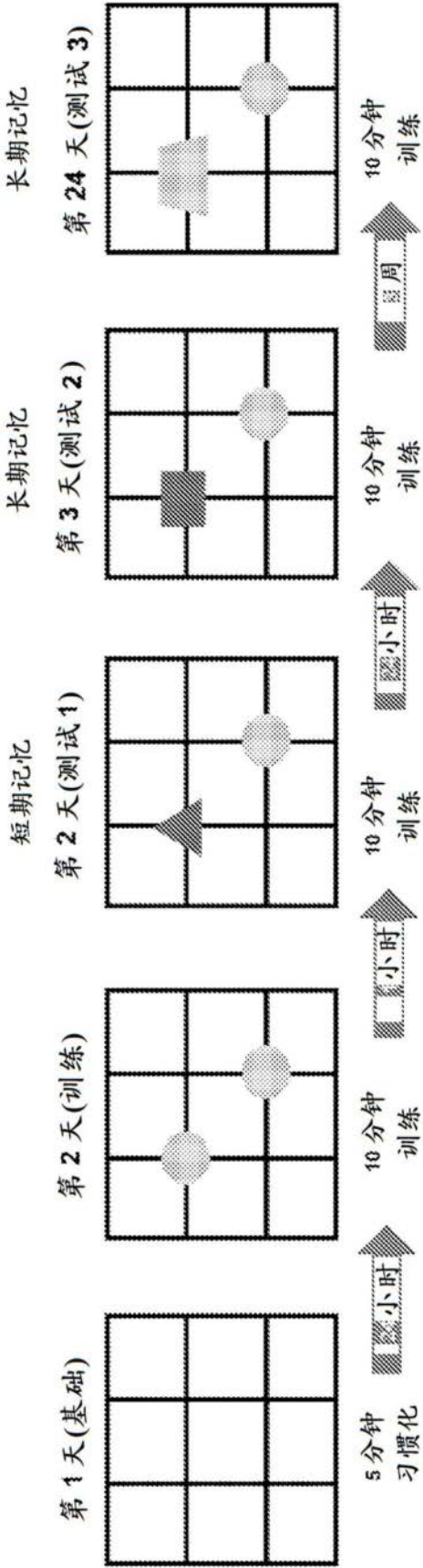


图29A

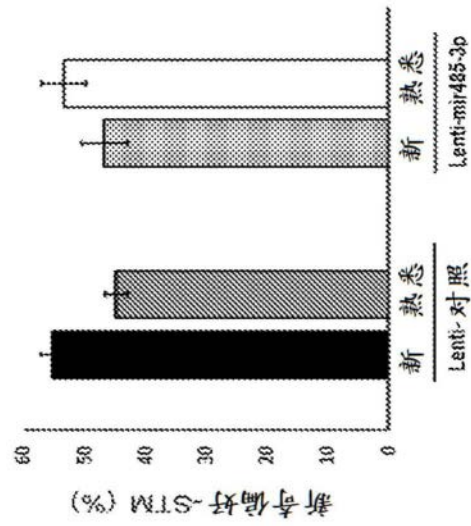


图29B

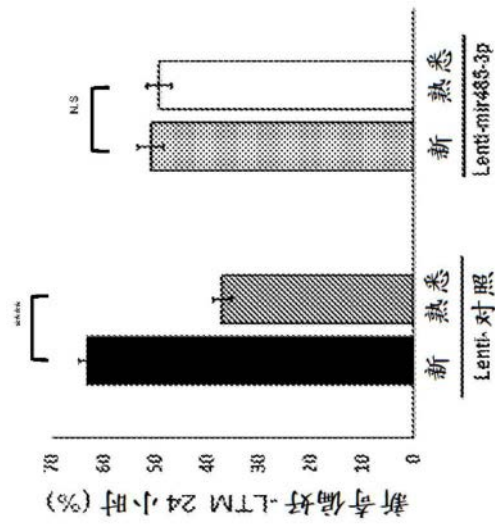


图29C

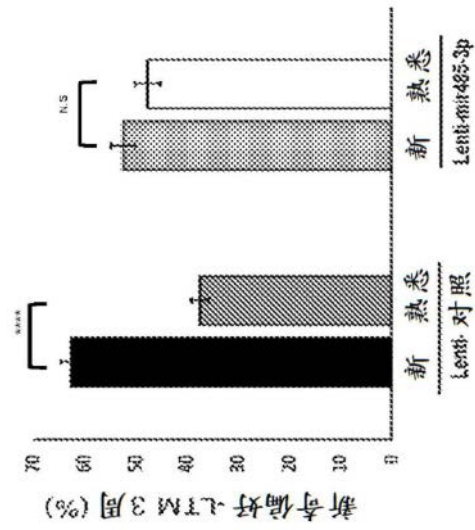


图29D

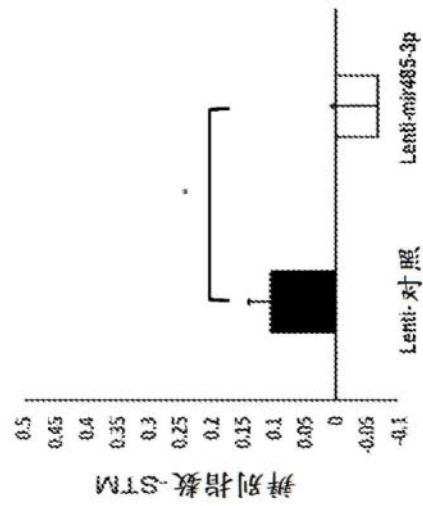


图29E

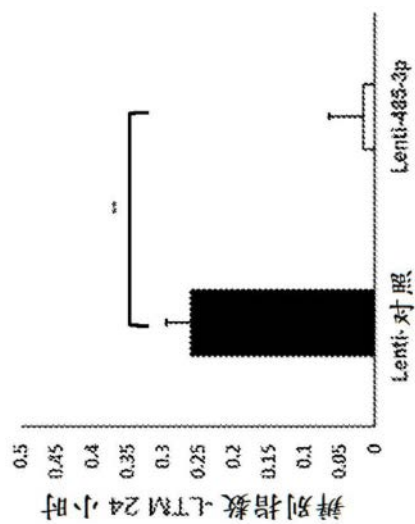


图29F

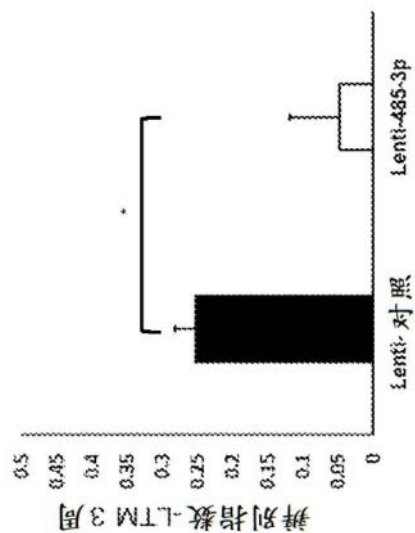


图29G

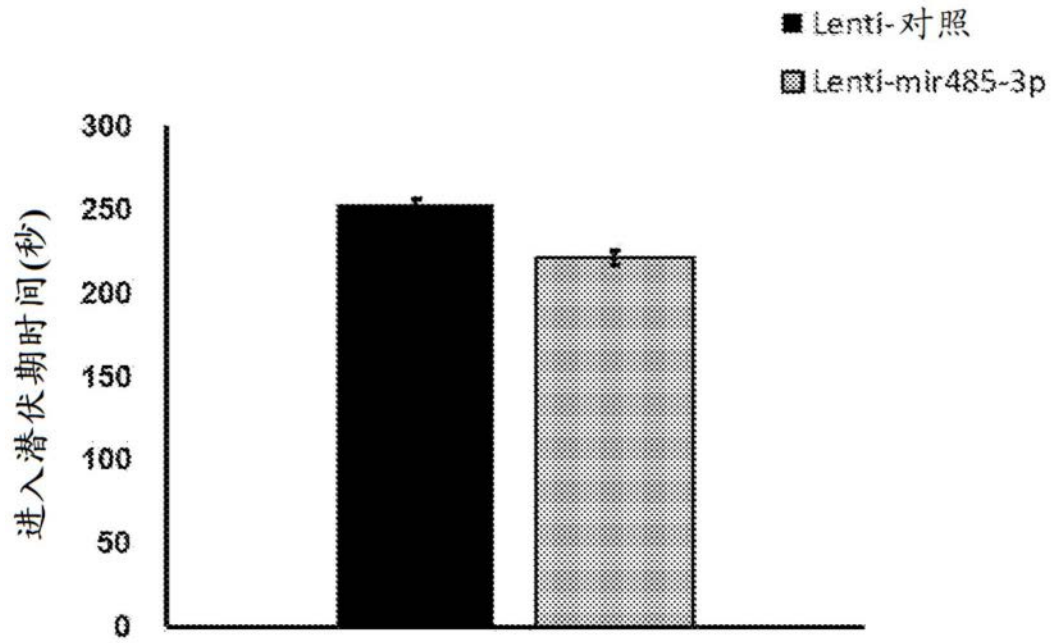


图30

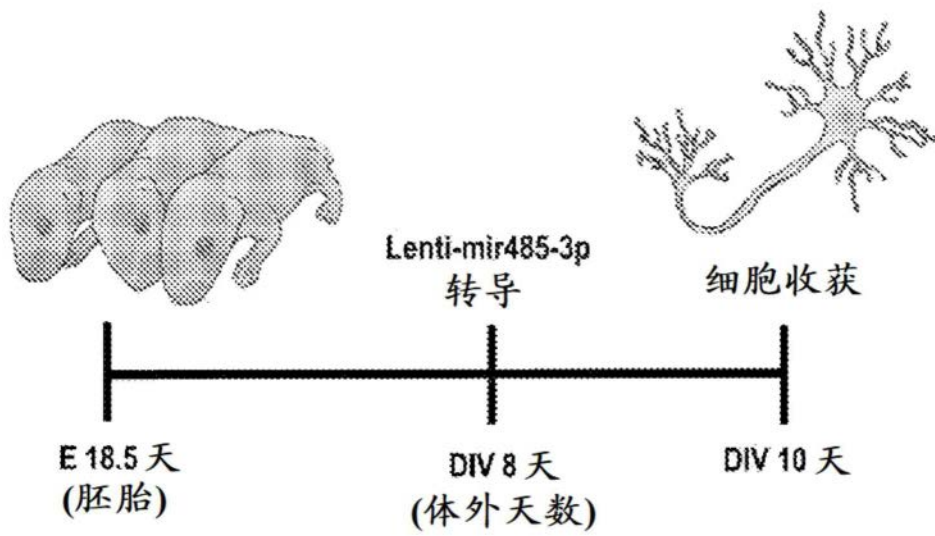


图31A

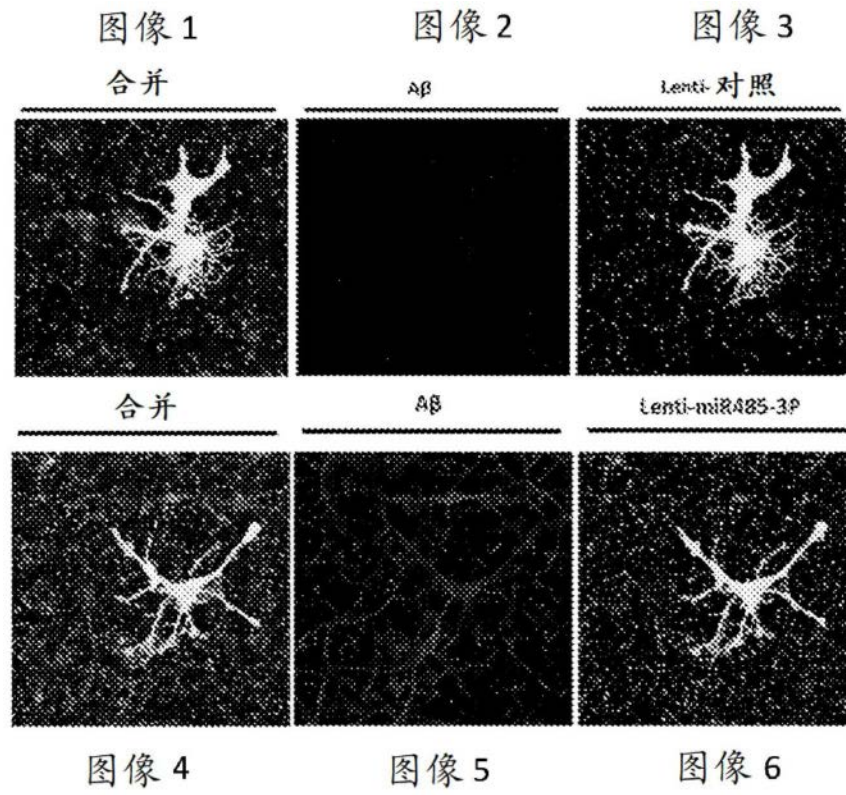


图31B

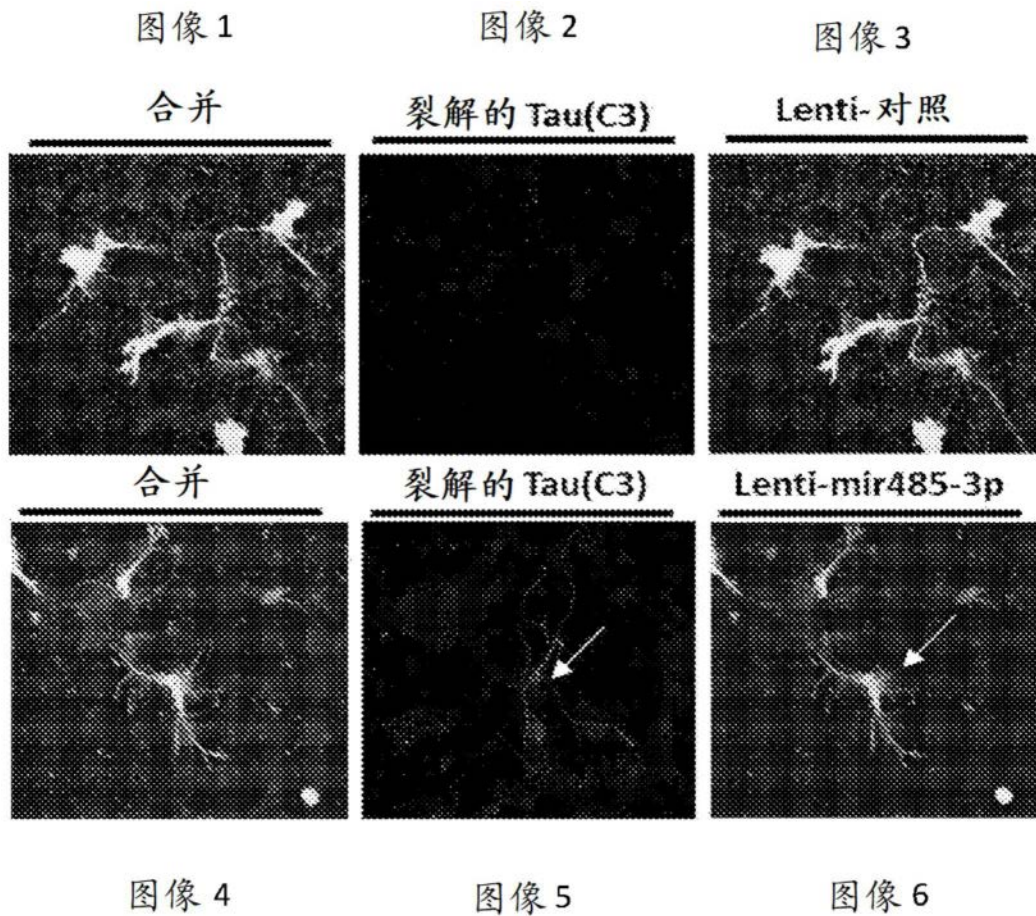
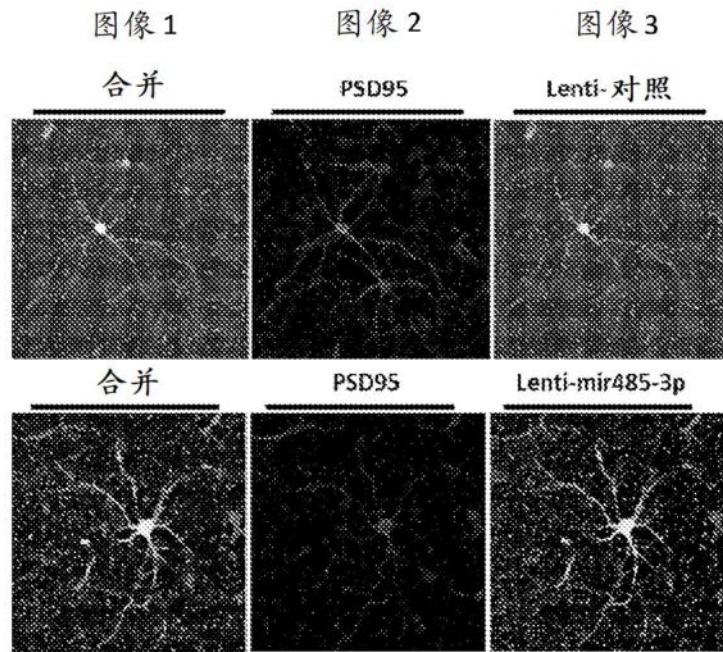


图32

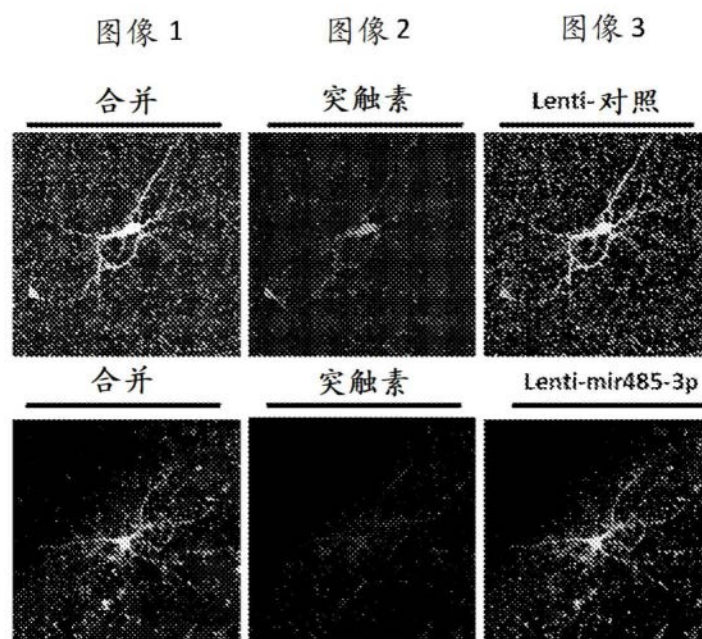


图像 4

图像 5

图像 6

图33A

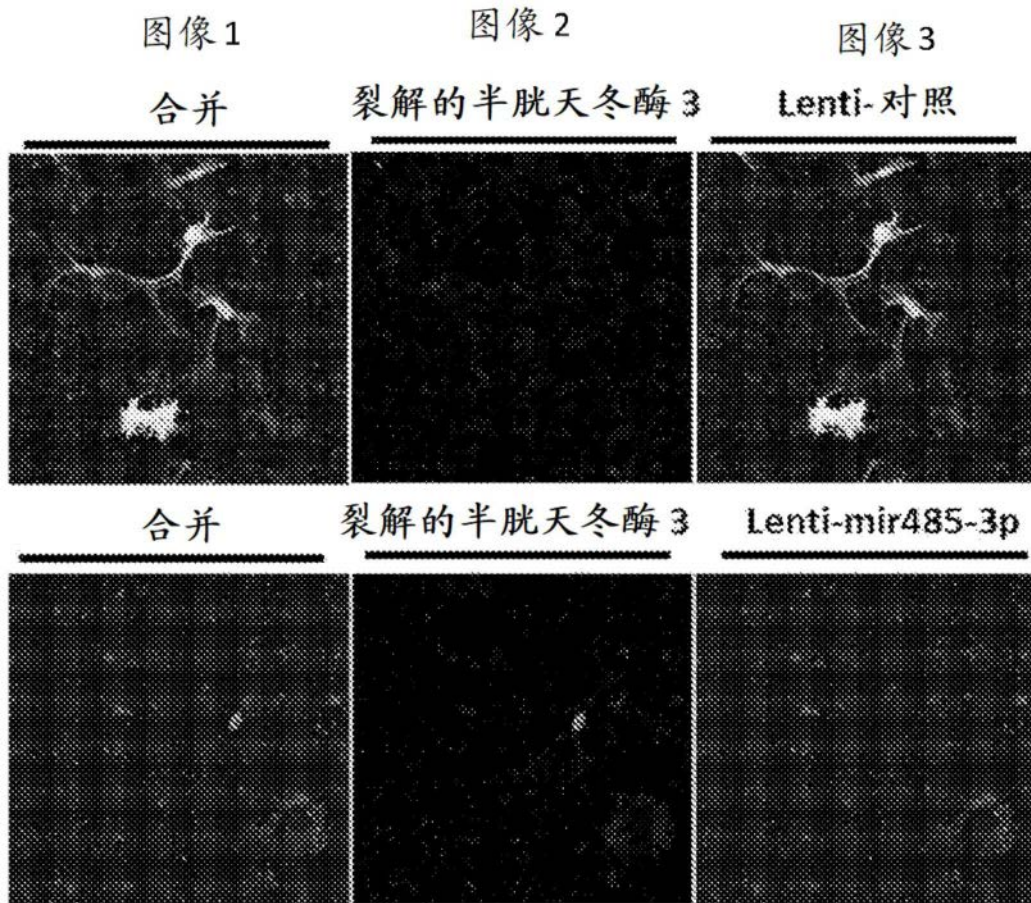


图像 4

图像 5

图像 6

图33B



图像4

图像5

图像6

图34

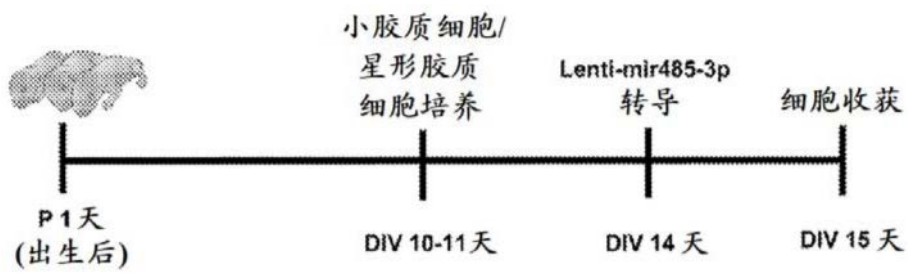


图35A

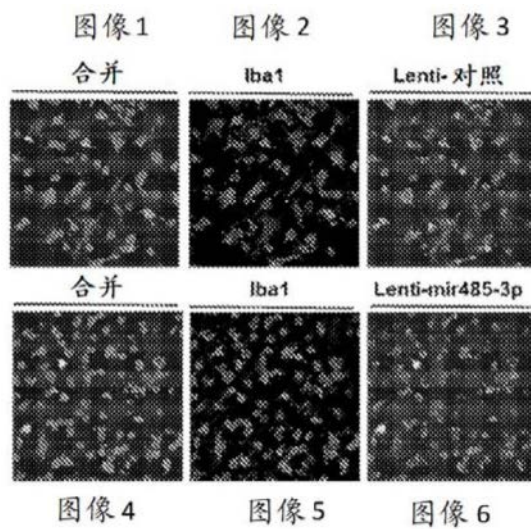


图35B

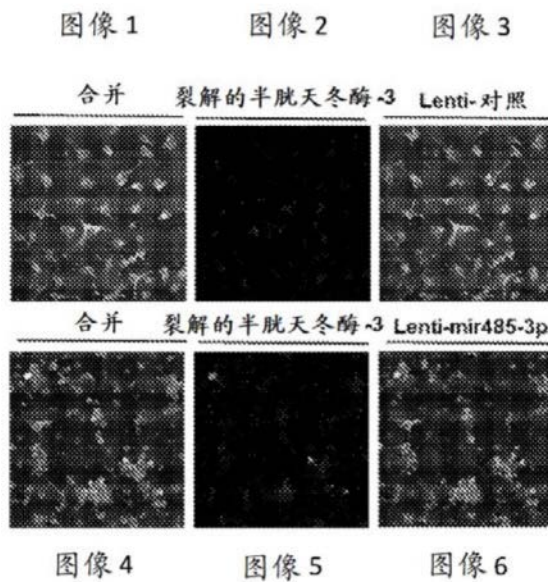


图35C

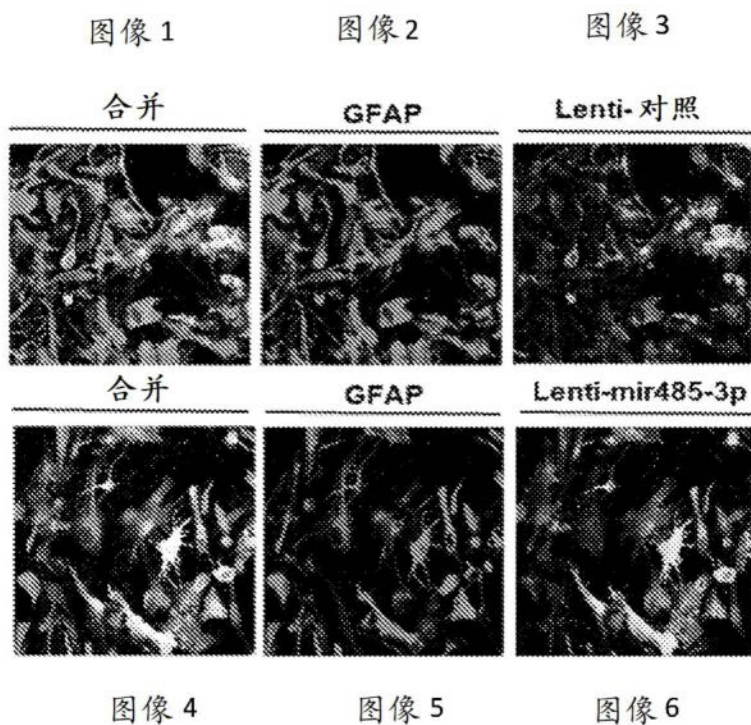


图36A

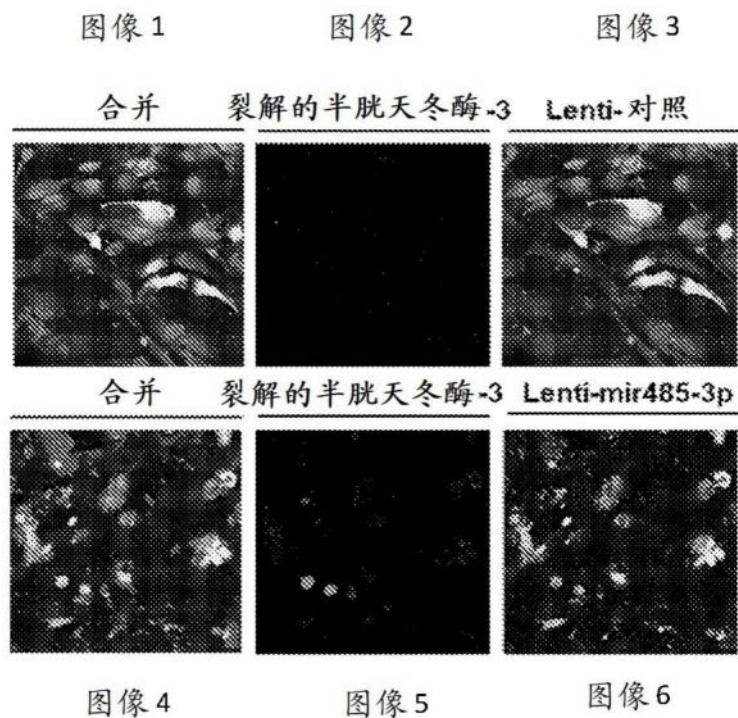


图36B

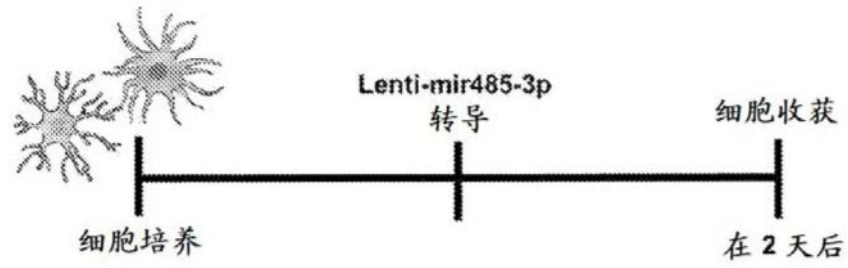


图37A

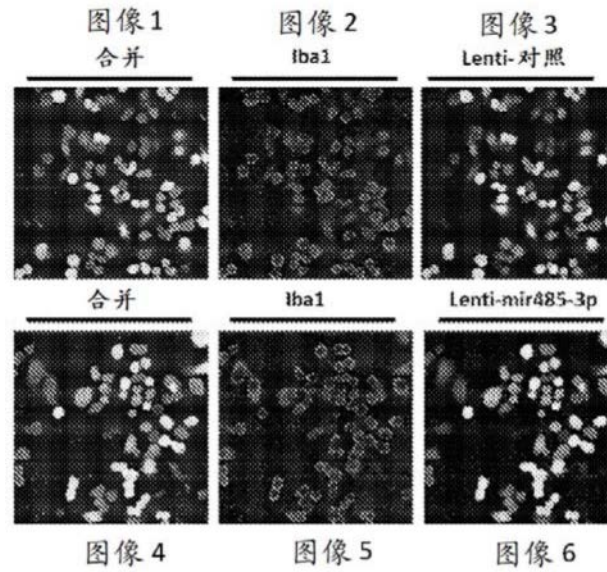


图37B

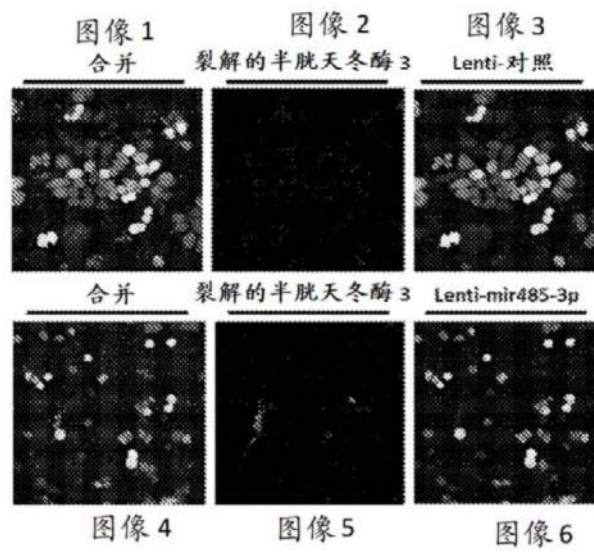


图37C

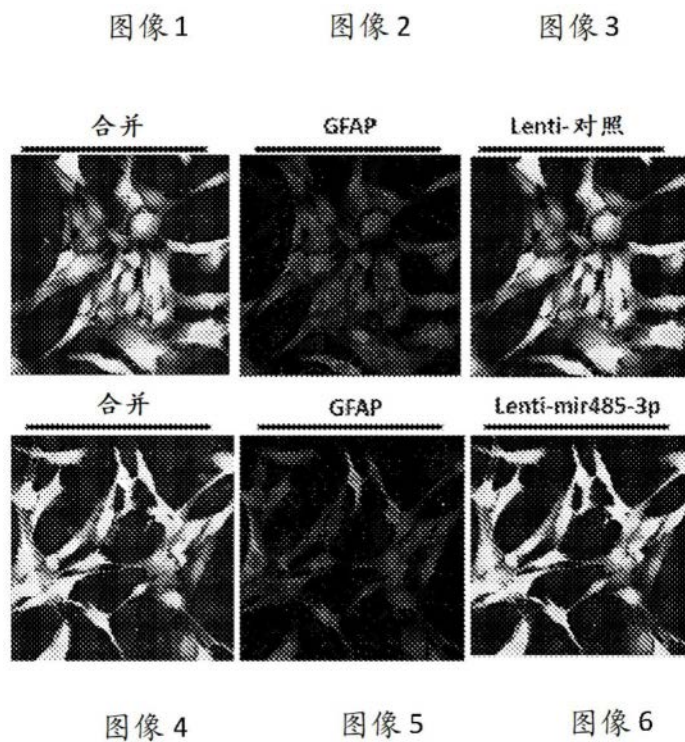


图38A

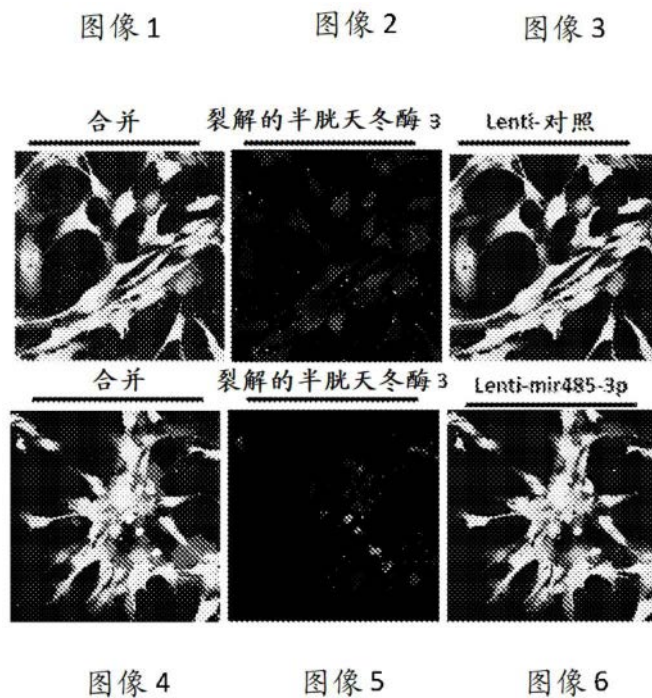


图38B

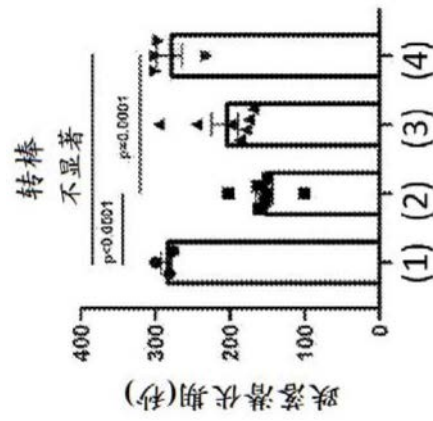


图39A

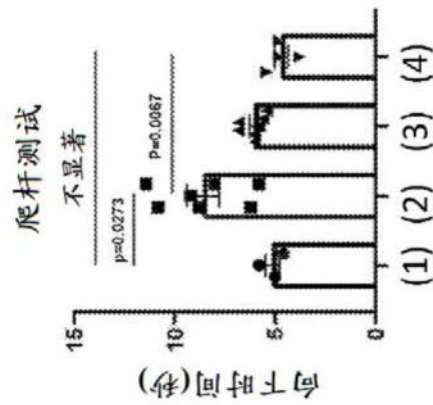


图39B

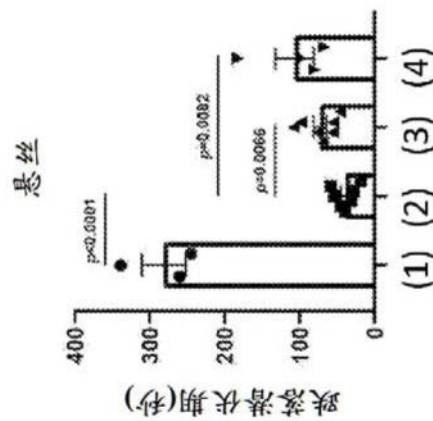


图39C

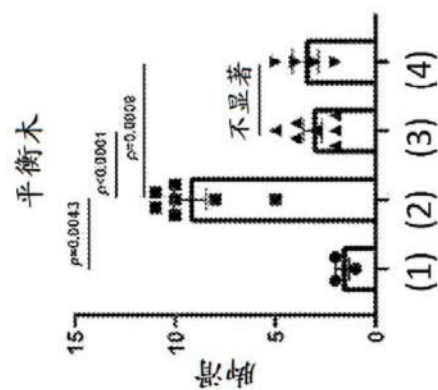


图39D

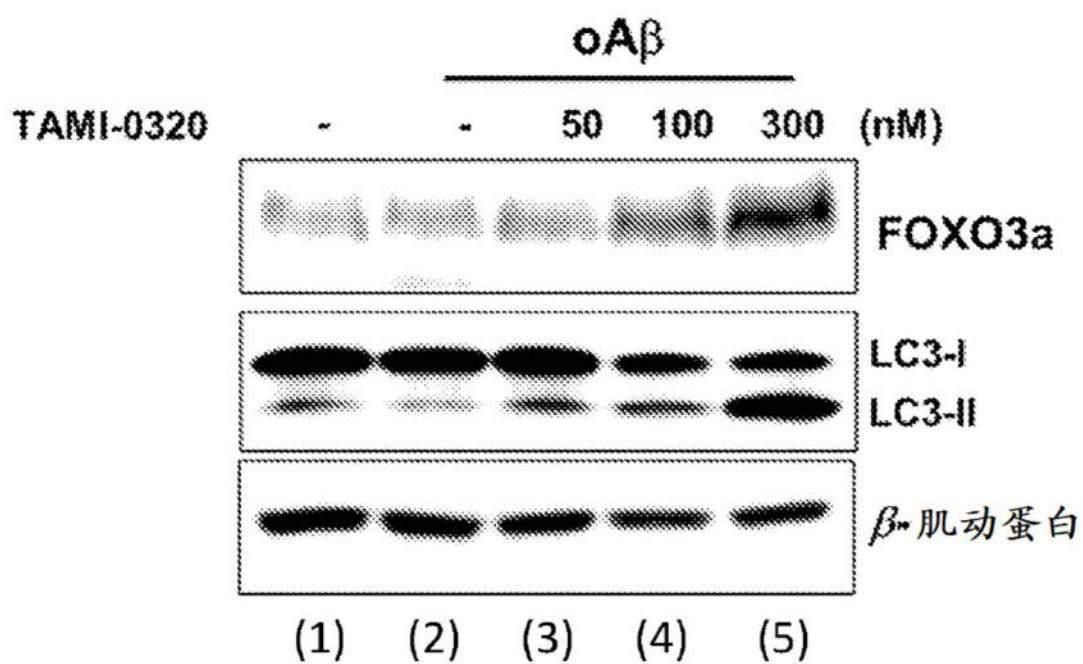


图40A

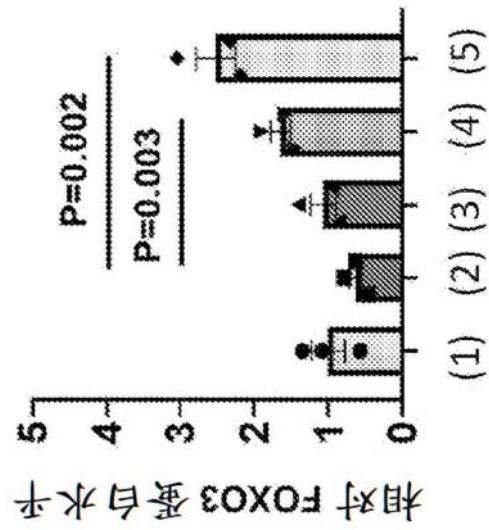


图40B

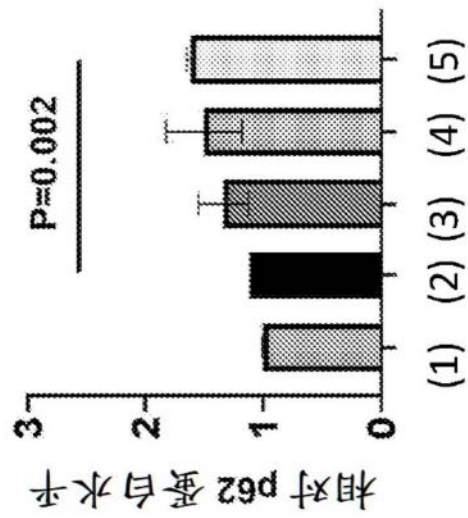


图40C

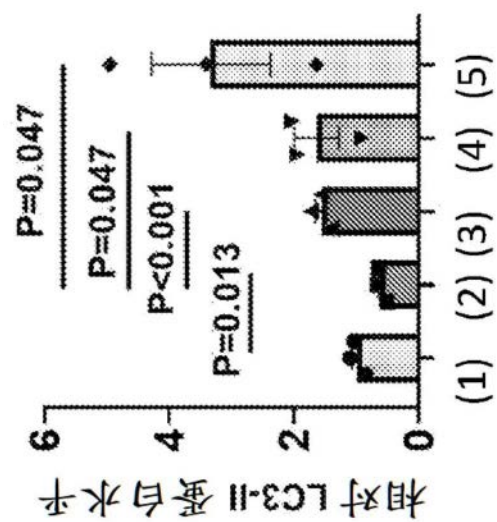


图40D