



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115917008 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 04

(21) 申请号 202180043984.X

闵贤洙 林云娜

(22) 申请日 2021.04.23

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

专利代理师 李献忠 张华

(30) 优先权数据

63/014,633 2020.04.23 US

63/047,206 2020.07.01 US

63/064,305 2020.08.11 US

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6883 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 47/69 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2021/053353 2021.04.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/214720 EN 2021.10.28

(71) 申请人 生物欧赛加有限责任公司

地址 韩国大田广域市

权利要求书8页 说明书63页

序列表46页 附图41页

(72) 发明人 柳金孝 金大勋 闵在雄 朴炳圭

(54) 发明名称

使用MIR-485-3P表达的诊断方法

(57) 摘要

本公开涉及miR-485-3p表达用于鉴定罹患认知障碍的受试者的用途。在一些方面,本文公开的方法还包括向所述受试者施用miR-485-3p抑制剂,其中所述miR-485-3p抑制剂能够治疗所述认知障碍。

1. 一种鉴定罹患认知障碍的人受试者的方法,所述方法包括测量源自所述受试者的上皮细胞或血清的生物样品中的miR-485-3p水平。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述生物样品是细胞外囊泡。

3. 一种鉴定罹患认知障碍的受试者的方法,所述方法包括测量从所述受试者获得的生物样品中的miR-485-3p水平,其中所述生物样品包括细胞外囊泡。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述细胞外囊泡获自所述受试者的上皮细胞。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述上皮细胞是口腔粘膜上皮细胞。

6. 如权利要求3所述的方法,其中所述细胞外囊泡获自所述受试者的血清。

7. 如权利要求2至6中任一项所述的方法,其中所述细胞外囊泡包括微囊泡。

8. 如权利要求2至6中任一项所述的方法,其中所述细胞外囊泡包括外泌体。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中与参考水平(例如,没有认知障碍的受试者中的miR-485-3p表达水平或所述受试者中患有认知障碍之前的miR-485-3p水平)相比,所述受试者中miR-485-3p的水平增加。

10. 如权利要求9所述的方法,其中与所述参考水平相比,所述受试者中miR-485-3p的水平增加至少约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60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%、至少约175%、至少约200%、至少约225%、至少约250%、至少约275%或至少约300%或更多。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,所述方法还包括施用治疗所述认知障碍的疗法。

12. 一种治疗有需要的人受试者的认知障碍的方法,所述方法包括向被鉴定为在源自所述受试者的上皮细胞或血清的生物样品中与参考水平(例如,没有认知障碍的受试者中的miR-485-3p表达水平或所述受试者中患有认知障碍之前的miR-485-3p水平)相比具有增加的miR-485-3p水平的人受试者施用治疗所述认知障碍的疗法。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述生物样品是细胞外囊泡。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述细胞外囊泡获自所述受试者的上皮细胞。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述上皮细胞是口腔粘膜上皮细胞。

16. 如权利要求13所述的方法,其中所述细胞外囊泡获自所述受试者的血清。

17. 如权利要求13至16中任一项所述的方法,其中所述细胞外囊泡包括微囊泡。

18. 如权利要求13至16中任一项所述的方法,其中所述细胞外囊泡包括外泌体。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的方法,其中使用聚合酶链反应(PCR)测定测量所述生物样品中的miR-485-3p水平。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述PCR测定包括实时PCR。

21. 如权利要求19或20所述的方法,其中所述测量包括确定miR-485-3p的循环阈值(Ct)。

22. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,所述方法还包括测量关于所述受试者的附加因素,其中所述附加因素选自年龄、性别、受教育年限(EDU)、载脂蛋白E(APOE)基因型、简易精神状态检查(MMSE)得分或它们的任何组合。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述附加因素是性别和受教育年限。

24. 如权利要求22所述的方法,其中所述附加因素是性别。

25. 如权利要求22至24中任一项所述的方法,其中所述性别包括男性或女性,并且其中男性与值1相关,并且女性与值2相关。

26. 如权利要求22至25中任一项所述的方法,其中所述APOE基因型包括(i) E2/E3,其与值1相关;(ii) E3/E3,其与值1相关;(iii) E2/E4,其与值2相关;(iv) E3/E4,其与值2相关;或(v) E4/E4。

27. 如权利要求22至26中任一项所述的方法,其中所述受教育年限包括介于0与16之间的值。

28. 如权利要求22至27中任一项所述的方法,所述方法还包括使用以下公式计算所述受试者的诊断得分:

$$(\text{初始Ct} \times (\text{性别} \times V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}})) \times (\text{受教育年限} \times V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}}),$$

其中V1和V2是与所述特定附加因素相关的回归系数值。

29. 如权利要求22至27中任一项所述的方法,所述方法还包括使用以下公式计算所述受试者的诊断得分:

$$(\text{初始CT} \times (\text{年龄} \times V1_{\text{年龄}} + V2_{\text{年龄}})) \times (\text{性别} \times V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}}) \times (\text{APOE} \times V1_{\text{APOE}} + V2_{\text{APOE}}) \times (\text{MMSE} \times V1_{\text{MMSE}} + V2_{\text{MMSE}}) \times (\text{受教育年限} \times V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}}),$$

其中V1和V2是与所述特定附加因素相关的回归系数值。

30. 如权利要求22至27中任一项所述的方法,所述方法还包括使用以下公式计算所述受试者的诊断得分:

$$(\text{初始CT} \times (\text{性别} \times V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}})),$$

其中V1和V2是与所述特定附加因素相关的回归系数值。

31. 如权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述测量包括使用一种或多种miR-485-3p引物来扩增存在于所述生物样品中的miR-485-3p。

32. 一种确定罹患认知障碍的受试者中的miR-485-3p水平的方法,所述方法包括检测从所述受试者获得的生物样品中的miR-485-3p水平与参考水平(例如,没有认知障碍的受试者中的miR-485-3p表达水平或所述受试者中患有认知障碍之前的miR-485-3p水平)相比是否增加,这通过用一种或多种miR-485-3p引物扩增所述生物样品中存在的miR-485-3p来进行。

33. 如权利要求32所述的方法,其中与所述参考水平相比,所述受试者中miR-485-3p的水平增加至少约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60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%、至少约175%、至少约200%、至少约225%、至少约250%、至少约275%或至少约300%或更多。

34. 如权利要求32或33所述的方法,其中所述生物样品包括组织、细胞、血液、血清、唾液或它们的组合。

35. 如权利要求32至34中任一项所述的方法,其中所述生物样品包括细胞外囊泡。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述细胞外囊泡获自所述受试者的上皮细胞。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述上皮细胞是口腔粘膜上皮细胞。

38. 如权利要求35所述的方法,其中所述细胞外囊泡获自所述受试者的血清。

39. 如权利要求35至38中任一项所述的方法,其中所述细胞外囊泡包括微囊泡。

40. 如权利要求35至38中任一项所述的方法,其中所述细胞外囊泡包括外泌体。

41. 如权利要求31至40中任一项所述的方法,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW1 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCT) (SEQ ID NO:94)、miR-485-3p_FW2 (TCATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:95)、miR-485-3p_FW3 (CATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:96)、miR-485-3p_FW4 (CATACACGGCTCTCCTCTCTA) (SEQ ID NO:97)、miR-485-3p_FW5 (CATACACGGCTCTCGTCTC) (SEQ ID NO:98)、miR-485-3p_FW6 (CATACACGGCTCTCGTCTCTAA) (SEQ ID NO:99)、miR-485-3p_FW7 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:100)、miR-485-3p_FW8 (GTCATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:101)、miR-485-3p_FW9 (CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA) (SEQ ID NO:52)、miR-485-3p_FW10 (GTCATACACGGCTCTCCTCTG) (SEQ ID NO:102)、miR-485-3p_FW11 (TCATACACGGCTCTCCTCTCT) (SEQ ID NO:103)、miR-485-3p_FW12 (TCATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:104)、miR-485-3p_FW13 (TCATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:105)、miR-485-3p_FW14 (CATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:106)、miR-485-3p_FW15 (ATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:107) 或它们的任何组合。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW7。

43. 如权利要求41所述的方法,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW2。

44. 如权利要求41所述的方法,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW1。

45. 如权利要求41所述的方法,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW9。

46. 如权利要求32至45中任一项所述的方法,所述方法还包括施用能够治疗所述认知障碍的疗法。

47. 如权利要求11至31和46中任一项所述的方法,其中所述疗法包括miR-485-3p抑制剂。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述miR-485-3p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miR-485-3p抑制剂包含约6至约30个核苷酸的长度。

49. 如权利要求47或48所述的方法,其中所述miR-485-3p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、至少20个核苷酸;并且/或者其中所述miR-485-3p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。

50. 如权利要求47至49中任一项所述的方法,其中所述miR-485-3p抑制剂包含选自以下组成的组的核苷酸序列: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) 和 AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC (SEQ ID NO:30)。

51. 如权利要求47至49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)。

52. 如权利要求47至49中任一项所述的方法, 其中所述miR-485-3p抑制剂包含与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%同一性的核苷酸序列。

53. 如权利要求52所述的方法, 其中所述miR-485-3p抑制剂包含与5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:30) 或 5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:90) 具有至少90%同一性的核苷酸序列。

54. 如权利要求52或53所述的方法, 其中所述miR-485-3p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。

55. 如权利要求52或53所述的方法, 其中所述miR-485-3p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)。

56.如权利要求55所述的方法,其中所述miR-485-3p抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:30)。

57.如权利要求47至56中任一项所述的方法,其中所述miR-485-3p抑制剂包含至少一种经修饰的核苷酸。

58.如权利要求57所述的方法,其中所述至少一种经修饰的核苷酸包括锁核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)、阿拉伯核酸(ABA)、桥联核酸(BNA)、肽核酸(PNA)或它们的任何组合。

59.如权利要求47至57中任一项所述的方法,其中所述miR-485-3p抑制剂包含主链修饰。

60.如权利要求59所述的方法,其中所述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。

61.如权利要求47至60中任一项所述的方法,其中所述miR-485-3p抑制剂通过病毒载体递送。

62.如权利要求61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。

63.如权利要求62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。

64.如权利要求47至60中任一项所述的方法,其中所述miR-485-3p抑制剂用递送剂递送。

65.如权利要求64所述的方法,其中所述递送剂包括胶束、外泌体、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡、合成囊泡、类脂质、脂质体、脂质复合物、聚合化合物、肽、蛋白质、细胞、纳米颗粒模拟物、纳米管、缀合物或它们的任何组合。

66.如权利要求64或65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是水溶性聚合物部分;

CC是阳离子载体部分;

AM是佐剂部分;并且,

L1和L2独立地是任选的接头。

67.如权利要求66所述的方法,其中所述miRNA抑制剂和所述阳离子载体单元当混合在一起时能够相互缔合形成胶束。

68.如权利要求67所述的方法,其中所述缔合是通过共价键。

69.如权利要求67所述的方法,其中所述缔合是通过非共价键。

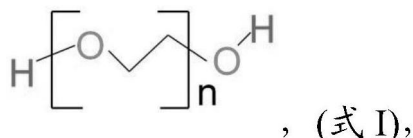
70.如权利要求69所述的方法,其中所述非共价键包括离子键。

71.如权利要求66至70中任一项所述的方法,其中所述水溶性聚合物部分包括聚(烷二醇)、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯炔醇)、聚(乙烷基吡咯烷酮)、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、聚磷腈、聚噁唑啉(“POZ”)聚(N-丙烯酰吗啉)或它们的任何组合。

72. 如权利要求66至71中任一项所述的方法,其中所述水溶性聚合物部分包括聚乙二醇(“PEG”)、聚甘油或聚(丙二醇)(“PPG”)。

73. 如权利要求66至72中任一项所述的方法,其中所述水溶性聚合物部分包含:



其中n是1-1000。

74. 如权利要求73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。

75. 如权利要求73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。

76. 如权利要求66至75中任一项所述的方法,其中所述水溶性聚合物部分是直链的、支链的或树枝状的。

77. 如权利要求66至76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。

78. 如权利要求77所述的方法,其中所述阳离子载体部分包含至少约三个、至少约四个、至少约五个、至少约六个、至少约七个、至少约八个、至少约九个、至少约十个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个、至少约40个、至少约41个、至少约42个、至少约43个、至少约44个、至少约45个、至少约46个、至少约47个、至少约48个、至少约49个或至少约50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约30至约50个碱性氨基酸。

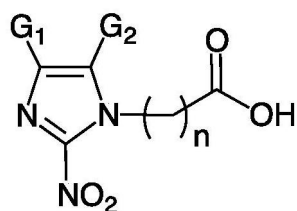
80. 如权利要求77至79中任一项所述的方法,其中所述碱性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸或它们的任何组合。

81. 如权利要求77至80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。

82. 如权利要求66至81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。

83. 如权利要求66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。

84. 如权利要求83所述的方法,其中所述佐剂部分包含:



, (式 II),

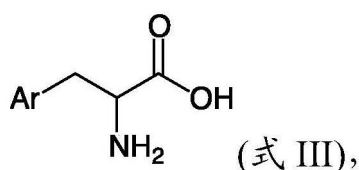
其中G1和G2各自是H、芳族环或1-10烷基,或者G1和G2一起形成芳族环,并且其中n是1-10。

85. 如权利要求83所述的方法,其中所述佐剂部分包含硝基咪唑。

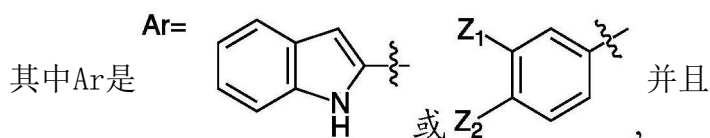
86. 如权利要求83所述的方法,其中所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼、奥硝唑、美格唑、阿扎硝唑、苄硝唑或它们的任何组合。

87. 如权利要求66至83中任一项所述的方法,其中所述佐剂部分包含氨基酸。

88. 如权利要求87所述的方法,其中所述佐剂部分包含



(式 III),

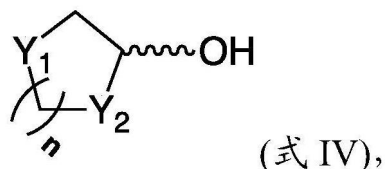


其中Z1和Z2各自是H或OH。

89. 如权利要求66至88中任一项所述的方法,其中所述佐剂部分包含维生素。

90. 如权利要求89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。

91. 如权利要求89或90所述的方法,其中所述维生素包含:



(式 IV),

其中Y1和Y2各自是C、N、O或S,并且其中n是1或2。

92. 如权利要求89至91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。

93. 如权利要求92所述的方法,其中所述维生素是维生素B3。

94. 如权利要求93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。

95. 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。

96. 如权利要求64至95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。

97.如权利要求64至96中任一项所述的方法,其中所述递送剂与所述miR-485-3p抑制剂缔合,从而形成胶束。

98.如权利要求97所述的方法,其中所述缔合是共价键、非共价键或离子键。

99.如权利要求97或98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miR-485-3p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miR-485-3p抑制剂的负电荷的离子比率是约1:1。

100.如权利要求66至99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miR-485-3p抑制剂免于酶促降解。

101.如权利要求1至100中任一项所述的方法,其中所述认知障碍与所述受试者的中枢神经系统(CNS)的区域内的淀粉样蛋白- β 累积的增加相关。

102.如权利要求101所述的方法,其中所述CNS的所述区域包括脑。

103.如权利要求1至102中任一项所述的方法,其中所述认知障碍包括阿尔茨海默氏病。

104.一种组合物,所述组合物包含miR-485-3p引物,所述引物包括miR485-3p_FW1 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCT) (SEQ ID NO:94)、miR485-3p_FW2 (TCATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:95)、miR485-3p_FW3 (CATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:96)、miR485-3p_FW4 (CATACACGGCTCTCCTCTCTA) (SEQ ID NO:97)、miR485-3p_FW5 (CATACACGGCTCTCGTCTC) (SEQ ID NO:98)、miR485-3p_FW6 (CATACACGGCTCTCGTCTCTAA) (SEQ ID NO:99)、miR485-3p_FW7 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:100)、miR-485-3p_FW8 (GTCATACACGGCTCTCCTC) (SEQ ID NO:101)、miR-485-3p_FW9 (CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA) (SEQ ID NO:52)、miR-485-3p_FW10 (GTCATACACGGCTCTCCTCTG) (SEQ ID NO:102)、miR-485-3p_FW11 (TCATACACGGCTCTCCTCTCT) (SEQ ID NO:103)、miR-485-3p_FW12 (TCATACACGGCTCTCCTC) (SEQ ID NO:104)、miR-485-3p_FW13 (TCATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:105)、miR-485-3p_FW14 (CATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:106)、miR-485-3p_FW15 (ATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:107) 或它们的任何组合。

105.如权利要求104所述的组合物,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW7。

106.如权利要求104所述的组合物,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW2。

107.如权利要求104所述的组合物,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW1。

108.如权利要求104所述的组合物,其中所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW9。

使用MIR-485-3P表达的诊断方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本PCT申请要求2020年4月23日提出申请的美国临时申请号63/014,633;2020年7月1日提出申请的美国临时申请号63/047,206;和2020年8月11日提出申请的美国临时申请号63/064,305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_025PC03_Seqlisting_ST25.txt;大小:81,709字节;和创建日期:2021年4月22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] 本公开提供鉴定罹患认知障碍(例如,阿尔茨海默氏病)的受试者的方法,所述方法包括测量受试者(例如,源自所述受试者的生物样品中)的miR-485-3p水平。本公开还提供了用于治疗被鉴定为具有miR-485-3p水平增加的受试者的认知障碍的方法。

背景技术

[0006] 认知障碍如阿尔茨海默氏病(AD)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。迄今为止,研究人员在开发能够有效抑制淀粉样蛋白- β 的产生和/或聚集和/或促进它们在人受试者中的清除的化合物(例如抗体)方面基本上没有成功。

[0007] 因此,仍然没有AD和类似认知障碍的已知治愈方法。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。此外,没有有效的早期诊断系统可用,并且因此,任何有助于缓解与认知障碍相关的一些症状的治疗选择直到病症发作很久之后才可用。而且,诊断认知障碍的可用方法通常是主观的(例如,问卷调查),可能有害(例如,使用放射性同位素进行核脑成像)和/或昂贵的。因此,非常需要治疗和/或诊断认知障碍的新的且更有效的方法。

发明内容

[0008] 本文提供了一种鉴定罹患认知障碍的人受试者的方法,所述方法包括测量源自所述受试者的上皮细胞或血清的生物样品中的miR-485-3p水平。在一些方面,所述生物样品是细胞外囊泡。

[0009] 本文还提供了一种鉴定罹患认知障碍的受试者的方法,所述方法包括测量从所述受试者获得的生物样品中的miR-485-3p水平,其中所述生物样品包括细胞外囊泡。

[0010] 在一些方面,所述细胞外囊泡获自所述受试者的上皮细胞。在一些方面,所述上皮细胞是口腔粘膜上皮细胞。在一些方面,所述细胞外囊泡获自所述受试者的血清。在某些方面,所述细胞外囊泡包括微囊泡。在一些方面,所述细胞外囊泡包括外泌体。

[0011] 在一些方面,与参考水平(例如,没有认知障碍的受试者中的miR-485-3p表达水平或所述受试者中患有认知障碍之前的miR-485-3p水平)相比,所述受试者中miR-485-3p的水平增加。在某些方面,与所述参考水平相比,所述受试者中miR-485-3p的水平增加至少约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60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%、至少约175%、至少约200%、至少约225%、至少约250%、至少约275%或至少约300%或更多。

[0012] 在一些方面,以上提供的方法还包括施用治疗所述认知障碍的疗法。

[0013] 本文提供了一种治疗有需要的人受试者的认知障碍的方法,所述方法包括向被鉴定为在源自所述受试者的上皮细胞或血清的生物样品中与参考水平(例如,没有认知障碍的受试者中的miR-485-3p表达水平或所述受试者中患有认知障碍之前的miR-485-3p水平)相比具有增加的miR-485-3p水平的人受试者施用治疗所述认知障碍的疗法。

[0014] 在一些方面,所述生物样品是细胞外囊泡。在某些方面,所述细胞外囊泡获自所述受试者的上皮细胞。在一些方面,所述上皮细胞是口腔粘膜上皮细胞。在一些方面,所述细胞外囊泡获自所述受试者的血清。在一些方面,所述细胞外囊泡包含微囊泡。在一些方面,所述细胞外囊泡包含外泌体。

[0015] 在一些方面,使用聚合酶链反应(PCR)测定测量所述生物样品中的miR-485-3p水平。在某些方面,所述PCR测定包括实时PCR。在一些方面,所述测量包括确定miR-485-3p的循环阈值(Ct)。

[0016] 在一些方面,上述方法还包括测量关于所述受试者的附加因素,其中所述附加因素选自年龄、性别、受教育年限(EDU)、载脂蛋白E(APOE)基因型、简易精神状态检查(MMSE)得分或它们的任何组合。

[0017] 在一些方面,所述附加因素是性别和受教育年限。在某些方面,所述附加因素是性别。在一些方面,所述性别包括男性或女性,并且其中男性与值1相关,并且女性与值2相关。在一些方面,所述APOE基因型包括(i) E2/E3,其与值1相关;(ii) E3/E3,其与值1相关;(iii) E2/E4,其与值2相关;(iv) E3/E4,其与值2相关;或(v) E4/E4。在一些方面,所述受教育年限包括介于0与16之间的值。

[0018] 在一些方面,所述包括测量关于所述受试者的附加因素的方法还包括使用下式计算所述受试者的诊断得分: $(\text{初始Ct} \times (\text{性别} \times V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}})) \times (\text{受教育年限} \times V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}})$,其中V1和V2是与特定附加因素相关的回归系数值。在某些方面,所述方法还包括使用下式计算所述受试者的诊断得分: $(\text{初始CT} \times (\text{年龄} \times V1_{\text{年龄}} + V2_{\text{年龄}})) \times (\text{性别} \times V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}}) \times (\text{APOE} \times V1_{\text{APOE}} + V2_{\text{APOE}}) \times (\text{MMSE} \times V1_{\text{MMSE}} + V2_{\text{MMSE}}) \times (\text{受教育年限} \times V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}})$,其中V1和V2是与特定附加因素相关的回归系数值。在某些方面,所述方法还包括使用下式计算所述受试者的诊断得分: $(\text{初始CT} \times (\text{性别} \times V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}}))$,其中V1和V2是与特定附加因素相关的回归系数值。

[0019] 在一些方面,测量受试者的所述生物样品中的miR-485-3p水平包括使用一种或多种miR-485-3p引物来扩增所述生物样品中存在的miR-485-3p。

[0020] 本文还提供了一种确定罹患认知障碍的受试者中的miR-485-3p水平的方法,所述方法包括检测从所述受试者获得的生物样品中的miR-485-3p水平与参考水平(例如,没有认知障碍的受试者中的miR-485-3p表达水平或所述受试者中患有认知障碍之前的miR-

485-3p水平)相比是否增加,这通过用一种或多种miR-485-3p引物扩增所述生物样品中存在的miR-485-3p来进行。

[0021] 在一些方面,与所述参考水平相比,所述受试者中miR-485-3p的水平增加至少约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60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%、至少约175%、至少约200%、至少约225%、至少约250%、至少约275%或至少约300%或更多。

[0022] 在一些方面,所述生物样品包括组织、细胞、血液、血清、唾液或它们的组合。在某些方面,所述生物样品是细胞外囊泡。在一些方面,所述细胞外囊泡获自所述受试者的上皮细胞。在一些方面,所述上皮细胞是口腔粘膜上皮细胞。在一些方面,所述细胞外囊泡获自所述受试者的血清。在某些方面,所述细胞外囊泡包含微囊泡。在一些方面,所述细胞外囊泡包含外泌体。

[0023] 在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW1 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCT) (SEQ ID NO:94)、miR-485-3p_FW2 (TCATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:95)、miR-485-3p_FW3 (CATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:96)、miR-485-3p_FW4 (CATACACGGCTCTCCTCTCTA) (SEQ ID NO:97)、miR-485-3p_FW5 (CATACACGGCTCTCGTCTC) (SEQ ID NO:98)、miR-485-3p_FW6 (CATACACGGCTCTCGTCTCTAA) (SEQ ID NO:99)、miR-485-3p_FW7 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:100)、miR-485-3p_FW8 (GTCATACACGGCTCTCCTC) (SEQ ID NO:101)、miR-485-3p_FW9 (CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA) (SEQ ID NO:52)、miR-485-3p_FW10 (GTCATACACGGCTCTCCTCTG) (SEQ ID NO:102)、miR-485-3p_FW11 (TCATACACGGCTCTCCTCTCT) (SEQ ID NO:103)、miR-485-3p_FW12 (TCATACACGGCTCTCCTC) (SEQ ID NO:104)、miR-485-3p_FW13 (TCATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:105)、miR-485-3p_FW14 (CATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:106)、miR-485-3p_FW15 (ATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:107)或它们的任何组合。在某些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW7。在某些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW2。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW1。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW9。

[0024] 在一些方面,本文公开的确定罹患认知障碍的受试者中的miR-485-3p水平的方法还包括施用能够治疗所述认知障碍的疗法。

[0025] 在一些方面,可与本文公开的方法组合使用的疗法包括miR-485-3p抑制剂(本文也称为“miRNA抑制剂”)。

[0026] 在一些方面,所述miR-485-3p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miR-485-3p抑制剂包含约6至约30个核苷酸的长度。在一些方面,所述miR-485-3p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;和/或所述miR-485-3p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。

[0027] 在一些方面,所述miR-485-3p抑制剂包含选自由以下组成的组的核苷酸序列: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)和5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:30)。

[0028] 在一些方面,所述miR-485-3p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)。

[0029] 在一些方面,miR-485-3p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)。

[0030] 在一些方面,所述miR-485-3p抑制剂包含至少一种经修饰的核苷酸。在一些方面,所述至少一种经修饰的核苷酸包括锁核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)、阿拉伯核酸(ABA)、桥联核酸(BNA)、肽核酸(PNA)或它们的任何组合。

[0031] 在一些方面,所述miR-485-3p抑制剂包含主链修饰。在一些方面,所述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。

[0032] 在一些方面,所述miR-485-3p抑制剂通过病毒载体递送。在一些方面,所述病毒载体是AAV、腺病毒、逆转录病毒或慢病毒。在某些方面,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。

[0033] 在一些方面,所述miR-485-3p抑制剂与递送剂一起递送。在一些方面,所述递送剂包括胶束、外泌体、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡、合成囊泡、类脂质、脂质体、脂质复合物、聚合化合物、肽、蛋白质、细胞、纳米颗粒模拟物、纳米管、缀合物、病毒载体或它们的任何组合。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

[0034] [WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (式I)

[0035] 或

[0036] [WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (式II)

[0037] 其中

[0038] WP是水溶性生物聚合物部分;

[0039] CC是带正电荷(即,阳离子)的载体部分;

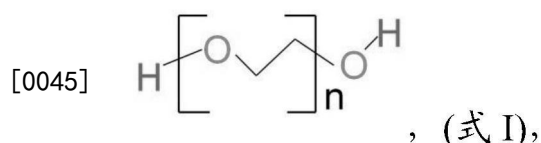
[0040] AM是佐剂部分;并且,

[0041] L1和L2独立地是任选的接头。

[0042] 在一些方面,所述miRNA抑制剂和所述阳离子载体单元当混合在一起时能够相互缔合形成胶束。在某些方面,所述缔合是通过共价键。在一些方面,所述缔合是通过非共价键。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,所述阳离子载体单元能够保护所述miRNA抑制剂免于酶促降解。

[0043] 在一些方面,所述水溶性聚合物部分包括聚(烷二醇)、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯二醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酸酰胺)、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,所述水溶性聚合物包括聚乙二醇("PEG")、聚甘油或聚(丙二醇)("PPG")。

[0044] 在一些方面,所述水溶性聚合物部分包含:



[0046] 其中n是1-1000。

[0047] 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。在某些方面,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。

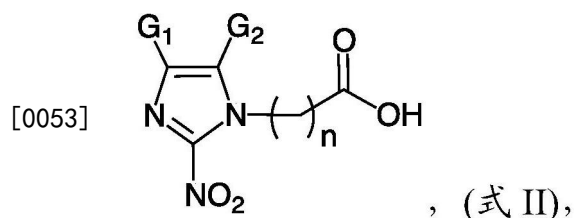
[0048] 在一些方面,所述水溶性聚合物部分是直链的、支链的或树枝状的。

[0049] 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约三个、至少约四个、至少约五个、至少约六个、至少约七个、至少约八个、至少约九个、至少约十个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个、至少约20个、至少约21个、至少约22个、至少约23个、至少约24个、至少约25个、至少约26个、至少约27个、至少约28个、至少约29个、至少约30个、至少约31个、至少约32个、至少约33个、至少约34个、至少约35个、至少约36个、至少约37个、至少约38个、至少约39个、至少约40个、至少约41个、至少约42个、至少约43个、至少约44个、至少约45个、至少约46个、至少约47个、至少约48个、至少约49个或至少约50个碱性氨基酸。

[0050] 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。

[0051] 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。

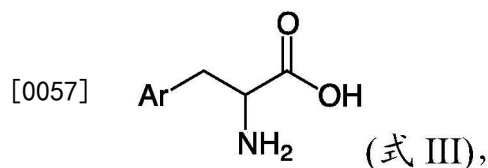
[0052] 在一些方面,所述佐剂部分包含:

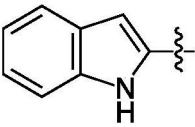
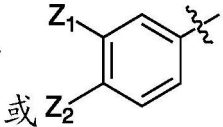
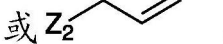


[0054] 其中G1和G2各自是H、芳族环或1-10烷基,或者G1和G2一起形成芳族环,并且其中n是1-10。

[0055] 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。

[0056] 在一些方面,所述佐剂部分包含氨基酸。在一些方面,所述佐剂部分包含

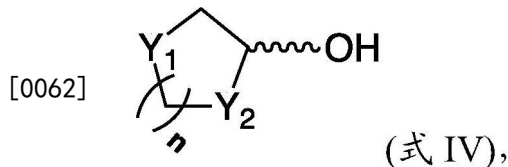


[0058] 其中Ar是  并且 , 或 ,

[0059] 其中Z1和Z2各自是H或OH。

[0060] 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。

[0061] 在一些方面,所述维生素包含:



[0063] 其中Y1和Y2各自是C、N、O或S,并且其中n是1或2。

[0064] 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。在某些方面,所述维生素是维生素B3。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 在一些方面,所述递送剂与所述miR-485-3p抑制剂缔合,从而形成胶束。在某些方面,所述缔合是共价键、非共价键或离子键。

[0068] 在一些方面,所述胶束中的阳离子载体单元和miR-485-3p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miR-485-3p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miR-485-3p抑制剂免于酶促降解。

[0069] 在一些方面,所述认知障碍与受试者的中枢神经系统(CNS)的区域内的淀粉样蛋白-β累积的增加相关。在某些方面,CNS的所述区域包括脑。在一些方面,所述认知障碍包括阿尔茨海默氏病。

[0070] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含miR-485-3p引物,所述引物包括 miR485-3p_FW1 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCT) (SEQ ID NO:94)、miR485-3p_FW2 (TCATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:95)、miR485-3p_FW3 (CATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:96)、miR485-3p_FW4 (CATACACGGCTCTCCTCTCTA) (SEQ ID NO:97)、miR485-3p_FW5 (CATACACGGCTCTCGTCTC) (SEQ ID NO:98)、miR485-3p_FW6 (CATACACGGCTCTCGTCTCTAA) (SEQ ID NO:99)、miR485-3p_FW7 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:100)、miR-485-3p_FW8 (GTCATACACGGCTCTCCTCTC) (SEQ ID NO:101)、miR-485-3p_FW9 (CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA) (SEQ ID NO:52)、miR-485-3p_FW10 (GTCATACACGGCTCTCCTCTG) (SEQ ID NO:102)、miR-485-3p_FW11 (TCATACACGGCTCTCCTCTCT)

(SEQ ID NO:103)、miR-485-3p_FW12(TCATACACGGCTCTCCTC) (SEQ ID NO:104)、miR-485-3p_FW13(TCATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:105)、miR-485-3p_FW14(CATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:106)、miR-485-3p_FW15(ATACACGGCTCTCCTCTCTAA) (SEQ ID NO:107) 或它们的任何组合。

[0071] 在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW7。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW2。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW1。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW9。

附图说明

[0072] 图1A和1B提供在检测人临床拭子样品中的淀粉样蛋白- β 累积中使用miR-485-3p表达(如用实时PCR测定所测量)的诊断准确性。图1A示出淀粉样蛋白- β 阴性样品(即,没有淀粉样蛋白- β 累积)(左)和淀粉样蛋白- β 阳性(即,有淀粉样蛋白- β 累积)(右)样品中miR-485-3p的实时PCR初始循环阈值(Ct)值的比较。如实施例1中所解释的,初始Ct值与表达值负相关(即,较高的miR-485-3p表达导致较低的初始Ct值)。使用淀粉样蛋白PET扫描测量淀粉样蛋白- β 累积。水平虚线表示淀粉样蛋白PET阴性组与阳性组之间的截止值。图1B示出在鉴定来自具有淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床拭子样品中使用miR-485-3p表达的特异性和灵敏度。接受者操作特征(ROC)分析用于测量以下值:(i)曲线下面积(AUC)、(ii)灵敏度、(iii)特异性和(iv)准确性。由箭头标识的圆点表示图1A中所示截止值的特异性和灵敏度。与圆点相关的AUC、准确性、灵敏度和特异性的数值还在图1B中提供。

[0073] 图2A和图2B展示性别和受教育年限对使用miR-485-3p表达(如用实时PCR测定所测量)来检测人临床拭子样品中的淀粉样蛋白- β 累积的诊断准确性的影响。图2A提供来自有(右)或没有(左)淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床拭子样品的得分比较。使用基于miR-485-3p的初始Ct值(参见图1A)、患者性别和患者教育水平的组合的回归建模确立得分。有关用于计算得分的特定公式,参见例如实施例2。水平虚线表示淀粉样蛋白PET阴性组与阳性组之间的截止值。图2B示出在鉴定来自具有淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床拭子样品中使用miR-485-3p表达、性别和受教育年限的组合的特异性和灵敏度。接受者操作特征(ROC)分析用于测量以下值:(i)曲线下面积(AUC)、(ii)灵敏度、(iii)特异性和(iv)准确性。由箭头标识的圆点表示图2A中所示截止值的特异性和灵敏度。与圆点相关的AUC、准确性、灵敏度和特异性的数值还在图2B中提供。

[0074] 图3A和3B展示性别、年龄、简易精神状态检查(MMSE)得分、APOE基因型和受教育年限对使用miR-485-3p表达(如用实时PCR测定所测量)来检测人临床拭子样品中的淀粉样蛋白- β 累积的诊断准确性的影响。图3A提供来自有(右)或没有(左)淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床拭子样品的得分比较。使用基于miR-485-3p的初始Ct值(参见图1A)、性别、年龄、MMSE得分、APOE基因型和受教育年限的组合的回归建模确立得分。有关用于计算得分的特定公式,参见例如实施例2。水平虚线表示淀粉样蛋白PET阴性组与阳性组之间的截止值。图3B示出在鉴定来自具有淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床拭子样品中使用miR-485-3p表达(即,初始Ct值)、性别、年龄、MMSE得分、APOE基因型和受教育年限的组合的特异性和灵敏度。接受者操作特征(ROC)分析用于测量以下值:(i)曲线下面积(AUC)、(ii)灵敏度、(iii)特异性和(iv)准确性。由箭头标识的圆点表示图3A中所示截止值的特异性和灵敏度。与圆

点相关的AUC、准确性、灵敏度和特异性的数值还在图3B中提供。

[0075] 图4提供基于临床拭子样品中的miR-485-3p表达(即,如使用实时PCR测定确定的初始Ct值)与患者的一种或多以下种临床因素:年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和MMSE得分的组的回归建模结果(即,准确性%)的比较。

[0076] 图5A和5B提供在检测人临床血浆样品中的淀粉样蛋白- β 累积中使用miR-485-3p表达(如用实时PCR测定所测量)的诊断准确性。图5A示出淀粉样蛋白- β 阴性样品(即,没有淀粉样蛋白- β 累积)(左)和淀粉样蛋白- β 阳性(即,有淀粉样蛋白- β 累积)(右)样品中miR-485-3p的实时PCR初始循环阈值(Ct)值的比较。如实施例1中所解释的,初始Ct值与表达值负相关(即,较高的miR-485-3p表达导致较低的初始Ct值)。使用淀粉样蛋白PET扫描测量淀粉样蛋白- β 累积。水平虚线表示淀粉样蛋白PET阴性组与阳性组之间的截止值。图5B示出在鉴定来自具有淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床血浆样品中使用miR-485-3p表达的特异性和灵敏度。接受者操作特征(ROC)分析用于测量以下值:(i)曲线下面积(AUC)、(ii)灵敏度、(iii)特异性和(iv)准确性。由箭头标识的圆点表示图5A中所示截止值的特异性和灵敏度。与圆点相关的AUC、准确性、灵敏度和特异性的数值还在图5B中提供。

[0077] 图6A和图6B展示性别对使用miR-485-3p表达(如用实时PCR测定所测量)来检测人临床血浆样品中的淀粉样蛋白- β 累积的诊断准确性的影响。图6A提供来自有(右)或没有(左)淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床血浆样品的得分比较。使用基于miR-485-3p的初始Ct值(参见图5A)和患者的性别的组的回归建模确立得分。有关用于计算得分的特定公式,参见例如实施例4。水平虚线表示淀粉样蛋白PET阴性组与阳性组之间的截止值。图6B示出在鉴定来自具有淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床血浆样品中使用miR-485-3p表达(即,初始Ct值)和性别的组的特异性和灵敏度。接受者操作特征(ROC)分析用于测量以下值:(i)曲线下面积(AUC)、(ii)灵敏度、(iii)特异性和(iv)准确性。由箭头标识的圆点表示图6A中所示截止值的特异性和灵敏度。与圆点相关的AUC、准确性、灵敏度和特异性的数值还在图6B中提供。图6C示出图6A和图6B中所示出的数据的归一化表达。归一化表达通过下式计算: $2^{-(\text{实时PCR的Ct值})} \times 10^{10}$ 。图6D示出基于图6A和6B中所示数据的性别拟合得分。得分是使用归一化表达值和患者特异性临床信息从回归建模方法得出的拟合值。在图6D中,用性别和归一化表达值进行建模。

[0078] 图7提供基于临床血浆样品中的miR-485-3p表达(即,如使用实时PCR测定确定的初始Ct值)与患者的一种或多以下种临床因素:年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和MMSE得分的组的回归建模结果(即,准确性%)的比较。

[0079] 图8A、8B、8C和8D分别示出miR-485-3p在用不同剂量(即0.1、0.5或1 μ M)的淀粉样蛋白- β 单体和低聚物处理的人来源的口腔上皮细胞中的表达。miR-485-3p的表达水平显示为针对对照(即,未处理的细胞)归一化(参见各图左侧所示的条形图)。在每幅图中,右侧提供的图示出miR-485-3p表达与淀粉样蛋白- β 处理剂量之间的正相关。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。在图8A和8B中,以下引物用于实时PCR测定以测量miR-485-3p表达:5'-GTCATACACGGCTCTCCTCTCT-3'(本文称为“miR-485-3p_FW1”;SEQ ID NO:94)。在图8C和8D中,使用了以下引物:5'-CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA-3'(在本文中称为“miR-485-3p_FW9”;SEQ ID NO:52)。

[0080] 图9A和9B分别示出miR-485-3p在用不同剂量(即0.1或0.5 μ M)的淀粉样蛋白- β 单

体和低聚物处理的人来源的口腔上皮细胞的上清液中的表达。miR-485-3p的表达水平显示为针对对照(即,未处理的细胞)归一化(参见各图左侧所示的条形图)。在图9A和9B中的每个图中,右侧提供的图示出miR-485-3p表达与淀粉样蛋白- β 处理剂量之间的正相关。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。

[0081] 图10A示出来自有(右) (“淀粉样蛋白PET阳性”)或没有(左) (“淀粉样蛋白PET阴性”)淀粉样蛋白- β 累积的61岁或更高患者的临床血浆样品的得分比较。p值通过非配对t检验测量。基于两组的目标微小RNA得分的ROC分析。量值是使用从标准曲线导出的回归方程的结果。图10B示出在鉴定来自具有淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床血浆样品中使用miR-485-3p表达(即,初始Ct值)和性别的组合的特异性和灵敏度。接受者操作特征(ROC)分析用于测量以下值:(i)曲线下面积(AUC)、(ii)灵敏度、(iii)特异性和(iv)准确性。由箭头标识的圆点表示图10A中所示截止值的特异性和灵敏度。

[0082] 图11A和11B示出根据阿尔茨海默病诊断的miR-485-3p表达。在被诊断患有阿尔茨海默病的患者中,仅对61岁以上的患者进行了分析。NC(n=10)是指阿尔茨海默病诊断为“NC”、PET阴性且MMSE25或更高的患者。MCI(n=4)是指阿尔茨海默病诊断为“MCI”、PET阳性且低于MMSE 25的患者。AD(n=4)是指阿尔茨海默病诊断为“AD”、PET阳性且低于MMSE 25的患者。P是指学生t检验结果的p值。

[0083] 图12A、12B和12C示出鉴定miR-485-3p作为用于诊断人受试者中淀粉样蛋白- β 累积的候选标志物。图12A提供AD患者和正常对照受试者(即,未患AD的受试者)中不同miRNA表达的比较。miRNA表达显示为AD患者与正常对照受试者之间的倍数变化(x轴)。y轴提供负log10标度的p值。每个圆圈表示个体miRNA。水平虚线表示p值为0.05。垂直虚线表示 ± 1 倍变化。图12B提供来自具有淀粉样蛋白- β 累积的个体(即,AD患者;“(1)”)和没有淀粉样蛋白- β 累积的个体(即,未患AD的受试者;“(2)”)的血浆和人口腔来源的无细胞外泌体(HOCFE)中miR-485-3p表达的比较。miR-485-3p表达被计算为 $2^{-\text{循环阈值}} \times 10^{13}$ 。“Q”是指log10(p值)。图12C提供图12B中提供的结果的特异性(y轴)和灵敏度(x轴)的比较。“AUC”是指根据ROC分析的曲线下面积。

[0084] 图13A、13B和13C提供本公开中公开的不同诊断方法的AUC的比较。在图13A中,AUC是使用仅涉及临床信息的算法生成的。在图13B中,使用涉及临床信息和miR-485-3p表达的循环阈值(Ct)的算法生成AUC。在图13C中,使用涉及临床信息和定量的miR-485-3p表达的组分的算法生成AUC。实施例1中提供了定量miR-485-3p表达的示例性方法(参见“微小RNA的定量”)。通过比较AUC,涉及不同诊断参数的算法被排序为第1、第2或第3。在每个图中,y轴提供针对每个不同诊断参数排序为第1、第2或第3的算法编号。

[0085] 图14A、14B和14C示出miR-485-3p表达(在HOCFE中测量的)与患者年龄之间的关系。在图14A中,基于淀粉样蛋白- β 累积(即,淀粉样蛋白PET阳性或淀粉样蛋白PET阴性)划分患者样品,然后随患者年龄的变化提供miR-485-3p的表达。提供了淀粉样蛋白PET阳性患者和淀粉样蛋白PET阴性患者两者的回归线。还提供了总患者群体的回归线。每个圆圈表示个体患者。图14B提供来自每个年龄组的患者的准确性和AUC值的比较。如所示,年龄组在53岁至86岁的范围内。红色虚线表示准确性和AUC值均显著较高的年龄组。顶部显示的条形图示出每个年龄组中淀粉样蛋白PET阴性(条形的浅灰色部分)和淀粉样蛋白PET阳性(条形的深灰色部分)患者的数量。图14C中所示的盒形图提供61-73岁的淀粉样蛋白PET阴性和淀粉

样蛋白PET阳性患者中miR-485-3p表达的比较。右侧的图提供特异性和灵敏度值。通过ROC分析测量AUC。

[0086] 图15A和15B示出可用于基于miR-485-3p表达诊断淀粉样蛋白- β 累积的示例性方法。图15A提供证实用于从拭子样品制备RNA的两种示例性方法的有效性的蛋白质印迹分析：(1)从细胞团块(“拭子团块”)；和(ii)从人口腔来源的无细胞外泌体(“拭子的上清液外泌体”)。为了从细胞团块制备，钙联蛋白被用作内质网(ER)的标志物。对于从人口腔来源的无细胞外泌体制备，CD81用作标志物。图15B提供使用人口腔来源的无细胞外泌体(HOCFE)中的miR-485-3p表达来诊断淀粉样蛋白- β 累积中所涉及的不同步骤的示意图。简言之，使用拭子方法收集HOCFE。然后，使用标准材料和PCR分析对miR-485-3p表达进行定量。接下来，与本文提供的一种或多种患者临床信息(例如，年龄、性别、受教育年限、MMSE得分、APOE基因型和CDR值)组合来分析miR-485-3p表达水平。所述分析通过交叉验证方法进行证实。

[0087] 图16A和16B示出患者的临床信息对使用miR-485-3p表达来诊断人受试者中淀粉样蛋白- β 累积的准确性的影响。图16A提供当患者的临床信息被单独考虑或与miR-485-3p表达组合考虑时的AUC(曲线下面积)值的比较。“CF0”仅指临床信息。“Ct值”是指使用实时PCR分析的结果，所述结果尚未使用标准材料进行定量(即，初始循环阈值)。“量”是指已使用标准材料定量的结果。“AUC”是指由特异性和灵敏度值的比较产生的曲线下面积。通过ROC分析测量AUC。图16B示出患者的年龄对使用miR-485-3p表达诊断淀粉样蛋白- β 累积的预测能力的影响。所示的不同年龄组包括：(i)60岁或以下(“ ~ 60 ”)；(ii)61-70岁(“61 $\sim$ 70”)；(iii)71-80岁(“71 $\sim$ 80”)；和(iv)81岁或以上(“81 $\sim$ ”)。顶部的条形图提供不同年龄组的准确性数据。准确性可如下确定：(患者总数-假阳性数-假阴性数)/(患者总数)。底部的条形图提供来自每个年龄组的没有淀粉样蛋白- β 累积(“1”；即淀粉样蛋白PET阴性)和有淀粉样蛋白- β 累积(“2”；即，淀粉样蛋白PET阳性)的患者中的miR-485-3p表达(量)的比较。所提供的Q值是指如使用学生t检验测量的p值的负 $\log_{10}$ 。沿x轴的“计数”是指来自每个年龄组的淀粉样蛋白PET阴性或淀粉样蛋白PET阳性患者的样品数。

[0088] 图17A、17B、17C和17D示出miR-485-3p表达准确地诊断特定年龄组内的患者中的淀粉样蛋白- β 累积的能力。在图17A和17B中，年龄组在60岁至约90岁的范围内。在图17C和17D中，年龄组在约50岁至约85岁的范围内。在图17A和17C中，为患者提供随年龄变化的准确性和AUC值。注意准确性和AUC值两者处于显著高水平的年龄组。顶部显示的条形图示出每个年龄组中淀粉样蛋白PET阴性(条形的浅灰色部分)和淀粉样蛋白PET阳性(条形的深灰色部分)患者的数量。在图17B和17D中提供年龄小于73岁(图17B)或大于68岁(图17D)的淀粉样蛋白PET阴性和淀粉样蛋白PET阳性患者中miR-485-3p表达的比较。右侧的图提供特异性和灵敏度值。通过ROC分析测量AUC。

[0089] 图18A、18B、18C、18D、18E和18F分别示出以下临床信息的显著模型数(左图)、AUC(中图)和错误率(右图)：年龄、教育程度、MMSE得分、性别、APOE得分和CDR得分。结果是来自于61岁或以上患者的样品。如实施例8中进一步描述的，为了构建本公开中描述的算法，使用回归建模确定AUC和错误率，其中使用高达第11维(即，本领域中也称为阶、次或多项式)的随机抽样重复模拟100次。图中所示的结果用于确定用于构建算法的最佳回归维度(即，图中所示的白色条形)。图18A中所示的显著模型数量值是指统计上显著(即， p 值 < 0.05)的模拟(或测试)的数量。

[0090] 图19A、19B、19C、19D、19E和19F示出图18A、18B、18C、18D、18E和18F中提供的相同结果,除了所述结果是基于来自所有患者的样品(即,不限于任一年龄组)。

[0091] 图20A、20B、20C和20D示出应用不同患者的临床信息的顺序对本文公开的算法用于基于来自60岁以上患者的人临床拭子样品中的miR-485-3p表达诊断淀粉样蛋白- β 累积的诊断准确性的影响。图20A提供针对使用不同诊断参数的各种组合构建的以下算法生成的平均AUC(曲线下面积)值的比较:(i)miR-485-3p表达、年龄、性别和受教育年限(“pre-DX”);(ii)miR-485-3p表达、年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和MMSE得分(“pro-DX1”);和(iii)miR-485-3p表达、年龄、性别、受教育年限、APOE基因型、MMSE得分和CDR得分(“pro-DX2”)。“AUC”是指由特异性和灵敏度值的比较产生的曲线下面积。通过ROC分析测量AUC。图20B、20C和20D提供图20A中所示的不同算法的准确性数据,即分别pre-DX、pro-DX1和pro-DX2。在图20B、20C和20D中的每个中,y轴提供与miR-485-3p表达组合的不同类型的临床信息。箭头表示最准确的组合。方框区域内提供的信息表示将最准确组合(即,由红色箭头表示)的不同临床信息应用于算法的特定顺序。图20B、20C和20D中的y轴提供应用于算法的临床信息类型以及miR-485-3p表达的定量值。所应用的临床信息分为底线。

[0092] 图21A、21B和21C示出应用不同患者的临床信息的顺序对本文公开的算法用于基于来自小于61岁患者的人临床拭子样品中的miR-485-3p表达诊断淀粉样蛋白- β 累积的诊断准确性的影响。图21A提供使用pre-DX算法确定的准确性数据。图21B提供使用pro-DX1算法确定的准确性数据。图21C提供使用pro-DX2算法确定的准确性数据。在每个图中,y轴提供与miR-485-3p表达组合的不同类型的临床信息。箭头表示最准确的组合。方框区域内提供的信息表示将最准确组合(即,由红色箭头表示)的不同临床信息应用于算法的特定顺序。

[0093] 图22A和22B分别提供以下算法的AUC和准确性值的比较:(i)pre-DX,(ii)pro-DX1,和(iii)pro-DX2。图22C提供不同临床信息如何影响算法准确性的比较。对准确性的影响显示为准确性校正率,其比较有和没有沿x轴指示的特定临床信息的算法的准确性。图22A、22B和22C中所示的结果是基于来自61岁及以上患者的样品。图22D和22E分别提供图22A和22B中所示的相同结果,除了所述结果是基于来自所有患者的样品(即,不限于某一年龄组)。图22F提供图22C中所示的相同结果,除了所述结果是基于来自所有患者的样品(即,不限于某一年龄组)。

[0094] 图23A和23B示出K倍交叉验证后患者口腔拭子样品中的灵敏度、特异性和AUC值。使用以下算法之一确定值:(i)pre-DX(左图),(ii)pro-DX1(中图)和(iii)pro-DX2(右图)。图23A和23B中提供的结果来自两个独立的实验。

[0095] 图24A、24B、24C和24D示出来自年龄至少61岁的患者的临床拭子样品的诊断得分(左侧的条形图)。使用基于以下诊断参数的组合的回归建模生成得分:(i)miR-485-3p表达和年龄(图24A);(ii)miR-485-3p表达、年龄、性别和受教育年限(本文称为“pre-DX”) (图24B);(iii)miR-485-3p表达、年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和MMSE得分(本文称为“pro-DX1”) (图24C);(iv)miR-485-3p表达、年龄、性别、受教育年限、APOE基因型、MMSE得分和CDR得分(本文称为“pro-DX2”) (图24D)。每个患者样品基于淀粉样蛋白- β 累积进行分类:(i)没有淀粉样蛋白- β 累积(左侧条形,即淀粉样蛋白PET阴性)($n=19$);或(ii)有淀粉样蛋白- β 累积(右侧条形,即淀粉样蛋白PET阳性)($n=20$)。为了定量miR-485-3p表达,实时PCR

平均重复4.3次。穿过盒形图的水平灰色框表示灰色区域。灰色区域是将每个样品的得分的标准偏差的一半与第一截止值相加和减去的部分。在图24A、24B、24C和24D中的每个中,右侧的ROC图示出使用上述诊断参数的不同组合的特异性(y轴)和灵敏度(x轴)。接受者操作特征(ROC)分析用于测量以下值:(i)曲线下面积(AUC)、(ii)灵敏度、(iii)特异性和(iv)准确性。ROC分析的统计值是通过排除灰色区域结果生成的。退出率是不包括在灰色区域的结果在总结果中的比率。由箭头标识的圆点表示在排除灰色区域的结果中准确性最高的特异性和灵敏度。

[0096] 图25A、25B、25C和25D分别是图24A、24B、24C和24D中所示的相同结果,除了所述结果是基于来自所有患者的样品(即,不限于任一特定年龄组)。

[0097] 图26A、26B和26C示出将来自人临床拭子样品的miR-485表达与各种临床信息组合以诊断患有以下认知障碍的患者的能力:(i)正常认知(“NC”);(ii)轻度认知损害(“MCI”),和(iii)阿尔茨海默病(“AD”)。图26A提供使用基于以下参数的组合的回归建模生成的诊断得分的比较:(i)miR-485-3p表达和年龄(左起第一个条形图;“量”);(ii)miR-485-3p表达、年龄、性别和受教育年限(左起第二条形图;“pre-DX”);(iii)miR-485-3p表达、年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和MMSE得分(左起第三条形图;“pro-DX1”);和(iv)miR-485-3p表达、年龄、性别、受教育年限、APOE基因型、MMSE得分和CDR得分(左起第四条形图;“pro-DX2”)。在所示的每个“NC”和“MCI”组中,左侧的方框表示来自没有淀粉样蛋白- β 累积的患者的样品(即,淀粉样蛋白PET阴性),并且右侧的方框表示来自有淀粉样蛋白- β 累积的患者的样品(即,淀粉样蛋白PET阳性)。在“AD”组中,所有患者的淀粉样蛋白- β 累积都呈阳性(即淀粉样蛋白PET阳性)。所提供的Q值是指如使用学生t检验测量的p值的负 $\log_{10}$ 。穿过盒形图的水平灰色框表示灰色区域。灰色区域是将每个样品的得分的标准偏差的一半与第一截止值相加和减去的部分(参见方法)。每个圆圈表示个体样品。图26B提供用于基于认知障碍诊断(即,诊断为具有正常损害(“NC”)或轻度认知损害(“MCI”)预测淀粉样蛋白- β 累积的以下值的比较:(i)准确性,(ii)AUC、(iii)灵敏度和(iv)特异性。图26C提供基于图26A中描述的诊断参数的组合生成的特异性(y轴)和灵敏度(x轴)值,即(i)“量”(第一列);(ii)“pre-DX”(第二列);(iii)“pro-DX1”(第三列);和(iv)“pro-DX2”(第四列)。顶行示出来自被诊断为具有正常损害(“NC”)的患者的临床拭子样品的结果,并且底行显示来自被诊断为具有轻度认知损害(“MCI”)的患者的临床拭子样品的结果。图26C中所示的每个图中的阴影区域表示如通过ROC分析测量的AUC。由箭头标识的圆点表示在排除灰色区域的结果中准确性最高的特异性和灵敏度。

具体实施方式

[0098] 本公开大体上涉及鉴定罹患认知障碍的受试者(例如,人受试者),包括测量所述受试者(例如,生物样品,例如,源自所述受试者的细胞外囊泡中)的miR-485-3p水平。在一些方面,本文公开的方法还包括向被鉴定为罹患认知障碍的受试者施用miR-485-3p抑制剂疗法。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/或降低受试者中miR-485-3p的表达水平和/或活性。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] I. 术语

[0102] 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。

[0103] 应注意,术语“一个/种(a或an)”实体是指一个/种或多个/种所述实体;例如,“一个核苷酸序列”应理解为表示一个或多个核苷酸序列。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。

[0104] 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)。

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 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值及其每个分数,以及在此类值之间的每个子范围。任何范围的上限和下限都可以独立地包括在该范围内或从该范围中排除,并且其中包括任一个限值、两个限值都不包括或包括两个限值的每个范围也涵盖于本公开中。因此,本文所列举的范围应理解为所述范围内所有值(包括所列举端点)的简写。例如,1至10的范围被理解为包括来自由1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组中的任何数值、数值组合或子范围。

[0108] 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。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 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,它通过扩展列举的数值的上限和下限将所述范围加以修饰。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。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 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)。

[0115] 如本文所用,术语“罹患”可与术语“患有”互换使用,并且是指患有本文公开的认知障碍的状态。在一些方面,罹患认知障碍的受试者表现出与认知障碍相关的一种或多种症状(例如,阿尔茨海默氏病患者的记忆丧失)。然而,如对本领域技术人员将显而易见的,受试者不需要表现出罹患本文公开的疾病或病症的一种或多种症状(例如,可具有所述疾病或病症的遗传易感性)。

[0116] 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miRNA,例如miR-485-3p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异常miRNA(例如,miR-485-

3p) 表达水平时,受试者患有(即,罹患)所述疾病或疾患的可能性增加。在一些方面,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。

[0117] 如本文所用,术语“异常水平”是指与未患本文描述的疾病或疾患(例如,认知障碍)的参考受试者不同于(例如,增加的)水平(表达和/或活性)。在一些方面,(例如,miR-485-3p的)异常水平是指与参考受试者(例如,未患本文所述的疾病或疾患的受试者)中的相应水平相比,增加至少约0.1倍、至少约0.2倍、至少约0.3倍、至少约0.4倍、至少约0.5倍、至少约0.6倍、至少约0.7倍、至少约0.8倍、至少约0.9倍、至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约75倍、至少约100倍、至少约200倍、至少约300倍、至少约400倍、至少约500倍、至少约750倍或至少约1,000倍或更多的水平。

[0118] 如本文所用,术语“认知障碍”是指影响心理过程的任何障碍,包括但不限于记忆、学习、意识、注意力、沟通、运动协调和/或智力能力。在一些方面,认知障碍是阿尔茨海默氏病(AD)和/或轻度认知障碍(MCI)。在一些方面,“认知障碍”是指AD、MCI、健忘症、皮质基底节综合征、痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、原发性进行性失语、进行性非流畅性失语、进行性核上性麻痹、假性衰老、语义性痴呆、严重认知障碍、皮层下痴呆、血管性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或开放性进行性失语。在一些方面,认知障碍与淀粉样蛋白- β 累积相关。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 如本文所用,术语“诊断”(及其派生词)是指可用于确定或预测受试者是否罹患、患有给定疾病或疾患或处于给定疾病或疾患的风险(例如遗传易感性)、从而确定适合治疗的受试者的方法。在一些方面,治疗可以是治疗性的(例如,施用于表现出与疾病或病症相关的一种或多种症状的受试者)。在一些方面,治疗可以是预防性的(例如,施用于有风险的受试者以预防和/或减少疾病或病症的发作)。如本文所述,技术人员可基于一种或多种诊断标志物(例如,miR-485-3p)进行诊断,其中诊断标志物的存在、不存在、量或量的变化指示疾患的存在、严重程度或不存在。在一些方面,miR-485-3p表达的增加(例如,在来自受试者的生物样品中)指示认知障碍(例如,阿尔茨海默氏病)。术语“诊断”不是指以100%的准确性确定特定疾病或病症的存在或不存在的的能力,或者甚至不是指给定过程或结果更有可能发生的能力。相反,本领域技术人员将理解,术语“诊断”是指受试者中存在某种疾病或病症的可能性增加。在一些方面,术语“诊断”包括一种或多种鉴定患有认知障碍(例如,本文所述的那些)的受试者的诊断方法。

[0125] 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。

[0126] 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。

[0127] 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。如本文所用,术语“表达”可与术语“水平”互换使用。例如,在一些方面,术语“miR-485-3p表达”可与术语“miR-485-3p水平”同义。

[0128] 如本文所用,术语“细胞外囊泡”(EV)是指包含包封内部空间的膜的细胞来源的囊泡。细胞外囊泡包括直径小于其所源自的细胞的直径的所有膜结合的囊泡(例如,外泌体、纳米囊泡、微囊泡)。举例而言并且非限制性地,细胞外囊泡包括凋亡小体、细胞片段、通过直接或间接操纵(例如,通过连续挤出或用碱性溶液进行的处理)而来源于细胞的囊泡、含有小囊的胞器和由活细胞产生(例如,通过直接质膜出芽(plasma membrane budding)或晚期内体与质膜的融合)的囊泡。细胞外囊泡可源自活的或死的生物体、外植组织或器官、原核或真核细胞和/或培养的细胞。在一些方面,细胞外囊泡来源于口腔上皮细胞(例如,来自人临床拭子样品)。在一些方面,细胞外囊泡来源于血清/血浆(例如,来自人血浆样品)。在一些方面,细胞外囊泡包括外泌体、微囊泡、纳米囊泡或它们的组合。在某些方面,细胞外囊泡是外泌体。

[0129] 如本文所用,术语“外泌体”是指直径介于约20nm至约300nm之间的细胞来源的囊泡。外泌体包括其它囊泡中不存在的特定表面标志物,包括表面标志物如四次跨膜蛋白,例如CD9、CD37、CD44、CD53、CD63、CD81、CD82和CD151;靶向或粘附标志物,如整联蛋白、ICAM-1、EpCAM和CD31;膜融合标志物,如膜联蛋白、TSG101、ALIX;以及其它外泌体跨膜蛋白,如Rab5b、HLA-G、HSP70、LAMP2(溶酶体相关膜蛋白)和LIMP(溶酶体整合膜蛋白)。

[0130] 如本文所用,术语“微囊泡”(MV)是指直径大于外泌体的一类EV(即,细胞来源的囊泡)。在一些方面,微囊泡包括介于约10nm至约5,000nm之间(例如,介于约50nm与1500nm之间、介于约75nm与1500nm之间、介于约75nm与1250nm之间、介于约50nm与1250nm之间、介于约30nm与1000nm之间、介于约50nm与1000nm之间、介于约100nm与1000nm之间、介于约50nm与750nm之间等)的直径。

[0131] 如本文所用,术语“纳米囊泡”是指直径介于约20nm至约250nm之间(例如,介于约30nm至约150nm之间)的细胞来源的囊泡。

[0132] 如本文所用,术语“人口腔来源的无细胞外泌体”(HOCFE)是指从人口腔生物流体分离的纳米尺寸体(例如,外泌体)。在本公开的其它地方提供了从人拭子样品中分离HOCFE的示例性方法。

[0133] 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。

[0134] 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。

[0135] 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。

[0136] 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”。

[0137] 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%。然后比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。

[0138] 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。

[0139] 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。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 本领域技术人员将理解,用于计算序列同一性百分比的序列比对的生成不限于仅由一级序列数据驱动的二进制序列-序列比较。还应理解,序列比对可通过将序列数据与来自异构源的数据如结构数据(例如,晶体学蛋白质结构)、功能数据(例如,突变的位置)或系统发育数据整合而产生。整合异构数据以生成多重序列比对的合适程序是可在www.tcoffee.org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。

[0144] 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。

[0145] 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%。

[0146] 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。

[0147] 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。

[0148] 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,miR-485-3p抑制剂包含编码与靶miR-485-3p核酸序列至少部分互补的核苷酸分子的核苷酸序列,使得所述miR-485-3p抑制剂与所述miR-485-3p序列杂交。在一些方面,miR-485-3p抑制剂与miR-485-3p序列的杂交减少、改变和/或调节miR-485-3p的表达、功能和/或活性。

[0149] 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。

[0150] 术语“错配(mismatch)”或“错配(mismatches)”是指低聚物核碱基序列(例如,miR-485-3p抑制剂)中根据碱基配对规则与靶核酸序列(例如,miR-485-3p)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-485-3p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。

[0151] 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-485-3p抑制剂可调节(例如,降低、改变或消除)miR-485-3p表达、功能和/或活性。

[0152] 如本文用于描述循环阈值(Ct)的术语“初始”是指原始Ct值(即,直接从PCR测定测量并且没有任何进一步计算)。

[0153] “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。

[0154] 术语“药学上可接受的载体”、“药学上可接受的赋形剂”及其语法变化形式涵盖美国联邦政府的监管机构批准的或美国药典中列出的用于包括人在内的动物的任何剂,以及不会导致产生以至于禁止向受试者施用所述组合物的程度的不希望的生理效应并且不会消除所施用的化合物的生物活性和性质的任何载体或稀释剂。包括可用于制备药物组合物并且通常是安全、无毒且合乎需要的赋形剂和载体。

[0155] 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。

[0156] 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。

[0157] 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。

[0158] 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。

[0159] 在本公开的一些方面,多核苷酸可以是例如寡核苷酸,如反义寡核苷酸。在一些方面,寡核苷酸是RNA。在一些方面,RNA是合成RNA。在一些方面,合成RNA包含至少一个非天然核碱基。在一些方面,某一类别的所有核碱基已被非天然核碱基替代(例如,本文公开的多核苷酸中的所有尿苷都可被非天然核碱基,例如5-甲氧基尿苷替代)。

[0160] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换地用于指具有任何长度的氨基酸的聚合物。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。

[0161] 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。

[0162] 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。

[0163] 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。

[0164] 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。

[0165] 启动子序列通常在其3'末端上通过转录起始位点结合并且向上游(5'方向)延伸以包括启动高于背景的可检测水平转录所需要的最小数目的碱基或元件。在启动子序列内将发现转录起始位点(通常例如通过用核酸酶S1映射来限定)以及负责RNA聚合酶的结合的蛋白质结合结构域(共有序列)。在一些方面,可与本公开一起使用的启动子包括组织特异性启动子。

[0166] 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。

[0167] 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。

[0168] 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'。

[0169] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂(例如,编码包含一个或多个miR-485-3p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。

[0170] 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。

[0171] 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。

[0172] 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”。

[0173] 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。

[0174] 术语“下游”是指位于参考核苷酸序列5'的核苷酸序列。

[0175] “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。

[0176] 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。

[0177] II. 诊断方法

[0178] 本文公开了诊断有需要的受试者的认知障碍的方法。在一些方面,此类方法包括鉴定罹患认知障碍的受试者。不受任何一种理论束缚,申请人已经鉴定,患有某些认知障碍的受试者具有与未患认知障碍的那些受试者相比更高水平的miR-485-3p。因此,在一些方面,本公开提供了鉴定罹患认知障碍的受试者(例如,人受试者)的方法,其中所述方法包括测量受试者的miR-485-3p水平,其中与参考(例如,未患认知障碍的受试者中的对应值或认知障碍发作之前受试者中的对应值)相比,所述受试者的miR-485-3p水平的增加表明所述受试者罹患认知障碍。

[0179] 在一些方面,与参考(例如,未患认知障碍的受试者中的对应值或认知障碍发作之前受试者中的对应值)相比,所述受试者中的miR-485-3p水平增加至少约1%、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60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%、至少约175%、至少约200%、至少约225%、至少约

250%、至少约275%、至少约300%、至少约400%、至少约500%、至少约1,000%或更多。

[0180] 如本文所述,在一些方面,测量受试者的生物样品中的miR-485-3p水平。因此,在一些方面,鉴定罹患认知障碍的受试者的方法包括在测量miR-485-3p表达之前从所述受试者获得生物样品。在一些方面,生物样品包括可用于测量目标分子(例如,miR-485-3p)的表达水平的受试者的任何细胞、组织和/或流体。在一些方面,生物样品包括组织、细胞、血液、血清、血浆、唾液、脑脊液、玻璃体内液、尿液或它们的组合。在一些方面,生物样品源自受试者的上皮细胞。在某些方面,上皮细胞包括口腔上皮细胞,例如,如可通过拭子样品获得的那些。在一些方面,生物样品来源于受试者的血清和/或血浆。

[0181] 微小RNA(miRNA)不仅存在于许多哺乳动物细胞类型(例如,口腔上皮细胞)中,而且可通过细胞外囊泡(例如,外泌体)内的体液转运。一旦释放到细胞外流体中,外泌体就与其它细胞融合,并将它们的货物转移至受体细胞。因此,在一些方面,其中可测量miR-485-3p表达的生物样品包括细胞外囊泡。在某些方面,所述细胞外囊泡包括微囊泡。在某些方面,所述细胞外囊泡包括外泌体。在一些方面,所述细胞外囊泡包括纳米囊泡。

[0182] 如本文所述,申请人已显示出miR-485-3p表达水平与认知障碍的一种或多种特征之间的正相关。例如,在一些方面,miR-485-3p表达的增加与淀粉样蛋白- β 累积的增加相关,其可导致受试者中形成淀粉样蛋白- β 斑块。在一些方面,miR-485-3p表达水平越高,受试者中的淀粉样蛋白- β 累积越大。

[0183] 在一些方面,诊断认知障碍的方法可包括评估(例如,测量)受试者中认知障碍的一种或多种特征的存在。因此,在一些方面,本公开提供了测量有需要的受试者的认知障碍的一种或多种特征的方法,所述方法包括测量所述受试者的miR-485-3p水平,其中所述受试者的miR-485-3p水平与认知障碍的一种或多种特征正相关。在某些方面,认知障碍的一种或多种特征的存在表明受试者罹患认知障碍。在一些方面,认知障碍的一种或多种特征包括淀粉样蛋白- β 的累积。因此,在一些方面,本文公开的诊断方法可用于鉴定罹患与淀粉样蛋白- β 累积相关的认知障碍的受试者。此类认知障碍的非限制性实例包括阿尔茨海默氏病(AD)、额颞叶痴呆(FTD)、脑血管性痴呆(CVD)、轻度认知障碍(MCI)、路易体痴呆(DLB)以及它们的组合。

[0184] 在一些方面,本文公开的方法可用于鉴定罹患阿尔茨海默氏病的受试者。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。

[0185] 如对于本领域技术人员将显而易见的,受试者的miR-485-3p表达可通过本领域已知的各种方式测量。可用于测量miR-485-3p表达的测定的非限制性实例包括PCR(例如,实时PCR)、RNA印迹、液相色谱-质谱(LC-MS)、质谱(MS)、下一代测序(NGS)(例如,Ion Torrent)、nanosttring、微阵列、ELISA(适体)、RNA免疫沉淀(RIP)、RNA原位杂交、RNA荧光原位杂交(FISH)以及它们的组合。在一些方面,可使用聚合酶链反应(PCR)测定来测量miR-485-3p表达。当使用PCR测定时,在一些方面,表1(下文)中提供的任何引物可用于测量miR-485-3p表达。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW7。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW2。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_

FW1。在一些方面,所述miR-485-3p引物包括miR-485-3p_FW9。

[0186] 表1.miR-485-3p引物序列

寡核苷酸名称	序列(5'至3')
miR-485-3p_FW1	GTCATACACGGCTCTCCTCTCT (SEQ ID NO: 94)
miR-485-3p_FW2	TCATACACGGCTCTCCTCTC (SEQ ID NO: 95)
miR-485-3p_FW3	CATACACGGCTCTCCTCTC (SEQ ID NO: 96)
miR-485-3p_FW4	CATACACGGCTCTCCTCTCTA (SEQ ID NO: 97)
miR-485-3p_FW5	CATACACGGCTCTCGTCTC (SEQ ID NO: 98)
miR-485-3p_FW6	CATACACGGCTCTCGTCTCTAA (SEQ ID NO: 99)
miR-485-3p_FW7	GTCATACACGGCTCTCCTCTCTAA (SEQ ID NO: 100)
miR-485-3p_FW8	GTCATACACGGCTCTCCTC (SEQ ID NO: 101)
miR-485-3p_FW9	CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA (SEQ ID NO: 52)
miR-485-3p_FW10	GTCATACACGGCTCTCCTCTG (SEQ ID NO: 102)
miR-485-3p_FW11	TCATACACGGCTCTCCTCTCT (SEQ ID NO: 103)
miR-485-3p_FW12	TCATACACGGCTCTCCTC (SEQ ID NO: 104)
miR-485-3p_FW13	TCATACACGGCTCTCCTCTCTAA (SEQ ID NO: 105)
miR-485-3p_FW14	CATACACGGCTCTCCTCTCTAA (SEQ ID NO: 106)
miR-485-3p_FW15	ATACACGGCTCTCCTCTCTAA (SEQ ID NO: 107)

[0189] 在一些方面,使用实时PCR测定来测量(例如,受试者的生物样品中)miR-485-3p的表达。在此类方面,可通过确定miR-485-3p的循环阈值(Ct)数来评估miR-485-3p表达。如本文所用,术语“循环阈值”(Ct)是指在实时PCR测定的热循环期间由于产物形成而产生的荧光量达到高于基线值(即,超过背景水平)的固定阈值的循环数(即,扩增数)。Ct水平与样品中存在的miR-485-3p水平成反比(即,Ct水平越低,样品中存在的miR-485-3p水平越高)。

[0190] 在一些方面,与参考(例如,未患认知障碍的受试者中的对应值或认知障碍发作之前受试者中的对应值)相比,罹患认知障碍(例如,本文所述的那些)的受试者中的Ct数降低

至少约1%、至少约2%、至少约3%、至少约4%、至少约5%、至少约6%、至少约7%、至少约8%、至少约9%、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%或至少约95%或更多。

[0191] 不受任何一种理论束缚,在一些方面,本文公开的诊断方法可基于miR-485-3p表达与认知障碍的一种或多种特征(例如,淀粉样蛋白- β 累积)的存在之间的相关性来鉴定罹患认知障碍的受试者。在一些方面,miR-485-3p的水平与认知障碍的一种或多种特征的存在正相关。在某些方面,一种或多种特征的较高存在指示认知障碍的严重程度。因此,在一些方面,本公开涉及确定有需要的受试者的认知障碍的严重程度的方法,所述方法包括测量所述受试者的miR-485-3p水平,其中所述miR-485-3p水平与严重程度正相关。

[0192] 如本文所述,在一些方面,将受试者的miR-485-3p水平与关于受试者的一个或多个附加临床信息组合可提高使用miR-485-3p表达来鉴定罹患认知障碍的受试者的诊断准确性。可使用的附加临床信息的非限制性实例包括年龄、性别、受教育年限(或水平)、载脂蛋白E(APOE)基因型、简易精神状态检查(MMSE)得分、认知损害、临床痴呆评定(CDR)得分以及它们的组合。

[0193] 为了将一种或多种附加临床信息与受试者的miR-485-3p水平组合,确立不同临床信息的数值(参见,例如实施例3)。在一些方面,附加临床信息是年龄,并且与年龄相关的值是测量miR-485-3p表达时受试者的年龄。在一些方面,附加临床信息是患者的性别,其中男性与值“1”相关,并且女性与值“2”相关。在一些方面,附加临床信息是患者的总教育年限,其与范围从0-16的值相关。对于完成的学校(即,小学(elementary/primary school)、初中、高中和大学)的每一年,患者对于受教育年限获得值“1”。对于小学,患者可获得从1至6的值(即,1至6年级)。对于中学,患者可获得从1至3的附加值(即,7至9年级)。对于高中,患者可获得从1至3的附加值(即,10至11年级)。对于大学,患者可收到从1至4的附加值。例如,从4年制大学毕业的患者对于受教育年限将获得最大值16。高中毕业但未上大学的患者对于受教育年限将获得值12。没有上小学及以后的患者对于受教育年限将获得值0。

[0194] 在一些方面,附加的临床信息是患者的APOE基因型,其中(i) E2/E3=1; (ii) E3/E3=1; (iii) E2/E4=2; (iv) E3/E4=2; 和 (v) E4/E4=4。如本文所用,术语“载脂蛋白E”(APOE)是指五种主要类型的脂蛋白(A-E)之一。APOE基因以三种不同的形式(等位基因)存在-E2、E3和E4。所有人受试者继承一对APOE基因,其是这三者的某种组合。APOE e4已被描述为与迟发型阿尔茨海默氏病(即,在65岁之后发生)的风险增加相关。Liu等人,Nat Rev Neurol 9(2):106-118(Feb.2013)。

[0195] 在一些方面,附加临床信息是受试者的简易精神状态检查(MMSE)(也称为Folstein检验)得分。术语“简易精神状态检查”(MMSE)是指30分问卷,其广泛用于临床和研究环境中以测量认知障碍。Arevalo-Rodriguez等人,Cochrane Database Syst Rev(3):CD010783(2015年3月)。在一些方面,MMSE得分是基于表2(下文)中所示的类别。在某些方面,24分或更高的MMSE得分指示正常认知。在一些方面, ≤ 9 分的MMSE得分指示严重认知损害。在一些方面,10-18分的MMSE得分指示中度认知损害。在一些方面,19-23分的MMSE得分指示轻微认知损害。

[0196] 表2. 简易精神状态检查(MMSE)类别

[0197]	类别	可能的分数	说明
	时间定向	5	从最宽至最窄。时间定向与未来衰退相关。
	地点定向	5	从最宽至最窄。这有时缩小至街道，并且有时缩小至楼层。
	登记	3	重复命名提示
	注意力和计算	5	连续七点，或向后拼写“世界”。有人建议，在英语不是第一语言的群体中，连续七点可能更合适
	回忆	3	登记回忆
	语言	2	给铅笔和手表命名
	重复	1	说回一句话
	复杂命令	6	变化。可涉及所示图

[0198] 在一些方面，为了鉴定罹患认知障碍的受试者，受试者的miR-485-3p表达水平与上述附加临床信息中的一项、二项、三项、四项或全部五项（即，年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和MMSE得分）组合使用。

[0199] 在一些方面，受试者的miR-485-3p表达与上述所有五项附加临床信息组合使用。在此类方面，所述组合的诊断准确性可通过使用下式计算给定生物样品的得分来评估：（初始CT x（年龄x $V1_{\text{年龄}} + V2_{\text{年龄}}$ ））x（性别x $V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}}$ ）x（APOE x $V1_{\text{APOE}} + V2_{\text{APOE}}$ ）x（MMSE x $V1_{\text{MMSE}} + V2_{\text{MMSE}}$ ）x（受教育年限x $V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}}$ ），其中V1和V2是与特定附加临床信息相关的回归系数值（即，分别回归曲线的斜率和截距）。

[0200] 在一些方面，受试者的miR-485-3p表达与上述附加临床信息中的两项组合使用。在某些方面，附加临床信息包括性别和受教育年限。在此类方面，可通过使用下式计算给定生物样品的得分来评估组合的诊断准确性：（初始Ct x（性别x $V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}}$ ））x（受教育年限x $V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}}$ ），其中V1和V2是与特定附加临床信息相关的回归系数值。

[0201] 在一些方面，受试者的miR-485-3p表达与上述一项附加临床信息组合使用。在某些方面，附加临床信息是性别。在此类方面，可通过使用下式计算给定生物样品的得分来评估组合的诊断准确性：（初始CT x（性别x $V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}}$ ）），其中V1和V2是与特定附加临床信息相关的回归系数值。

[0202] 在一些方面，miR-485-3p表达与本文所述的一项或多项临床信息的组合的诊断准确性可使用表9中提供的任何方程（本文也称为式或算法）来评估。

[0203] 在一些方面，源自罹患认知障碍的受试者的生物样品在上述任一种组合中的得分低于参考样品（例如，来自未患认知障碍的受试者或来自认知障碍发作之前的受试者）的相应得分。在某些方面，与参考样品的相应得分相比，来自罹患认知障碍的受试者的生物样品的得分低至少约1%、至少约2%、至少约3%、至少约4%、至少约5%、至少约6%、至少约7%、至少约8%、至少约9%、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%或至少约95%或更

多。

[0204] 在一些方面,本文公开的诊断方法可与用于诊断认知障碍的其它方法组合使用。这种附加方法的非限制性实例包括脑部扫描,如计算机断层摄影术(CT)、磁共振成像(MRI)或正电子发射断层摄影术(PET)。在一些方面,本文公开的诊断方法可用于排除可引起与本文所述的认知障碍相似症状的其它医学疾患,例如中风、肿瘤、帕金森氏病、睡眠障碍、药物的副作用、感染、轻度认知损害或非阿尔茨海默氏痴呆,包括血管性痴呆。

[0205] III. 治疗方法

[0206] 本文还公开了基于本文所述的诊断治疗、控制、改善或减轻有需要的受试者的认知障碍(例如,本文描述的那些)的方法。因此,在一些方面,本文公开的方法包括向被鉴定为罹患认知障碍的受试者施用疗法。在一些方面,所述疗法能够治疗、控制、改善或减轻认知障碍。

[0207] 在一些方面,所述疗法可包括可治疗、控制、改善或减轻与本文公开的认知障碍相关的一种或多种症状的任何剂(例如,治疗剂)。与本文所述的认知障碍相关的症状的非限制性实例包括:记忆丧失、经常问相同的问题或一遍又一遍地重复相同的故事、难以识别熟悉的人和地点、难以进行判断(例如,知道在紧急情况下该怎么做)、情绪或行为的改变、视力问题、计划和执行任务(例如,遵循食谱或跟踪每月账单)的困难以及它们的组合。

[0208] 在一些方面,所述疗法包括抑制miR-485-3p活性的化合物(“miR-485-3p抑制剂”)。在本公开中的其它地方提供了与可与本文公开的方法一起使用的miR-485-3p抑制剂有关的另外公开内容(参见例如,部分IV)。

[0209] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使所述受试者中的miR-485-3p活性与参考(例如,未用所述miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中的miR-485-3p活性)相比降低至少约5%、至少约6%、至少约7%、至少约8%、至少约9%、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%或至少约95%或更多。

[0210] 在一些方面,向本文所述的受试者施用miR-485-3p抑制剂使所述受试者中的miR-485-3p表达和/或水平与参考(例如,未用所述miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中的miR-485-3p表达和/或水平)相比降低至少约5%、至少约6%、至少约7%、至少约8%、至少约9%、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%或至少约95%或更多。

[0211] 在一些方面,miR-485-3p的活性和/或表达降低可使被鉴定为罹患认知障碍的受试者中的淀粉样蛋白 β (A β)斑块负荷与参考(例如,施用前受试者中的淀粉样蛋白 β (A β)斑块负荷或未用miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中的淀粉样蛋白 β (A β)斑块负荷)相比降低。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,施用本文所述的miR-485-3p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%。

[0212] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使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抑制剂施用的相应受试者)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%。

[0213] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使记忆丧失与参考(例如,施用之前受试者中的记忆丧失或未用miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中的记忆丧失)相比减少。在一些方面,施用miR-485-3p抑制剂使记忆丧失或记忆丧失的发生风险与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者)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%。

[0214] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使记忆保持与参考(例如,施用之前受试者中的记忆保持或未用miR-485抑制剂治疗的相应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-485-3p抑制剂使记忆保持与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者)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。

[0215] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使空间工作记忆与参考(例如,施用之前受试者中的空间工作记忆或未用miR-485抑制剂治疗的相应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抑制剂施用的相应受试者)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。

[0216] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使所述受试者中清除细胞(例如,神经胶质细胞)的吞噬活性与参考(例如,施用之前受试者中的吞噬活性或未用miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中的吞噬活性)相比增加。在一些方面,施用miR-485-3p抑制剂使受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)中神经元的树突棘密度与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者)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。

[0217] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使神经发生与参考(例如,施用之前受试者中的神经发生或未用miR-485抑制剂治疗的相应受试者中的神经发生)相比增加。如本文所用,术语“神经发生”是指产生神经元的过程。神经发生涵盖神经干细胞和祖细胞的增殖,这些细胞分化成新的神经细胞类型,以及新细胞的迁移和存活。所述术语意图涵盖在正常发育过程中发生的神经发生,主要是在产前和围产期发育过程中;以及在疾病、损伤或治疗干预后发生的神经细胞再生。成人神经发生也称为“神经(nerve或neural)”再生。在一些方面,施用miR-485-3p抑制剂使受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)中的神经发生与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者)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。

[0218] 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,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂可增加所述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抑制剂施用的相应受试者)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抑制剂施用的相应受试者)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。

[0219] 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抑制剂施用的相应受试者)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。

[0220] 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抑制剂施用的相应受试者)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。

[0221] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂预防和/或抑制所述受试者中淀粉样蛋白 β 斑块负荷的发展。在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂延迟所述受试者中淀粉样蛋白 β 斑块负荷发展的开始。在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂降低发展淀粉样蛋白 β 斑块负荷的风险。

[0222] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使

所述受试者中神经元的树突棘密度与参考(例如,施用之前受试者中神经元的树突棘密度或未用miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中神经元的树突棘密度)相比增加。在一些方面,施用miR-485-3p抑制剂使受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)中神经元的树突棘密度与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者)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。

[0223] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使所述受试者中神经元的树突棘的损失与参考(例如,施用之前受试者中神经元的树突棘的损失或未用miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中神经元的树突棘的损失)相比增加。在某些方面,施用miR-485-3p抑制剂使受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)中神经元的树突棘的损失与参考(例如,未接受miR-485-3p抑制剂施用的相应受试者)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%。

[0224] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使所述受试者中的神经炎症与参考(例如,施用之前受试者中的神经炎症或未用miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中的神经炎症)相比减少。在某些方面,施用miR-485-3p抑制剂使神经炎症与参考(例如,未接受miR-485-3p抑制剂施用的相应受试者)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,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p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抑制剂施用的相应受试者)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。

[0225] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使所述受试者中的自噬增加。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。在一些方面,施用miR-485-3p抑制剂使自噬与参考(例如,未接受miR-485-3p抑制剂施用的相应受试者)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。

[0226] 在一些方面,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂使所述受试者中的突触功能与参考(例如,施用之前受试者中的突触功能)相比改善。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miR-485-3p抑制剂使受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)中的突触功能与参考(例如,未接受miR-485抑制剂施用的相应受试者)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。

[0227] 在一些方面,与参考(例如,施用之前受试者中的突触功能丧失或未用miR-485-3p抑制剂治疗的相应受试者中的突触功能丧失)相比,向受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)施用miR-485-3p抑制剂可预防、延迟和/或改善受试者中的突触功能丧失。在一些方面,施用miR-485-3p抑制剂使受试者(例如,被鉴定为患有认知障碍)中的突触功能丧失与参考(例如,相应)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%。

[0228] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p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-485-3p抑制剂通过胃肠外、肌内、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。

[0229] 在一些方面,miR-485-3p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-485-3p抑制剂。在某些方面,依序施用另外的治疗剂和miR-485-3p抑制剂。

[0230] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p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-485-3p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-485-3p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。

[0231] IV. 可用于本公开的miRNA-485-3p抑制剂

[0232] 本文公开了能够抑制miR-485-3p活性的化合物(miR-485-3p抑制剂)。在一些方面,本公开的miR-485-3p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-485-3p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-485-3p结合位点与靶miRNA核酸序列(即,miR-485-3p)至少部分互补,使得miR-485-3p抑制剂与miR-485-3p核酸序列杂交。

[0233] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂的miR-485-3p结合位点与miR-485-3p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-485-3p结合位点与miR-485-3p的核酸序列完全互补。

[0234] miR-485-3p发夹前体可产生miR-485-3p。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。

[0235] 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)。由于序列的相似性,在一些方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂能够结合来自一种或多种物种(例如,人和小鼠)的miR-485-3p。

[0236] 在一些方面,miR-485-3p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-485-3p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-485-3p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-485-3p结合位点与SEQ ID NO:1中所示的核酸序列完全互补。

[0237] 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-485-3p结合位点包含在miR-485-3p的种子序列的整个长度上完全互补(即,100%互补)的子序列。

[0238] 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。

[0239] 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-485-3p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-485-3p特异性结合。

[0240] 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。

[0241] 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。

[0242] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p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-485-3p抑制剂的长度是7个核苷酸。在其它方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂的长度是8个核苷酸。在一些方面,miR-485-3p抑制剂的长度是9个核苷酸。在一些方面,本公开的miR-485-3p抑制剂的长度是10个核苷酸。在某些方面,miR-485-3p抑制剂的长度是11个核苷酸。在其它方面,miR-485-3p抑制剂的长度是12个核苷酸。在一些方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂的长度是13个核苷酸。在某些方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂的长度是14个核苷酸。在一些方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂的长度是15个核苷酸。在其它方面,miR-485-3p抑制剂的长度是16个核苷酸。在某些方面,本公开的miR-485-3p抑制剂的长度是17个核苷酸。在一些方面,miR-485-3p抑制剂的长度是18个核苷酸。在一些方面,miR-485-3p抑制剂的长度是19个核苷酸。在某些方面,miR-485-3p抑制剂的长度是20个核苷酸。在其它方面,本公开的miR-485-3p抑制剂的长度是21个核苷酸。在一些方面,miR-485-3p抑制剂的长度是22个核苷酸。

[0243] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p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-485-3p抑制剂包含选自自由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。

[0244] 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)。

[0245] 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 5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:30)。

[0246] 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 5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:90)。

[0247] 在一些方面,本文公开的miRNA抑制剂(即,miR-485-3p抑制剂)包含与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28) 或 5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:88) 至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同一的核苷酸序列。在一些方面,miRNA抑制剂包含与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28) 或 5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:88) 具有至少90%相似性的核苷酸序列。在一些方面,所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28) 或 5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:88),具有一个取代或两个取代。在某些方面,miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:28) 或 5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3' (SEQ ID NO:88)。

[0248] 在一些方面,miR-485-3p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)。

[0249] 在一些方面,本公开的miR-485-3p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-485-3p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-485-3p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-485-3p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-485-3p抑制剂包含5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:29)。在某些方面,miR-485抑制剂包含5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3' (SEQ ID NO:30)。

[0250] 在一些方面,本公开的miR-485-3p抑制剂包含一个miR-485-3p结合位点。在其它方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂包含至少两个miR-485-3p结合位点。在某些方面,miR-485-3p抑制剂包含三个miR-485-3p结合位点。在一些方面,miR-485-3p抑制剂包含四个miR-485-3p结合位点。在一些方面,miR-485-3p抑制剂包含五个miR-485-3p结合位点。在某些方面,miR-485-3p抑制剂包含六个或更多个miR-485-3p结合位点。在一些方面,所有的miR-485-3p结合位点都是相同的。在一些方面,所有的miR-485-3p结合位点都是不同的。在一些方面,至少一个miR-485-3p结合位点是不同的。

[0251] IV.a.经化学修饰的多核苷酸

[0252] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p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”。

[0253] “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。

[0254] 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。

[0255] 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。

[0256] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485-3p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。

[0257] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485-3p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-485-3p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)。

[0258] 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。

[0259] 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。

[0260] 在一些方面,多核苷酸(例如,miR-485-3p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。

[0261] 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%。

[0262] (i) 碱基修饰

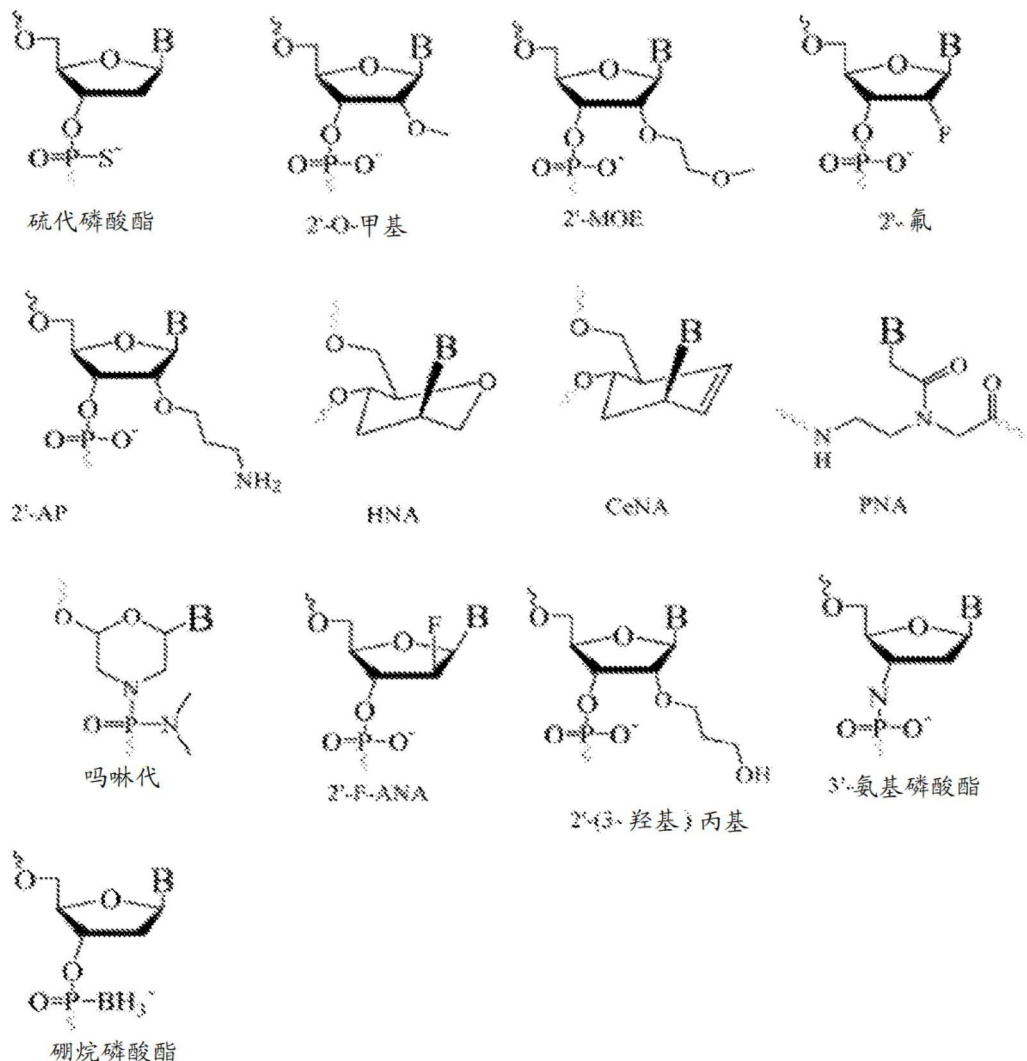
[0263] 在某些方面,化学修饰在本公开的多核苷酸(例如,miR-485-3p抑制剂)中的核碱基处。在一些方面,至少一个经化学修饰的核苷是经修饰的尿苷(例如,假尿苷(ψ)、2-硫尿苷(s2U)、1-甲基-假尿苷(m1 ψ)、1-乙基-假尿苷(e1 ψ)或5-甲氧基-尿苷(mo5U))、经修饰的胞嘧啶(例如,5-甲基-胞苷(m5C))、经修饰的腺苷(例如,1-甲基-腺苷(m1A)、N6-甲基-腺苷(m6A)或2-甲基-腺嘌呤(m2A))、经修饰的鸟苷(例如,7-甲基-鸟苷(m7G)或1-甲基-鸟苷(m1G))或它们的组合。

[0264] 在一些方面,对于特定修饰,对本公开的多核苷酸(例如,miR-485-3p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。

[0265] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485-3p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-485-3p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。

[0266] (ii) 主链修饰

[0267] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485-3p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。



[0268]

[0269] 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-485-3p抑制剂)的稳定性和对降解的抗性。

[0270] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485-3p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)。

[0271] 在一些方面,可包含在本公开的多核苷酸(即,miR-485-3p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。

[0272] (iii)糖修饰

[0273] 可并入本公开的多核苷酸(即,miR-485-3p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-485-3p抑制剂与miR-485-3p核酸序列结合的亲和力。在miR-485-3p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-485-3p抑制剂的长度和/或大小。

[0274] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485-3p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)。

[0275] 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)。

[0276] 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。

[0277] 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。

[0278] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485-3p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-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-485-3p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)。

[0279] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485-3p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-485-3p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-485-3p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。

[0280] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485-3p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。

[0281] V. 载体和递送系统

[0282] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p抑制剂可使用本领域已知的任何相关的递送系统来施用(例如,被鉴定为罹患认知障碍)。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-485-3p抑制剂的载体。

[0283] 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。

[0284] 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)。

[0285] 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载体选自自由以下组成的组: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。

[0286] 在一些方面,AAV载体源自选自自由以下组成的组的AAV载体:AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、蛙AAV、蛇AAV以及它们的任何组合。

[0287] 在一些方面,AAV载体是源自选自自由以下组成的组的至少两种AAV载体的嵌合载体:AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、蛙AAV、蛇AAV以及它们的任何组合。

[0288] 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。

[0289] 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、蛙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、蛙AAV、蛇AAV或它们的任何衍生物)的第二反向末端重复序列。

[0290] 在一些方面,AAV载体包含选自自由以下组成的组的AAV载体的一部分:AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、蛙AAV、蛇AAV以及它们的任何组合。在一些方面,AAV载体包含AAV2。

[0291] 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启动子选自自由以下组成的组:U6启动子、H1启动子、7SK启动子、5S启动子、腺病毒2(Ad2)VAI启动子以及它们的任何组合。在一些方面,启动子是巨细胞病毒立即早期基因(CMV)启动子、EF1a启动子、SV40启动子、PGK1启动子、Ubc启动子、人β肌动蛋白启动子、CAG启动子、TRE启动子、UAS启动子、Ac5启动子、多角体启动子、CaMKIIa启动子、GAL1启动子、GAL10启动子、TEF启动子、GDS启动子、ADH1启动子、CaMV35S启动子或Ubi启动子。在一个具体方面,启动子包括U6启动子。

[0292] 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,组成型启动子选自自由以下组成的组:次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、β-肌动蛋白启动子、巨细胞病毒(CMV)、猿病毒(例如,SV40)、乳头瘤病毒、腺病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、劳斯肉瘤病毒、逆转录病毒长末端重复序列(LTR)、鼠干细胞病毒(MSCV)和单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。

[0293] 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AVV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。

[0294] 在一些方面,AVV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)尾序列选自自由以下组成的组:bGH poly(A)、肌动蛋白poly(A)、血红蛋白poly(A)以及它们的任何组合。在一些方面,3'UTR poly(A)尾序列包括bGH poly(A)。

[0295] 在一些方面,本文公开的miR-485-3p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。

[0296] 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-485-3p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

[0297] [WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (式I)

[0298] 或

[0299] [WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (式II)

[0300] 其中

[0301] WP是水溶性生物聚合物部分;

[0302] CC是带正电荷(即,阳离子)的载体部分;

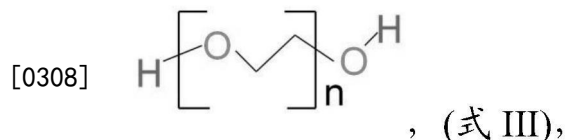
[0303] AM是佐剂部分;并且,

[0304] L1和L2独立地是任选的接头,并且

[0305] 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。因此,在一些方面,miRNA抑制剂和阳离子载体单元当混合在一起时能够彼此缔合(例如,通过共价键或非价键)以形成胶束。

[0306] 在一些方面,包含本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485-3p抑制剂)的组合物通过离子键与阳离子载体单元相互作用。

[0307] 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(烯醇)、聚甘油、聚磷脂、聚噁唑啉("POZ")聚(N-丙烯酰吗啉)或它们的任何组合。在一些方面,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:



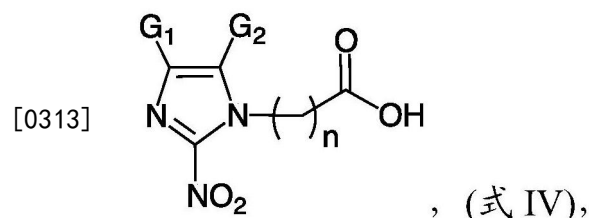
[0309] 其中n是1-1000。

[0310] 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。

[0311] 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。

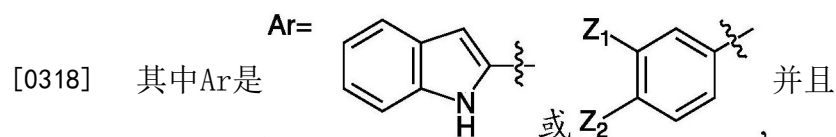
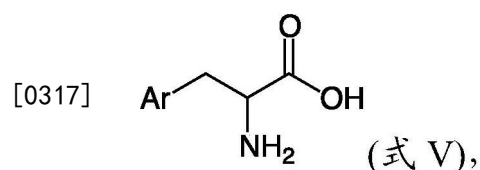
[0312] 在一些方面，所述佐剂部分能够调节免疫应答、炎症应答和/或组织微环境。在一些方面，所述佐剂部分包含咪唑衍生物、氨基酸、维生素或它们的任何组合。在一些方面，所述佐剂部分包含：



[0314] 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。

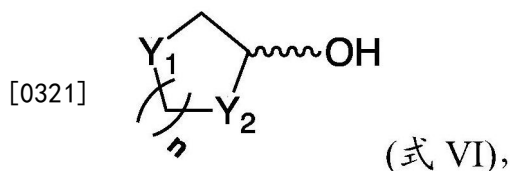
[0315] 在一些方面，所述佐剂部分包含硝基咪唑。在一些方面，所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼、奥硝唑、美格唑、阿扎硝唑、苜硝唑或它们的任何组合。在一些方面，所述佐剂部分包含氨基酸。

[0316] 在一些方面，所述佐剂部分包含



[0319] 其中Z1和Z2各自是H或OH。

[0320] 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：



[0322] 其中Y1和Y2各自是C、N、O或S,并且其中n是1或2。

[0323] 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。

[0324] 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。

[0325] 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。

[0326] 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。

[0327] 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。

[0328] 本公开还提供了包含本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485-3p抑制剂)的胶束,其中所述miRNA抑制剂和递送剂彼此缔合。

[0329] 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-485-3p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-485-3p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。

[0330] 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-485-3p抑制剂)免于酶促降解。参见美国PCT公布号W02020/261227,所述公布以引用的方式整体并入本文。

[0331] VI. 药物组合物

[0332] 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-485-3p抑

制剂(例如,包含miR-485-3p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-485-3p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。

[0333] 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-485-3p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。

[0334] VII. 药盒

[0335] 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-485-3p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-485-3p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-485-3p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。

[0336] 通过说明而不是通过限制的方式提供以下实例。

[0337] 实施例

[0338] 实施例1:材料和方法

[0339] 以下描述的实施例使用一种或多种以下材料和方法。

[0340] 临床样品和信息

[0341] 所有人来源的样品均来自在韩国建阳大学医院、波拉美医疗中心、乙支医疗中心和庆尚国立大学医院获得批准的基于国际审查委员会(IRB)招募的患者。总共招募了21名淀粉样蛋白PET阴性患者和26名淀粉样蛋白PET阳性患者。表3A(下文)提供了这些患者中的一名或多名的临床信息。

[0342] 表3A. 所招募患者的临床信息

¹ 地点	组织类型	ID	年龄	性别	² D X	³ 淀粉样 蛋白 PET 结果	⁴ MMSE	⁵ CDR	受教育 年限	⁶ APOE 基因 型
地点 1	拭子	地点 1-1	66	男性	NC	阴性	27	0	16	E3/E4
地点 1	拭子	地点 1-2	80	男性	NC	阴性	23	0	16	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-3	73	女性	NC	阴性	27	0	6	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-4	78	女性	NC	阴性	26	0	0	E2/E3
地点 1	拭子	地点 1-5	68	女性	NC	阴性	26	0	0	E2/E3
地点 1	拭子	地点 1-6	73	女性	NC	阴性	25	0	6	E3/E4
地点 1	拭子	地点 1-7	76	女性	NC	阴性	27	0	10	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-8	81	女性	NC	阴性	23	0	7	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-9	69	女性	M CI	阴性	25	0.5	2	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-10	58	男性	NC	阳性	29	0	16	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-11	78	男性	M CI	阳性	26	0.5	12	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-12	86	女性	M CI	阳性	22	0.5	7	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-13	70	女性	M CI	阳性	22	0.5	7	E3/E4
地点 1	拭子	地点 1-14	76	男性	M CI	阳性	22	0.5	0	E3/E4
地点 1	拭子	地点 1-15	65	男性	M CI	阳性	30	0.5	12	E3/E4
地点 1	拭子	地点 1-16	70	女性	M CI	阳性	24	0.5	6	E4/E4

[0343]

[0344]

¹ 地点	组织类型	ID	年龄	性别	² D X	³ 淀粉样 蛋白 PET 结果	⁴ MMSE	⁵ CDR	受教育 年限	⁶ APOE 基因型
地点 1	拭子	地点 1-17	85	男性	AD	阳性	18	0.5	6	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-18	74	女性	AD	阳性	17	0.5	4	E3/E3
地点 1	拭子	地点 1-19	85	女性	AD	阳性	16	1	6	E2/E4
地点 1	拭子	地点 1-20	73	女性	AD	阳性	24	0.5	16	E4/E4
地点 2	拭子, 血浆	地点 2-1	75	女性	NC	阴性	29	0	9	E3/E3
地点 2	拭子, 血浆	地点 2-2	81	女性	NC	阴性	23	0	6	E3/E3
地点 2	拭子, 血浆	地点 2-3	89	女性	NC	阴性	28	0	6	E2/E3
地点 2	拭子, 血浆	地点 2-4	75	女性	NC	阴性	27	0	9	E2/E3
地点 2	拭子, 血浆	地点 2-5	74	男性	AD	阳性	23	0.5	6	E4/E4
地点 3	拭子	地点 3-1	60	女性	NC	阴性	30	0.5	15	E2/E4
地点 3	拭子	地点 3-2	58	女性	NC	阴性	27	0.5	5	E3/E4
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-3	66	女性	NC	阴性	27	0.5	6	E2/E3
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-4	67	男性	M CI	阴性	26	0.5	6	E3/E3
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-5	72	女性	M CI	阴性	25	0.5	6	E3/E3
地点 3	拭子	地点 3-6	57	男性	NC	阳性	29	0.5	16	E3/E3
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-7	66	女性	NC	阳性	27	0	9	E3/E3
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-8	70	男性	M CI	阳性	27	0.5	16	E3/E4
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-9	71	男性	M CI	阳性	26	0.5	18	E3/E4
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-10	64	男性	M CI	阳性	27	0.5	12	E3/E3
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-11	80	男性	AD	阳性	20	0.5	6	E3/E3
地点 3	拭子	地点 3-12	61	男性	AD	阳性	20	0.5	12	E3/E3
地点 3	拭子, 血浆	地点 3-13	78	男性	AD	阳性	23	1	12	E3/E4
地点 3	拭子	地点 3-14	53	男性	AD	阳性	16	1	12	E3/E4
地点 3	拭子	地点 3-15	68	女性	AD	阳性	27	1	6	E4/E4

	¹ 地点	组织类型	ID	年龄	性别	² DX	³ 淀粉样蛋白 PET 结果	⁴ MMSE	⁵ CDR	受教育年限	⁶ APOE 基因型
[0345]	地点 3	拭子, 血浆	地点 3-16	71	女性	AD	阳性	16	0.5	1	E3/E3
	地点 4	血浆	地点 4-1	59	女性	NC	阴性				
	地点 4	血浆	地点 4-2	61	男性	NC	阴性				
	地点 4	血浆	地点 4-3	64	女性	NC	阴性				
	地点 4	血浆	地点 4-4	84	女性	AD	阳性				
	地点 4	血浆	地点 4-5	79	女性	AD	阳性				
	地点 4	血浆	地点 4-6	88	男性	AD	阳性				

[0346] 47例患者的临床信息。¹地点是指采集样品的医院。地点1是首尔国立大学波拉美医疗中心。地点2是乙支医疗中心。地点3是庆尚国立大学医院。²DX是临床专家使用认知功能和各种临床结果的诊断结果。³淀粉样蛋白PET结果是如由核医学专家确定的淀粉样蛋白PET CT成像的结果。阴性意味着很少或没有淀粉样蛋白-β累积的结果,并且阳性意味着有淀粉样蛋白-β累积的结果。⁴MMSE是简易精神状态检查的缩写。⁵CDR是临床痴呆率的缩写。⁶APOE基因型是从APOE基因的先天等位基因类型的基因分型得出的结果。

[0347] 对于实时PCR测定实验,招募了3名淀粉样蛋白PET阴性患者和8名淀粉样蛋白PET阳性患者。表3B(下文)提供了从这些患者获得的样品的临床信息。

[0348] 表3B.用于实时PCR实验的临床样品和信息

	¹ 地点	ID	年龄	性别	² DX	³ PET	⁴ MMSE	⁵ CDR	⁶ EDU	⁷ APOE
[0349]	EMC	EMC016	75	女性	NC	阴性	29	0	9	E3/E3
	EMC	EMC019	74	男性	AD	阳性	23	0.5	6	E4/E4
	EMC	EMC020	81	女性	NC	阴性	23	0	6	E3/E3
	EMC	EMC021	89	女性	NC	阴性	28	0	6	E2/E3
	EMC	EMC022	82	男性	AD	阴性	21	0.5	9	E3/E4
	EMC	EMC023	75	女性	NC	阴性	27	0	9	E2/E3

	¹ 地点	ID	年龄	性别	² DX	³ PET	⁴ MM SE	⁵ CD R	⁶ ED U	⁷ APO E
[0350]	GNUH	GNUH001	60	女性	NC	阴性	30	0.5	15	E2/E4
	GNUH	GNUH002	70	男性	MCI	阳性	27	0.5	16	E3/E4
	GNUH	GNUH003	67	男性	MCI	阴性	26	0.5	6	E3/E3
	GNUH	GNUH004	72	女性	MCI	阴性	25	0.5	6	E3/E3
	GNUH	GNUH005	68	女性	AD	阳性	27	1	6	E4/E4
	GNUH	GNUH007	71	男性	MCI	阳性	26	0.5	18	E3/E4
	GNUH	GNUH008	57	男性	NC	阳性	29	0.5	16	E3/E3
	GNUH	GNUH010	71	女性	AD	阳性	16	0.5	1	E3/E3
	GNUH	GNUH011	58	女性	NC	阴性	27	0.5	5	E3/E4
	GNUH	GNUH012	66	女性	NC	阴性	27	0.5	6	E2/E3
	GNUH	GNUH013	66	女性	NC	阳性	27	0	9	E3/E3
	GNUH	GNUH014	64	男性	MCI	阳性	27	0.5	12	E3/E3
	GNUH	GNUH015	80	男性	AD	阳性	20	0.5	6	E3/E3
	GNUH	GNUH016	61	男性	AD	阳性	20	0.5	12	E3/E3
	GNUH	GNUH017	78	男性	AD	阳性	23	1	12	E3/E4
	GNUH	GNUH018	53	男性	AD	阳性	16	1	12	E3/E4

[0351] ¹地点:获得样品的机构或医院。“EMC”是乙支医疗中心。“GNUH”是庆尚国立大学医院;²DX:(i) 正常认知(NC)、(ii) 轻度认知损害(MCI)或(iii) 阿尔茨海默氏病(AD)的专家诊断结果;³PET:淀粉样蛋白-βPET(正电子发射断层摄影术)CT(计算机断层摄影术)成像后,由核医学专家和相关专家诊断;⁴MMSE:简易精神状态检查得分;⁵CDR:临床痴呆评定;⁶EDU:受教育年限;⁷APOE:APOE基因型。

[0352] 阿尔茨海默氏病的诊断和淀粉样蛋白-βPET CT成像

[0353] 在医疗机构使用淀粉样蛋白-βPET CT成像测量淀粉样蛋白-β。使用影像学结果,由核医学专家和神经科医生做出淀粉样蛋白-βPET阳性和阴性判断。具有淀粉样蛋白-β累积的患者被归类为“淀粉样蛋白PET阳性”。否则,患者被归类为“淀粉样蛋白PET阴性”。阿尔茨海默氏病诊断由医学专家进行。诊断分为以下类别之一:(i) 正常认知(NC),(ii) 轻度认知损害(MCI)和(iii) 阿尔茨海默氏病(AD)。

[0354] 患者口腔上皮细胞收集(拭子样品)

[0355] 为了收集口腔上皮细胞,使用单个棉拭子擦拭患者口腔内部(约5-10次)。从每名患者,收集了总计10个不同的拭子样品。每个拭子样品都收集在单独的e管中。然后,用患者ID标记管并储存在-20℃直到进一步分析。

[0356] 用于PCR扩增的寡核苷酸

[0357] 如本文所述,使用实时PCR对miR-485-3p表达进行定量。所使用的不同引物和探针提供在表4(下文)中。

[0358] 表4. 用于miR-485-3p的PCR扩增的引物和探针

[0359]	寡核苷酸名称	序列	PCR 方法
	miR-485-3p_FW1	5'-GTCATACACGGCTCTCCTCTCT-3' (SEQ ID NO: 94)	实时
	miR-485-3p_FW7	5'-GTCATACACGGCTCTCCTCTCTAA -3' (SEQ ID NO: 100)	实时
	miR-485-3p_FW9	5'-CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA-3' ' (SEQ ID NO: 52)	实时
	反向	5'-GAATCGAGCACCAGTTACG-3' (SEQ ID NO: 60)	实时
	荧光探针	FAM-CGAGGTTCGACTTCCTAGA-NFQ (SEQ ID NO: 108)	实时

[0360] 微小RNA制备

[0361] 根据制造商的说明书使用miRNeasy血清/血浆试剂盒 (Qiagen, Germany) 提取微小RNA。根据制造商的说明书使用exoRNeasy血清/血浆Midi试剂盒 (Qiagen, Germany) 从口腔上皮和血浆的外泌体中提取微小RNA。然后, 使用miScript II RT试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 将1μg提取的微小RNA用于cDNA合成。

[0362] 标准材料的制备

[0363] miR-485-3p的模拟物(序列:GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU (SEQ ID NO:1);来自miRDB的人小RNA序列;mirdb.org/index.html)使用miScript II RT试剂盒 (Qiagen, 目录218161) 通过ssDNA合成。使用Quantus™荧光计 (Promega, E6150) 仪器测量所合成的ssDNA的浓度。此后, 使用MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA纯化试剂盒 (Intron, 17290) 纯化ssDNA。

[0364] 实时PCR

[0365] 为了分析miRNA表达, 使用TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (Enzynomics, Korea) 在CFX连接系统 (Bio-Rad) 上进行TaqMan miRNA分析。使用TaqMan探针进行单独cDNA的实时PCR测量, 以使用Bio-Rad实时PCR系统测量双链DNA形成。通过将cDNA样品稀释至不同浓度进行实时PCR。然后, 10ng/μL cDNA用于一般微小-RNA制备, 并且2ng/μL的cDNA用于外泌体微小-RNA制备。实时PCR如下进行: 95°C 15分钟, 40个循环 (95°C 10s, 55°C 1min, 72°C 10s)。对于每个数据点, 实验一式两份进行。数据从BioRad软件导出并导入分析程序中。

[0366] 微小RNA的定量

[0367] 使用本文所述的miR-485-3p引物(参见以上表4)的实时PCR结果作为循环阈值(Ct)输出。然后, 将Ct值替换为使用下式确定的表达值: 表达值 = $2^{-\text{循环阈值}} \times 10^{10}$ 。

[0368] 接下来, 将标准材料按以下量预先称重: (1) 0.01pg; (2) 0.03pg; (3) 0.05pg; (4) 0.07pg; (5) 0.09pg; 和 (6) 0.20pg。标准材料的Ct值也替换为使用上文提供的公式确定的表达值。使用预先测量的标准材料的量和相关的表达值获得每批的回归方程。为了定量miRNA表达水平, 将患者的miR-485-3p表达值(如前所述)代入上述获得的回归方程中。

[0369] APOE基因分型

[0370] 如Zhong等人, Mol Neurodegener 11:2-4 (2016) 所述进行APOE基因分型, 其以引

用的方式整体并入本文。简言之,将大约1mL的DPBS添加至含有口腔临床拭子样品的管中,并涡旋。然后,取出棉拭子,并将管以13,000rpm离心3分钟。丢弃上清液以制备沉淀物。接下来,使用Higene基因组DNA制备试剂盒 (Biofact, GD141-100) 从沉淀物中提取基因组DNA。引物、探针和qPCR混合物如表5和6(下文)中所提供制备。制备E2、E3和E4的混合物,并将1 μ L提取的基因组DNA添加至混合物中。然后,使用BioRad CFX 96进行实时PCR扩增。

[0371] 表5. 用于APOE基因分型的PCR反应混合物

PCR反应混合物	体积 (u1)
2x主混合物 (2QPP)	10
E2/E3/E4引物 (10p/F+R)	2
ApoE探针 (10p)	1
模板 (10-30ng)	1
无RNA酶水	6
总混合物	20

[0373] 表6. 用于APOE基因分型的引物信息

名称	序列(5'-3')	nt
E2-正向	GCGGACATGGAGGACGTGT (SEQ ID NO: 109)	19
E2-反向	CCTGGTACACTGCCAGGCA (SEQ ID NO: 110)	19
E3-正向	CGGACATGGAGGACGTGT (SEQ ID NO: 111)	18
E3-反向	CTGGTACACTGCCAGGCG (SEQ ID NO: 112)	18
E4-正向	CGGACATGGAGGACGTGC (SEQ ID NO: 113)	18
E4-反向	CTGGTACACTGCCAGGCG (SEQ ID NO: 112)	18
ApoE 探针	[FAM] CAGCTCCTCGGTGCTCTGGC [BHQ1] (SEQ ID NO: 114)	20

[0375] 用于验证外泌体RNA的蛋白质印迹

[0376] 如本文所述加工含有口腔临床拭子样品的管以获得团块和上清液。上清液用于使用exoRNeasy血清/血浆Midi试剂盒 (Qiagen, 目录77144) 进一步提取外泌体。通过SDS-PAGE对细胞团块和HOCFE进行分级分离,并根据制造商的方案使用转移装置转移至聚偏二氟乙烯膜上。分级分离的纯度可见于图13A中。与10%脱脂乳在TBST(10mM Tris, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% Tween 20) 中一起孵育60分钟后,将膜用TBST洗涤一次,并与针对CD81的抗体(1:100)和钙联蛋白(1:200)一起在4℃下孵育12小时。将膜洗涤3次,每次10分钟,并与缀合至辣根过氧化物酶的IgG轻链结合蛋白的1:1000稀释液一起孵育1小时。将印迹用TBST洗涤3次,并根据制造商的方案用ECL系统 (Amersham Biosciences) 显色。

[0377] 淀粉样蛋白- β 的制备和细胞处理

[0378] 将A β (淀粉样蛋白- β) 1-42六氟异丙醛 (HFIP) 肽 (#AS-64129) 获自AnaSpec (Fremont, CA, USA)。为了形成淀粉样蛋白- β 单体, 将HFIP肽溶解于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100 μ M。为了形成淀粉样蛋白- β 低聚物, 将单体在4 $^{\circ}$ C下孵育24小时。

[0379] 人原代口腔上皮细胞 (目录号36063-01) 购自Celprogen (Torrance, California)。将细胞 (5×10^5 个细胞/孔) 置于6孔板上过夜。然后用不同浓度 (0.1、0.5、1 μ M) 的淀粉样蛋白- β 单体或低聚物处理细胞, 并孵育6小时。孵育后, 收获上清液和细胞用于分析。

[0380] 使用临床信息的预测模型构建

[0381] 为了计算本文所述的相关值, 为各种临床信息分配值: (i) 性别 (男性=1; 女性=2); (ii) APOE基因型 (E2/E3=1; E3/E3=1; E2/E4=2; E3/E4=2; 和E4/E4=4)。年龄、受教育年限 (0至18岁)、MMSE得分和CDR照常使用。为了确定具有最高AUC和最低错误率的维度, 使用随机抽样将模拟重复100次直到每个临床信息的第11维度。应用维度直到模型的所有系数都正常输出。因此, 可确定其值的维度的数量在不同的临床信息中是不同的 (参见图18A-18F和19A-19F)。随机抽样后, 对每个测试计数ANOVA检验的p值为0.05或更低的测试数。一旦确定了最佳维度, 就使用临床信息来构建具有miR-485-3p的数量值的算法。临床信息应用于不按任何顺序重叠的病例数。

[0382] 为了评估每种临床信息如何影响准确性的变化, 使用下式来计算“准确性校正率”: 准确性校正率 (%) = $[(ACC1/ACC2) - 1] \times 100$, 其中“ACC1”是指含有特定临床信息的算法的准确性, 并且“ACC2”是指没有特定临床信息的算法准确性。

[0383] 交叉验证和计算随机抽样

[0384] 为了验证和/或修改本文公开的算法, 使用K折交叉验证方法。在具有41名受试者的患者组中, 将所述组分为具有10名患者的三个组和具有11名患者的一个组。在具有36名受试者的患者组 (年龄>60岁) 中, 将所述组分为四组, 每组9名患者。模型是通过合并三个组创建的, 并与剩余的一组进行验证。在替换验证集的同时执行4次相同的过程。随机抽样是通过从所有样品中随机重复20个非重叠样品100次来进行的。

[0385] 灰色区域的计算

[0386] 通过将数量或得分值的最大值与最小值之间的值分成500个值, 得出第一截止值作为模拟结果值。模拟结果的最准确截止值是第一截止值。然后, 计算所有样品的标准偏差的平均值并将其分成两半。灰色区域是通过将第一截止值加上和减去先前计算的标准偏差的平均值的一半来确定的。灰区区域上方=第1截止值+样品数量或得分的SD平均值的一半。灰区区域下方=第1截止值-样品数量或得分的SD平均值的一半。

[0387] 统计检验

[0388] 所有统计分析均通过R (版本3.5.2) 进行。通过非配对t检验进行两组之间的统计学显著性检验。ROC (接受者操作特征) 分析用于测量AUC (曲线下面积) 值、灵敏度和特异性。ROC分析是使用“ROCR”和“pROC” (一种R包) 进行的。使用R的“lm”命令分析回归建模。

[0389] 实施例2: 目标微小RNA的选择

[0390] 为了鉴定可用于诊断本文公开的认知障碍 (例如, 阿尔茨海默氏病) 的特定miRNA, 使用qPCR确定来自被诊断患有阿尔茨海默氏病 (AD) 的患者和正常对照受试者 (即, 正常认知) 的血浆样品中的不同miRNA的表达。如图12A所示, 与来自对照受试者的血浆样品中的相

应表达相比,来自AD患者的血浆样品中存在统计学上显著增加的miR-485-3p表达。在所测试的miRNA中,其它miRNA均未表现出如此显著的表达差异。

[0391] 为了确认上述结果,从另外的患者收集血浆样品和口腔临床拭子样品。再次,如图12B和12C所示,与对照受试者(即,淀粉样蛋白PET阴性)相比,来自AD患者(即,淀粉样蛋白PET阳性)的血浆样品中的miR-485-3p表达显著更高。从口腔临床拭子样品制备的人口腔来源的无细胞外泌体中,miR-385-3p表达的差异甚至更显著。

[0392] 上述结果证明在患有某些认知障碍(例如,阿尔茨海默氏病)的患者中增加的miR-485-3p表达,从而表明miR-485-3p是合适的生物标志物候选物。

[0393] 实施例3:对临床信息中的潜在偏差的分析

[0394] 为了评估患者的临床信息是否能够表明患者中淀粉样蛋白- β 累积的任何潜在偏见,收集了以下临床信息并在适当的情况下分配值:(i)诊断时的年龄,(ii)性别(男性=1;女性=2),(iii)受教育年限(0-16),(iv)APOE基因型(E2/E3=1;E3/E3=1;E2/E4=2;E3/E4=2;和E4/E4=4),(v)简易精神状态检查(MMSE)得分;(vi)认知损害(即,正常认知(“NC”);轻度认知损害(“MCI”);和阿尔茨海默氏病(“AD”)),和(vii)临床痴呆评定(CDR)得分。然后,在确认具有淀粉样蛋白- β 累积(即,淀粉样蛋白PET阳性)的患者和确认没有淀粉样蛋白- β 累积(即,淀粉样蛋白PET阴性)的患者中评估每种临床信息。

[0395] 如表7(下文)所示,在被诊断为具有正常认知(NC)或CDR值为0的患者组中,与淀粉样蛋白PET阴性受试者相比,淀粉样蛋白PET阳性受试者显著更少。淀粉样蛋白PET阳性与阴性受试者之间的其它临床信息没有统计学上显著的差异。

[0396] 表7.临床信息的统计结果

临床信息	值	淀粉样蛋	淀粉样蛋	<i>p</i> 值	优势比	95%置信区 间
		白 PET 阴 性数	白 PET 阳 性数			
根据认知损 害的诊断	NC	15	3	0.005	0.17	0.03-0.61
根据认知损 害的诊断	MCI	3	9	0.239	2.25	0.56-11.95
根据认知损 害的诊断	AD	0	11	-	-	-
CDR 值	0	12	2	0.007	0.14	0.02-0.62
CDR 值	0.5	6	17	0.158	2.17	0.72-7.18
CDR 值	1	0	4	-	-	-
性别	男性	3	14	0.058	3.47	0.93-17.65
性别	女性	15	9	0.148	0.48	0.16-1.34
诊断时年龄	51-60	2	3	0.868	1.15	0.16-10.73
诊断时年龄	61-70	5	8	0.730	1.24	0.34-4.85
诊断时年龄	71-80	8	9	0.826	0.88	0.28-2.84
诊断时年龄	81-90	3	3	0.779	0.79	0.12-5.07
受教育年限	0	2	1	0.445	0.42	0.01-5.61
受教育年限	1-6	9	8	0.530	0.70	0.22-2.23
受教育年限	7-9	3	3	0.779	0.79	0.12-5.07
受教育年限	10-12	1	6	0.139	4.14	0.60-114.33

临床信息	值	淀粉样蛋白 PET 阴性数	淀粉样蛋白 PET 阳性数	<i>p</i> 值	优势比	95%置信区间
受教育年限	13-18	3	5	0.738	1.28	0.26-7.37
MMSE 得分	15-19	0	5	-	-	-
MMSE 得分	20-25	6	9	0.794	1.16	0.35-4.14
MMSE 得分	26-30	12	9	0.323	0.59	0.20-1.73
APOE 基因型	E2/E2	0	0	-	-	-
APOE 基因型	E2/E3	5	0	-	-	-
APOE 基因型	E3/E3	9	11	0.935	0.96	0.32-2.89
APOE 基因型	E2/E4	1	1	0.865	0.79	0.02-32.14
APOE 基因型	E3/E4	3	7	0.423	1.76	0.41-9.66
APOE 基因型	E4/E4	0	4	-	-	-

[0398] 上述结果表明,单独使用临床信息并不是认知障碍,如与淀粉样蛋白- β 累积相关的认知障碍(例如,阿尔茨海默氏病)的有效预测指标。

[0400] 实施例4:人临床拭子样品中miR-485-3p表达的实时PCR分析

[0401] 为了开始评估miR-485-3p表达作为认知障碍(例如,阿尔茨海默氏病)的诊断标志物的用途,使用实时PCR测定来比较来自有或没有淀粉样蛋白- β 累积的患者的人临床拭子样品中的miR-485-3p表达。如本文所述,淀粉样蛋白- β 累积与许多认知障碍相关。为了扩增临床拭子样品中存在的miR-485-3p,使用了以下引物:5'-GTCATACACGGCTCTCCTCTCTAA-3' (本文称为“miR-485-3p_FW7”;SEQ ID NO:100)。如上所示,为实时PCR制备的RNA是外泌体RNA。

[0402] 图1A提供临床拭子样品中miR-485-3p表达的初始循环阈值(Ct)。初始Ct值与表达值负相关(即,较高的表达导致较低的初始Ct)。如所示,与淀粉样蛋白- β 阴性拭子样品(即,来自没有淀粉样蛋白- β 累积的患者)相比,淀粉样蛋白- β 阳性拭子样品(即,来自具有淀粉样蛋白- β 累积的患者)中的miR-485-3p表达在统计学上更高。来自两个组的拭子样品中miR-485-3p表达差异的AUC、准确性、灵敏度和特异性分别如下:(i) 0.80, (ii) 0.78, (iii) 0.75和(iv) 0.81(参见图1B)。

[0403] 上述结果表明miR-485-3p表达可用于区分来自有或没有淀粉样蛋白- β 累积的患者的临床拭子样品。

[0404] 实施例5:单独或与miR-485-3p表达组合考虑临床信息的诊断能力的比较

[0405] 几项研究已经创建了仅使用患者临床信息预测淀粉样蛋白 β 的存在或不存在或AD诊断的模型。参见Kim等人, J Alzheimer's Dis 66:681-691 (2018), 其以引用的方式整体

并入本文。为了将这种模型与本文所述的方法(即,将一种或多种临床信息与miR-485-3p表达水平组合)进行比较,使用了三种不同的统计方法:(i)仅临床信息(CF0), (ii)微小RNA(即,miR-485-3p)的Ct值,和(iii)微小RNA(即,miR-485-3p)的数量。对于每种方法,生成了所有病例中临床信息的组合的算法。在CF0方法中,仅使用患者的临床信息而不使用微小RNA信息生成算法。对于Ct值和数量方法,将Ct值和微小RNA数量的组合分别添加至CF0方法中。然后,对所得算法的AUC进行比较和排序。

[0406] 如图3A所示,当仅考虑临床信息的组合时,1,956个可能的算法中只有58种算法排序第1。大部分算法排序第3。相比之下,使用数量统计方法,除了60(1,896个算法)之外的所有算法都获得了第1名。至于使用Ct值的方法,除1100(1856个算法)以外的所有算法均排序第2。此外,当考虑总体AUC值时,与仅使用临床信息的方法相比,涉及临床信息与Ct值或数量值的组合的方法显著更好。在此所示的结果证明本公开中公开的诊断方法与本领域中存在的仅使用临床信息的诊断方法相比的优异性。

[0407] 实施例6:年龄对使用miR-485-3p表达来检测人临床拭子样品中淀粉样蛋白-β累积的影响的分析

[0408] 为了更好地评估不同临床信息对使用miR-485-3p表达来诊断本文公开的认知障碍(例如,阿尔茨海默氏病)的能力的影响,对患者年龄与人口腔中来源的无细胞外泌体(HOCFE)中的miR-485-3p表达之间的关系进行了评估。

[0409] 如图14A所示,随着患者的年龄增加,HOCFE中miR-485-3p的表达降低。即使将HOCFE样品分为淀粉样蛋白PET阴性和阳性患者,这种逆相关仍然是统计上显著的。此外,在淀粉样蛋白PET阳性患者中,这种逆相关进展更快。但在淀粉样蛋白PET阴性患者中,miR-485-3p表达随年龄增长显示出更大的统计学显著性。

[0410] 接下来,基于上述结果,评估了使用miR-485-3p表达来预测不同年龄组的患者中淀粉样蛋白-β累积的能力。将患者分为以下组:(i)60岁或以下(“~60”);(ii)61-70岁(“61~70”);(iii)71-80岁(“71~80”);和(iv)81岁或以上(“81~”)。如图16B所示,在所有年龄组中,在具有确认的淀粉样蛋白-β累积的患者(即,淀粉样蛋白PET阳性)和证实没有淀粉样蛋白-β累积的患者(即,淀粉样蛋白PET阴性)之间存在miR-485-3p表达的统计上显著的差异。令人感兴趣地,在小于61岁的组中,与淀粉样蛋白PET阳性患者相比,淀粉样蛋白PET阴性患者中miR-485-3p的表达增加。所述关系对于所有其它年龄组相反(即,淀粉样蛋白PET阳性受试者中的miR-485-3p表达更高)。不受任一种理论束缚,这种现象可能是由于超过一定年龄的具有淀粉样蛋白β累积的患者中miR-485-3p的表达急剧增加。这种现象似乎开始在60岁以上的患者中发展,并随着年龄增长而减少。相比之下,在没有淀粉样蛋白-β累积的患者(即,淀粉样蛋白PET阴性)中,miR-485-3p表达从60岁或以上开始迅速下降,并随着年龄增长而保持降低的水平。miR-485-3p表达随年龄的不平衡影响淀粉样蛋白-β累积预测的准确性,并且在60多岁的患者中具有最高统计学显著性(参见图16B)。表8(下文)提供每个年龄组的特异性和灵敏度值,其用于确定

[0411] 表8.各种算法的公式

[0412]

年龄范围	特异性	灵敏度
50岁	0.9167	0.6471
60岁	0.8462	1.0000

70岁	0.9744	0.6486
80岁	0.8750	1.0000

[0413] 为了评估使用miR-485-3p表达来诊断淀粉样蛋白-β累积在某些年龄组中是否最准确,将年龄标准设定为高于或低于某个年龄组。如图17A和17B所示,在73岁或以下年龄组中观察到最高准确性和AUC。在65岁或以下年龄组中,miR-485-3p的表达在有或没有淀粉样蛋白-β累积的组之间逆转,并且准确性较低。上述趋势在具有更高年龄标准的单独独立实验中得到证实,这表明在71岁以上的患者中,高准确性和AUC始终保持,并且在72岁以上的患者组中呈现出快速下降的模式。在超过79岁的组中,样品的数量减少至10个或更少,并且准确性波动显著(参见图17C)。两个标准(高于或低于一定年龄)的综合测试结果表明,高于一定年龄的标准的结果在AUC和准确性方面高于一定年龄以下的结果(参见图17B和17D)。

[0414] 为了进一步证明特定年龄组内miR-485-3p表达的诊断准确性,根据年龄(从低到高)对患者进行分选,然后通过滑动窗口选择10名患者来测量AUC和准确性(参见图14C)。使用滑动窗口进行此类分析的方法是本领域已知的(参见,例如coleoguy.blogspot.com/2014/04/sliding-window-analysis.html,其以引用的方式整体并入本文)。这种方法减少了因不同年龄组的样品大小而导致的任何变化。如图14C所示,与73岁的患者相比,61岁及以下患者中的准确性和AUC更高。在61-73岁年龄组中,miR-485-3p表达预测淀粉样蛋白-β累积的准确性接近100%。

[0415] 实施例7:其它临床信息对使用miR-485-3p表达来检测人临床拭子样品中淀粉样蛋白-β累积的影响的分析

[0416] 为了提高使用miR-485-3p表达来检测淀粉样蛋白-β累积的诊断能力,从与临床拭子样品相关的患者中收集以下临床信息并分配值:(i) 年龄,(ii) 性别(男性=1;女性=2),(iii) 受教育年限(0-16),(iv) APOE基因型(E2/E3=1;E3/E3=1;E2/E4=2;E3/E4=2;和E4/E4=4),和(v) 简易精神状态检查(MMSE)得分(参见以上表3)。然后,创建了miR-485-3p表达(即,初始循环Ct值)和一种或多种上述临床信息的不同组合,并确定了每个组合的诊断准确性。

[0417] 图4提供不同可能组合的诊断准确性。如所示,当临床拭子样品中的miR-485-3p表达与所有测试的附加临床信息(即,年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和MMSE得分)组合评估时,观察到了最大准确性。组合所有因素,准确度性是89.20%,比单独使用miR-485-3p表达时高11.11%(比较图3A和3B与图1A和1B)。

[0418] 为了进一步评估使用所有测试的临床信息的组合在检测淀粉样蛋白-β累积方面的能力,使用下式为不同的临床拭子样品确立得分:(初始CT x (年龄 x $V1_{\text{年龄}} + V2_{\text{年龄}}$)) x (性别 x $V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}}$) x (APOE x $V1_{\text{APOE}} + V2_{\text{APOE}}$) x (MMSE x $V1_{\text{MMSE}} + V2_{\text{MMSE}}$) x (受教育年限 x $V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}}$),其中V1和V2是与特定附加临床信息相关的回归系数值。如图3A所示,在来自没有淀粉样蛋白-β累积的患者(左)和有淀粉样蛋白-β累积的患者(右)的临床拭子样品的得分方面存在统计学差异。

[0419] 虽然上述结果表明使用所有测试的临床信息的重要性,但需要额外成本来确定患者的APOE基因型和MMSE得分。因此,为了提供成本更低的诊断认知障碍的方式,比较了排除APOE基因型和MMSE得分的不同组合的诊断准确性。如图4所示,在排除APOE基因型和MMSE得分的组合中,miR-485-3p表达、性别和受教育年限的组合具有最高准确性。这种组合的准确

性是82.95%，比不考虑附加临床信息时高5.11%（比较图2A和2B与图1A和1B）。

[0420] 为了评估这种特定组合（即，miR-485-3p表达、性别和教育水平）的诊断能力，使用下式为不同的临床拭子样品确立得分： $(\text{初始Ct} \times (\text{性别} \times V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}})) \times (\text{受教育年限} \times V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}})$ ，其中V1和V2是与特定附加临床信息相关的回归系数值。如图2A所示，与来自没有淀粉样蛋白-β积累的患者的临床拭子样品相比，淀粉样蛋白PET阳性拭子样品（即，来自具有淀粉样蛋白-β累积的患者）的得分显著较低。

[0421] 上述结果共同证明，附加临床信息（例如，性别和教育水平）的组合可提高使用miR-485-3p表达来区分来自有或没有淀粉样蛋白-β累积的患者的临床拭子样品的能力。

[0422] 实施例8：组合miR-485-3p表达和临床信息的诊断能力的加法分析

[0423] 除了以上实施例7中提供的结果之外，构建了另外的算法或公式以确认将miR-485-3p表达与一种或多种临床信息组合以诊断认知障碍（例如，阿尔茨海默氏病）的能力。特别地，第一种算法将年龄、性别和教育与miR-485-3p表达组合（本文称为“pre-DX”；参见表9）。第二种算法将年龄、性别、教育、APOE基因型和MMSE得分与miR-485-3p表达组合（本文称为“pro-DX1”；参见表9）。第三种算法将年龄、性别、教育、APOE基因型、MMSE得分和临床痴呆评定（CDR）得分与miR-485-3p表达组合（本文称为“pro-DX2”；参见表9）。

[0424] 表9. 各种算法的公式

算法类型		计算公式
数量		得分= (miR-485-3p 的数量+ 0.007) x 10 ⁴

算法类型	计算公式
Pre-DX	得分 = ((miR-485-3p 的数量 $\times$ (3.5e-02 $\times$ 受教育年限 ⁵ + 5.2e-02 $\times$ 受教育年限 ⁴ - 2e-02 $\times$ 受教育年限 ³ + 2.8e-03 $\times$ 受教育年限 ² - 1.6e-04 $\times$ 受教育年限 + 3.1e-06) $\times$ (-0.0027 $\times$ 性别 + 0.008)) + 7e-0.7) $\times$ 10 ⁸
Pro-DX1	得分 = ((miR-485-3p 的数量 $\times$ (3.5e-02 $\times$ 受教育年限 ⁵ + 5.2e-02 $\times$ 受教育年限 ⁴ - 2e-02 $\times$ 受教育年限 ³ + 2.8e-03 $\times$ 受教育年限 ² - 1.6e-04 $\times$ 受教育年限 + 3.1e-06) $\times$ (0.001 $\times$ 数值 APOE 基因型 + 0.002) $\times$ (-4e-07 $\times$ MMSE + 2.1e-05) $\times$ (-3.27 $\times$ 数值性别 + 1.77e-10)) + 8e-17) $\times$ 10 ¹⁸
Pro-DX2	得分 = ((miR-485-3p 的数量 $\times$ (0.034 $\times$ CDR + 0.06) $\times$ (0.0015 $\times$ 数值 APOE 基因型 + 0.0016) $\times$ (-7e-07 $\times$ MMSE + 3.48e-05) $\times$ (1.85e-11 $\times$ 受教育年限 + 1.51e-10) $\times$ (-7.6e-20 $\times$ 数值性别 + 2.2e-19)) + 7e-31) $\times$ 10 ³³
数量 (年龄 > 60)	得分 = (miR-485-3p 的数量 + 0.007) $\times$ 10 ⁴
Pre-DX (年龄 > 60)	得分 = ((miR-485-3p 的数量 $\times$ (-0.0188 $\times$ 数值性别 + 0.08)) + 0.001) $\times$ 10 ⁴
Pro-DX1 (年龄 > 60)	得分 = ((miR-485-3p 的数量 $\times$ (-0.0188 $\times$ 数值性别 + 0.08) $\times$ (-6.45e-05 $\times$ MMSE + 0.004) $\times$ (1.345e-06 $\times$ 数值 APOE 基因型 + 5.86e-06)) + 4e-6) $\times$ 10 ¹³
Pro-DX2 (年龄 > 60)	得分 = ((miR-485-3p 的数量 $\times$ (0.033 $\times$ CDR + 0.055) $\times$ (-7.65e-05 $\times$ MMSE + 0.005) $\times$ (-2.87e-06 $\times$ 数值性别 + 1.456e-05) $\times$ (2.77e-5 $\times$ APOE + 6e-11)) + 9e-23) $\times$ 10 ²⁴

[0427] 在构建上述算法之前,在将回归建模方法应用于每种临床信息的miR-485-3p的定量值时,进行了分析以鉴定合适的维度水平。miR-485-3p的定量值和回归建模对每种临床信息进行多达11个维度,并通过每个维度随机抽样100次来确认重现性。在100次随机抽样实验中,对p值显著的实验(模拟)次数进行计数,测量每个实验的AUC,并通过AUC的偏差值除以AUC的平均值来计算错误率。选择了具有以下性质的维度:(i)统计上显著的实验结果(即,总计100次模拟中p值<0.05的模拟的次数),(ii)相对高的AUC,和(iii)相对低的错误

率(参见图18A-18F和19A-19F)。

[0428] 一旦选择了维度值,就将不同的临床信息应用于上述算法,然后确定不同组合的准确性。如图20B、20C和20D中所示,虽然特定的临床信息对于给定算法是相同的,但是应用临床信息的顺序具有影响。对于pre-DX算法,当单独的性别与miR-485-3p表达组合时,观察到最高准确性(参见图20B)。对于pro-DX1算法,当性别、MMSE得分和APOE基因型(以列举的顺序)与miR-485-3p表达组合应用于算法时,观察到最高准确性(参见图20C)。对于pro-DX2算法,当CDR得分、MMSE得分性别和APOE基因型(以列举的顺序)与miR-485-3p表达组合应用于算法时,观察到最高准确性(参见图20D)。考虑到上述算法中的每个的总体AUC值,应用最多临床信息类型的pro-DX2算法记录了最高平均AUC值(参见图20A)。类似地,具有最高准确性(0.9740)的算法也使用pro-DX2算法进行测量(参见图20D)。使用来自仅61岁以下(参见图21A-21C)或仅超过60岁(参见图22A-22F)的患者的样品观察到类似的结果。

[0429] 除上述外,还针对上述算法评估了个体临床信息对准确性的影响。为此,如实施例1中所述确定准确性校正率。如图22C和22F中,CDR得分与高准确性相关。令人感兴趣地,年龄并没有提高准确性,并且事实上,似乎降低准确性。不受任何一种理论束缚并且如前所述,这种结果可能是由于淀粉样蛋白-PET阳性患者组中miR-485-3p表达的快速上升和下降。

[0430] 实施例9:将临床信息与miR-485-3p表达组合用于诊断认知障碍

[0431] 为了验证和鉴定具有最高准确性的算法,使用了K折交叉验证方法。参见例如,Jung等人,J Nonparametr Stat 27(2):167-179(2015),其以引用的方式整体并入本文。简言之,将患者样品平均分为四组。其中三组用作试验集,而其中一组用作验证集。然后,对每个组进行总共四次鉴定和验证。验证后,前面描述的所有三种算法(即pre-DX、pro-DX1和pro-DX2)都获得了高AUC值(高达0.86)。选择具有最高AUC值的第K个模型作为每种算法的最终模型(参见图23A和23B)。各算法的计算公式在表9(上文)中示出。不同算法的结果提供在图24A-24D中。

[0432] 上述结果表明,不同临床信息和miR-485-3p表达的组合可用作某些认知障碍(例如,阿尔茨海默氏病)的诊断工具。

[0433] 实施例10:人血浆样品中miR-485-3p表达的实时PCR分析

[0434] 接下来,评估了使用miR-485-3p表达来检测人血浆样品中淀粉样蛋白- β 累积的能力。如前所述,例如实施例2中,使用实时PCR测量miR-485-3p表达。

[0435] 如图5A所示,与临床拭子样品不同,在淀粉样蛋白PET阴性(即,来自没有淀粉样蛋白- β 累积的患者)与淀粉样蛋白PET阳性(即,来自具有淀粉样蛋白- β 累积的患者)血浆样品之间不存在初始循环阈值(Ct)的显著差异。与临床拭子样品相比,AUC、准确性、灵敏度和特异性值均显著降低(比较图5B和图1B)。

[0436] 然而,当人血浆样品中的miR-485-3p表达与患者的单独性别信息组合时,来自有和没有淀粉样蛋白- β 累积的患者的血浆样本之间存在显著差异。例如,使用下式,为不同的血浆样品确立得分:(初始CT $\times$ (性别 $\times$ $V1_{\text{性别}} + V2_{\text{性别}}$)),其中V1和V2是与附加临床信息相关的回归系数值。如图6A所示,在淀粉样蛋白PET阴性与淀粉样蛋白PET阳性血浆样品之间观察到统计学差异。类似地,当仅使用来自血浆样品的miR-485-3p表达时,AUC、准确性、灵敏度和特异性的值均显著高于相应的值(比较图6B和图5B)。将miR-485-3p表达从测定归一化并

在图6C中进行比较。还计算性别拟合得分并如图6D所示绘制。与图6A和6B不同,其表示Y轴上较低的数字意味着较高的miR-485-3p表达,绘制图6C和6D以显示较高的miR-485-3p表达在Y轴上具有较高的数字。图7提供血浆样品中miR-485-3p表达的不同组合和实施例2中先前描述的一种或多种附加临床信息(即,年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和MMSE得分)的诊断准确性(还参见上文表3A和3B)。如所示,当使用人血浆样品时,单独miR-485-3p表达和性别的组合导致最高准确性(即,85.71%)。

[0437] 上述结果表明,当与其它临床信息(例如,患者的性别)组合时,人血浆样品中的miR-485-3p表达也可用作淀粉样蛋白- β 累积的诊断标志物。

[0438] 实施例11:对淀粉样蛋白- β 累积与miR-485-3p表达之间的关系分析

[0439] 为了进一步评估淀粉样蛋白- β 累积与miR-485-3p表达之间的关系,将人来源的口腔上皮细胞用不同浓度(即,0、0.1、0.5或1 μ M)淀粉样蛋白- β 单体或低聚物处理。然后,使用实时PCR评估经处理细胞中和经处理细胞的上清液中miR-485-3p的表达。使用两种不同的引物测量经处理细胞中的miR-485-3p表达:(i) 5'-GTCATACACGGCTCTCCTCTCT-3'(本文中称为“miR-485-3p_FW1”;SEQ ID NO:94);和(ii) 5'-CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA-3'(本文中称为“miR-485-3p_FW9”;SEQ ID NO:52)。为了测量上清液中miR-485-3p的表达,使用了miR-485-3p_FW9引物。

[0440] 如图8A和8B所示,使用miR-485-3p_FW1引物,在用淀粉样蛋白- β 单体或低聚物处理的细胞中,在淀粉样蛋白- β 浓度与miR-485-3p表达之间存在统计学上显著的正相关。然而,使用miR-485-3p_FW9,仅在淀粉样蛋白- β 单体处理的细胞中观察到统计学上显著的正相关(参见图8C)。在用淀粉样蛋白- β 低聚物处理的细胞中,存在miR-485-3p表达随淀粉样蛋白- β 浓度增加而增加的趋势,但相关性不是统计上显著的(参见图8D)。

[0441] 与经处理的细胞相比,淀粉样蛋白- β 浓度与上清液中的miR-485-3p表达之间没有显著相关性(仅呈正趋势)。对于淀粉样蛋白- β 单体和低聚物都是如此(参见图9A和9B)。

[0442] 上述结果进一步证明了淀粉样蛋白- β 累积与miR-485-3p表达之间的关系,至少在细胞,如口腔上皮细胞(例如拭子样品)中,从而证实了miR-485-3p可用作诊断标志物以鉴定患有某些认知障碍,例如与淀粉样蛋白- β 累积相关的那些(例如,阿尔茨海默氏病)的患者。

[0443] 实施例12:使用miR-485-3p表达诊断淀粉样蛋白- β 累积

[0444] 除了以上提供的实施例(参见例如,实施例10),进一步评估了miR-485-3p表达诊断淀粉样蛋白- β 累积的能力。特别地,使用本文所述的算法(即,定量、pre-DX、pro-DX1和pro-DX2;参见以上表9)和从口腔临床拭子样品中分离的人口腔来源的无细胞外泌体中的miR-485-3p表达值,生成了诊断得分。然后,使用本文所述的方法(参见例如,实施例1),确定具有最高准确度的最佳截止值,并确立灰色区域。

[0445] 如图24A-24D所示,使用所提供的不同算法实现了高AUC值(0.92或更高)和高准确性(0.91或更高)。与早期数据一致,随着不同临床信息的数量增加,观察到更高的AUC值。当年龄不受限制时,在单独的独立实验中观察到类似的结果(参见图25A-25D)。然而,当考虑年龄时,在61岁以上的患者中观察到相对较高的AUC和准确性(参见图24A-24D)。在数量诊断方法(参见表3A)中准确性提高了大约9%,在pre-DX方法中大约9%,在pro-DX1方法中大约11%,并且在pro-DX2方法中大约6%。60岁以上患者组中的AUC值也较高。此外,当年龄限

制在61岁或以上时,灵敏度平均增加2%,并且特异性平均增加15%(参见表3A)。

[0446] 上述结果证实组合本文所述的不同临床信息和miR-485-3p表达的诊断能力。

[0447] 实施例13:使用miR-485-3p表达诊断认知损害

[0448] 为了评估miR-485-3p表达预测认知损害的能力,根据认知损害的程度(即,正常认知(NC)、轻度认知损害(MCI)和阿尔茨海默氏病(AD)),基于他们的阿尔茨海默氏病诊断对患者进行分组。尽管来自不同组的淀粉样蛋白PET阳性和阴性患者之间存在一些偏差,但显示的所有诊断方法(即,使用以下算法之一:数量、pre-DX、pro-DX1、pro-DX2;参见表9)获得了强统计学显著性(参见图11A、11B和26A-26C)。特别地,NC和MCI患者组显示出非常高的统计准确性(参见图26A-26C)。NC患者组在所有统计值中显示出比其它患者组更高的结果。此外,包括61岁以下的NC患者组显示出相对较低的预测能力。NC患者组包括大多数61岁以下的患者。

[0449] 上述结果证明,在NC和MCI患者组中淀粉样蛋白- β 累积的高预测能力可用作非常有用的诊断标准,以鉴定正在转变为AD发作的组中的患者。

[0450] ***

[0451] 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。

[0452] 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。

[0453] 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。

[0454] 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。

[0455] 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>	使用MIR-485-3P表达的诊断方法	
<130>	4366.025PC03	
<150>	US 63/014,633	
<151>	2020-04-23	
<150>	US 63/047,206	
<151>	2020-07-01	
<150>	US 63/064,305	
<151>	2020-08-11	
<160>	114	
<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 gugua	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
Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu		
	500	505
Lys Pro Pro Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Leu Pro		
	515	520
Pro Thr Pro Leu His Val Ser Glu Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr		
	530	535
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
Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr Ser Arg Asn Val Glu Ser Ile Ala		
	580	585
Glu Gln Met Glu Asn Pro Asp Leu Lys Asn Val Gly Ser Ser Thr Gly		
	595	600
Glu Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Gly Thr Val Arg Lys Cys Trp		
	610	615
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
Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly		
	660	665
Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro		
	675	680
Met Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp		
	690	695
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
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 Leu Trp Arg Glu Ala Glu	
65 70 75 80	
Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Glu Gln Glu Ala Gln Ala Thr Ala	
85 90 95	
Ala Ala Gly Glu Gly Asp Asn Gly Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Arg	
100 105 110	
Glu Pro Pro Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu	
115 120 125	
Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp	
130 135 140	
Asn Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys	
145 150 155 160	
Glu Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp	
165 170 175	
Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu	
180 185 190	
Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu	
195 200 205	
Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val	
210 215 220	
Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile	
225 230 235 240	
Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile	
245 250 255	
Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp	

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

<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	智人 (Homo sapiens)	
<400>	33	
agaggcuggc	cgugaugaau uc	22
<210>	34	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	miR-485-3p	
<400>	34	
agucauacac	ggcucuccuc uc	22
<210>	35	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	miR-485-5p	
<400>	35	
agaggcuggc	cgugaugaau 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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
Ile Glu Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln Pro Leu Cys Pro Asp		
20	25	30
Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val Asn Asp Leu Asp Thr		
35	40	45
Asp Ser Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser Asp Gln Ser Glu Ile		
50	55	60
Ile Ser Asn Gln Tyr Asn Asn Glu Pro Ser Asn Ile Phe Glu Lys Ile		
65	70	75
Asp Glu Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val Leu Thr Glu Thr Leu		
85	90	95
Asp Ser Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro Ser Phe Asp Ala Leu		
100	105	110
Thr Asp Gly Asp Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala Ser Pro Ser Ser Met		
115	120	125
Pro Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu Glu Pro Ser Leu Leu		
130	135	140
Lys Lys Leu Leu Leu Ala Pro Ala Asn Thr Gln Leu Ser Tyr Asn Glu		
145	150	155
Cys Ser Gly Leu Ser Thr Gln Asn His Ala Asn His Asn His Arg Ile		
165	170	175
Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn Ser Trp Ser Asn Lys		
180	185	190

Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln Arg Arg Pro Cys Ser		
195	200	205
Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp Pro Pro His Thr Lys		
210	215	220
Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys Cys Thr Ser Lys Lys		
225	230	235
Lys Ser His Thr Gln Ser Gln Ser Gln His Leu Gln Ala Lys Pro Thr		
245	250	255
Thr Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro Asn Asp Pro Lys Gly		
260	265	270
Ser Pro Phe Glu Asn Lys Thr Ile Glu Arg Thr Leu Ser Val Glu Leu		
275	280	285
Ser Gly Thr Ala Gly 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
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
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
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	315 320
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	395 400
Ile Leu Ile Asn Ile Ser Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Glu		
	405	410 415
Asn Lys Asp Val Ser Ser Asp Trp Gln Gly Gln Ile Cys Ser Ser Thr		
	420	425 430
Asp Ser Asp Gln Cys Tyr Leu Arg Glu Thr Leu Glu Ala Ser Lys Gln		
	435	440 445
Val Ser Pro Cys Ser Thr Arg Lys Gln Leu Gln Asp Gln Glu Ile Arg		
	450	455 460
Ala Glu Leu Asn Lys His Phe Gly His Pro Ser Gln Ala Val Phe Asp		
465	470	475 480
Asp Glu Ala Asp Lys Thr Gly Glu Leu Arg Asp Ser Asp Phe Ser Asn		
	485	490 495
Glu Gln Phe Ser Lys Leu Pro Met Phe Ile Asn Ser Gly Leu Ala Met		
	500	505 510
Asp Gly Leu Phe Asp Asp Ser Glu Asp Glu Ser Asp Lys Leu Ser Tyr		
	515	520 525
Pro Trp Asp Gly Thr Gln Ser Tyr Ser Leu Phe Asn Val Ser Pro Ser		
	530	535 540
Cys Ser Ser Phe Asn Ser Pro Cys Arg Asp Ser Val Ser Pro Pro Lys		
545	550	555 560
Ser Leu Phe Ser Gln Arg Pro Gln Arg Met Arg Ser Arg Ser Arg Ser		
	565	570 575
Phe Ser Arg His Arg Ser Cys Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Ser Arg		
	580	585 590
Ser Arg Ser Pro Gly Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Cys Tyr Tyr Tyr		

595	600	605
Glu Ser Ser His Tyr Arg His Arg Thr His Arg Asn Ser Pro Leu Tyr		
610	615	620
Val Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Arg Pro Arg Tyr Asp		
625	630	635
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 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	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		240
	245	250
His Asp Tyr Cys Gln Ser Ile Asn Ser Lys Thr Glu Ile Leu Ile Asn		255
	260	265
Ile Ser Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Glu Asn Lys Asp Val		270
	275	280
Ser Ser Asp Trp Gln Gly Gln Ile Cys Ser Ser Thr Asp Ser Asp Gln		285
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
Lys His Phe Gly His Pro Ser Gln Ala Val Phe Asp Asp Glu Ala Asp		335
	340	345
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
Asn Ser Pro Cys Arg Asp Ser Val Ser Pro Pro Lys Ser Leu Phe Ser		415
	420	425
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		480
	485	490
Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Arg Pro Arg Tyr Asp Ser Tyr Glu Glu		495
	500	505
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	
gacaaggtag aacccatcgg	20
<210> 57	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 57	
ttagacacat 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 gaggcccgga 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> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 91	
ucucuccucu cggcacauac ug	22
<210> 92	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 92	
uuuaaagguu cauuuguaug au	22
<210> 93	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 93	
uuuaaagguu cauuagatag tu	22
<210> 94	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW1引物	
<400> 94	
gtcatacacg gctctcctct ct	22
<210> 95	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>	
<223>	miR485-3p_FW2引物
<400>	95
tcatacacgg ctctcctctc	20
<210>	96
<211>	19
<212>	DNA
<213>	人工序列(Artificial Sequence)
<220>	
<223>	miR485-3p_FW3引物
<400>	96
catacacggc tctcctctc	19
<210>	97
<211>	21
<212>	DNA
<213>	人工序列(Artificial Sequence)
<220>	
<223>	miR485-3p_FW4引物
<400>	97
catacacggc tctcctctct a	21
<210>	98
<211>	19
<212>	DNA
<213>	人工序列(Artificial Sequence)
<220>	
<223>	miR485-3p_FW5引物
<400>	98
catacacggc tctcgtctc	19
<210>	99
<211>	22
<212>	DNA
<213>	人工序列(Artificial Sequence)
<220>	
<223>	miR485-3p_FW6引物
<400>	99
catacacggc tctcgtctct aa	22
<210>	100
<211>	24
<212>	DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW7引物	
<400> 100	
gtcatacacg gctctcctct ctaa	24
<210> 101	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW8引物	
<400> 101	
gtcatacacg gctctcctc	19
<210> 102	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW10引物	
<400> 102	
gtcatacacg gctctcctct g	21
<210> 103	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW11引物	
<400> 103	
tcatacacgg ctctcctctc t	21
<210> 104	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW12引物	
<400> 104	
tcatacacgg ctctcctc	18
<210> 105	
<211> 23	

<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW13引物	
<400> 105	
tcatacacgg ctctcctctc taa	23
<210> 106	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW14引物	
<400> 106	
catacacggc tctcctctct aa	22
<210> 107	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR485-3p_FW15引物	
<400> 107	
atacacggct ctcctctcta a	21
<210> 108	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 荧光探针	
<400> 108	
cgaggtcgac ttcctaga	18
<210> 109	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> E2-正向引物	
<400> 109	
gcggacatgg aggacgtgt	19
<210> 110	

<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	E2-反向引物	
<400>	110	
cctggtacac tgccaggca		19
<210>	111	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	E3-正向引物	
<400>	111	
cggacatgga ggacgtgt		18
<210>	112	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	E3/E4-反向引物	
<400>	112	
ctggtacact gccaggcg		18
<210>	113	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	E4-正向引物	
<400>	113	
cggacatgga ggacgtgc		18
<210>	114	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	ApoE荧光探针	
<400>	114	
cagctcctcg gtgctctggc		20

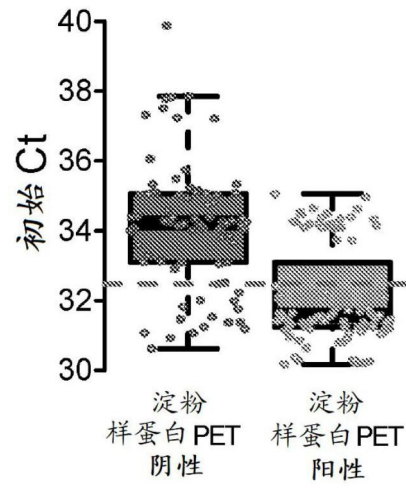


图1A

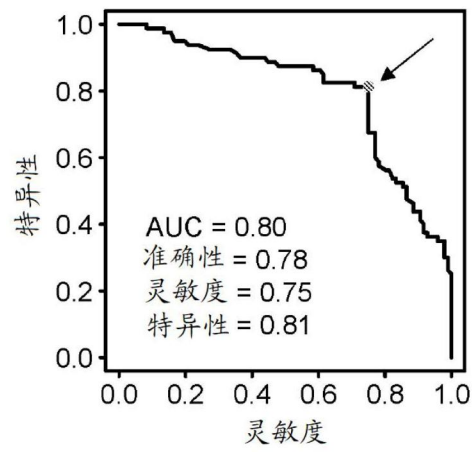


图1B

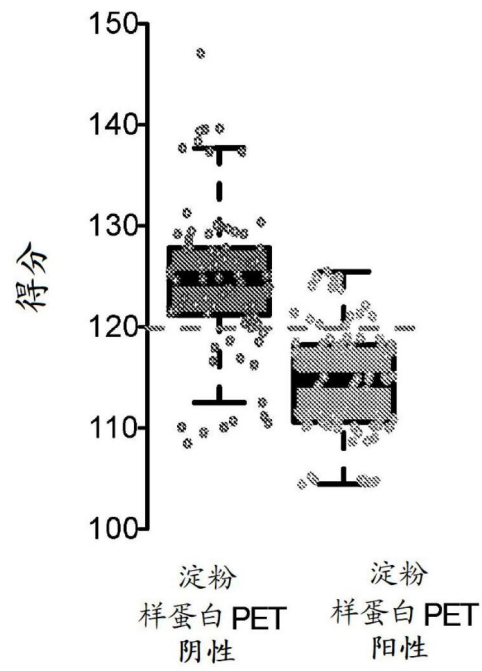


图2A

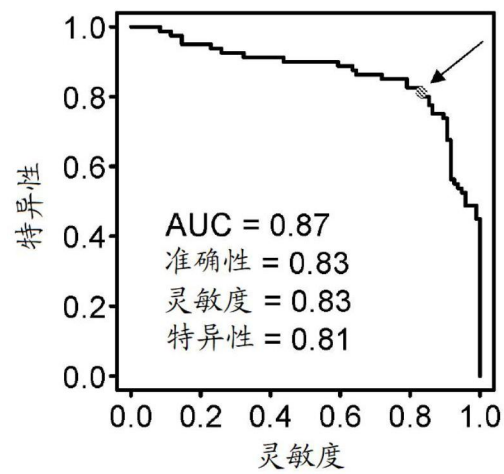


图2B

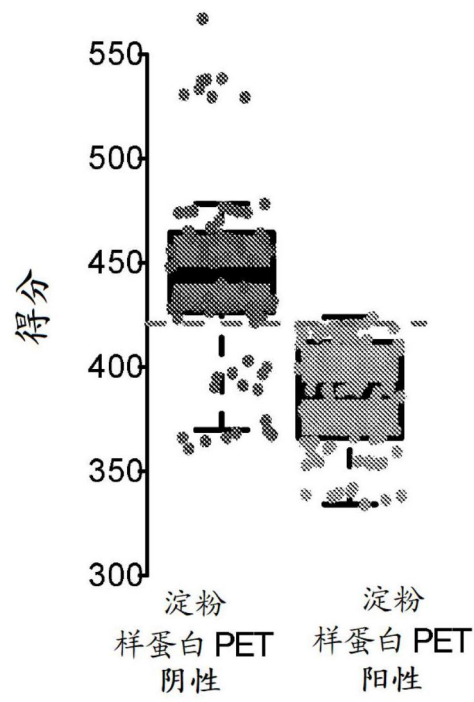


图3A

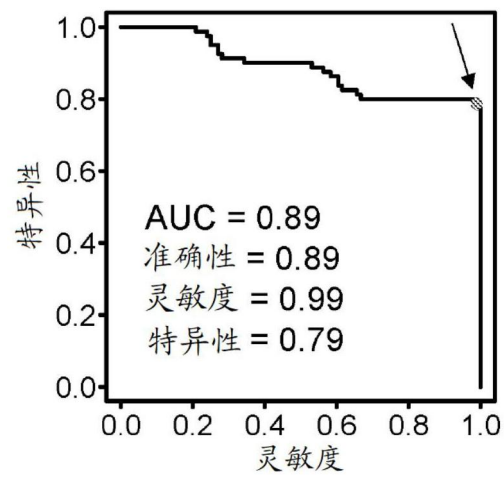
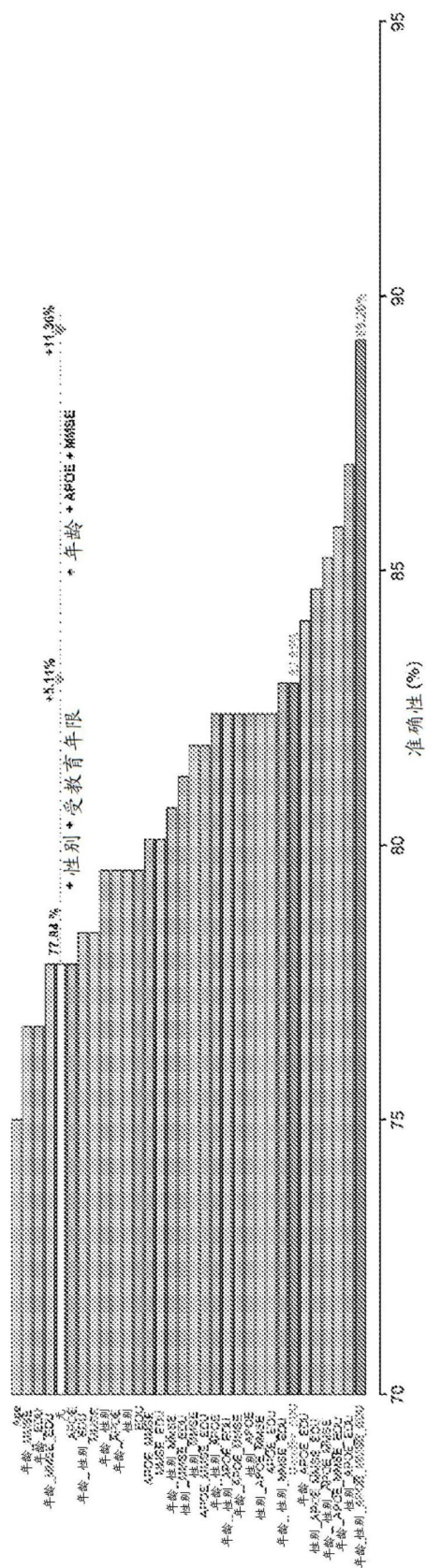


图3B



因素的組合

图4

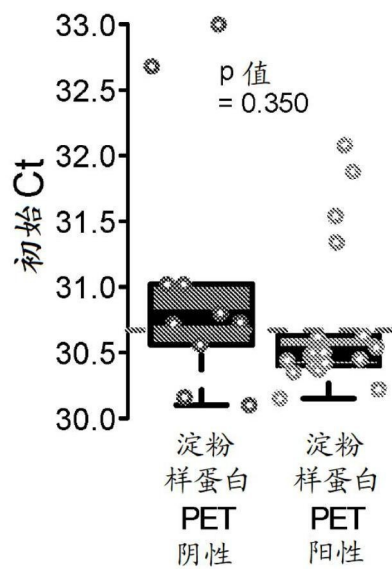


图5A

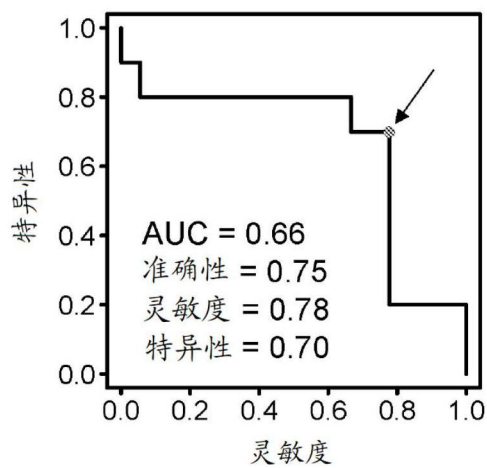


图5B

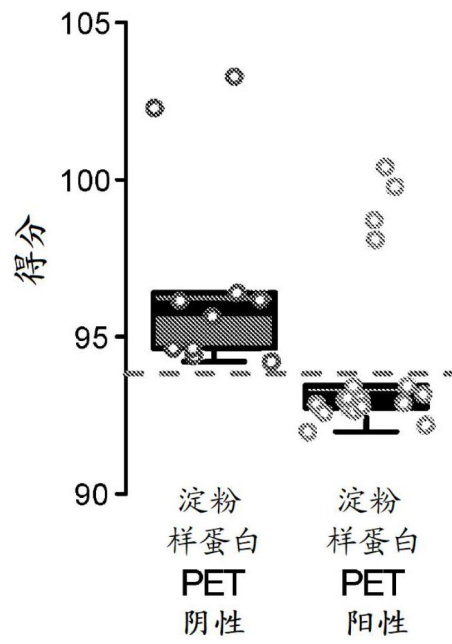


图6A

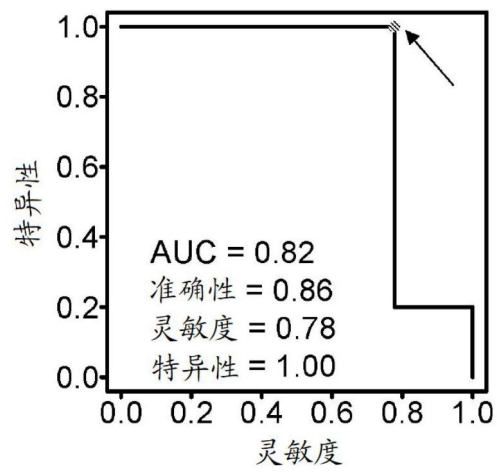


图6B

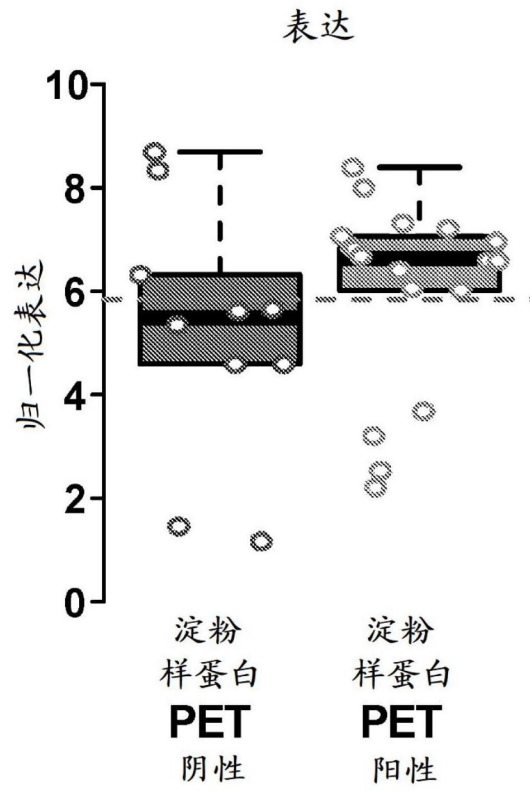


图6C

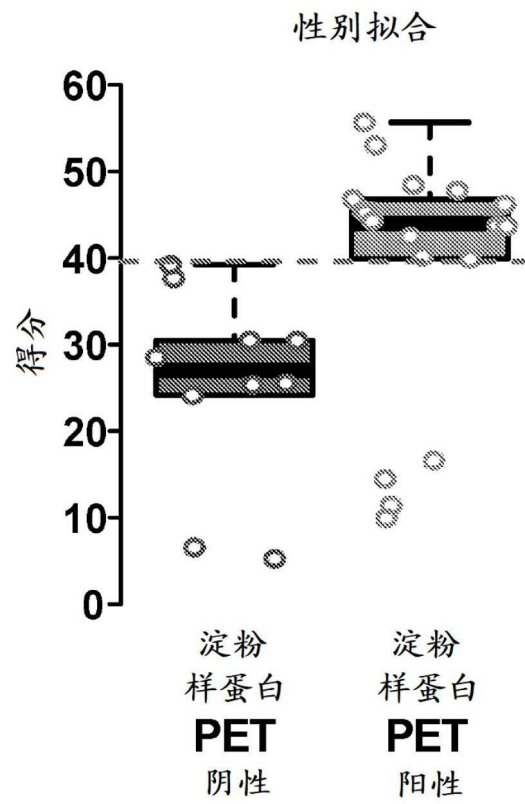
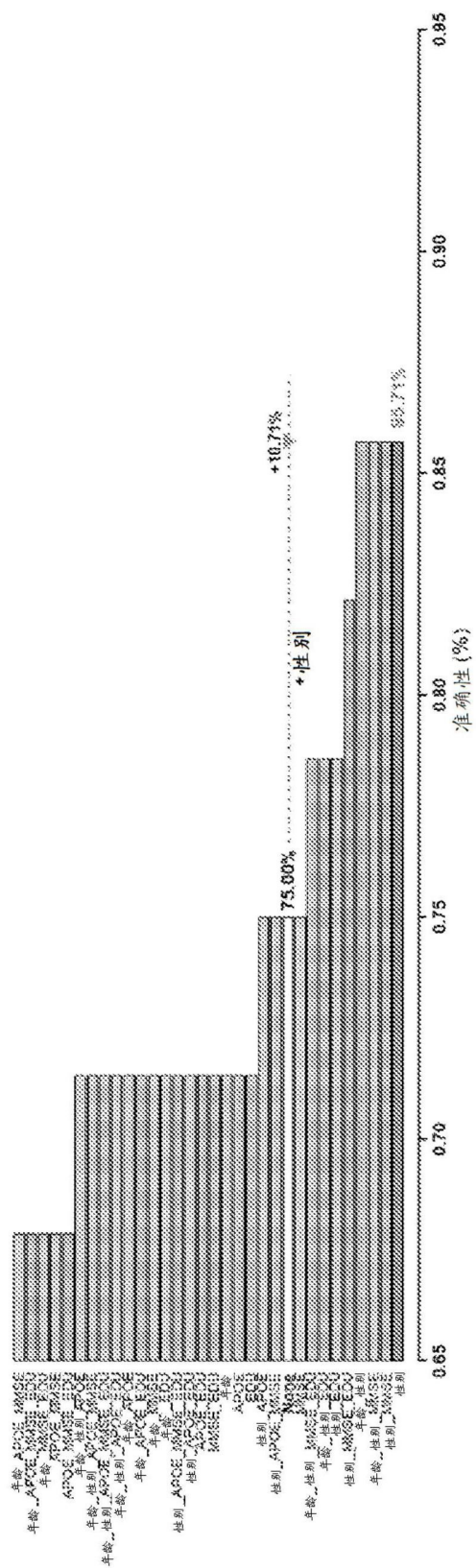


图6D



因素的组合

图7

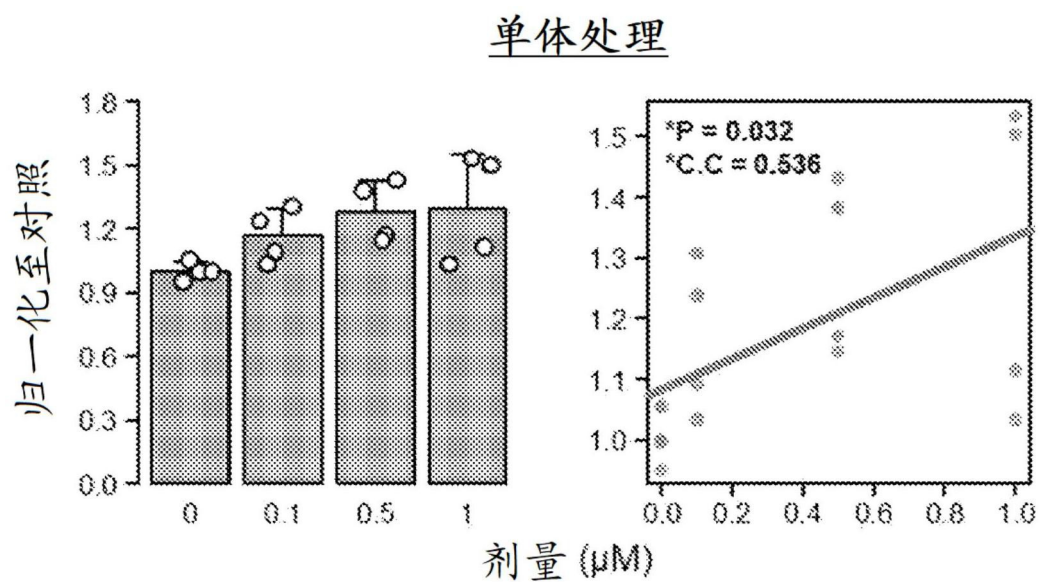


图8A

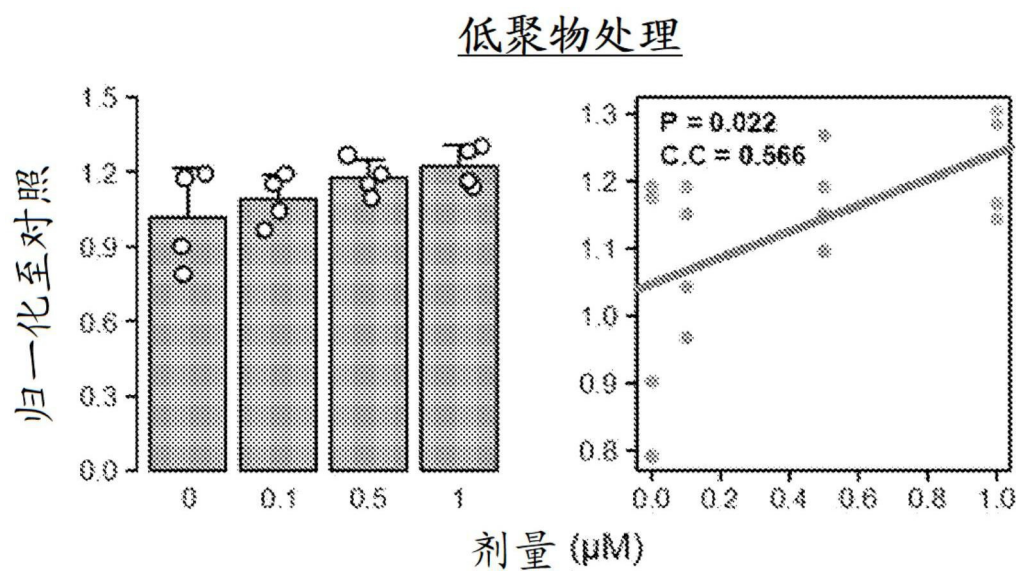


图8B

单体处理

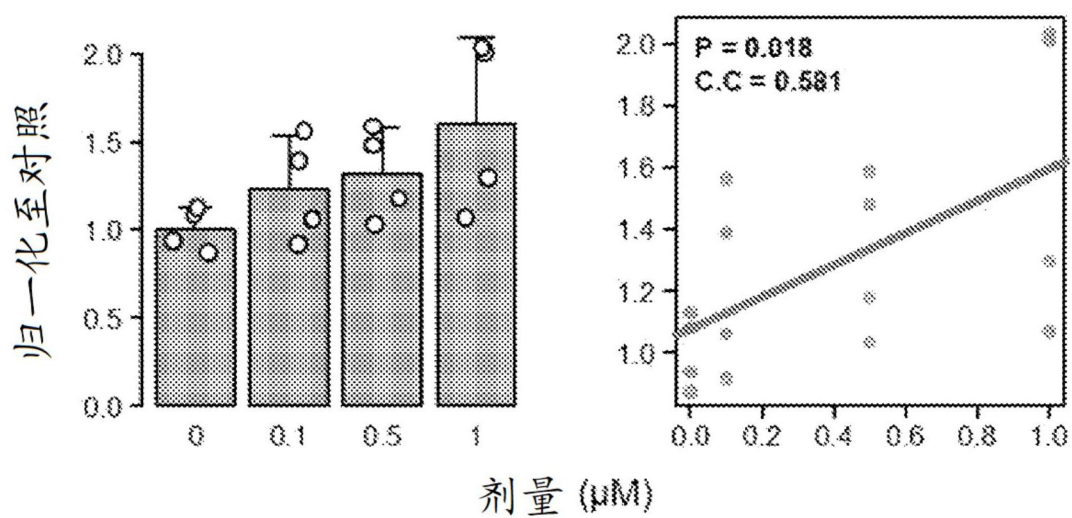


图8C

低聚物处理

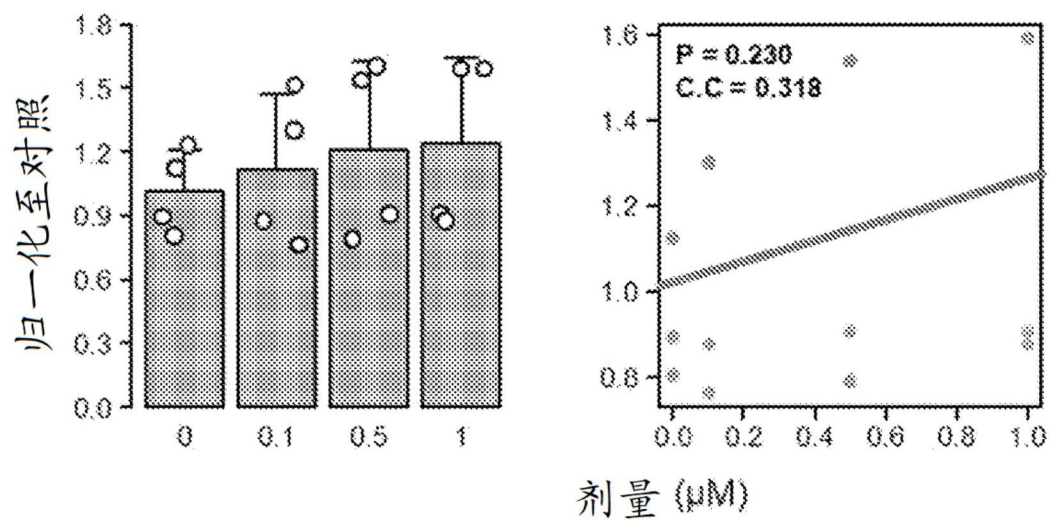


图8D

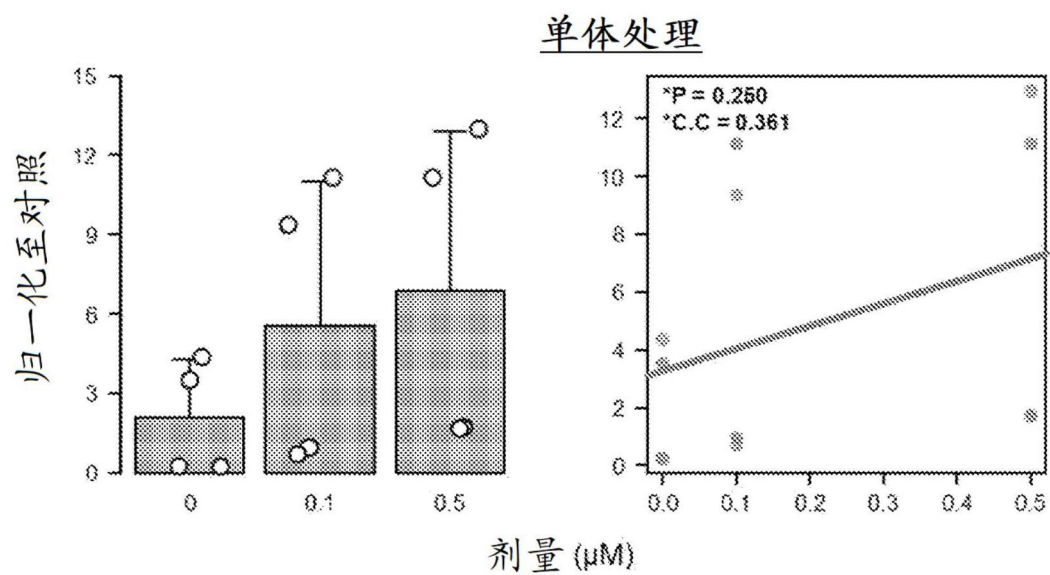


图9A

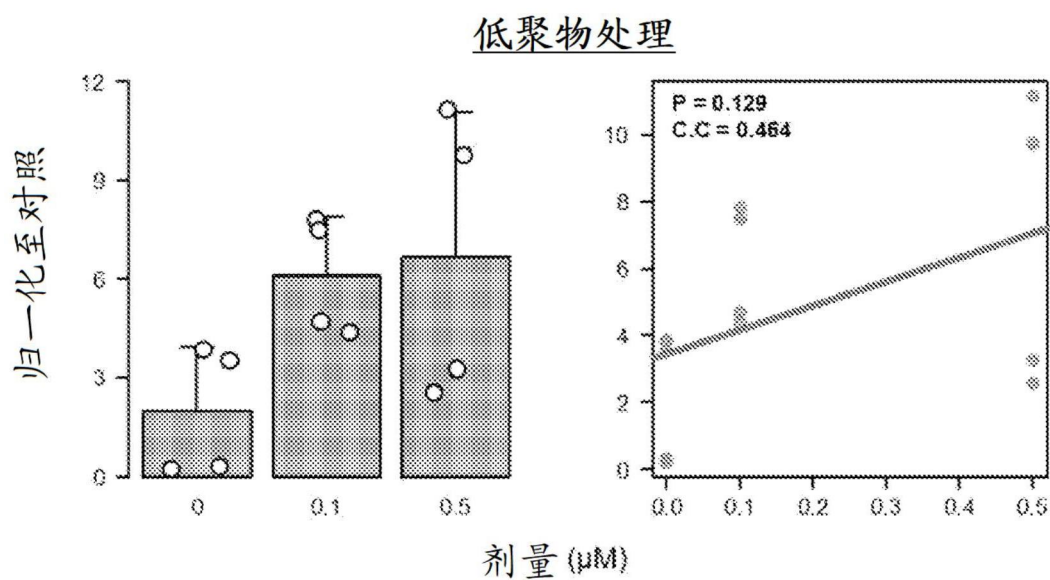


图9B

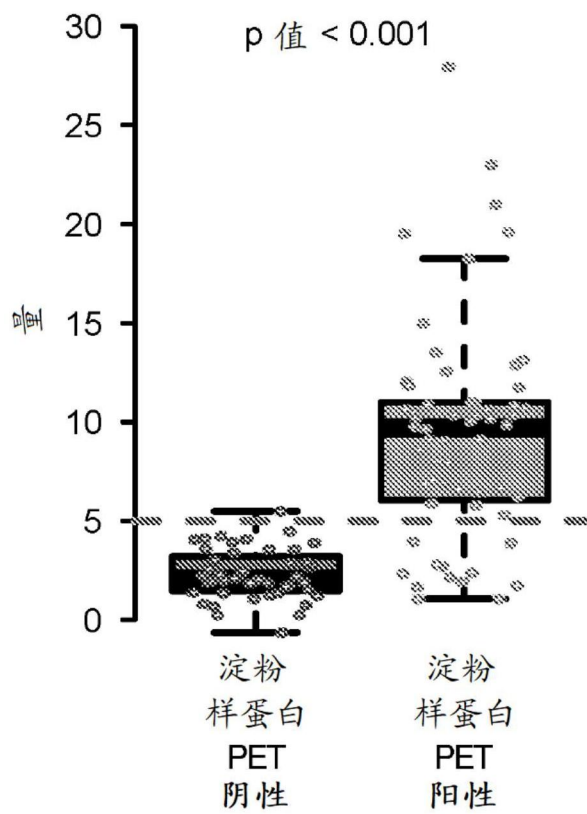


图10A

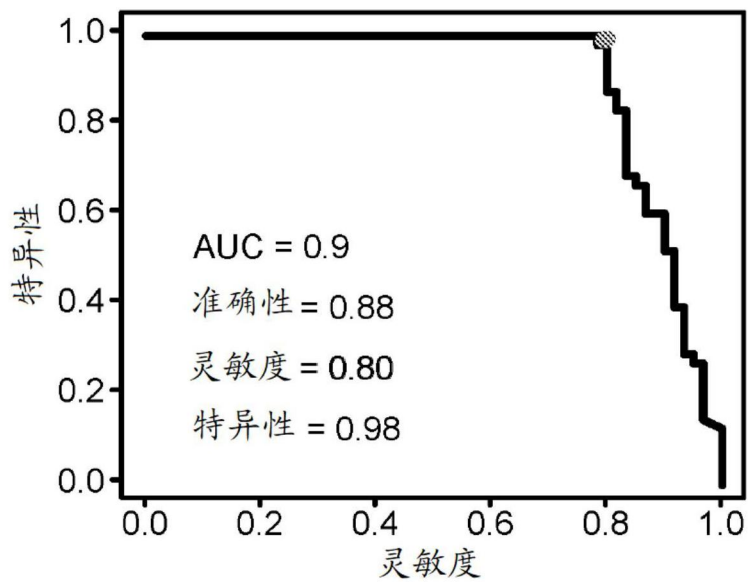


图10B

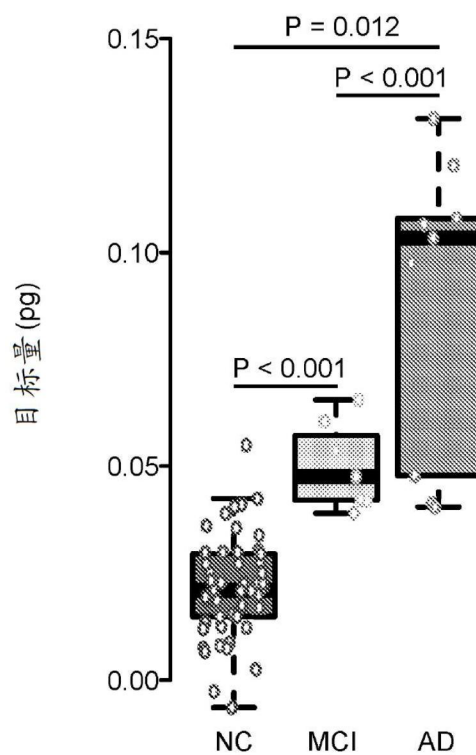


图11A

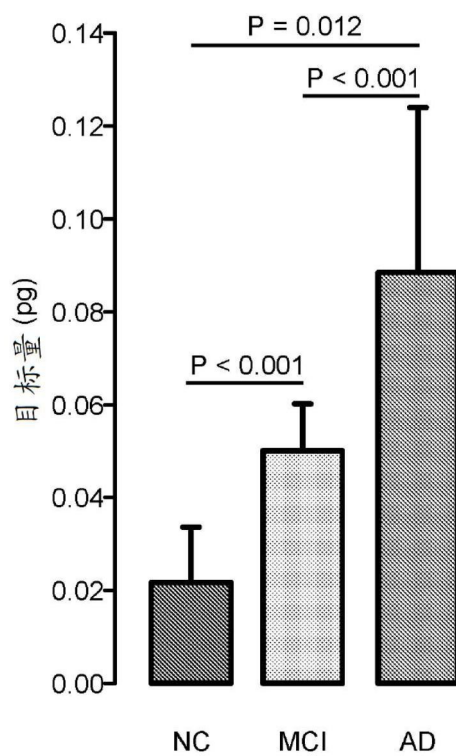


图11B

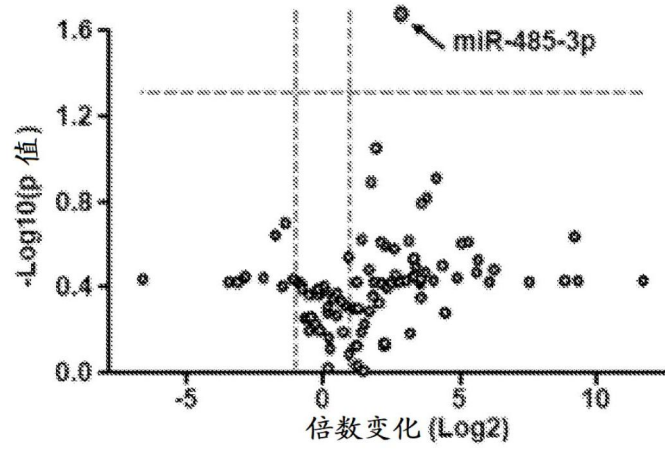


图12A

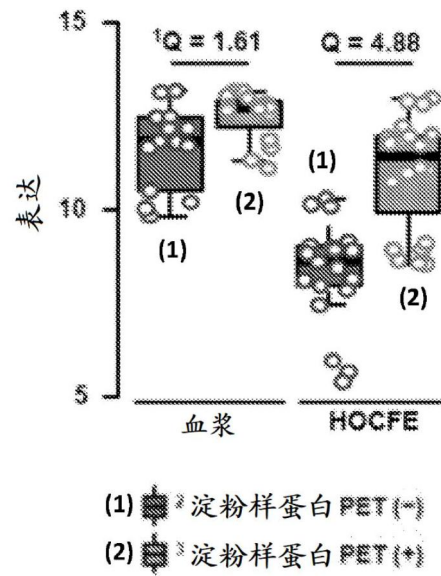


图12B

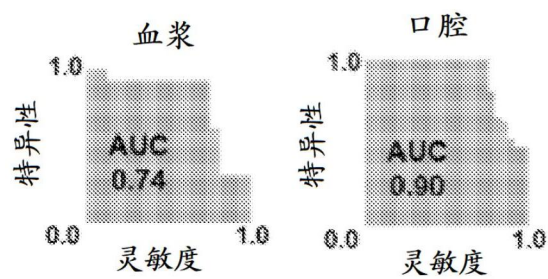


图12C

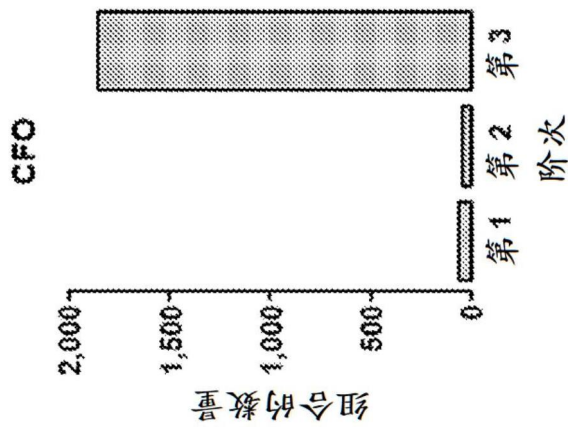


图13A

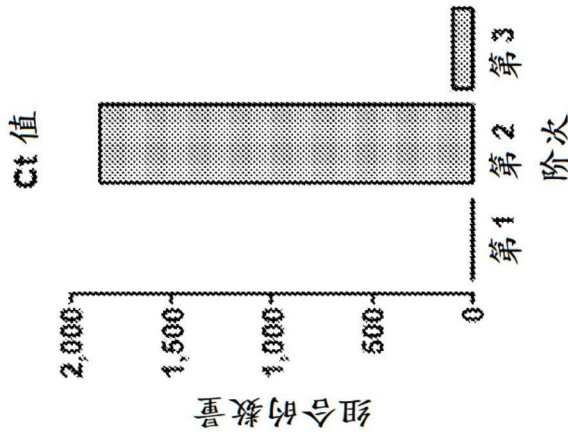


图13B

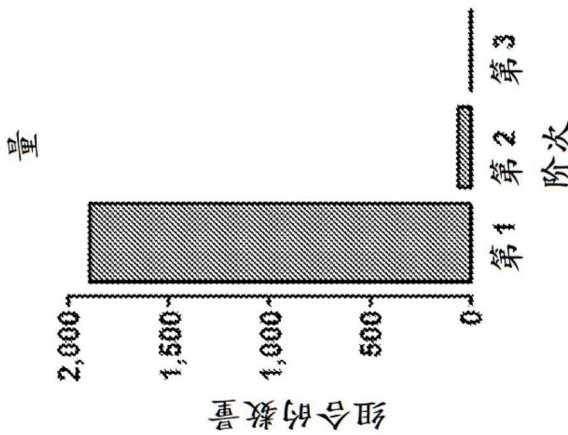


图13C

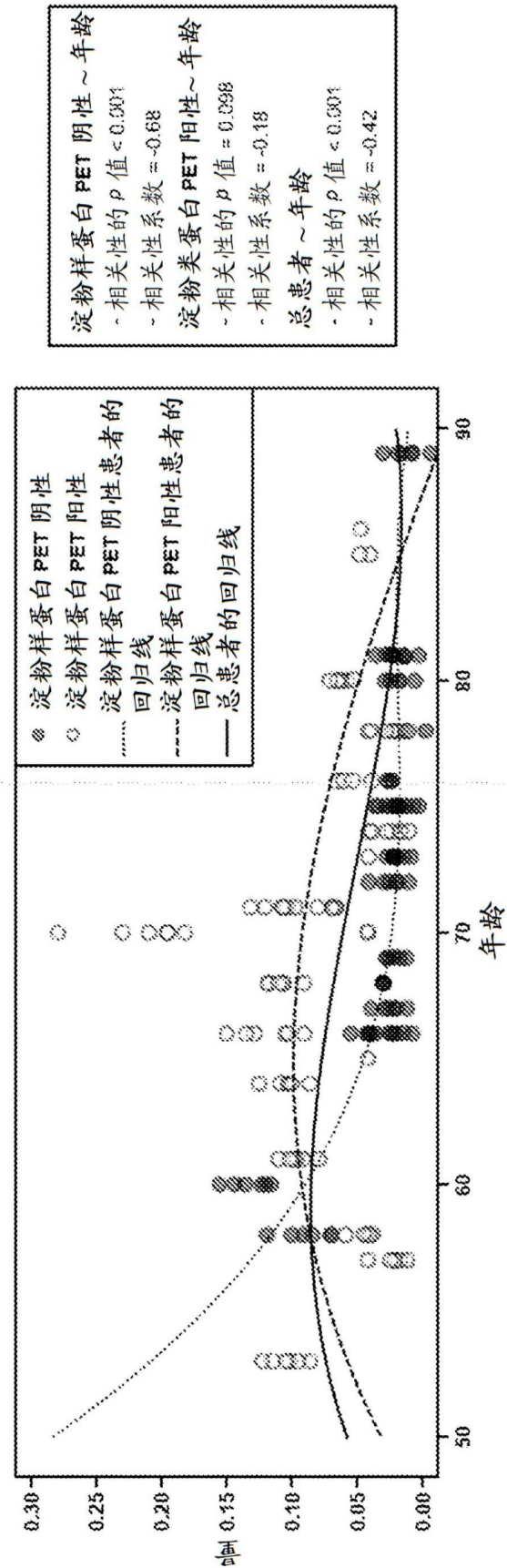


图14A

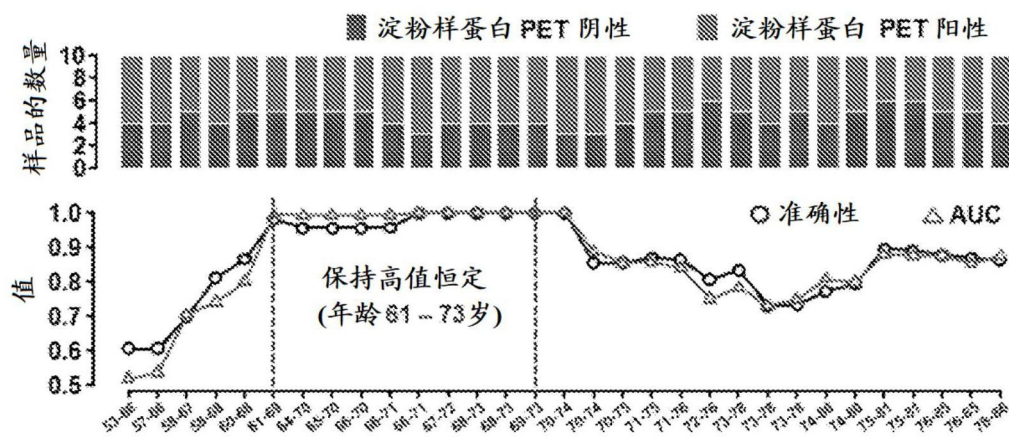


图14B

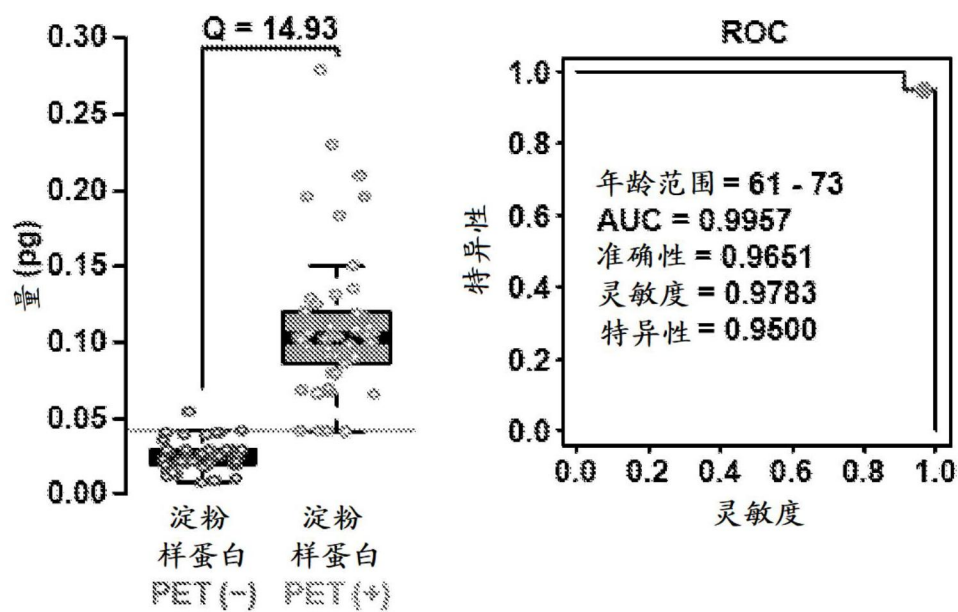


图14C

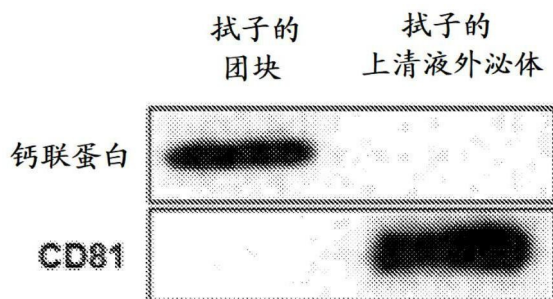


图15A

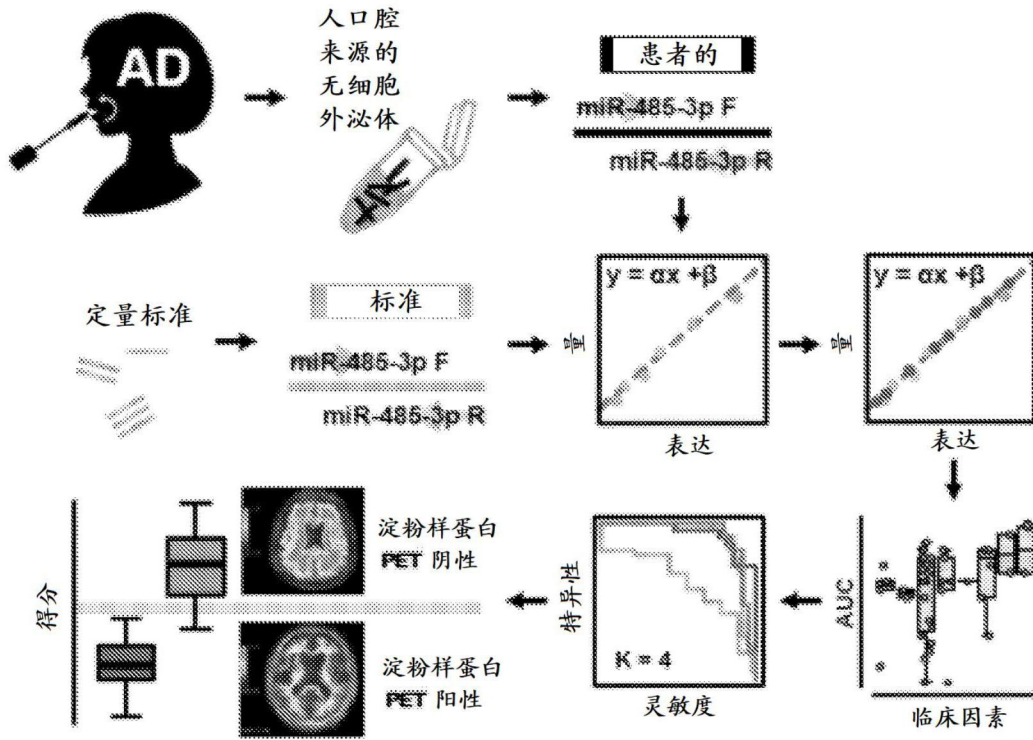


图15B

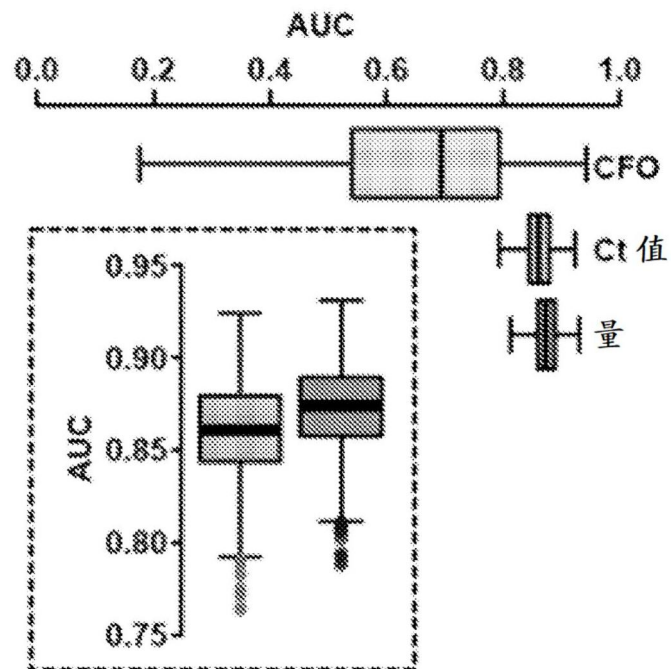


图16A

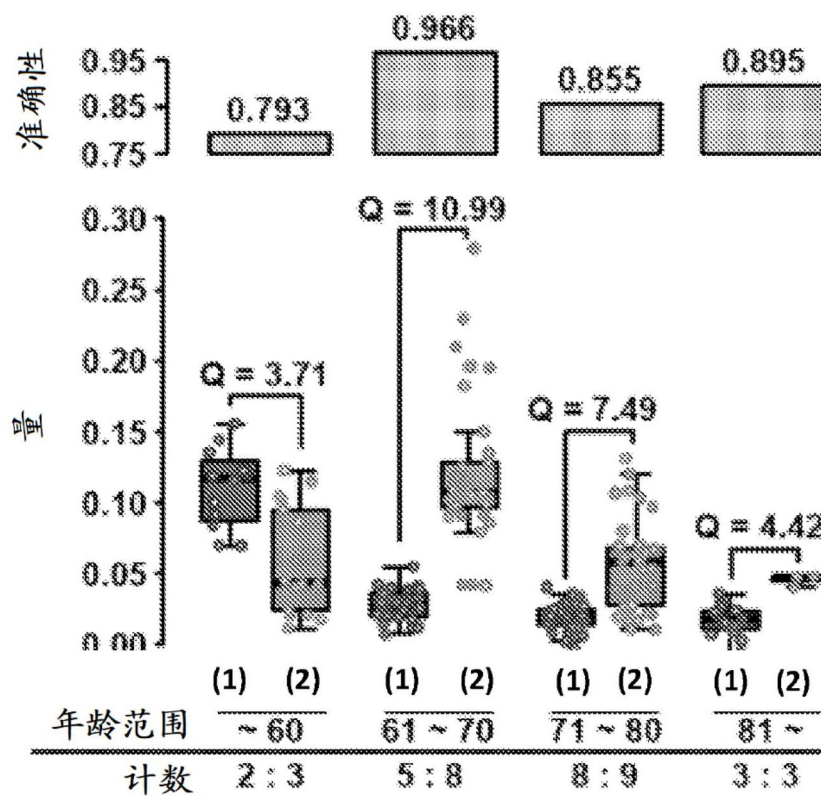


图16B

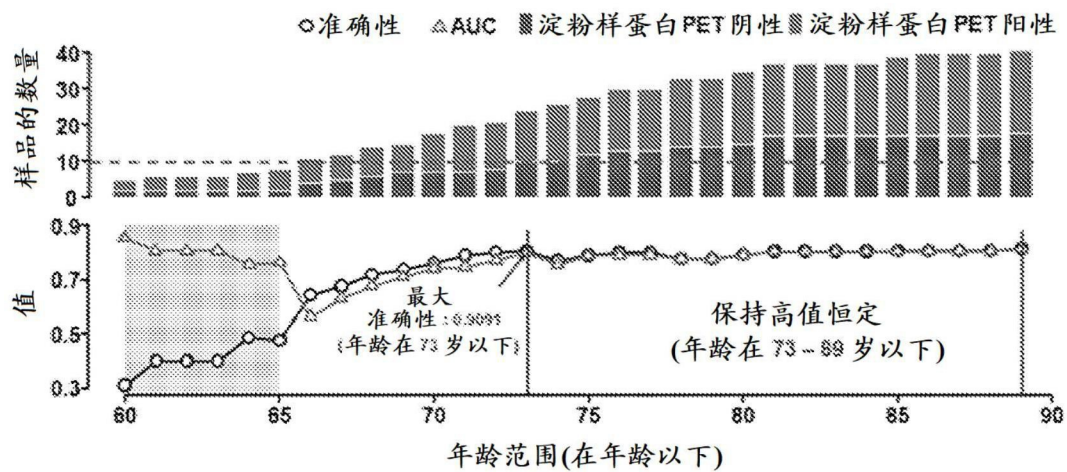


图17A

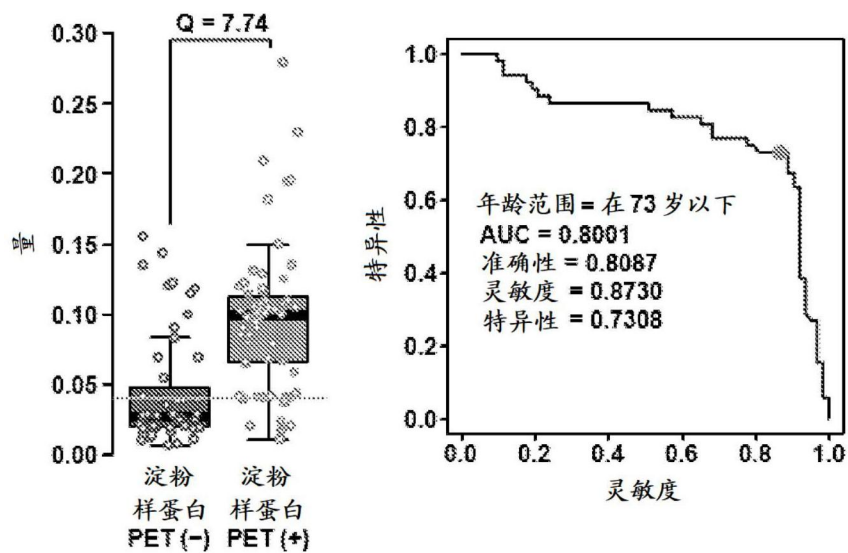


图17B

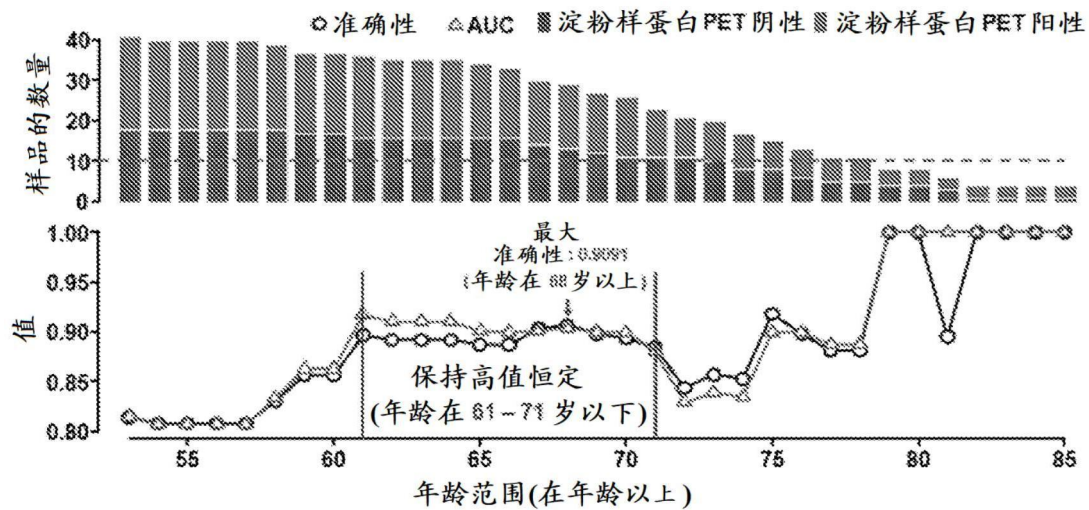


图17C

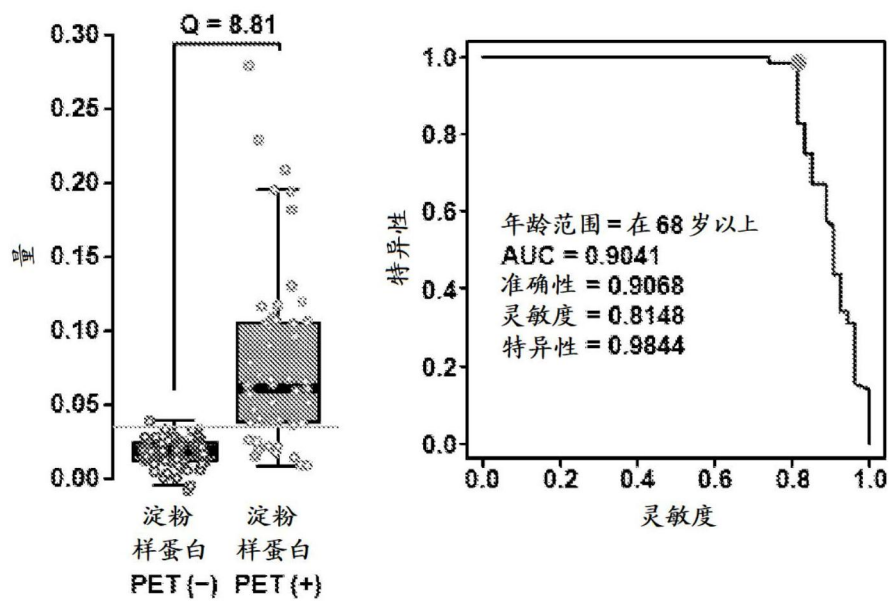


图17D

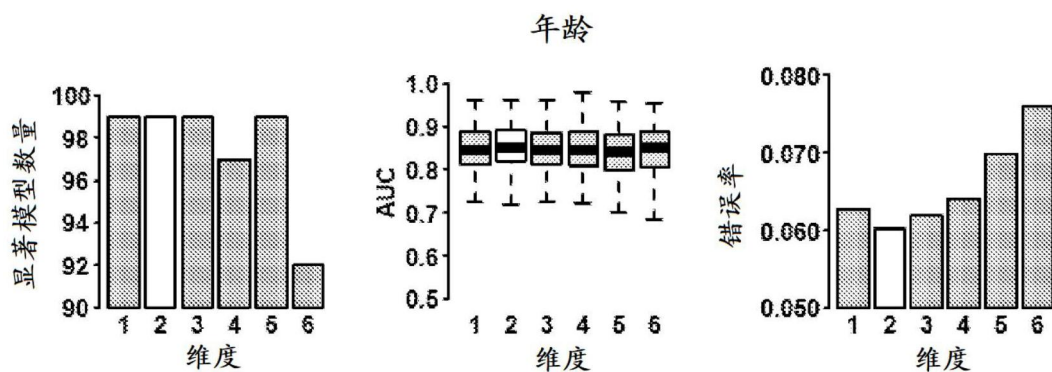


图18A

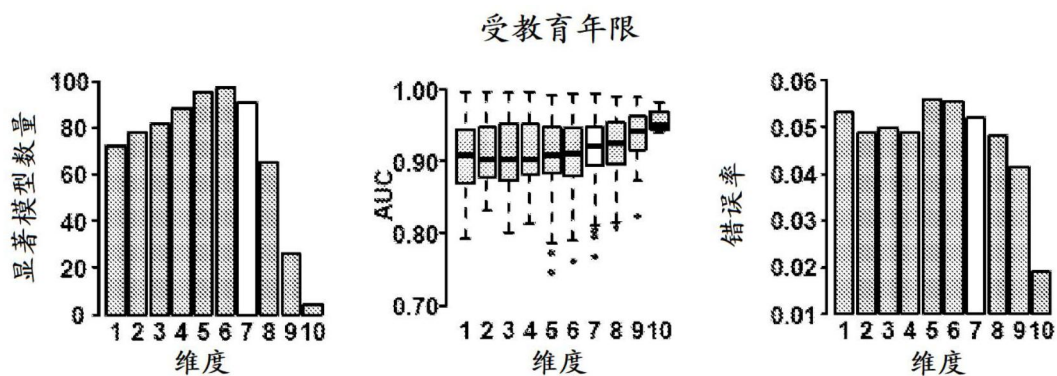


图18B

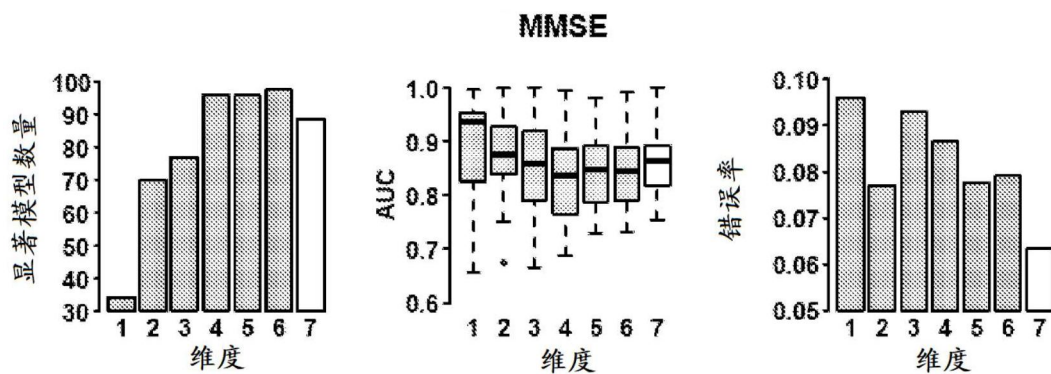


图18C

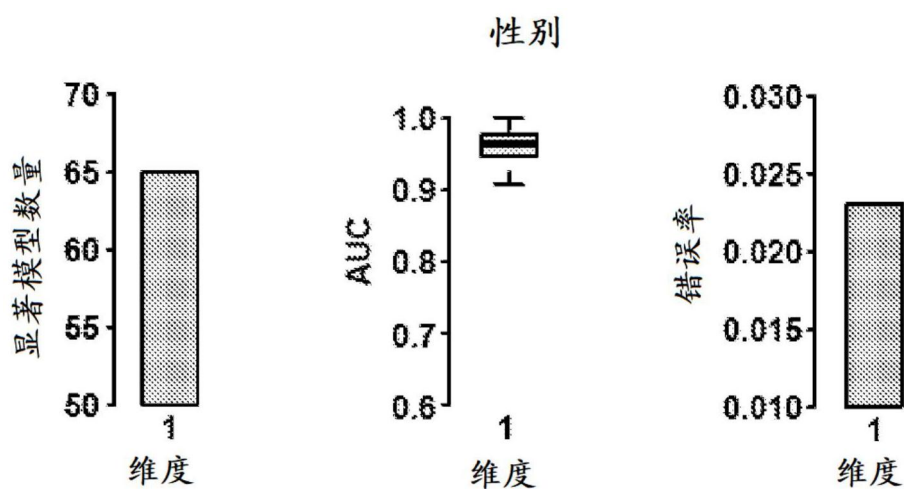


图18D

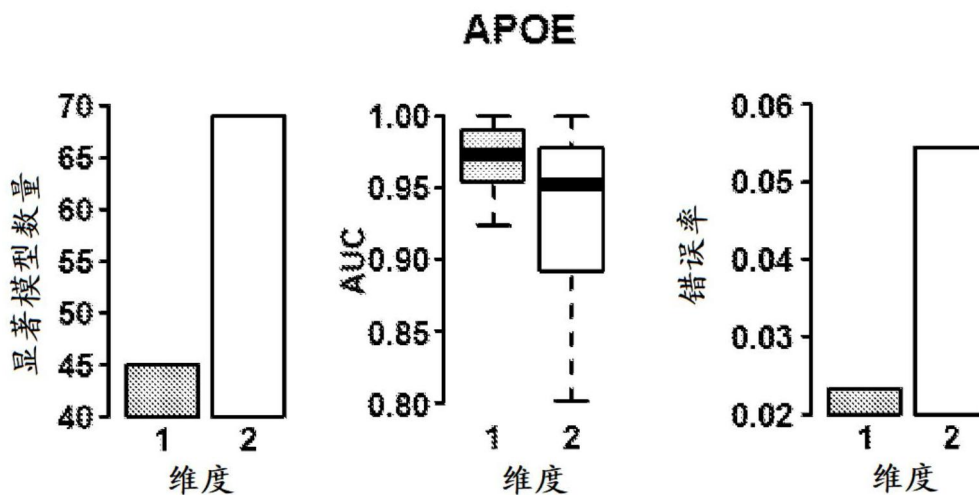


图18E

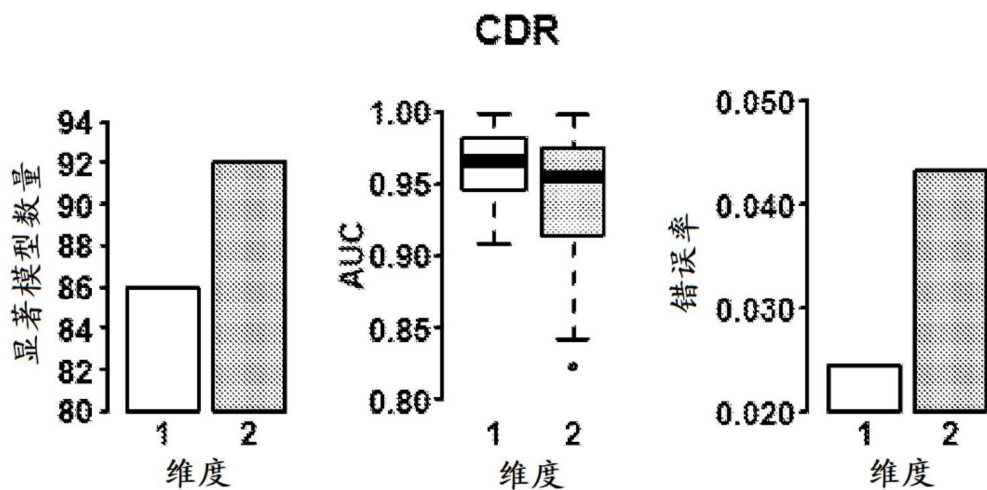


图18F

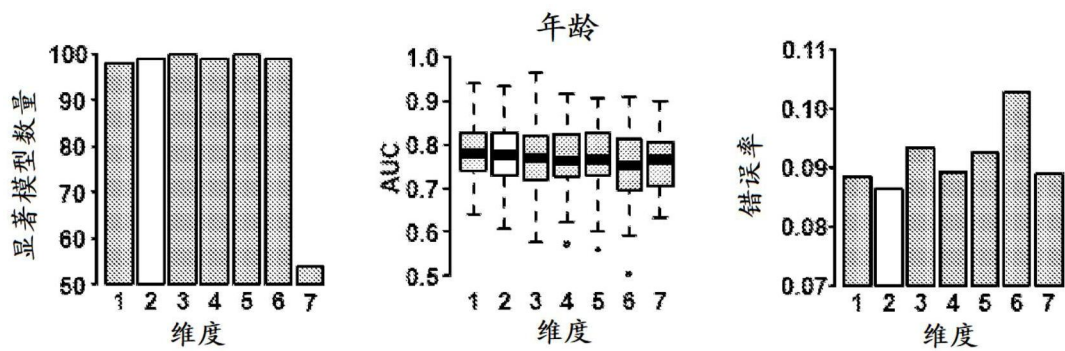


图19A

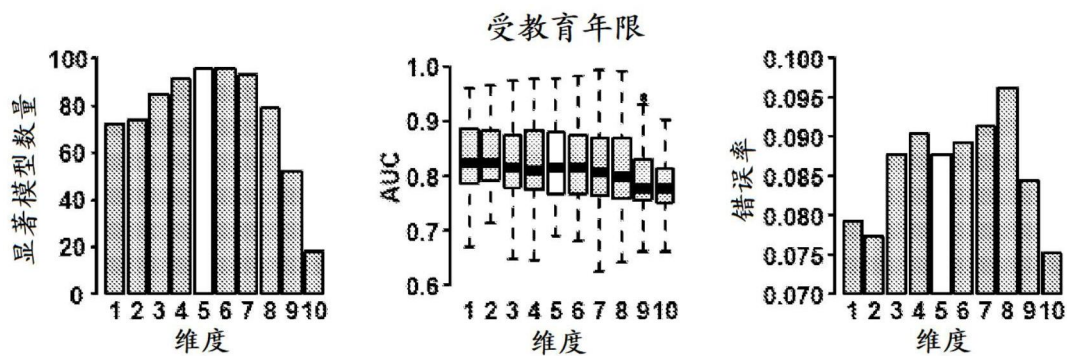


图19B

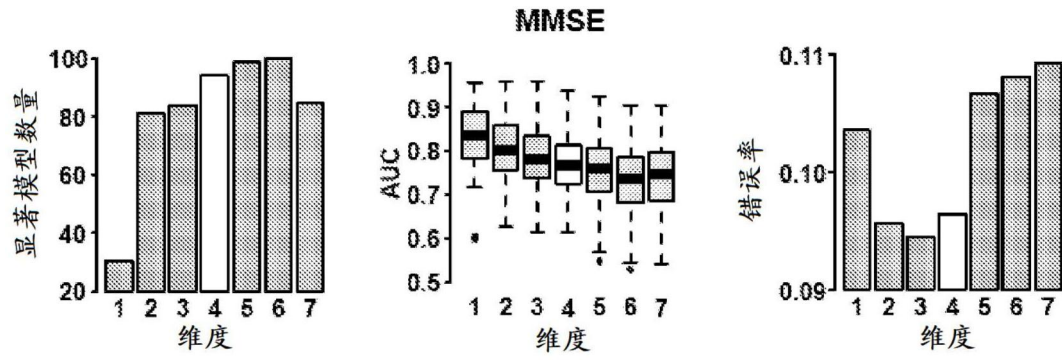


图19C

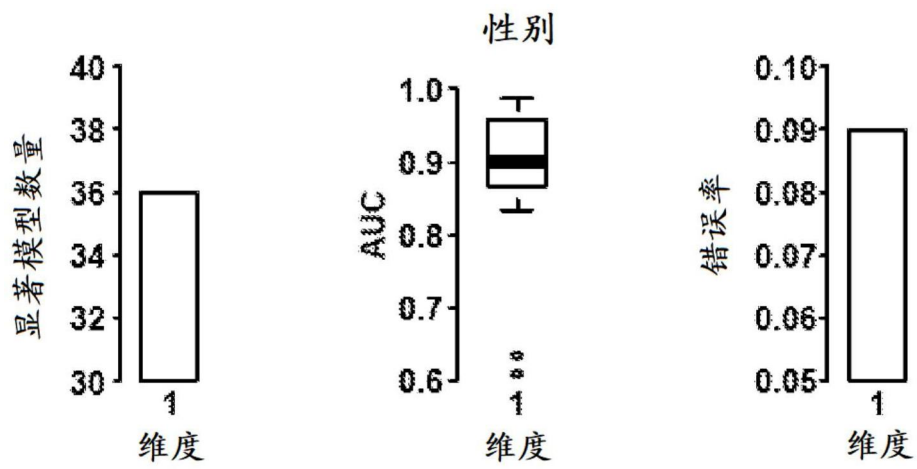


图19D

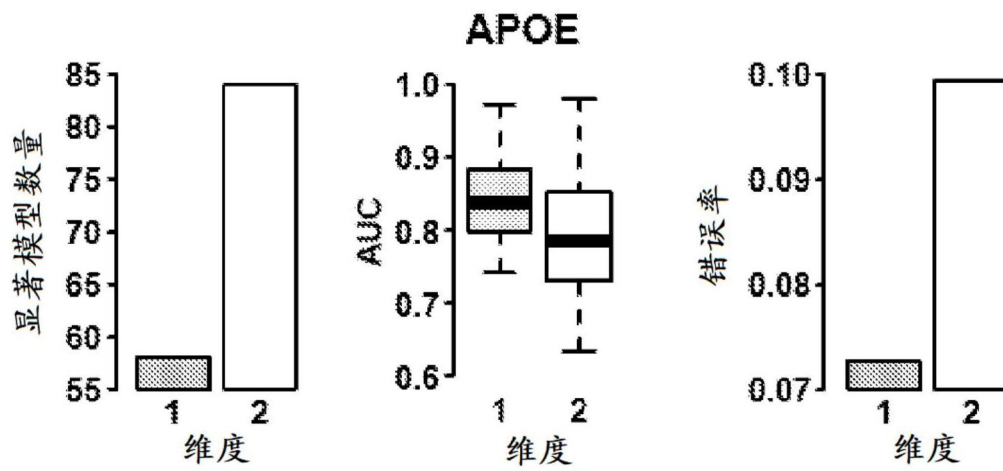


图19E

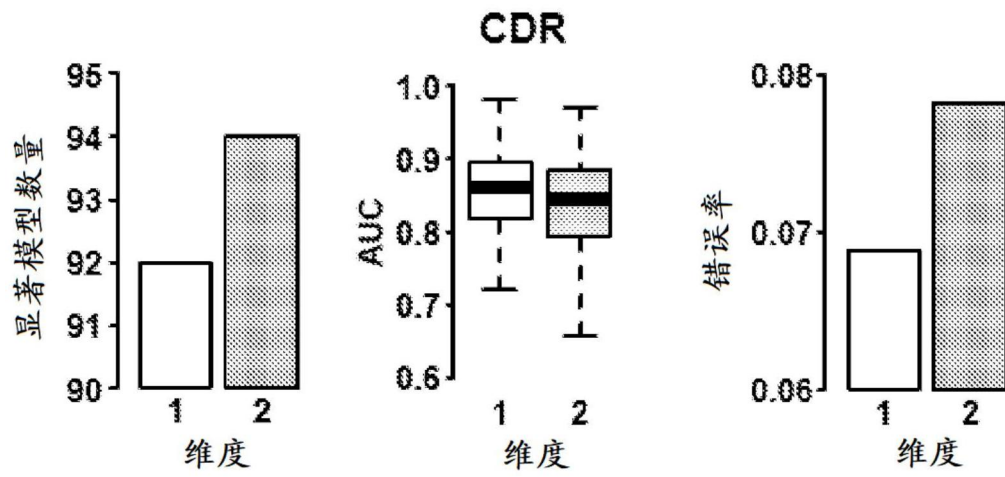


图19F

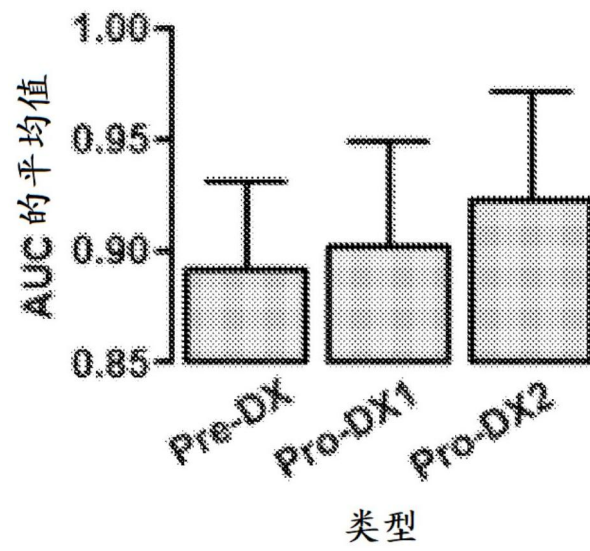


图20A

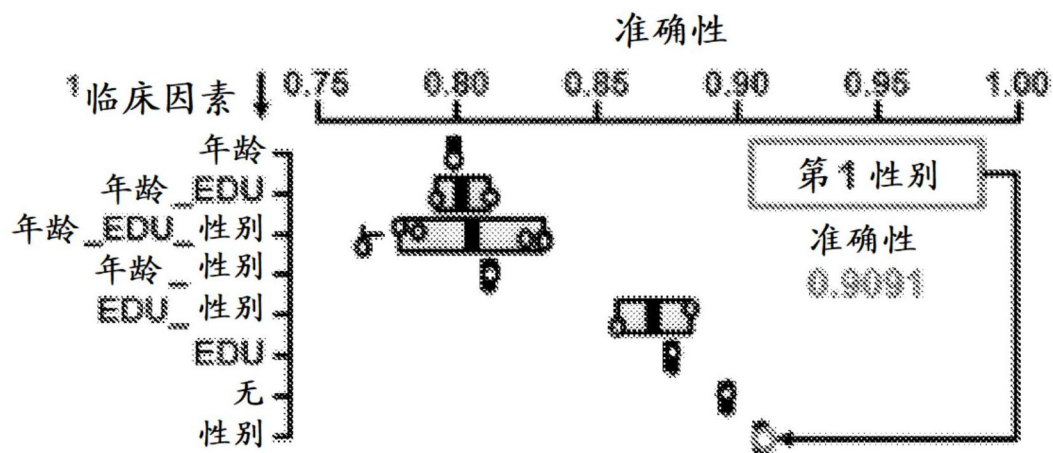


图20B

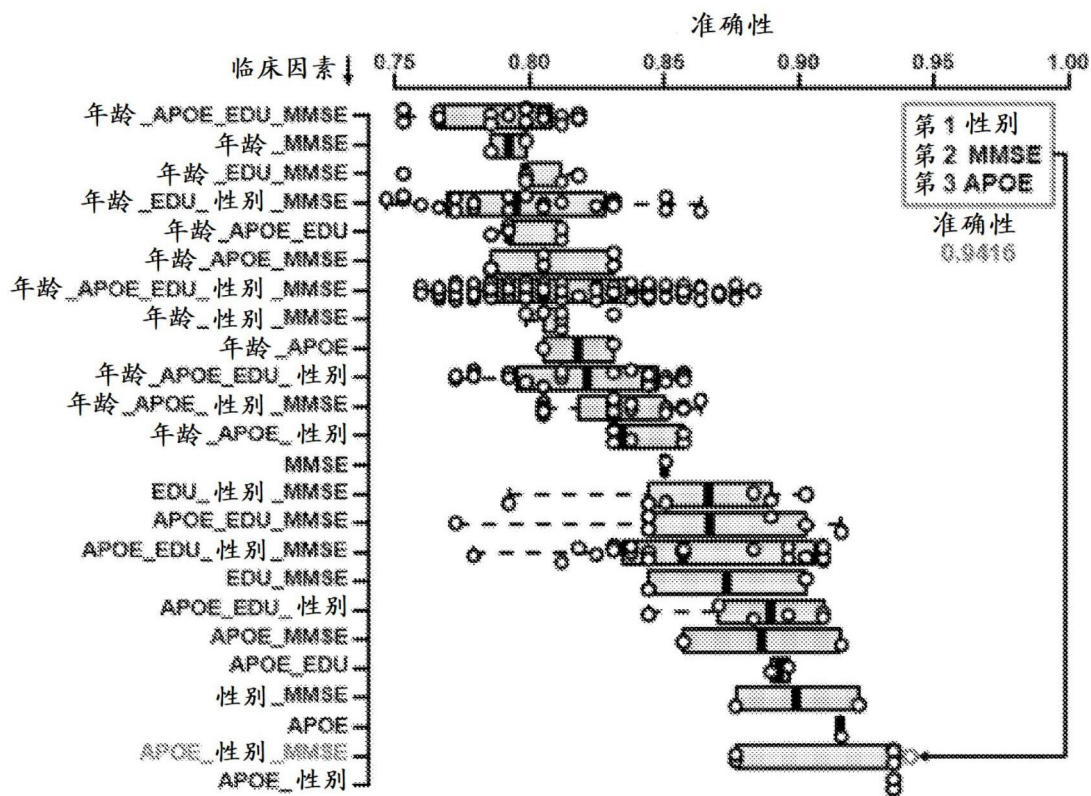


图20C

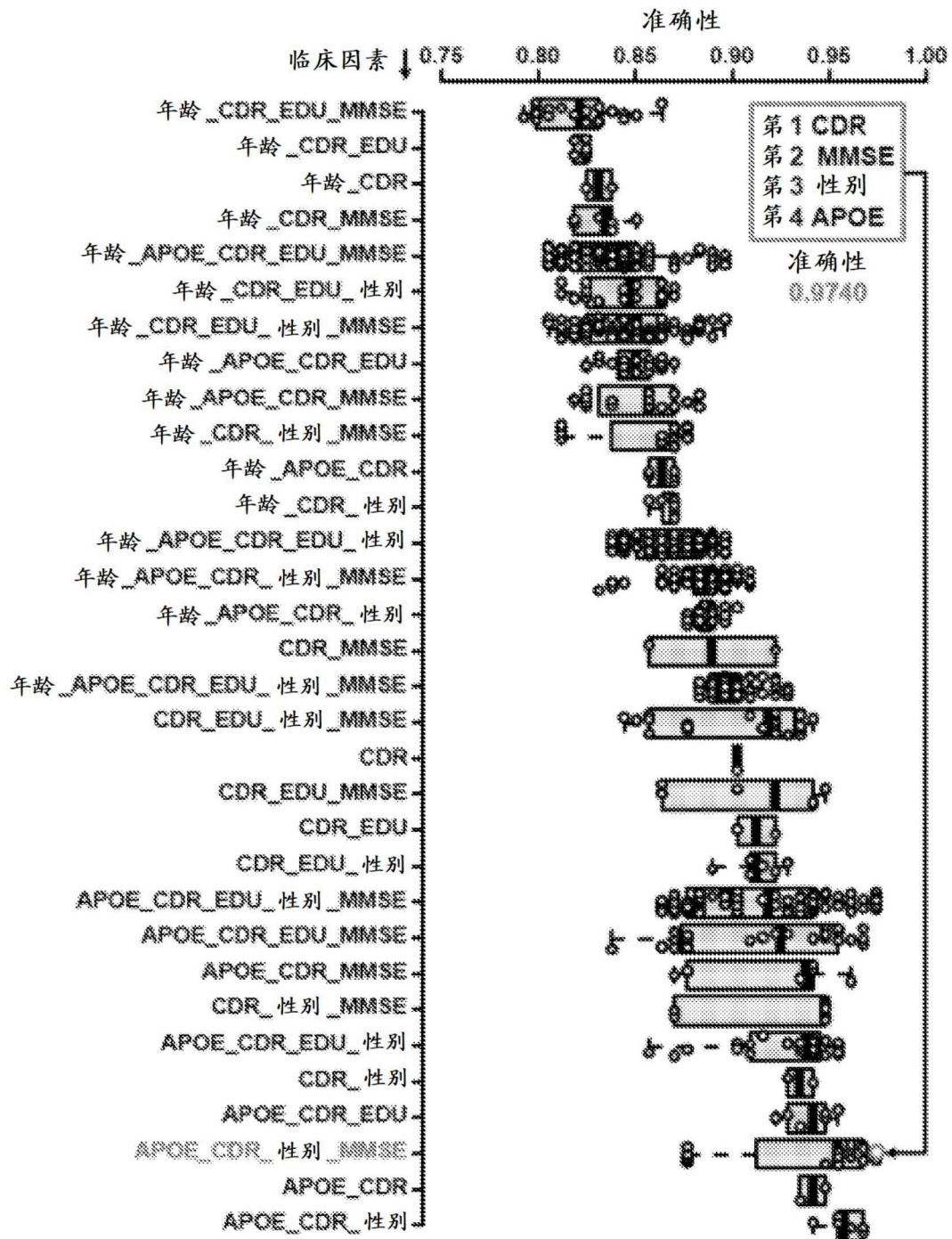


图20D

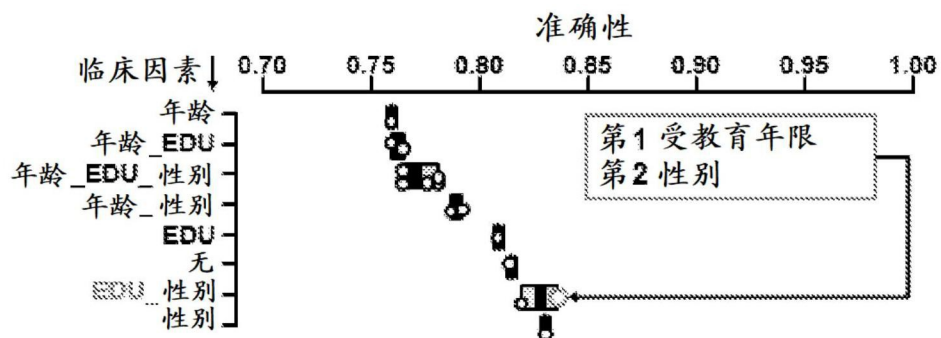


图21A

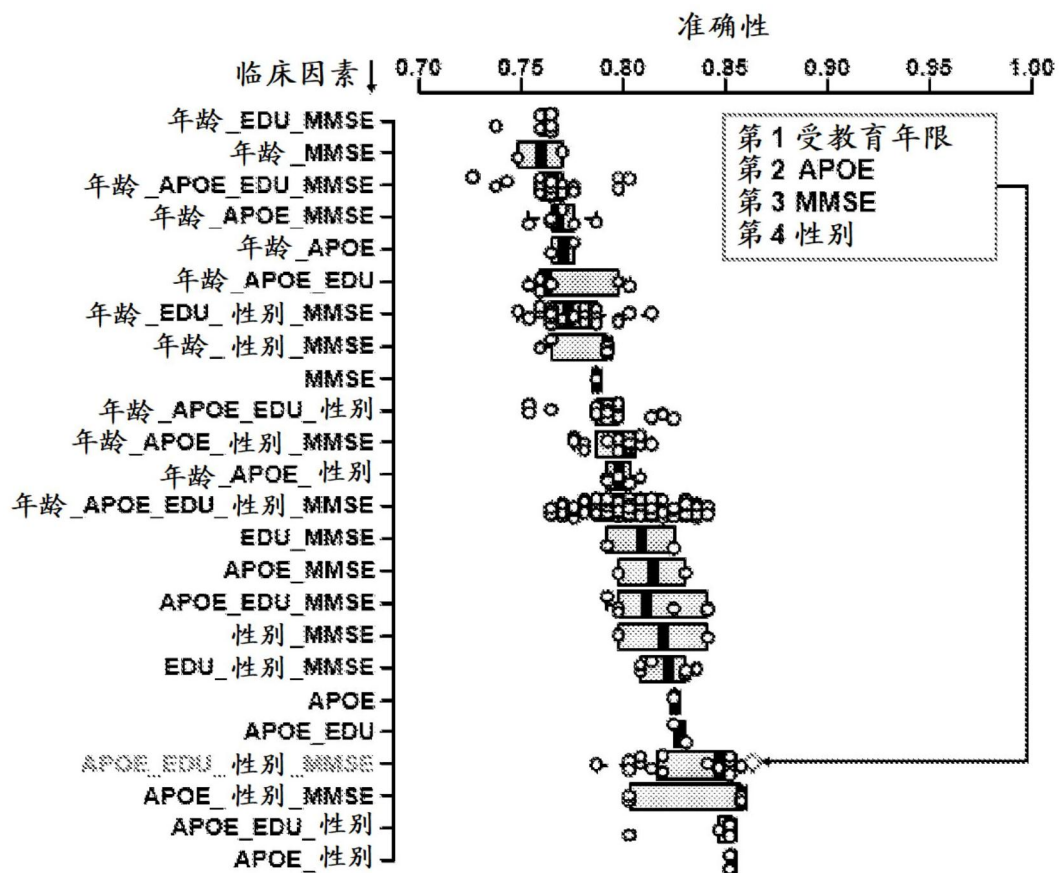


图21B

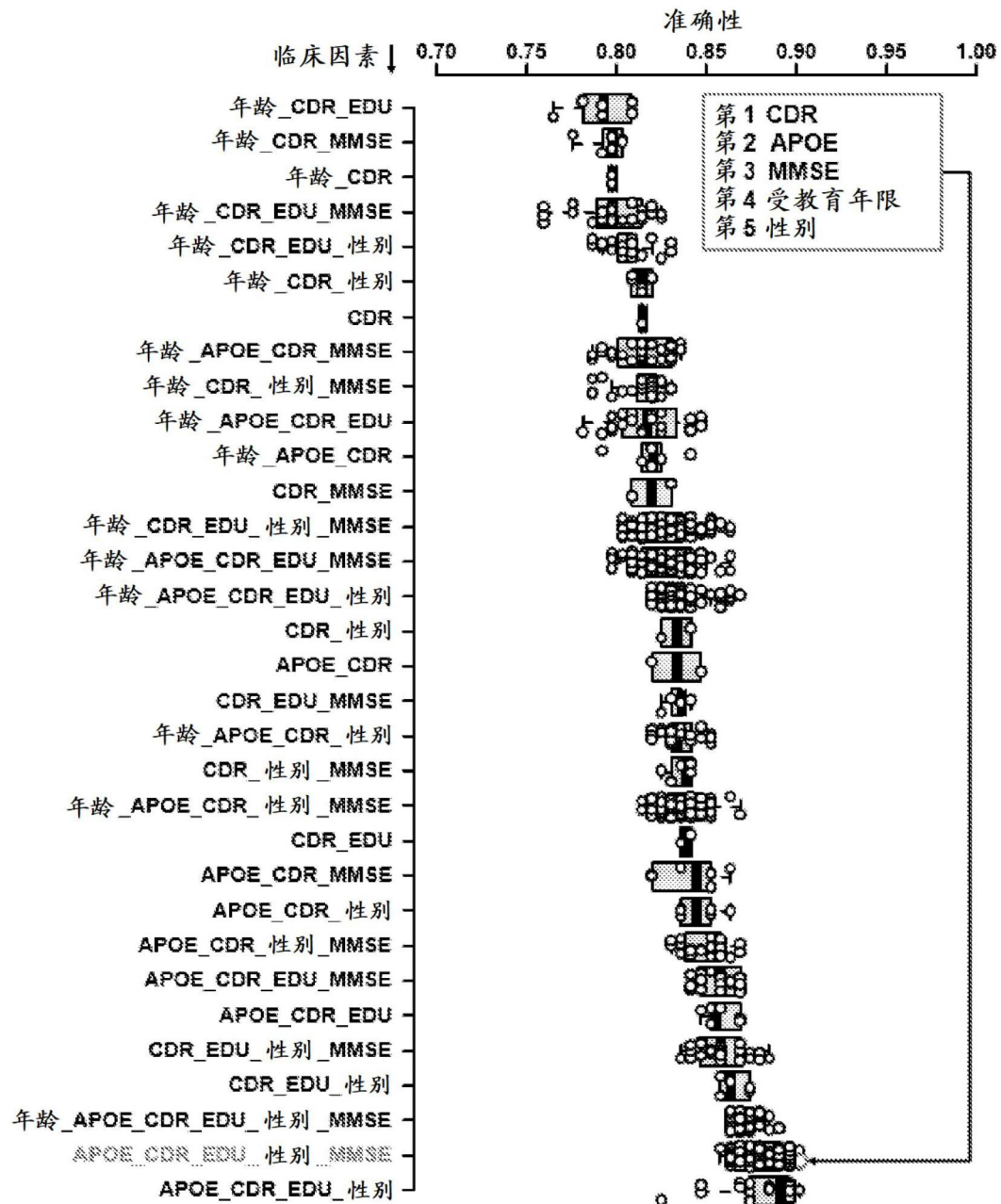


图21C

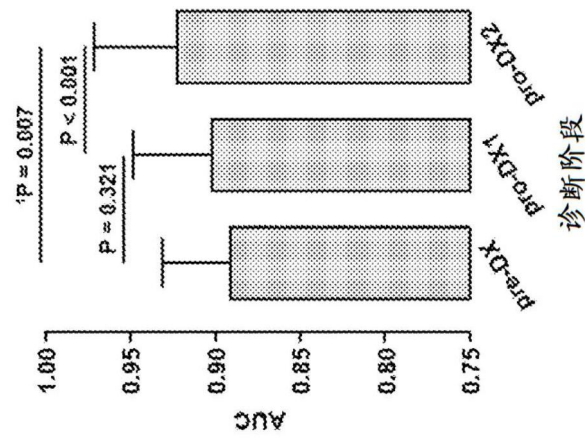


图22A

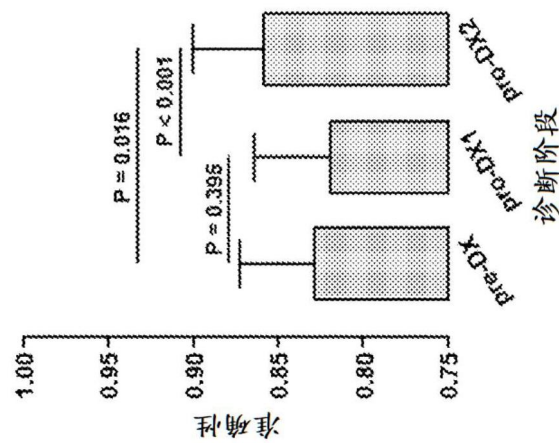


图22B

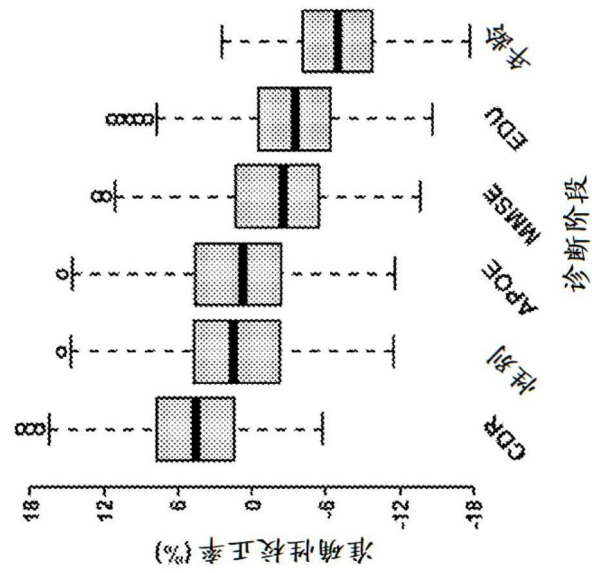


图22C

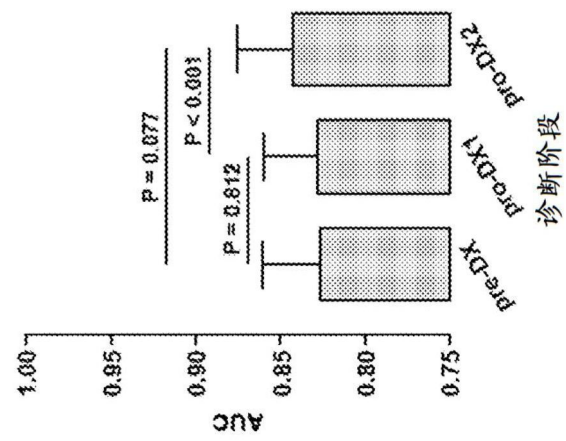


图22D

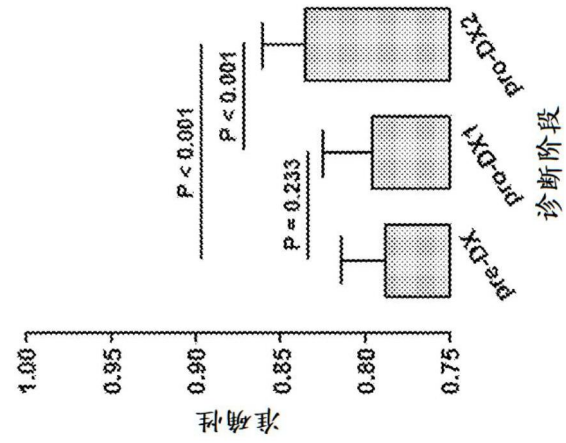


图22E

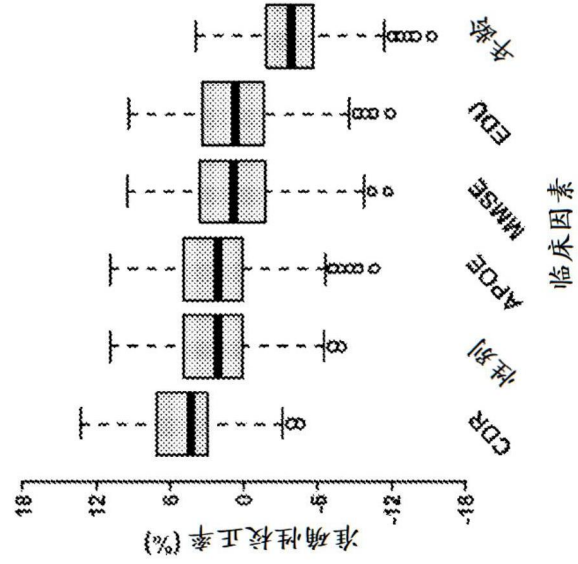


图22F

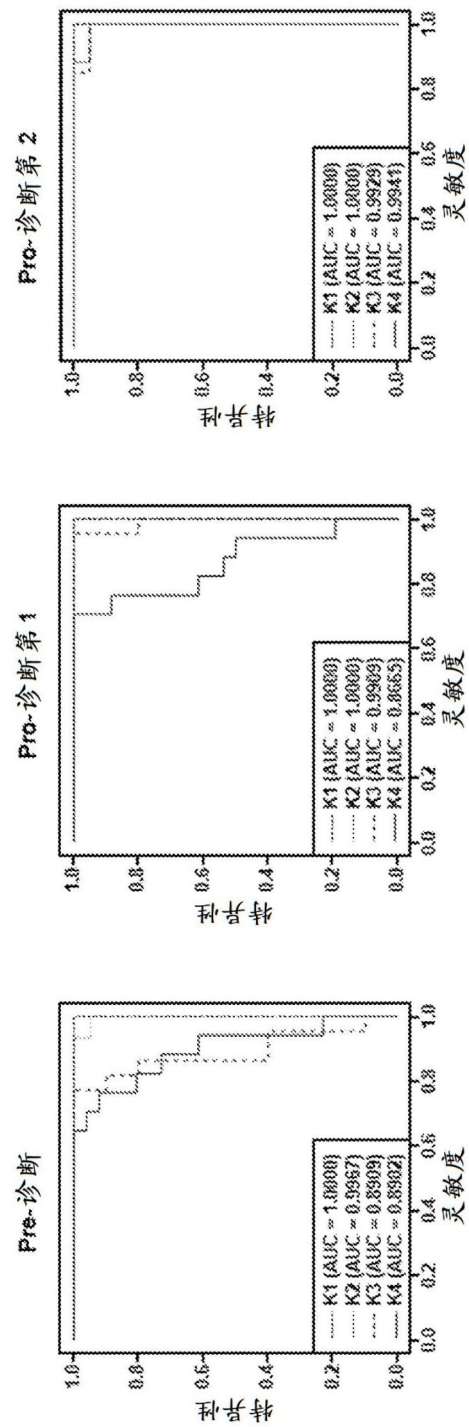


图23A

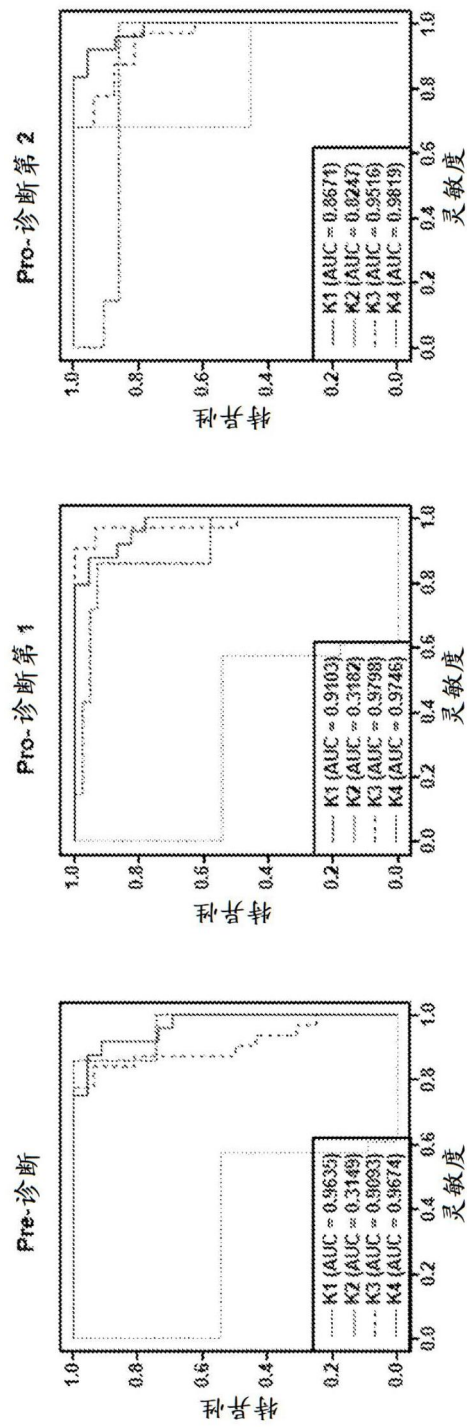


图23B

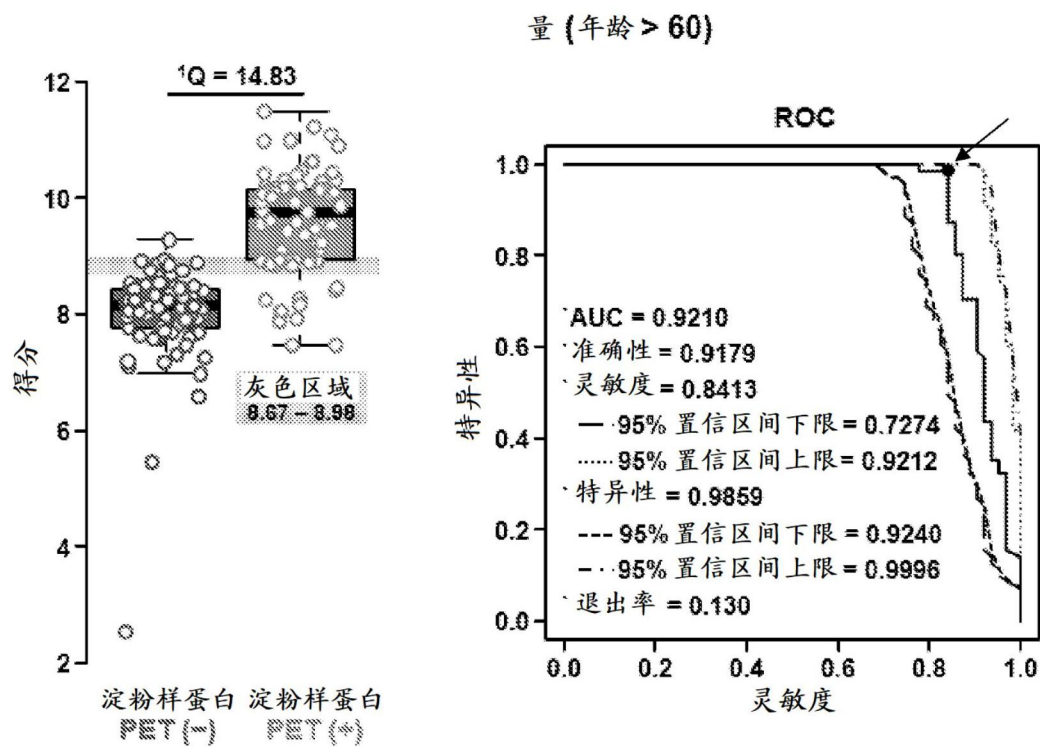


图24A

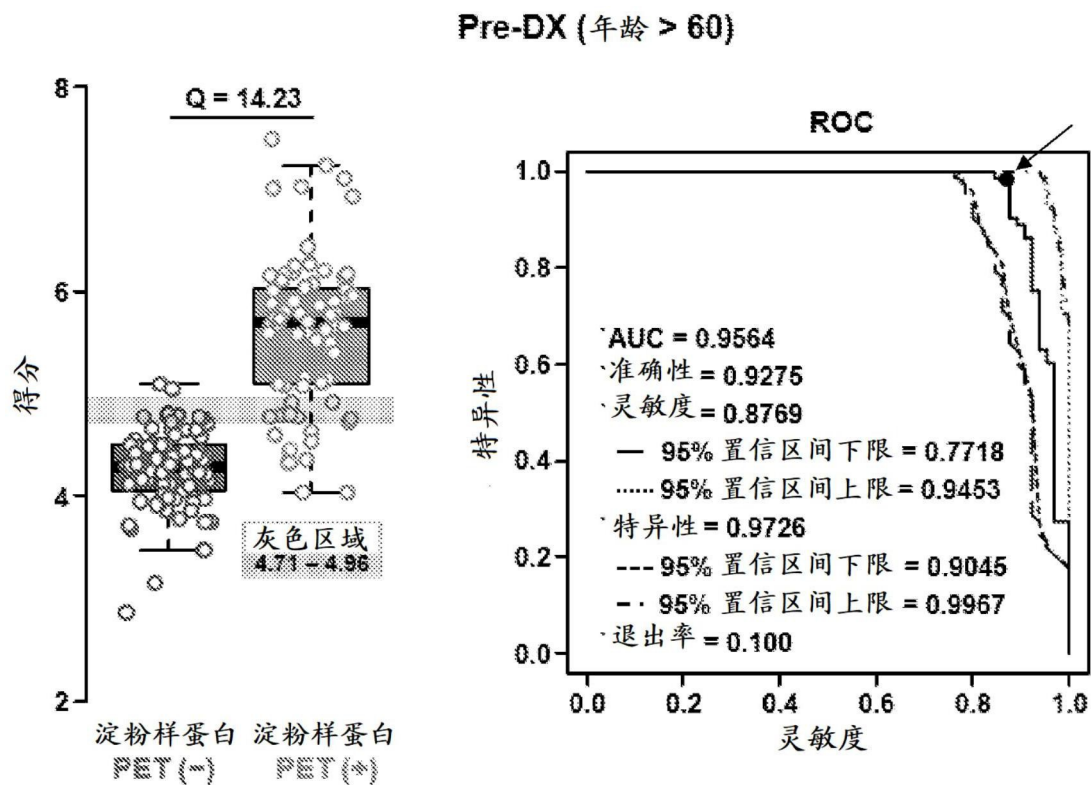


图24B

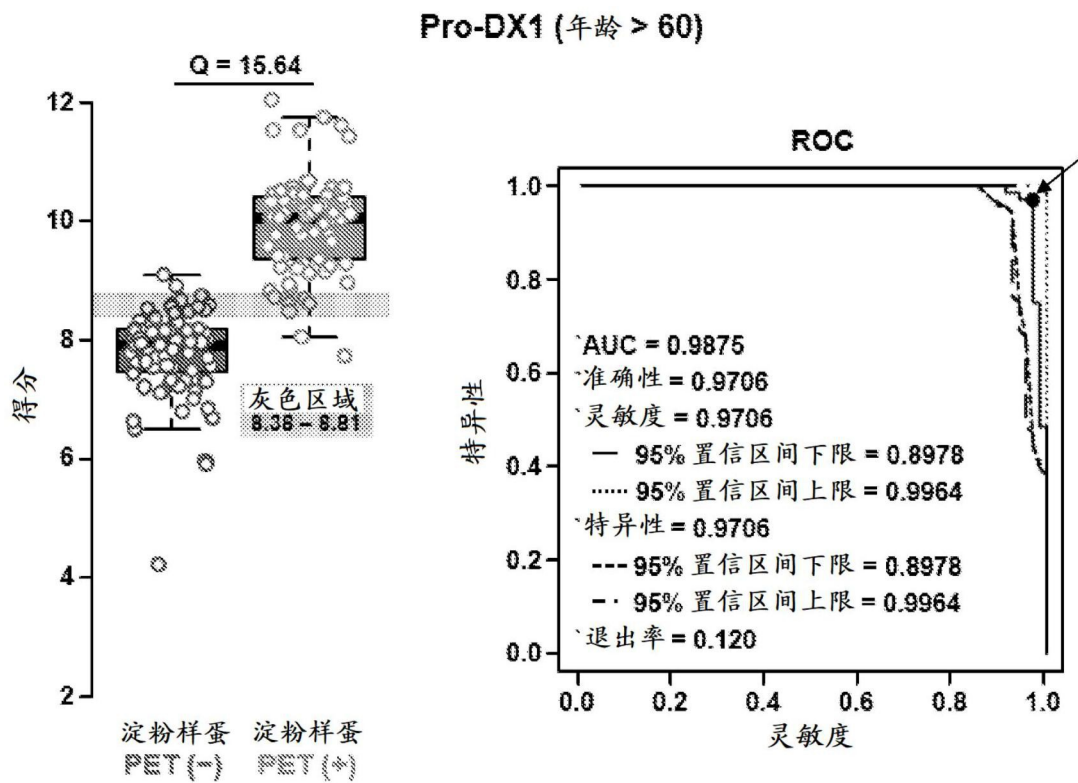


图24C

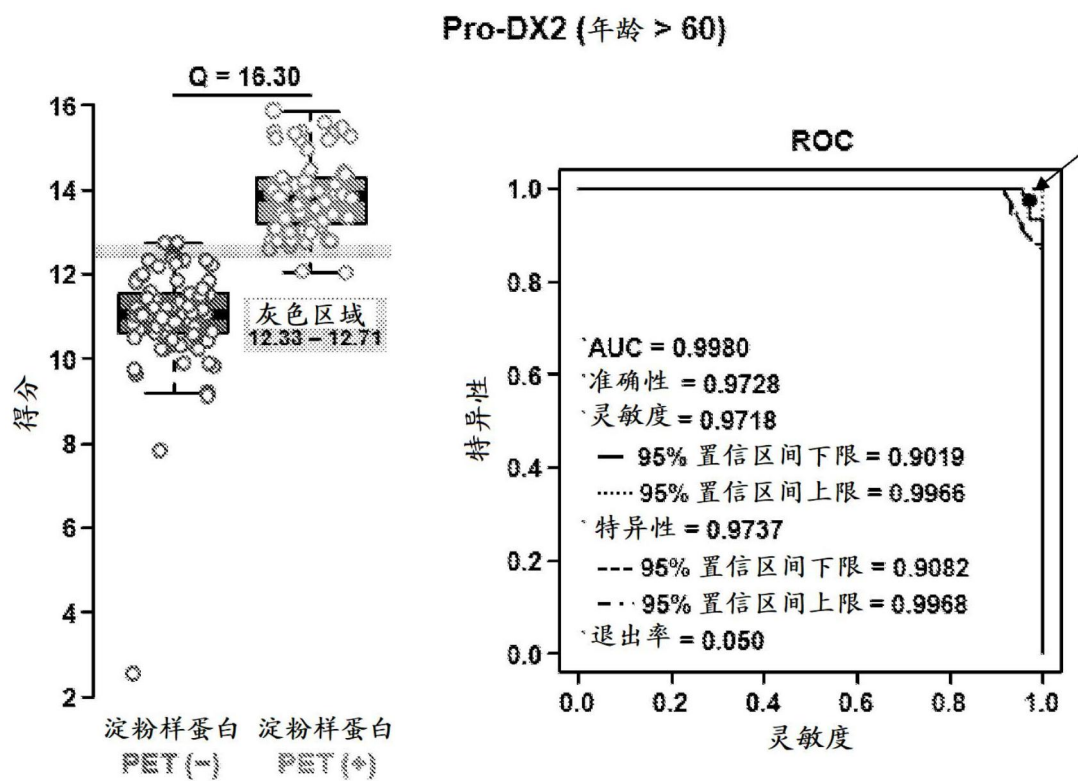


图24D

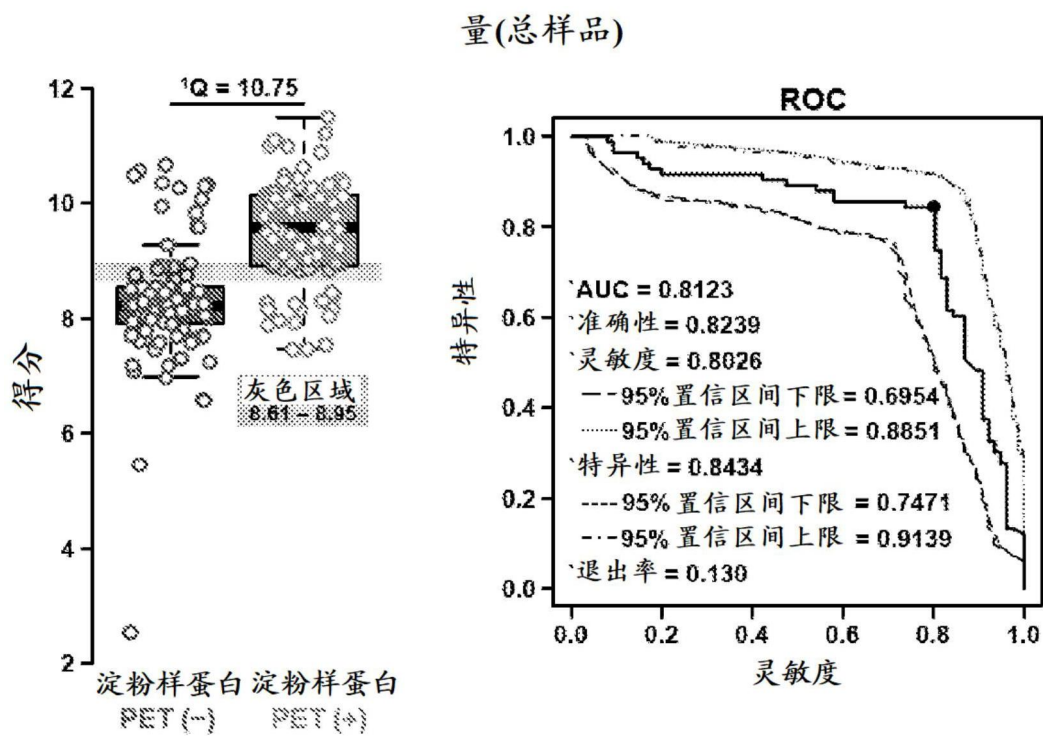


图25A

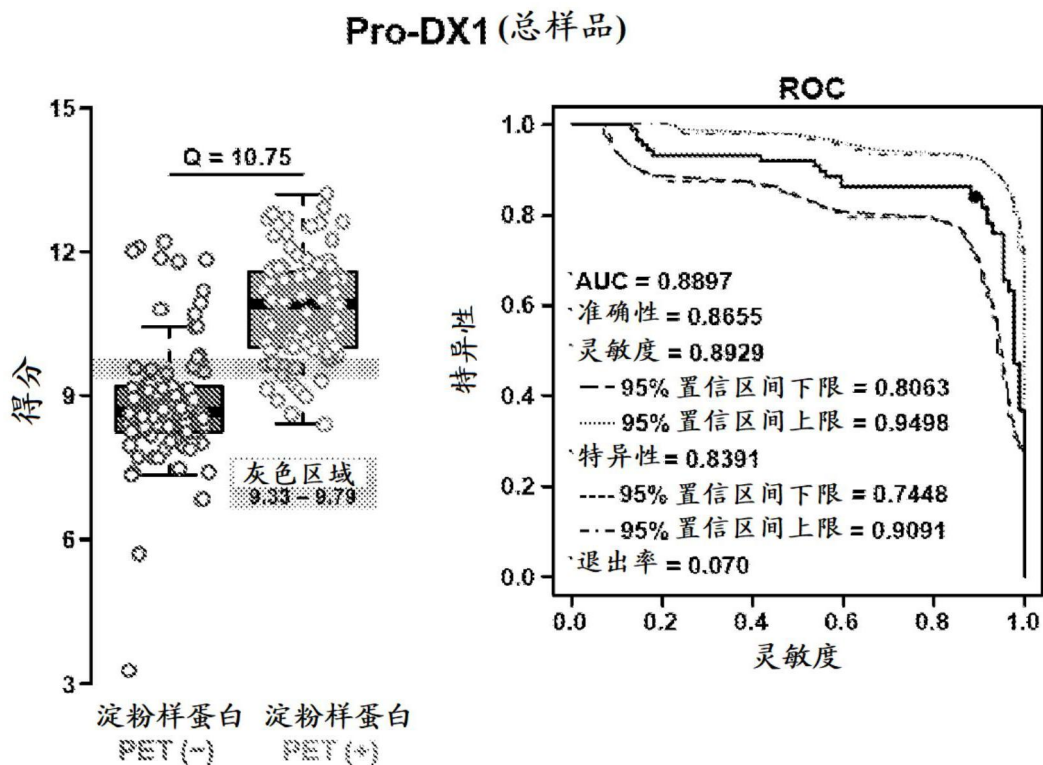


图25B

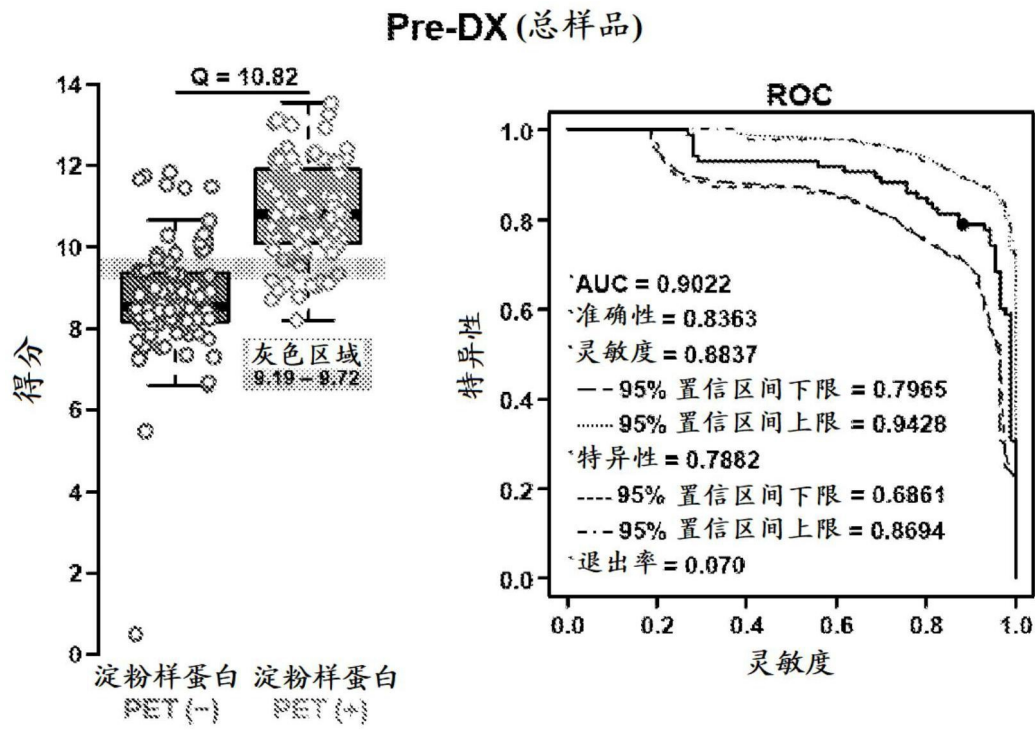


图25C

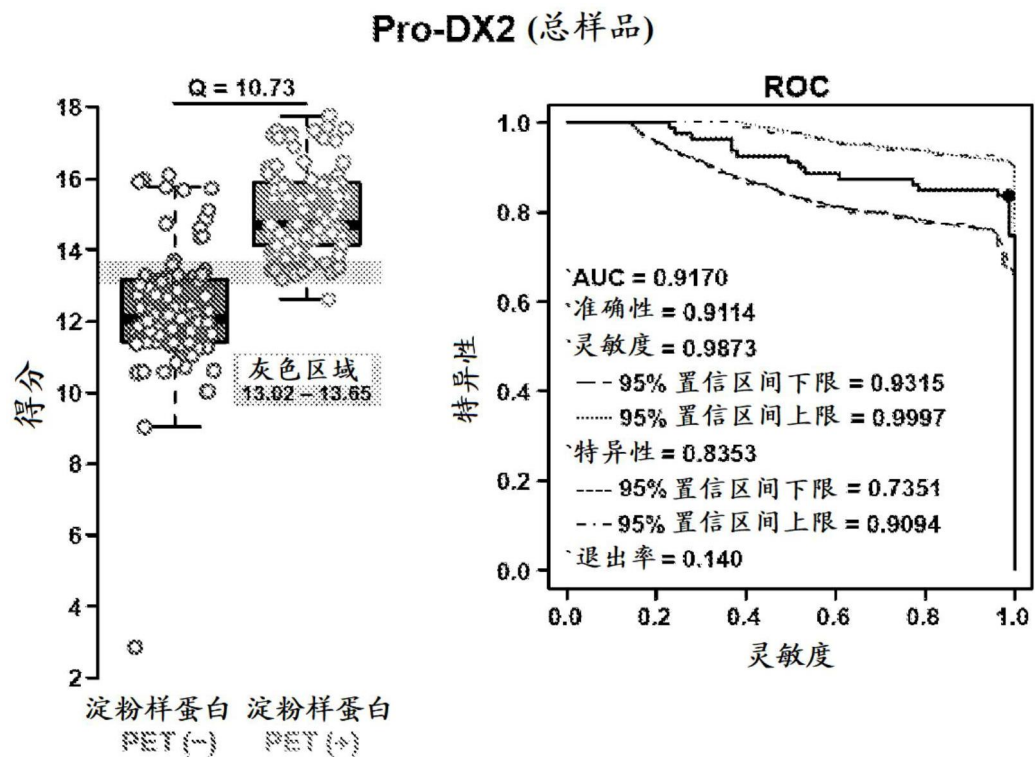


图25D

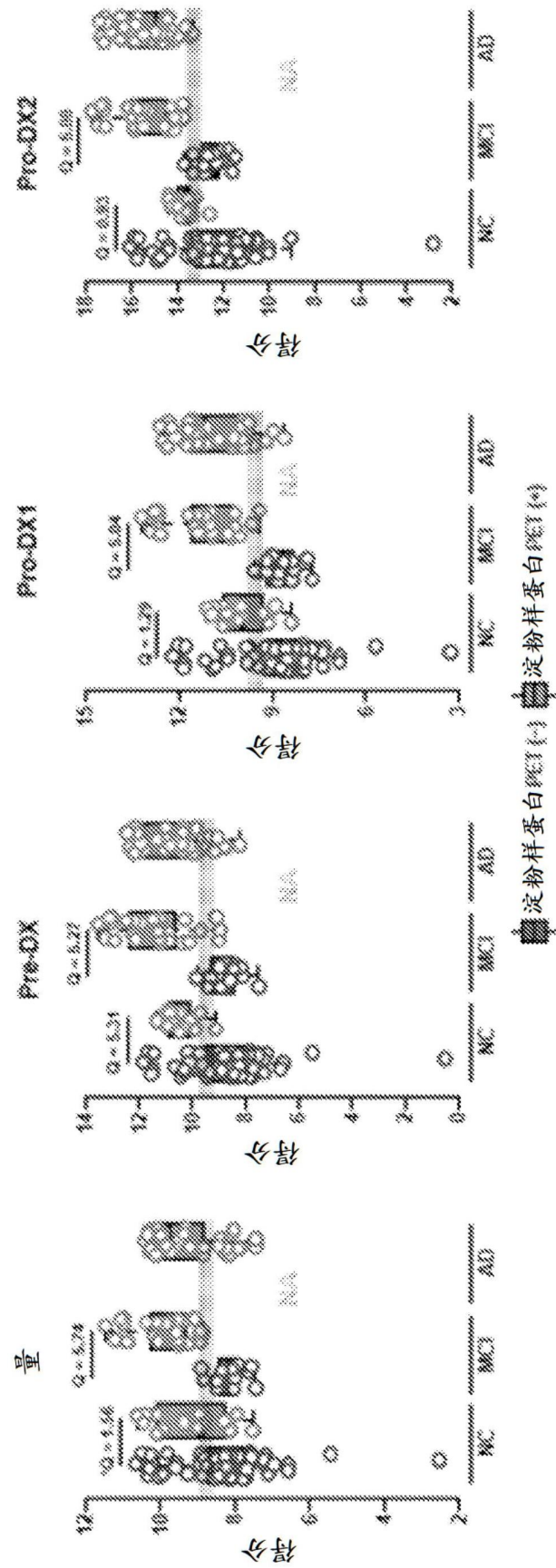


图26A

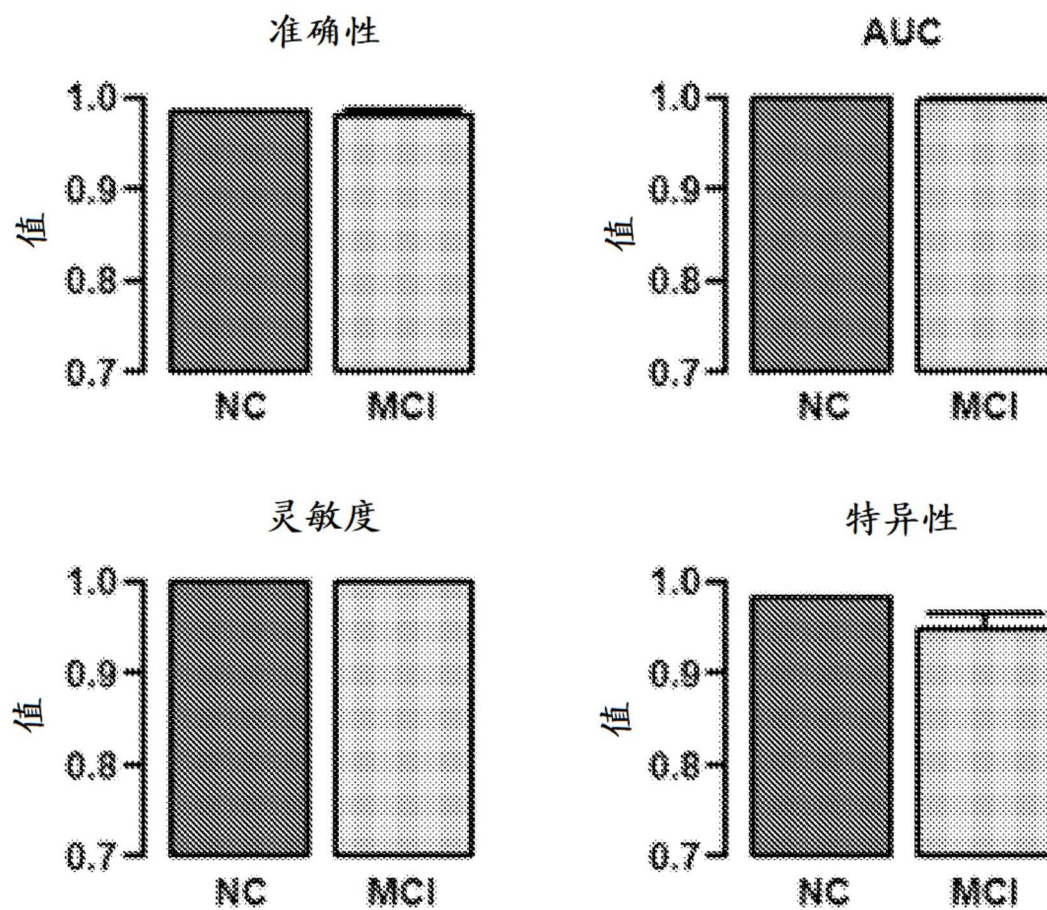


图26B

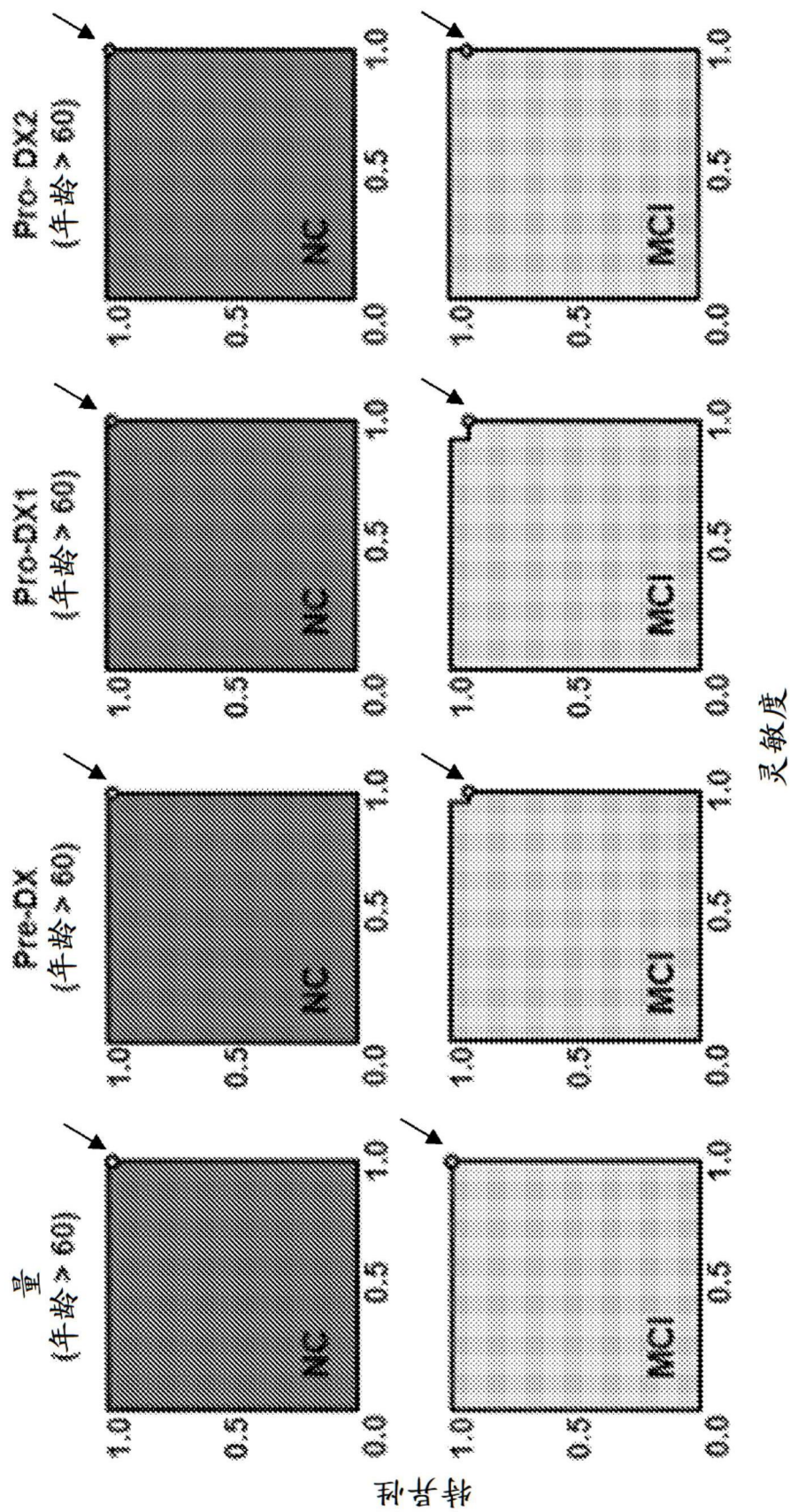


图26C