(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116568333 A
(43)申请公布日 2023.08.08

(21)申请号 202180082153.3
(22)申请日 2021.12.23
(30)优先权数据
63/130,121 2020.12.23 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.06.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2021/062226 2021.12.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/137188 EN 2022.06.30
(71)申请人 生物欧赛加有限责任公司
地址 韩国大田广域市
(72)发明人 柳金孝 贝古姆·沙赫纳兹 贾米尔·姆德侯赛因 闵贤洙 林云娜
(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
专利代理师 樊英如 张静
(51)Int.Cl.
A61K 47/24(2006.01)

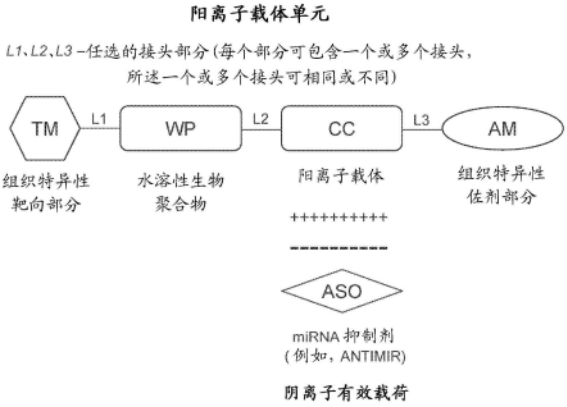
权利要求书6页 说明书47页
序列表41页 附图27页

(54)发明名称

miRNA-485抑制剂用于诱导毛发生长的用途

(57)摘要

本公开包括miRNA抑制剂用于在有需要的受试者中诱导毛发生长、增加毛发密度、增加毛囊密度、增加毛干厚度、增加毛发长度、预防脱发、减少脱发或它们的任何组合的用途。在一些方面,所述受试者患有一种或多种选自由以下组成的组的病症:斑秃、雄激素源性秃发、斑秃、普秃、更年期秃发、拔毛癖、休止期落发、生长期落发、瘢痕性秃发、疤痕性秃发、头皮变薄、毛干异常、感染性毛发病症、遗传性病症以及由于化学疗法、激素失衡、真菌感染、药物摄入、化学毛发处理或衰老所致的脱发。



CN 116568333 A

1.一种诱导有需要的受试者中的毛发生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

2.一种增加有需要的受试者中的毛发密度的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

3.一种增加有需要的受试者中的毛囊密度的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

4.一种增加有需要的受试者中的毛干厚度的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

5.一种增加有需要的受试者中的毛发长度的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

6.一种预防处于脱发风险的受试者的脱发的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

7.一种减少有需要的受试者中的脱发的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

8.一种上调有需要的受试者的毛囊的真皮鞘中的CD36蛋白的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

9.如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述受试者患有一种或多种选自由以下组成的组的病症:斑秃、雄激素源性秃发、斑秃、普秃、更年期秃发、拔毛癖、休止期落发、生长期落发、瘢痕性秃发、疤痕性秃发、头皮变薄、毛干异常、感染性毛发病症、遗传性病症以及由于化学疗法、激素失衡、真菌感染、药物摄入、化学毛发处理或衰老所致的脱发。

10.如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

11.如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂诱导自噬和/或治疗或预防炎症。

12.如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂诱导吞噬作用。

13.如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂抑制miR485-3p。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述miR485-3p包含5’-gucauacacggcucuccucucu-3’(SEQ ID NO:1)。

15.如权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含5’-UGUAUGA-3’(SEQ ID NO:2),并且其中所述miRNA抑制剂包含约6至约30个核苷酸的长度。

16.如权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂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。

17.如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂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。

18.如权利要求1至13和16至17中任一项所述的方法，其中所述miRNA抑制剂具有选自由以下组成的组的序列：5'-UGUAUGA-3'(SEQ ID NO:2)、5'-GUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:3)、5'-CGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:4)、5'-CCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:5)、5'-GCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:6)、5'-AGCCGUGUAU GA-3'(SEQ ID NO:7)、5'-GAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:8)、5'-AGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:9)、5'-GAGAGCCGUGUAU GA-3'(SEQ ID NO:10)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:11)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:12)、5'-GAGGAG AGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:13)、5'-AGAGGAGAGCCGUGU AUGA-3'(SEQ ID NO:14)、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:15)、5'-UGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:16)、5'-GUGUAUG AC-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'-AGAGCCGUGU AUGAC-3'(SEQ ID NO:23)、5'-GAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:24)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:25)、5'-AGG AGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:26)、5'-GAGGAGAGCCGU GUAUGAC-3'(SEQ ID NO:27)、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:29)。

19.如权利要求1至13和16至17中任一项所述的方法，其中所述miRNA抑制剂具有选自由以下组成的组的序列：5'-TGTATGA-3'(SEQ ID NO:30)、5'-GTGTATGA-3'(SEQ ID NO:51)、5'-CGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:52)、5'-CCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:53)、5'-GCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:54)、5'-AGCCGTGTA TGA-3'(SEQ ID NO:55)、5'-GAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:35)、5'-AGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:56)、5'-GAGAGCCGTG TATGA-3'(SEQ ID NO:57)、5'-GGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:58)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:59)、5'-GAGG AGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:60)、5'-AGAGGAGAGCCGTG TATGA-3'(SEQ ID NO:61)、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:62)、5'-TGTATGAC-3'(SEQ ID NO:63)、5'-GTGTATG AC-3'(SEQ ID NO:64)、5'-CGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:65)、5'-CCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:66)、5'-GCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:67)、5'-AGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:68)、5'-GAG CCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:69)、5'-AGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:70)、5'-GAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:71)、5'-GGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:72)、5'-AGGAGAGCC GTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:73)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:74)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:75)和5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:76)。

20.如权利要求1至18中任一项所述的方法，其中所述miRNA抑制剂的序列与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77)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。

21.如权利要求19所述的方法，其中所述miRNA抑制剂具有与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77)具有至少90％相似性的序列。

22.如权利要求1至20中任一项所述的方法，其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-

AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3’(SEQ ID NO:28)或5’-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3’(SEQ ID NO:77),具有一个取代或两个取代。

23.如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5’-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3’(SEQ ID NO:28)或5’-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3’(SEQ ID NO:77)。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含核苷酸序列5’-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3’(SEQ ID NO:28)。

25.如权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含至少一种经修饰的核苷酸。

26.如权利要求25所述的方法,其中所述至少一种经修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)、阿拉伯核酸(ABA)、桥联核酸(BNA)和/或肽核酸(PNA)。

27.如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂包含主链修饰。

28.如权利要求27所述的方法,其中所述主链修饰是二氨基磷酸酯吗啉代低聚物(PMO)和/或硫代磷酸酯(PS)修饰。

29.如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂在递送剂中递送。

30.如权利要求29所述的方法,其中所述递送剂是胶束、外泌体、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡或合成囊泡。

31.如权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂通过病毒载体递送。

32.如权利要求31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。

33.如权利要求32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。

34.如权利要求1至33中任一项所述的方法,其中所述miRNA抑制剂用递送剂递送。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述递送剂包括胶束、外泌体、类脂质、脂质体、脂质复合物、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡、合成囊泡、聚合化合物、肽、蛋白质、细胞、纳米颗粒模拟物、纳米管、缀合物、病毒载体或它们的组合。

36.如权利要求34或35所述的方法,其中所述递送剂包含阳离子载体单元,所述阳离子载体单元包含:

[WP]-L1-[CC]-L2-[AM](式I)

或

[WP]-L1-[AM]-L2-[CC](式II)

其中

WP是水溶性生物聚合物部分;

CC是带正电荷的载体部分;

AM是佐剂部分;并且,

L1和L2独立地是任选的接头,并且

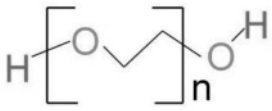
其中当以约1:1的离子比率与核酸混合时,所述阳离子载体单元形成胶束。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述miRNA抑制剂通过离子键与所述阳离子载体单元相互作用。

38.如权利要求36或37所述的方法，其中所述水溶性聚合物包括聚(烷二醇)、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯烃醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚甘油、聚磷腈、聚噁唑啉(“POZ”)聚(N-丙烯酰吗啉)或它们的任何组合。

39.如权利要求36至38中任一项所述的方法，其中所述水溶性聚合物包括聚乙二醇(“PEG”)、聚甘油或聚(丙二醇)(“PPG”)。

40.如权利要求36至39中任一项所述的方法，其中所述水溶性聚合物包含：



，(式I)，

其中n是1-1000。

41.如权利要求40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。

42.如权利要求40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。

43.如权利要求36至42中任一项所述的方法，其中所述水溶性聚合物是直链的、支链的或树枝状的。

44.如权利要求36至43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。

45.如权利要求44所述的方法，其中所述阳离子载体部分包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个、至少31个、至少32个、至少33个、至少34个、至少35个、至少36个、至少37个、至少38个、至少39个、至少40个、至少41个、至少42个、至少43个、至少44个、至少45个、至少46个、至少47个、至少48个、至少49个或至少50个碱性氨基酸。

46.如权利要求45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。

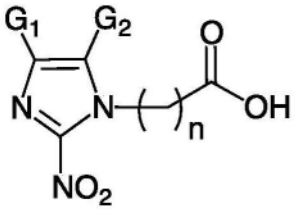
47.如权利要求45或46所述的方法，其中所述碱性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸或它们的任何组合。

48.如权利要求36至47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。

49.如权利要求36至48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。

50.如权利要求36至49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。

51.如权利要求50所述的方法，其中所述佐剂部分包含：



，(式 II)，

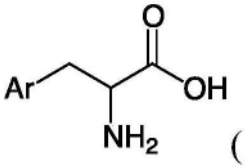
其中G1和G2各自是H、芳族环或1-10烷基，或者G1和G2一起形成芳族环，并且其中n是1-10。

52.如权利要求50所述的方法，其中所述佐剂部分包含硝基咪唑。

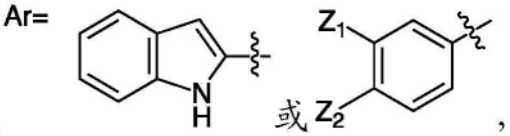
53.如权利要求50所述的方法，其中所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼、奥硝唑、美格唑、阿扎硝唑、苄硝唑或它们的任何组合。

54.如权利要求36至50中任一项所述的方法，其中所述佐剂部分包含氨基酸。

55.如权利要求54所述的方法，其中所述佐剂部分包含



(式 III)，

其中Ar是  并且

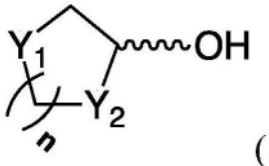
，

其中Z1和Z2各自是H或OH。

56.如权利要求36至50中任一项所述的方法，其中所述佐剂部分包含维生素。

57.如权利要求56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。

58.如权利要求57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。

59.如权利要求56至58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。

60.如权利要求56至59中任一项所述的方法，其中所述维生素是维生素B3。

61.如权利要求56至60中任一项所述的方法，其中所述佐剂部分包含至少约两个、至少约三个、至少约四个、至少约五个、至少约六个、至少约七个、至少约八个、至少约九个、至少约十个、至少约11个、至少约12个、至少约13个、至少约14个、至少约15个、至少约16个、至少约17个、至少约18个、至少约19个或至少约20个维生素B3。

62.如权利要求61所述的方法，其中所述佐剂部分包含约10个维生素B3。

63.如权利要求56至62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。

64.如权利要求56至63中任一项所述的方法，其中所述递送剂与所述miRNA抑制剂缔合，从而形成胶束。

65.如权利要求64所述的方法，其中所述缔合是共价键、非共价键或离子键。

66.如权利要求64或65所述的方法，其中所述胶束中的所述阳离子载体单元和所述miRNA抑制剂在溶液中混合，使得所述阳离子载体单元的正电荷与所述miRNA抑制剂的负电荷的离子比率是约1:1。

67.如权利要求64至66中任一项所述的方法，其中所述阳离子载体单元能够保护所述miRNA抑制剂免于酶促降解。

68.如权利要求1至67中任一项所述的方法，其中所述miRNA抑制剂经肠胃外、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、局部或它们的任何组合施用。

69.如权利要求1至68中任一项所述的方法，其中通过涂抹、喷雾、蒸汽或注射将所述miRNA抑制剂施用于需要促进毛发生长的皮肤区域。

70.如权利要求1至68中任一项所述的方法，其中将所述miRNA抑制剂局部施用于需要促进毛发生长的皮肤区域。

71.如权利要求1至68中任一项所述的方法，其中所述miRNA抑制剂以选自由以下组成的组的形式配制:软膏、洗发剂、护发素、洗剂、补剂、凝胶和摩丝。

72.如权利要求1至68中任一项所述的方法，其中所述施用步骤通过使受试者在所述miRNA抑制剂中浸泡或沐浴来进行，所述miRNA抑制剂以选自由以下组成的组的形式配制：软膏、洗发剂、护发素、洗剂、补剂、凝胶和摩丝。

miRNA-485抑制剂用于诱导毛发生长的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年12月23日提交的美国临时专利申请号63/130,121的提交日期的权益,所述申请的内容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:Sequence-Listing-4366-037PC02_SL_ST25;大小:76,935字节;和创建日期:2021年12月21日)以电子方式提交的序列表的内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0005] 本公开提供了miR-485抑制剂(例如,编码包含至少一个miR-485结合位点的核苷酸分子的多核苷酸)用于诱导毛发生长的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 随着现代社会老龄人口的增加和压力的增加,越来越多的人受到脱发(hair fall和hair loss)的威胁。虽然在医学上是良性的,但它们可在受影响的患者及其家人中造成巨大的情感和心理压力。脱发的原因包括自然衰老过程的一部分、受损的毛发生长周期、遗传倾向、来自药物和/或医学治疗的不希望的副作用、环境原因诸如过敏、感染、压力、缺乏适当的饮食和睡眠和/或其它系统性疾病。

[0008] 据估计,美国40%的男性到35岁时将具有一些明显的脱发。这种情况随着男性年龄的增长而恶化。到60岁时,估计美国65%的成年男性将遭受明显的脱发。女性也遭受脱发。与男性不同,女性脱发通常涉及整个头部和发际线的明显变薄。美国皮肤病学会报告,40%的女性到40岁时具有明显的脱发。参见例如,美国专利号9,173,921。

[0009] 因此,非常需要诱导毛发生长的新的且更有效的方法。

发明内容

[0010] 本文提供了一种诱导有需要的受试者中的毛发生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

[0011] 本文还提供了一种增加有需要的受试者中的毛发密度的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

[0012] 本文还提供了一种增加有需要的受试者中的毛囊密度的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

[0013] 本文还提供了一种增加有需要的受试者中的毛干厚度的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

[0014] 本文还提供了一种增加有需要的受试者中的毛发长度的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

[0015] 本文还提供了一种预防处于脱发风险的受试者的脱发的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。

[0016] 本文还提供了一种减少有需要的受试者中的脱发的方法,所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(miRNA抑制剂)。

[0017] 在一些方面,受试者患有一种或多种选自由以下组成的组的病症:斑秃(alopecia greata)、雄激素源性秃发、斑秃(alopecia areata)、普秃、更年期秃发、拔毛癖、休止期落发、生长期落发、瘢痕性秃发、疤痕性秃发、头皮变薄、毛干异常、感染性毛发病症、遗传性病症以及由于化学疗法、激素失衡、真菌感染、药物摄入、化学毛发处理或衰老所致的脱发。在一些方面,所述受试者是人。

[0018] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂诱导自噬和/或治疗或预防炎症。

[0019] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂抑制miR485-3p。在一些方面,所述miR485-3p包含5'-GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU-3'(SEQ ID NO:1)。在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含5'-UGUAUGA-3'(SEQ ID NO:2),并且其中所述miRNA抑制剂包含约6至约30个核苷酸的长度。

[0020] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂在所述核苷酸序列的5'包含至少1个核苷酸、至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。在一些方面,所述miRNA抑制剂在所述核苷酸序列的3'包含至少1个核苷酸、至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个核苷酸、至少6个核苷酸、至少7个核苷酸、至少8个核苷酸、至少9个核苷酸、至少10个核苷酸、至少11个核苷酸、至少12个核苷酸、至少13个核苷酸、至少14个核苷酸、至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸、至少19个核苷酸或至少20个核苷酸。

[0021] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂具有选自由以下组成的组的序列:5'-UGUAUGA-3'(SEQ ID NO:2)、5'-GUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:3)、5'-CGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:4)、5'-CCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:5)、5'-GCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:6)、5'-AGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:7)、5'-GAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:8)、5'-AGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:9)、5'-GAGAGCCGUGU AUGA-3'(SEQ ID NO:10)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:11)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:12)、5'-GAG GAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:13)、5'-AGAGGAGAGCCG UGUAUGA-3'(SEQ ID NO:14)、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:15)、5'-UGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:16)、5'-GUGUA UGAC-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'-AGAGCCGUGUAU GAC-3'(SEQ ID NO:23)、5'-GAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:24)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:25)、5'-AGGA GAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:26)、5'-GAGGAGAGCCGUG UAUGAC-3'(SEQ ID NO:27)、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:29)。

[0022] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂具有选自由以下组成的组的序列:5'-TGTATGA-3'(SEQ ID NO:30)、5'-GTGTATGA-3'(SEQ ID NO:51)、5'-CGTGTATGA-3'(SEQ ID

NO:52)、5'-CCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:53)、5'-GCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:54)、5'-AGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:55)、5'-GAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:35)、5'-AGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:56)、5'-GAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:57)、5'-GGAGAGCCGTG TATGA-3'(SEQ ID NO:58)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:59)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:60)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:61)、5'-GAGAGGA GAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:62)、5'-TGTATGAC-3'(SEQ ID NO:63)、5'-GTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:64)、5'-CGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:65)、5'-CCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:66)、5'-GCCGT GTATGAC-3'(SEQ ID NO:67)、5'-AGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:68)、5'-GAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:69)、5'-AGAGCCG TGTATGAC-3'(SEQ ID NO:70)、5'-GAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:71)、5'-GGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:72)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:73)、5'-GAGGAGAG CCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:74)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTA TGAC-3'(SEQ ID NO:75)和5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:76)。

[0023] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂的序列与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGG AGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77)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,本文所述的miRNA抑制剂具有与5'-AGAGGAGAGCCGUGU AUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77)具有至少90%相似性的序列。在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUG UAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77),具有一个取代或两个取代。在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUA UGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77)。在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)。

[0024] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂包含至少一种经修饰的核苷酸。在某些方面,所述至少一种经修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)、阿拉伯核酸(ABA)、桥联核酸(BNA)和/或肽核酸(PNA)。

[0025] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂包含主链修饰。在某些方面,所述主链修饰是二氨基磷酸酯吗啉代低聚物(PMO)和/或硫代磷酸酯(PS)修饰。

[0026] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂在递送剂中递送。在某些方面,所述递送剂是胶束、外泌体、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡或合成囊泡。

[0027] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂通过病毒载体递送。在某些方面,所述病毒载体是AAV、腺病毒、逆转录病毒或慢病毒。在一些方面,所述病毒载体是具有血清型AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或它们的任何组合的AAV。

[0028] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂与递送剂一起递送。在某些方面,所述递送剂包括胶束、外泌体、类脂质、脂质体、脂质复合物、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡、合成囊泡、聚合化合物、肽、蛋白质、细胞、纳米颗粒模拟物、纳米管、缀合物、病毒载体或它们的组合。

[0029] 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

[0030] [WP]-L1-[CC]-L2-[AM](式I)

[0031] 或

[0032] [WP]-L1-[AM]-L2-[CC](式II)

[0033] 其中

[0034] WP是水溶性生物聚合物部分;

[0035] CC是带正电荷的载体部分;

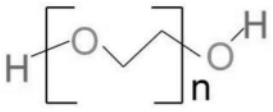
[0036] AM是佐剂部分;并且,

[0037] L1和L2独立地是任选的接头,并且

[0038] 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。

[0039] 在一些方面,本文所述的miRNA抑制剂通过离子键与所述阳离子载体单元相互作用。在一些方面,所述水溶性聚合物包括聚(烷二醇)、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯烃醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚甘油、聚磷腈、聚噁唑啉("POZ")聚(N-丙烯酰吗啉)或它们的任何组合。在其它方面,所述水溶性聚合物包括聚乙二醇("PEG")、聚甘油或聚(丙二醇)("PPG")。

[0040] 在一些方面,所述水溶性聚合物包含:

[0041] , (式I),

[0042] 在一些方面,n是1-1000。在某些方面,n是至少约110、至少约111、至少约112、至少约113、至少约114、至少约115、至少约116、至少约117、至少约118、至少约119、至少约120、至少约121、至少约122、至少约123、至少约124、至少约125、至少约126、至少约127、至少约128、至少约129、至少约130、至少约131、至少约132、至少约133、至少约134、至少约135、至少约136、至少约137、至少约138、至少约139、至少约140或至少约141。在其它方面,n是约80至约90、约90至约100、约100至约110、约110至约120、约120至约130、约140至约150、约150至约160。

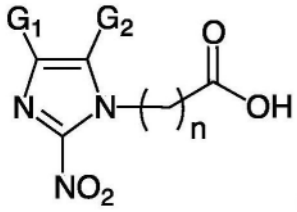
[0043] 在一些方面,所述水溶性聚合物是直链的、支链的或树枝状的。

[0044] 在一些方面,所述阳离子载体部分包含一个或多个碱性氨基酸。在某些方面,所述阳离子载体部分包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个、至少31个、至少32个、至少33个、至少34个、至少35个、至少36个、至少37个、至少38个、至少39个、至少40个、至少41个、至少42个、至少43个、至少44个、至少45个、至少46个、至少47个、至少48个、至少49个或至少50个碱性氨基酸。在某些方面,所述阳离子载体部分包含约30至约50个碱性氨基酸。

[0045] 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。

[0046] 在一些方面,所述佐剂部分能够调节免疫应答、炎症应答和/或组织微环境。在某些方面,所述佐剂部分包含咪唑衍生物、氨基酸、维生素或它们的任何组合。

[0047] 在一些方面,所述佐剂部分包含:

[0048] 

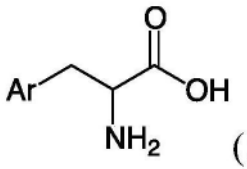
，(式 II)，

[0049] 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。

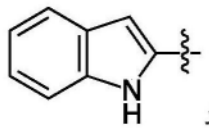
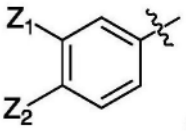
[0050] 在一些方面，所述佐剂部分包含硝基咪唑。在某些方面，所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼(pretomanid)、奥硝唑、美格唑(megazol)、阿扎硝唑、苄硝唑或它们的任何组合。

[0051] 在一些方面，所述佐剂部分包含氨基酸。

[0052] 在一些方面，所述佐剂部分包含

[0053] 

(式 III)，

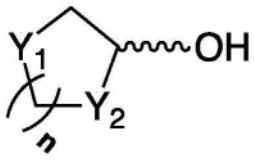
[0054] 其中Ar是 Ar=  或 

并且，

[0055] 其中Z1和Z2各自是H或OH。

[0056] 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。

[0057] 在一些方面，所述维生素包含：

[0058] 

(式 IV)，

[0059] 其中Y1和Y2各自是C、N、O或S，并且其中n是1或2。

[0060] 在一些方面，所述维生素选自由以下组成的组：维生素A、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B6、维生素B7、维生素B9、维生素B12、维生素C、维生素D2、维生素D3、维生素E、维生素M、维生素H以及它们的任何组合。例如，所述维生素可以是维生素B3。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 在一些方面，所述递送剂与所述miRNA抑制剂缔合，从而形成胶束。例如，所述缔合

可以是共价键、非共价键或离子键。

[0064] 在一些方面，所述胶束中的阳离子载体单元和miRNA抑制剂在溶液中混合，使得所述阳离子载体单元的正电荷与所述miRNA抑制剂的负电荷的离子比率是约1:1。在一些方面，所述阳离子载体单元能够保护所述miRNA抑制剂免于酶促降解。

[0065] 在一些方面，本文所述的miRNA抑制剂经胃肠外、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。

[0066] 在一些方面，通过涂抹、喷雾、蒸汽或注射将本文所述的miRNA抑制剂施用于需要促进毛发生长的皮肤区域。

[0067] 在一些方面，将本文所述的miRNA抑制剂局部施用于需要促进毛发生长的皮肤区域。

[0068] 在一些方面，本文所述的miRNA抑制剂以选自由以下组成的组的形式配制：软膏、洗发剂、护发素、洗剂、补剂(tonic)、凝胶和摩丝。在一些方面，施用步骤通过使受试者在本文所述的miRNA抑制剂中浸泡或沐浴来进行，所述miRNA抑制剂以选自由以下组成的组的形式配制：软膏、洗发剂、护发素、洗剂、补剂、凝胶和摩丝。

附图说明

[0069] 图1示出本公开的载体单元的示例性架构。所呈现的实例包括阳离子载体部分，其可与miRNA抑制剂(antimir)静电相互作用。在一些方面，组织特异性佐剂部分(AM)可位于水溶性生物聚合物(WP)与阳离子载体(CC)之间。为简单起见，CC和AM组分以线性排列方式描绘。然而，CC和AM可以支架方式排列。

[0070] 图2A-2F提供在施用0.1mg/kg(mpk)、0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)后5天(图2A)、7天(图2B)、9天(图2C)、12天(图2D)、14天(图2E)和16天(图2F)，miR-485抑制剂(485ASO-001)对脱毛的C57BL/6J小鼠的毛发生长作用的评价。

[0071] 图2G示出在施用0.1mg/kg(mpk)、0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)后5天、7天、9天、12天和14天，脱毛的C57BL/6J小鼠中的毛发再生定量。y轴显示毛发再生定量量表(0-6)，其中0级＝皮肤粉红色，无色素沉着；1级＝<30％的皮肤区域显示变暗，但没有可见的毛发；2级＝30％-70％的皮肤区域显示变暗，没有可见的毛发；3级＝>70％的皮肤区域显示变暗，或30％的毛发可见；4级＝>70％的皮肤区域显示变暗，并且30％-70％的毛发可见；5级＝>70％的皮肤区域显示变暗，并且>70％的毛发可见；并且6级＝>90％的皮肤区域显示变暗，>90％的毛发可见。数据表示为平均值(n＝6)±平均值的标准误差(SEM)。与PBS处理的对照相比，miR485-3p抑制剂(485ASO-001)处理的组的*p<0.05和**p<0.01。

[0072] 图3A-3B示出在施用0.1mg/kg(mpk)、0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)后12天(图3A)和16天(图3B)，miR-485抑制剂(485ASO-001)对脱毛的C57BL/6J小鼠中的毛干密度的影响。

[0073] 图3C示出在施用0.1mg/kg(mpk)、0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)后12天(白色条)和16天(阴影条)，脱

毛的C57BL/6J小鼠中的毛发密度定量。y轴显示通过分析图像(200倍放大倍数;实际面积，3.6mm^2)。数据表示为平均值(n＝6)±平均值的标准误差(SEM)。与PBS处理的对照相比，485ASO-001处理的组的*p<0.05和**p<0.01。

[0074] 图4A-4B示出在施用0.1mg/kg(mpk)、0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)后16天(图4A)和21天(图4B)，miR-485抑制剂(485ASO-001)对脱毛的C57BL/6J小鼠中的毛发长度的影响。

[0075] 图4C示出在施用0.1mg/kg(mpk)、0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)后16天(白色条)和21天(阴影条)，脱毛的C57BL/6J小鼠中的毛发长度定量。y轴显示毛发长度(mm)。数据表示为平均值(n＝6)±平均值的标准误差(SEM)。与PBS处理的对照相比，485ASO-001处理的组的*p<0.05和**p<0.01。

[0076] 图4D-4I提供在施用两次肌内注射0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)和阳性对照(2％米诺地尔)后5天(图4D)、7天(图4E)、10天(图4F)、12天(图4G)、14天(图4H)和16天(图4I)，miR-485抑制剂(485ASO-001)对C57BL/6J小鼠的毛发再生作用的评估。

[0077] 图4J示出在两次肌内注射0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)和阳性对照米诺地尔后7天、10天、12天、14天、16天，脱毛的C57BL/6J小鼠中的毛发再生定量。y轴显示毛发再生定量量表(0-6)，其中0级＝皮肤粉红色，无色素沉着;1级＝<30％的皮肤区域显示变暗，但没有可见的毛发;2级＝30％-70％的皮肤区域显示变暗，没有可见的毛发;3级＝>70％的皮肤区域显示变暗，或30％的毛发可见;4级＝>70％的皮肤区域显示变暗，并且30％-70％的毛发可见;5级＝>70％的皮肤区域显示变暗，并且>70％的毛发可见;并且6级＝>90％皮肤区域显示变暗，>90％的毛发可见。数据是基于每组5只小鼠，并报告为平均值±SEM。

[0078] 图5A-5B示出在脱毛(PD)后第10天(图5A)和在施用两次肌内注射0.3mg/kg(mpk)(中间条)或0.6mg/kg(mpk)(右侧条)的miR-485抑制剂(485ASO-001或“ASO”)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)(左侧条)后16天(图5B)，miR-485抑制剂(485ASO-001)对485-3p(FW7_模拟物)表达水平的影响。

[0079] 图6A-6B示出在脱毛后(pd)的毛囊周期10期间小鼠背侧皮肤的H&E染色结果。图6A示出在处理10天后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)和阳性对照(米诺地尔)处理的小鼠背侧皮肤的纵截面和横截面。图6B示出在处理10天后用0.3mg/kg(mpk)和0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)的两次肌内注射处理的小鼠背侧皮肤的纵截面和横截面。

[0080] 图6C-6H示出10pd时在脱毛的C57BL/6J小鼠中，miR-485抑制剂(485ASO-001)对真皮(μm)(图6C)和皮下组织(μm)(图6D)的厚度、毛囊长度(μm)(图6E)和毛球直径(μm)(图6F)、真皮(图6G)和皮下组织(图6H)中的毛囊密度的影响。不同的处理组与图6A和6B中所描述的相同。

[0081] 图7A-7B示出16pd时小鼠背侧皮肤的H&E染色结果。图7A示出在处理16天后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)和阳性对照(米诺地尔)处理的小鼠背侧皮肤的纵截面和横截面。图7B示出在处理16天后用0.3mg/kg(mpk)和0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)的两次肌内注射处理的小鼠背侧皮肤的纵截面和横截面。

[0082] 图7C-7H示出16pd时在两次肌内注射0.3mg/kg(mpk)或0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)和(米诺地尔阳性对照)后,16Pd时在脱毛的C57BL/6J小鼠中,miR-485抑制剂(485ASO-001)对皮下组织(μm)(图7C)和真皮(μm)(图7D)的厚度、毛囊长度(μm)(图7E)和毛球直径(μm)(图7F)、真皮(图7G)和皮下组织(图7H)中的毛囊密度的影响。每个时间点n=3-10只小鼠。

[0083] 图8A示出CD36和血管内皮生长因子(VEGF-A)的表达的蛋白质印迹分析。

[0084] 图8B-8C示出在用两次肌内注射0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)处理后10pd时的CD36蛋白(图8B)或VEGF-A蛋白(图8C)表达定量。使用β-肌动蛋白对蛋白质的相对表达进行归一化。数值为平均值±平均值的标准误差。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001。

[0085] 图9A示出Wnt3a和β-连环蛋白的表达的蛋白质印迹分析。

[0086] 图9B-9C示出在用两次肌内注射0.6mg/kg(mpk)的miR-485抑制剂(485ASO-001)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)处理后10pd时的Wnt3a蛋白(图9B)或β-连环蛋白(图9C)表达定量。使用β-肌动蛋白对蛋白质的相对表达进行归一化。数值为平均值±平均值的标准误差。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001。

[0087] 图10A-10B示出CD36的免疫荧光染色。在miR-485抑制剂(485ASO-001)处理的毛囊(图10B)中,在毛囊的血管周围区域中观察到PBS处理的对照(图10A)和CD36富集的真皮鞘(DS)表达。比例尺=50μm。

具体实施方式

[0088] 本公开涉及miR-485抑制剂用于在有需要的受试者中诱导毛发生长、增加毛发密度、增加毛囊密度、增加毛干厚度、增加毛发长度、预防脱发、减少脱发或其任何组合的用途,所述miR-485抑制剂包含编码包含至少一个miR-485结合位点的核苷酸分子的核苷酸序列,其中所述核苷酸分子不编码蛋白质。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] I.术语

[0092] 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。

[0093] 应注意术语“一个(种)(a/an)”实体是指一个(种)或多个(种)所述实体;例如“一个(种)核苷酸序列”应理解为表示一个(种)或多个(种)核苷酸序列。因此,术语“一个(种)”、“一个(种)或多个(种)”和“至少一个(种)”在本文中可互换使用。还应注意,权利要

求可以被草拟为排除任何任选的要素。因此，对于与叙述权利要求要素结合使用的像“单独”、“只”等这样的排他性术语或所使用的“否定性”限制，这份说明书仅欲充当一个先行基础。

[0094] 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)。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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内。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内。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。

[0099] 术语“毛发”在本文中用于意指头皮、头部、面部和/或身体毛发，包括但不限于头皮、睫毛、眉毛、胡子、胡须、耳毛、鼻毛、胸毛、阴毛、辅助毛发等。

[0100] 术语“毛发生长”在本文中用于意指更早地诱导新毛发周期的生长、延长毛发周期的活跃生长期(生长期)、增加毛发的生长速率和/或增加毛干的宽度，包括但不限于诱导毛发生长并使其对眼睛更可见。

[0101] 术语“脱发”和“毛发稀疏”在本文中用于意指正常毛发密度的降低和/或毛发周期的正常生长期(生长期)的缩短和/或毛干宽度的减小以及毛发数量的减少，其可由年龄增加、遗传易感性和/或其它原因引起，并且可由男性或女性、年轻人或老年人遭受。术语“脱发”、“秃发”、“秃顶”和“模式性脱发”在本文中可互换使用。

[0102] 术语“诱导毛发生长”、“促进毛发生长”、“刺激毛发生长”、“促进毛发生长”或“增

加毛发生长”在本文中用于意指在受影响的皮肤(或头皮)表面的至少一部分上毛发的数量和/或长度和/或厚度增加的结果中的至少一者。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 术语“约”在本文中用于意指近似、大致、约或在……左右。当术语“约”与数值范围结合使用时,其通过使边界延伸高于和低于阐述的数值来修饰那个范围。一般来说,术语“约”可通过例如向上或向下(升高或降低)10%的变化修饰高于或低于所述值的数值。

[0106] 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。

[0107] 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。

[0108] 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)。

[0109] 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。

[0110] 在一些方面,如果两个或更多个序列彼此具有100%同一性,则称它们为“完全保守的”或“相同的”。在一些方面,如果两个或更多个序列彼此至少70%同一、至少80%同一、至少90%同一或至少95%同一,则它们被称为“高度保守的”。在一些方面,如果两个或更多个序列彼此约70%同一、约80%同一、约90%同一、约95%、约98%或约99%同一,则它们被称为“高度保守的”。在一些方面,如果两个或更多个序列彼此至少30%同一、至少40%同一、至少50%同一、至少60%同一、至少70%同一、至少80%同一、至少90%同一或至少95%

同一，则它们被称为“保守的”。在一些方面，如果两个或更多个序列彼此约30％同一、约40％同一、约50％同一、约60％同一、约70％同一、约80％同一、约90％同一、约95％同一、约98％同一或约99％同一，则它们被称为“保守的”。序列的保守可适用于多核苷酸或多肽的整个长度或者可适用于其部分、区或特征。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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。

[0119] 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。

[0120] 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”。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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www.ebi.ac.uk/Tools/psa获得。

[0124] 序列比对可以使用本领域已知的方法诸如MAFFT、Clustal(ClustalW、Clustal X或Clustal Omega)、MUSCLE等进行。

[0125] 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。

[0126] 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＝100x(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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 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，分离的组合物的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%。

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 如本文所用，“miRNA抑制剂”是指可降低、改变和/或调节miRNA表达、功能和/或活性的化合物。miRNA抑制剂可以是与靶miRNA核酸序列至少部分互补的多核苷酸序列，使得所述miRNA抑制剂与所述靶miRNA序列杂交。例如，在一些方面，本公开的miR-485抑制剂包含编码与靶miR-485(例如，miR-485-3p)核酸序列至少部分互补的核苷酸序列，使得所述miR-485抑制剂与所述miR-485序列杂交。在其它方面，miR-485与miR-485抑制剂序列的杂交降低、改变和/或调节miR-485的表达、功能和/或活性(例如，杂交导致SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达增加)。

[0133] 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。

[0134] 术语“错配(mismatch)”或“错配(mismatches)”是指低聚物核碱基序列(例如，miR-485抑制剂)中根据碱基配对规则与靶核酸序列(例如，miR-485)不匹配的一个或多个核碱基(无论是连续的还是分离的)。虽然通常需要完美互补性，但在一些方面，可相对于靶核酸序列存在一个或多个(例如，6、5、4、3、2或1个错配)。包括在低聚物内的任何位置处的变化。在某些方面，本公开的反义低聚物(例如，miR-485抑制剂)包括末端附近的核碱基序列的变化、内部的变化，并且如果存在，通常在5’和/或3’末端的约6、5、4、3、2或1个亚基范围内。在一些方面，可除去一个、两个或三个核碱基并且仍然提供中靶结合。

[0135] 如本文所用，术语“调节”、“修饰”及其语法变体当应用于特定浓度、水平、表达、功能或行为时，通常是指通过增加或降低，例如直接地或间接地促进/刺激/上调或干扰/抑制/下调特定浓度、水平、表达、功能或行为进行改变的能力，诸如，例如以充当拮抗剂或激动剂。在一些情况下，调节剂可相对于对照、或相对于通常可预期的平均活性水平、或相对于对照活性水平，增加和/或降低特定浓度、水平、活性或功能。在一些方面，本文公开的miRNA抑制剂(例如miR-485抑制剂)可调节(例如，降低、改变或消除)miR-485表达、功能和/或活性，并且由此调节SIRT1蛋白或基因表达和/或活性。

[0136] “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。

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] 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。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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)。

[0143] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指例如由SIRT1基因编码的任何长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可包含经修饰的氨基酸。所述术语还涵盖已经天然地或通过干预修饰的氨基酸聚合物；例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操纵或修饰，诸如与标记组分缀合。定义中还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括，例如非天然氨基酸，诸如高半胱氨酸、鸟氨酸、对乙酰基苯丙氨酸、D-氨基酸和肌酸)以及本领域已知的其它修饰的多肽。如本文所用，术语“多肽”是指具有任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。

[0144] 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。

[0145] 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，二硫连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。

[0146] 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。

[0147] 如本文所用的术语“预防脱发(prevent hair loss、preventing hair loss)”、“预防毛发稀疏(prevent hair thinning和preventing hair thinning)”意指如本文预先描述的对减少任何脱发或毛发稀疏的效果。

[0148] 如本文所用的术语“减少脱发(reduce hair loss、reducing hair loss)”、“减少毛发稀疏(reduce hair thinning和reducing hair thinning)”意指在有需要的受试者中(例如在受脱发影响的受试者中)减少如本文所述的任何脱发或毛发稀疏的效果。

[0149] 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。

[0150] 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。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 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'。

[0154] 在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂(例如，包含含有一个或多个miR-485结合位点的RNA的多核苷酸)可包含与一个或多个编码区可操作地关联的启动子和/或其它表达(例如，转录)控制元件。在可操作关联中，基因产物的编码区按以下这种方式与一个或多个调控区缔合，所述方式使得所述基因产物的表达处于所述一个或多个调控区的影响或控制之下。例如，如果启动子功能的诱导导致编码由所述编码区编码的基因产物的mRNA的转录，并且如果所述启动子与所述编码区之间的连键的性质不干扰表达启动子引导基因产物的表达的能力或不干扰DNA模板转录的能力，那么所述编码区和启动子"可操作地关联"。除了启动子以外，其它表达控制元件例如增强子、操纵子、阻遏子以及转录终止信号也能够与编码区可操作地关联以便引导基因产物表达。

[0155] 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。

[0156] 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。

[0157] 如本文所用，短语"有需要的受试者"和"处于脱发风险的受试者"包括将受益于施用本公开的miRNA抑制剂(例如，miR-485抑制剂)例如以诱导毛发生长的受试者，如哺乳动物受试者。在一些方面，受试者患有一种或多种选自由以下组成的组的病症：斑秃(alopecia greata)、雄激素源性秃发、斑秃(alopecia areata)、普秃、更年期秃发、拔毛癖、休止期落发、生长期落发、瘢痕性秃发、疤痕性秃发、头皮变薄、毛干异常、感染性毛发病症、遗传性病症以及由于化学疗法、激素失衡、真菌感染、药物摄入、化学毛发处理或衰老所致的脱发。在一些方面，所述受试者是人。

[0158] 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"。

[0159] 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。

[0160] 术语"下游"是指位于参考核苷酸序列5'的核苷酸序列。

[0161] "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。

[0162] 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。

[0163] II.使用方法

[0164] 本文提供了诱导有需要的受试者(例如，处于脱发风险的受试者)中的毛发生长的方法，所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(“miRNA抑制剂”)。本文还提供了减少有需要的受试者(例如，处于脱发风险的受试者)中的脱发的方法，所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物。本文还提供了增加有需要的受试者(例如，处于脱发风险的受试者)中的毛发密度的方法，所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物。本文还提供了增加有需要的受试者(例如，处于脱发风险的受试者)中的毛发长度的方法，所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物。本文还提供了增加有需要的受试者(例如，处于脱发风险的受试者)中的毛囊密度的方法，所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物。本文还提供了增加有需要的受试者(例如，处于脱发风险的受试者)中的毛干厚度的方法，所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物。本文还提供了用于预防处于脱发风险的受试者的脱发的方法，所述方法包括向所述受试者施用抑制miR-485的化合物(miRNA抑制剂)。

[0165] 脱发的根本原因并不总是在个体与个体之间相同。此外，毛发生长的过程涵盖若干阶段，并且存在许多可改变毛发的正常旺盛生长的促成因素。毛发生长周期分为三个阶段：生长期，其中毛发活跃地生长，毛囊中发生非常显著水平的细胞增殖；退化期，此时毛囊暂时减缓其增殖活性以允许毛发发育；和休止期，其中毛囊只是停止生长和退化，直到毛发脱落，并且新的生长期开始。当然，对于普通人来说，每天失去许多毛发是完全正常的，并且因此，这个周期通常在整个生命中不断重复，以补充失去的毛发。在所有个体中，周期确实随着年龄的增长而减慢，然而正常的毛发逐渐被逐渐更细的毛发(毫毛)所替代，并且周期变得更短。早期至中期脱发几乎完全表现为大部分毛囊的毛干变薄和毛干生长延迟，使得存在的毛发薄、轻且接近头皮，而毛囊密度和每个毛囊的毛干基本上不变。对于患有异常脱发的个体，很明显，正常的周期性过程以某种方式被破坏，无论是通过异常加速还是所述过程的其它改变。这最终导致更快速地转变至休止期，这进而逐渐导致产生更多的毫毛，并最终可导致秃顶。只有在终末期秃顶时，毛囊才变得不可逆地失活。参见例如，国际公布号WO2004/078117A2。

[0166] 毛发厚度或密度D可定量为三个因素的乘积：(1)以每平方厘米的毛囊数测量的毛囊密度F，(2)每个毛囊的平均毛干数N，和(3)毛干的平均厚度T。这三个量的乘积表示头发

密度D。

[0167] D＝F*N*T

[0168] 毛发稀疏的另一种可能的客观量度可以是来自头部的所选毛发子集的毛发宽度在两个标准偏差之外的分数。

[0169] 在毛发密度的另一个替代量度中，毛发厚度(直径)可用毛发横截面积$A=\pi T^2/4$代替。毛发的“丰满度”的总体感觉或指示符还可包括毛发长度L，产生头发体积参数V＝F*N*A*L。由于可通过让剩余毛发生长来增加毛发体积的感觉，因此V用作外观度量，但掩盖毛发稀疏。因此，D＝FNA将是使用的客观标准。

[0170] 典型的毛囊单位密度在60-120cm^{-2}的范围内，并且每个毛囊通常含有一个或两个毛干，但很少有超过两个不同年龄的毛干。毛干厚度可分类为粗、中等或细，并且毛干厚度的平均值对于细毛发将在约40微米宽度范围内变化，而粗毛发的平均宽度可为90微米。N通常将是介于1与2之间的数字，并且更常见的是1-1.25，它可从密度测定中消除，但在一些罕见情况下可能需要考虑。

[0171] 每个个体的归一化毛发密度测量值是顶部和/或前部毛发密度与左侧和/或右侧毛发密度的比率。因此，个体的毛发稀疏率可表示为：对于每个相应区域，$R=100\times(D_{顶部})/D_{侧面}$，其中$D_{顶部}$和$D_{侧面}$＝F*N*T。参见例如，美国公布号2009/0036800，其以引用的方式整体并入本文。

[0172] 在一些方面，受试者患有一种或多种选自由以下组成的组的病症：斑秃(alopecia greata)、雄激素源性秃发、斑秃(alopecia areata)、普秃、更年期秃发、拔毛癖、休止期落发、生长期落发、瘢痕性秃发、疤痕性秃发、头皮变薄、毛干异常、感染性毛发病症、遗传性病症以及由于化学疗法、激素失衡、真菌感染、药物摄入、化学毛发处理或衰老所致的脱发。在一些方面，所述受试者是人。

[0173] 在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂可通过本领域已知的任何合适的途径施用。在一些方面，miR-485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、局部或它们的任何组合施用。在某些方面，肌内施用miR-485抑制剂。

[0174] 在一些方面，通过涂抹、喷雾、蒸汽或注射将miR-485抑制剂施用于需要促进毛发生长的皮肤区域。

[0175] 在一些方面，将miR-485抑制剂局部施用于需要促进毛发生长的皮肤区域。

[0176] 在一些方面，miR-485抑制剂以选自由以下组成的组的形式配制：软膏、洗发剂、护发素、洗剂、补剂、凝胶和摩丝。在一些方面，施用步骤通过使受试者在miRNA抑制剂中浸泡或沐浴来进行，所述miRNA抑制剂以选自由以下组成的组的形式配制：软膏、洗发剂、护发素、洗剂、补剂、凝胶和摩丝。

[0177] 在一些方面，本公开的miR-485抑制剂可与一种或多种另外的治疗剂组合使用。在一些方面，同时施用另外的治疗剂和miR-485抑制剂。在某些方面，依序施用另外的治疗剂和miR-485抑制剂。

[0178] 在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂的施用不会导致任何副作用。在某些方面，本公开的miR-485抑制剂在施用于受试者时不会不利地影响体重。在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂在施用于受试者时不会导致死亡率增加或引起病理性异常。

[0179] 在一些方面，本公开的miR-485抑制剂可通过调控一种或多种基因的表达和/或活性来发挥治疗效果(例如，诱导毛发生长或预防脱发)。在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂能够调控选自CTBP1、TRIP6、SIRT1、CD36、PGC1-a或它们的组合的基因的表达和/或活性。

[0180] CTBP1调控

[0181] 在一些方面，使本文所述的miR-485抑制剂与细胞接触可增加细胞中CTBP1蛋白和/或CTBP1基因的表达。

[0182] C末端结合蛋白1(CTBP1)是在人类中由CTBP1基因编码的蛋白质。CTBP1是结合至序列特异性DNA结合蛋白并例如通过募集添加抑制性组蛋白标记和去除活化标记的组蛋白修饰酶而帮助关闭基因的调控性蛋白质。CTBP1蛋白还可自缔合并将基因调控复合物聚集在一起。

[0183] 在人类中，CTBP1基因位于4号染色体上(GenBank登录号NC_000004.12的核苷酸1,211,444至1,250,355，负链取向)。CTBP1基因的同义词及其编码蛋白是已知的，并且包括“布雷菲德菌素A-核糖基化底物”、“BARS”、“HADDTS”、“CtBP1”或“CTBP”。

[0184] 存在由选择性剪接产生的至少两种已知的人CTBP1蛋白异型体。CTBP1异型体1(UniProt标识符:Q13363-1,SEQ ID NO:31)由440个氨基酸组成，并且已被选择作为规范序列。CTBP1异型体2(UniProt标识符:Q13363-2;SEQ ID NO:32)由429个氨基酸组成并且与规范序列的区别如下:1-13:MGSSHLLNKGLPL→MS.下表1提供两种CTBP1异型体的序列。

[0185] 表1.CTBP1蛋白异型体

[0186]

异型体1 (UniProt: Q13363-1) (SEQ ID NO: 31)	MGSSHLLNKGLPLGVRPPIMNGPLHPRPLVALLDGRDCTVEMPILKDVATVAFCDAQSTQ EIHEKVLNEAVGALMYHTITLTREDLEKFKALRIIVRIGSGFDNIDIKSAGDLGIAVCNV PAASVEETADSTLCHILNLYRRATWLHQALREGTRVQSVEQIREVASGAARIRGETLGII GLGRVGQAVALRAKAFGFNVLFYDPYLSDGVERALGLQRVSTLQDLLFHSDCVTLHCGLN EHNHHLINDFTVKQMRQGAFLVNTARGGLVDEKALAQALKEGRIRGAALDVHESEPFSFS QGPLKDAPNLICTPHAAWYSEQASIEMREEAAREIRRAITGRIPDSLKNCVNKDHLTAAT HWASMDPAVVHPELNGAAYRYPPGVVGVAPTGIPAAVEGIVPSAMSLSHGLPPVAHPPHA PSPGQTVKPEADRDHASDQL
异型体2 (UniProt: Q13363-2) (SEQ ID NO: 32)	MSGVRPPIMNGPLHPRPLVALLDGRDCTVEMPILKDVATVAFCDAQSTQEIHEKVLNEAV GALMYHTITLTREDLEKFKALRIIVRIGSGFDNIDIKSAGDLGIAVCNVPAASVEETADS TLCHILNLYRRATWLHQALREGTRVQSVEQIREVASGAARIRGETLGIIGLGRVGQAVAL RAKAFGFNVLFYDPYLSDGVERALGLQRVSTLQDLLFHSDCVTLHCGLNEHNHHLINDFT VKQMRQGAFLVNTARGGLVDEKALAQALKEGRIRGAALDVHESEPFSFSQGPLKDAPNLI CTPHAAWYSEQASIEMREEAAREIRRAITGRIPDSLKNCVNKDHLTAATHWASMDPAVVH PELNGAAYRYPPGVVGVAPTGIPAAVEGIVPSAMSLSHGLPPVAHPPHAPSPGQTVKPEA DRDHASDQL

[0187] 如本文所用，术语“CTBP1”包括由细胞天然表达的CTBP1的任何变体或异型体。因此，在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂可增加CTBP1异型体1的表达。在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂可增加CTBP1异型体2的表达。在其它方面，本文公开的miR-485抑制剂可增加CTBP1异型体1和异型体2的表达。除非另有说明，否则异型体1和异型体2在本文中统称为“CTBP1”。

[0188] 在一些方面，与参考细胞(例如，未与miR-485抑制剂接触的相应细胞)中的表达和/或活性相比，使细胞与miR-485抑制剂接触使所述细胞中CTBP1蛋白和/或CTBP1基因的表达和/或活性增加至少约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6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9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60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍或至少约100倍或更多倍。

[0189] 不受任一种理论的束缚，在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂通过降低miR-485(例如miR-485-3p)的表达和/或活性来增加CTBP1蛋白和/或CTBP1基因的表达。

[0190] TRIP6调控

[0191] 在一些方面，使本文所述的miR-485抑制剂与细胞接触可增加细胞中TRIP6蛋白和/或TRIP6基因的表达。

[0192] 甲状腺受体相互作用蛋白6(TRIP6)是在人类中由TRIP6基因编码的蛋白质。TRIP6蛋白是斑联蛋白(zyxin)家族的成员，并且包含三个LIM锌结合结构域。TRIP6蛋白已显示定位于粘着斑位点并且沿着肌动蛋白应力纤维定位。

[0193] 在人类中，TRIP6基因位于7号染色体上(GenBank登录号NC_000007.14的核苷酸100,867,387至100,873,454，正链取向)。TRIP6基因的同义词及其编码蛋白是已知的，并且包括：“甲状腺激素受体相互作用蛋白6”、“ZRP-1”、“OIP1”、“甲状腺激素受体相互作用蛋白6”、“OPA相互作用蛋白1”和“斑联蛋白相关蛋白1”。

[0194] 存在由选择性剪接产生的至少3种已知的人TRIP6蛋白异型体。TRIP6异型体1(UniProt标识符:Q15654-1,SEQ ID NO:78)由4766个氨基酸组成，并且已被选择作为规范序列。TRIP6异型体2(UniProt标识符:Q15654-2;SEQ ID NO:79)由106个氨基酸组成并且与规范序列的区别如下：(i)37-106：ALQPHPRVNF...IDLLSSTLAE→VLPGPRGTGG...CVTATRPTGI;(ii)107-476:缺失。TRIP6异型体3(UniProt标识符:Q15654-2;SEQ ID NO:80)由80个氨基酸组成，并且与规范序列的区别如下：(i)37-80:ALQPHPRVNF...SHGVLQHTQG→GAPCRQGGPS...CVTATRPTGI;(ii)81-476:缺失。下表2提供不同TRIP6蛋白异型体的序列。

[0195] 表2.TRIP6蛋白异型体

[0196]

异型体1 (UniProt: Q15654-1) (SEQ ID NO: 78)	MSGPTWLPPKQPEPARAPQGRAIPRGTPGPPPAHGAALQPHPRVNFCPLPSEQCYQAPGG PEDRGPAWVGSHGVLQHTQGLPADRGGLRPGSLDAEIDLLSSTLAELNGGRGHASRRPDR QAYEPPPPPAYRTGSLKPNPASPLPASPYGGPTPASYTTASTPAGPAFPVQVKVAQPVRG CGPPRRGASQASGPLPGPHFPLPGRGEVWGPGYRSQREPGPGAKEEAAGVSGPAGRGRGG EHGPQVPLSQPPEDELDRLTKKLVHDMNHPPSGEYFGQCGGCGEDVVGDGAGVVALDRVF HVGCFVCSTCRAQLRGQHFYAVERRAYCEGCYVATLEKCATCSQPILDRILRAMGKAYHP GCFTCVVCHRGLDGIPFTVDATSQIHCIEDFHRKFAPRCSVCGGAIMPEPGQEETVRIVA LDRSFHIGCYKCEECGLLLSSEGECQGCYPLDGHILCKACSAWRIQELSATVTTDC
异型体2 (UniProt: Q15654-2) (SEQ ID NO: 79)	SGPTWLPPKQPEPARAPQGRAIPRGTPGPPPAHGAVLPGPRGTGGSGAGVGGVPWSTPA HAGAPCRQGGPSPWKPGRRDRLAEQHAGRAEWGSGSCVTATRPTGI
异型体3 (UniProt: Q15654-2) (SEQ ID NO: 80)	MSGPTWLPPKQPEPARAPQGRAIPRGTPGPPPAHGAGAPCRQGGPSPWKPGRRDRLAEQH AGRAEWGSGSCVTATRPTGI

[0197] 如本文所用，术语“TRIP6”包括由细胞天然表达的TRIP6的任何变体或异型体。因此，在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂可增加TRIP6异型体1的表达。在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂可增加TRIP6异型体2的表达。在一些方面，本文公开的miR-485抑制

剂可增加TRIP6异型体3的表达。在其它方面，本文公开的miR-485抑制剂可增加TRIP6异型体1、异型体2和异型体3的表达。除非另外指明，否则异型体1、异型体2和异型体3在本文中统称为“TRIP6”。

[0198] 在一些方面，与参考细胞(例如，未与miR-485抑制剂接触的相应细胞)中的表达和/或活性相比，使细胞与miR-485抑制剂接触使所述细胞中TRIP6蛋白和/或TRIP6基因的表达和/或活性增加至少约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6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9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60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍或至少约100倍或更多倍。

[0199] 在一些方面，miR-485抑制剂还可增加其它含LIM结构域的蛋白的表达和/或活性。

[0200] 不受任一种理论的束缚，在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂通过降低miR-485(例如miR-485-3p)的表达和/或活性来增加TRIP6蛋白和/或TRIP6基因的表达。

[0201] SIRT1调控

[0202] 在一些方面，使本文所述的miR-485抑制剂与细胞(例如，神经干细胞)接触可增加细胞中SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达。

[0203] 长寿蛋白1(SIRT1)，也称为NAD依赖性去乙酰化酶长寿蛋白-1，是人类中由SIRT1基因编码的蛋白质。SIRT1基因位于人类中10号染色体上(GenBank登录号NC_000010.11的核苷酸67,884,656至67,918,390，正链取向)。SIRT1基因的同义词及其编码蛋白是已知的并且包括“调控蛋白SIR2同源物1”、“沉默接合型信息调控2同源物1”、“SIR2”、“SIR2样蛋白1”、“SIR2L1”、“SIR2α”、“长寿蛋白1型”、“hSIRT1”或“hSIR2”。

[0204] 存在由选择性剪接产生的至少两种已知的人SIRT1蛋白异型体。SIRT1异型体1(UniProt标识符:Q96EB6-1)由747个氨基酸组成，并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO:31)。SIRT1异型体2(也称为“δ-外显子8”)(UniProt标识符:Q96EB6-2)由561个氨基酸组成，并且与规范序列的区别如下:454-639:缺失(SEQ ID NO:32)。下表3提供两种SIRT1异型体的序列。

[0205] 表3.SIRT1蛋白异型体

[0206]

异型体 1 (UniProt: Q96EB6-1) (SEQ ID NO: 31)	MADEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEPLRKRPRRDGPGLERSPGEPGGAAPEREV PAAARGCPGAAAAALWREAEAEAAAAGGEQEAQATAAAGEGDNGPGLQGPSREPPLADNL YDEDDDDEGEEEEEAAAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCESDEEDRASHASSSDWTPRP RIGPYTFVQQHLMIGTDPRTILKDLLPETIPPPELDDMTLWQIVINILSEPPKRKKRKDI NTIEDAVKLLQECKKIIVLTGAGVSVSCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLPDPQAMFDIE YFRKDPRPFFKFAKEIYPGQFQPSLCHKFIALSDKEGKLLRNYTQNIDTLEQVAGIQRII QCHGSFATASCLICKYKVDCEAVRGDIFNQVVPRCPRCPADEPLAIMKPEIVFFGENLPE QFHRAMKYDKDEVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIPHEVPQILINREPLPHLHFDVELLG DCDVIINELCHRLGGEYAKLCCNPVKLSEITEKPPRTQKELAYLSELPPTPLHVSEDSSS PERTSPPDSSVIVTLLDQAAKSNDDLDVSESKGCMEEKPQEVQTSRNVESIAEQMENPDL KNVGSSTGEKNERTSVAGTVRKCWPNRVAKEQISRRLDGNQYLFLPPNRYIFHGAEVYSD SEDDVLSSSSCGSNSDSGTCQSPSLEEPMEDESEIEEFYNGLEDEPDVPERAGGAGFGTD GDDQEAINEAISVKQEVTDMNYPSNKS

[0207]

异型体 2 (UniProt: Q96EB6-2) (SEQ ID NO: 32)	MADEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEPLRKRPRRDGPGLERSPGEPGGAAPEREV PAAARGCPGAAAAALWREAEAEAAAAGGEQEAQATAAAGEGDNGPGLQGPSREPPLADNL YDEDDDDEGEEEEEAAAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCESDEEDRASHASSSDWTPRP RIGPYTFVQQHLMIGTDPRTILKDLLPETIPPPELDDMTLWQIVINILSEPPKRKKRKDI NTIEDAVKLLQECKKIIVLTGAGVSVSCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLPDPQAMFDIE YFRKDPRPFFKFAKEIYPGQFQPSLCHKFIALSDKEGKLLRNYTQNIDTLEQVAGIQRII QCHGSFATASCLICKYKVDCEAVRGDIFNQVVPRCPRCPADEPLAIMKPEIVFFGENLPE QFHRAMKYDKDEVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSNQYLFLPPNRYIFHGAEVYSDSEDDVL SSSSCGSNSDSGTCQSPSLEEPMEDESEIEEFYNGLEDEPDVPERAGGAGFGTDGDDQEA INEAISVKQEVTDMNYPSNKS

[0208] 如本文所用,术语“SIRT1”包括由细胞天然表达的SIRT1的任何变体或异型体。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加SIRT1异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加SIRT1异型体2的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加SIRT1异型体1和异型体2的表达。除非另有说明,否则异型体1和异型体2在本文中统称为“SIRT1”。

[0209] 在一些方面,与参考细胞(例如,未与miR-485抑制剂接触的相应细胞)中的表达和/或活性相比,使细胞与miR-485抑制剂接触使所述细胞中SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达和/或活性增加至少约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6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9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60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍或至少约100倍或更多倍。

[0210] 不受任一种理论的束缚,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂通过降低miR-485(例如miR-485-3p)的表达和/或活性来增加SIRT1蛋白和/或SIRT1基因的表达。

[0211] CD36调控

[0212] 在一些方面,使本文所述的miR-485抑制剂与细胞接触可增加细胞中CD36蛋白和/或CD36基因的表达。

[0213] 分化簇36(CD36)也称为血小板糖蛋白4,是人类中由CD36基因编码的蛋白质。CD36基因位于7号染色体上(GenBank登录号NC_000007.14的核苷酸80,602,656至80,679,277,正链取向)。CD36基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括“血小板糖蛋白IV”、“脂肪酸转位酶”、“清道夫受体B类成员3”、“糖蛋白88”、“糖蛋白IIIb”、“糖蛋白IV”、“血小板反应蛋白受体”、“GPIIIB”、“PAS IV”、“GP3B”、“GPIV”、“FAT”、“GP4”、“BDPLT10”、“SCARB3”、“CHDS7”、“PASIV”或“PAS-4”。

[0214] 存在由选择性剪接产生的至少四种已知的人CD36蛋白异型体。CD36异型体1(UniProt标识符:P16671-1)由472个氨基酸组成,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO:36)。CD36异型体2(也称为“ex8-del”)(UniProt标识符:P16671-2)(SEQ ID NO:37)由288个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:274-288:SIYAVFESDVNLKGI→ETCVHFTSSFSVCKS;以及289-472:缺失。CD36异型体3(也称为“ex6-7-del”)(UniProt标识符:P16671-3)(SEQ ID NO:38)由433个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:234-272:缺失。CD36异型体4(也称为“ex4-del”)(UniProt标识符:P16671-4)(SEQ ID NO:39)由412个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:144-203:缺失。下表4提供四种CD36异型体的序列。

[0215] 表4.CD36蛋白异型体

[0216]

异型体 1 (UniProt: P16671-1) (SEQ ID NO: 36)	MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTE VYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSFLQPNGA IFEPSLSVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSLINKSKSSMFQVRTLRELLW GYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFYPYNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWE SHCDMINGTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGIPVYRFVLPSKAF ASPVENPDNYCFCTEKIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASPDVSEPIDGL NPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLLVKPSEKIQVLKNLKRNYIVPILWLNETG TIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSVGVVMFVAFMISYCACRSKTIK
异型体 2 (UniProt: P16671-2) (SEQ ID NO: 37)	MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTE VYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSFLQPNGA IFEPSLSVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSLINKSKSSMFQVRTLRELLW GYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFYPYNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWE SHCDMINGTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRETCVHFTSSFSVCKS

[0217]

异型体 3 (UniProt: P16671-3) (SEQ ID NO: 38)	MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTE VYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSFLQPNGA IFEPSLSVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSLINKSKSSMFQVRTLRELLW GYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFYPYNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRSIYAVF ESDVNLKGIPVYRFVLPSKAFASPVENPDNYCFCTEKIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPV YISLPHFLYASPDVSEPIDGLNPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLLVKPSEKI QVLKNLKRNYIVPILWLNETGTIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSVGVVMFVAF MISYCACRSKTIK
异型体 4 (UniProt: P16671-4) (SEQ ID NO: 39)	MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTE VYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSFLQPNGA IFEPSLSVGTEADNFTVLNLAVAYNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWE SHCDMINGTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGIPVYRFVLPSKAF ASPVENPDNYCFCTEKIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASPDVSEPIDGL NPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLLVKPSEKIQVLKNLKRNYIVPILWLNETG TIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSVGVVMFVAFMISYCACRSKTIK

[0218] 如本文所用,术语“CD36”包括由细胞天然表达的CD36的任何变体或异型体。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体2的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体3的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体4的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加CD36异型体1和异型体2、和/或异型体3和异型体4、和/或异型体1和异型体4、和/或异型体2和异型体3的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加所有CD36异型体的表达。除非另外指示,否则异型体1、异型体2、异型体3和异型体4在本文中统称为“CD36”。

[0219] 在一些方面,与参考细胞(例如,未与miR-485抑制剂接触的相应细胞)中的表达和/或活性相比,使细胞与miR-485抑制剂接触使所述细胞中CD36蛋白和/或CD36基因的表达和/或活性增加至少约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6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9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60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍或至少约100倍或更多倍。

[0220] 不受任一种理论的束缚,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂通过降低miR-

485(例如miR-485-3p)的表达和/或活性来增加CD36蛋白和/或CD36基因的表达。

[0221] PGC1调控

[0222] 在一些方面,使本文所述的miR-485抑制剂与细胞接触可增加细胞中PGC-1α蛋白和/或PGC-1α基因的表达。

[0223] 过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅激活剂1-α(PGC1-α),也称为PPARG辅激活剂1α或配体效应调节剂-6,是在人类中由PPARGC1A基因编码的蛋白质。PGC1-α基因位于人类中4号染色体上(GenBank登录号NC_000004.12的核苷酸23,792,021至24,472,905,正链取向)。PGC1-α基因的同义词及其编码蛋白是已知的,并且包括"PPARGC1A"、"LEM6"、"PGC1"、"PGC1A"、"PGC-1v"、"PPARGC1"、"PGC1α"或"PGC-1(α)。"

[0224] 存在由选择性剪接产生的至少九种已知的人PGC1-α蛋白异型体。PGC1-α异型体1(UniProt标识符:Q9UBK2-1)由798个氨基酸组成,并且已被选择作为规范序列(SEQ ID NO:40)。PGC1-α异型体2(也称为"异型体NT-7a")(UniProt标识符:Q9UBK2-2)(SEQ ID NO:41)由271个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:269-271:DPK→LFL;272-798:缺失。PGC1-α异型体3(也称为"异型体B5")(UniProt标识符:Q9UBK2-3)(SEQ ID NO:42)由803个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE→MDETSPRLEEDWKKVLQREAGWQ。PGC1-α异型体4(也称为"异型体B4")(UniProt标识符:Q9UBK2-4)(SEQ ID NO:43)由786个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE→MDEGYF。PGC1-α异型体5(也称为"异型体B4-8a")(UniProt标识符:Q9UBK2-5)(SEQ ID NO:44)由289个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE→MDEGYF;294-301:LTPPTTPP→VKTNLISK;302-798:缺失。PGC1-α异型体6(也称为"异型体B5-NT")(UniProt标识符:Q9UBK2-6)(SEQ ID NO:45)由276个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE→MDETSPRLEEDWKKVLQREAGWQ;269-271:DPK→LFL;272-798:缺失。PGC1-α异型体7(也称为"B4-3ext")(UniProt标识符:Q9UBK2-7)(SEQ ID NO:46)由138个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:1-18:MAWDMCNQDSESVWSDIE→MDEGYF;144-150:LKKLLLA→VRTLPTV;151-798:缺失。PGC1-α异型体8(也称为"异型体8a")(UniProt标识符:Q9UBK2-8)(SEQ ID NO:47)由301个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:294-301:LTPPTTPP→VKTNLISK;302-798:缺失。PGC1-α异型体9(也称为"异型体9"或"L-PGG-1α")(UniProt标识符:Q9UBK2-9)(SEQ ID NO:48)由671个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:1-127:缺失。下表5提供九种PGC1-α异型体的序列。

[0225] 表5.PGC1-α蛋白异型体

[0226]

异型体 1 (UniProt: Q9UBK2-1) (SEQ ID NO: 40)	MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALTDGDVTTD NEASPSSMPDGTPPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRTNP AIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKK KSHTQSQSQHLQAKPTTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTTP PHKANQDNPFRASPKLKSSCKTVVPPPSKKPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQSELYAQLSK SSVLTGGHEERKTKRPSLRLFGDHDYCQSINSKTEILINISQELQDSRQLENKDVSSDWQ GQICSSTDSDQCYLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAELNKHFGHPSQAVFDDEADK TGELRDSDFSNEQFSKLPMFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQSYSLFNVSPSC SSFNSPCRDSVSPPKSLFSQRPQRMRSRSRSFSRHRSCSRSPYSRSRSRSPGSRSSSRSC YYYESSHYRHRTHRNSPLYVRSRSRSPYSRRPRYDSYEEYQHERLKREEYRREYEKRESE RAKQRERQRQKAIEERRVIYVGKIRPDTTRTELRDRFEVFGEIEECTVNLRDDGDSYGFI TYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDSNSDDFDPASTKSKY DSLDFDSLLKEAQRSLRR
异型体 2 (UniProt: Q9UBK2-2) (SEQ ID NO: 41)	MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALTDGDVTTD NEASPSSMPDGTPPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRTNP AIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKK KSHTQSQSQHLQAKPTTLSLPLTPESPNLFL

异型体 3 (UniProt: Q9UBK2-3) (SEQ ID NO: 42)	MDETSPRLEEDWKKVLQREAGWQCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGL KWCSDQSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALTDG DVTTDNEASPSSMPDGTPPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHR IRTNPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDK CTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLT PPTTPPHKANQDNPFRASPKLKSSCKTVVPPPSKKPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQSELY AQLSKSSVLTGGHEERKTKRPSLRLFGDHDYCQSINSKTEILINISQELQDSRQLENKDV SSDWQGQICSSTDSDQCYLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAELNKHFGHPSQAVFD DEADKTGELRDSDFSNEQFSKLPMFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQSYSLFN VSPSCSSFNSPCRDSVSPPKSLFSQRPQRMRSRSRSFSRHRSCSRSPYSRSRSRSPGSRS SSRSCYYYESSHYRHRTHRNSPLYVRSRSRSPYSRRPRYDSYEEYQHERLKREEYRREYE KRESERAKQRERQRQKAIEERRVIYVGKIRPDTTRTELRDRFEVFGEIEECTVNLRDDGD SYGFITYRYTCDAFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDSNSDDFDPAS TKSKYDSLDFDSLLKEAQRSLRR
异型体 4 (UniProt: Q9UBK2-4) (SEQ ID NO: 43)	MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSDQSEIISNQYNNE PSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRTNPAIVKTENSWSNK AKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQ AKPTTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTTPPHKANQDNPFRA SPKLKSSCKTVVPPPSKKPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQSELYAQLSKSSVLTGGHEERK TKRPSLRLFGDHDYCQSINSKTEILINISQELQDSRQLENKDVSSDWQGQICSSTDSDQC YLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAELNKHFGHPSQAVFDDEADKTGELRDSDFSNE QFSKLPMFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQSYSLFNVSPSCSSFNSPCRDSVS PPKSLFSQRPQRMRSRSRSFSRHRSCSRSPYSRSRSRSPGSRSSSRSCYYYESSHYRHRT HRNSPLYVRSRSRSPYSRRPRYDSYEEYQHERLKREEYRREYEKRESERAKQRERQRQKA IEERRVIYVGKIRPDTTRTELRDRFEVFGEIEECTVNLRDDGDSYGFITYRYTCDAFAAL ENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDSNSDDFDPASTKSKYDSLDFDSLLKEA QRSLRR
[0227] 异型体 5 (UniProt: Q9UBK2-5) (SEQ ID NO: 44)	MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSDQSEIISNQYNNE PSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRTNPAIVKTENSWSNK AKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQSQHLQ AKPTTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGVKTNLISK
异型体 6 (UniProt: Q9UBK2-6) (SEQ ID NO: 45)	MDETSPRLEEDWKKVLQREAGWQCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGL KWCSDQSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALTDG DVTTDNEASPSSMPDGTPPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHR IRTNPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDK CTSKKKSHTQSQSQHLQAKPTTLSLPLTPESPNLFL
异型体 7 (UniProt: Q9UBK2-7) (SEQ ID NO: 46)	MDEGYFCAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSDQSEIISNQYNNE PSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALTDGDVTTDNEASPSSMPDGT PPPQEAEEPSLVRTLPTV
异型体 8 (UniProt: Q9UBK2-8) (SEQ ID NO: 47)	MAWDMCNQDSESVWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALTDGDVTTD NEASPSSMPDGTPPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRTNP AIVKTENSWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKK KSHTQSQSQHLQAKPTTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGVKTNLIS K

[0228]

异型体9 (UniProt: Q9UBK2-9) (SEQ ID NO: 48)	MPDGTPPPQEAEEPSLLKKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHANHNHRIRTNPAIVKTEN SWSNKAKSICQQQKPQRRPCSELLKYLTTNDDPPHTKPTENRNSSRDKCTSKKKSHTQSQ SQHLQAKPTTLSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTTPPHKANQD NPFRASPKLKSSCKTVVPPPSKKPRYSESSGTQGNNSTKKGPEQSELYAQLSKSSVLTGG HEERKTKRPSLRLFGDHDYCQSINSKTEILINISQELQDSRQLENKDVSSDWQGQICSST DSDQCYLRETLEASKQVSPCSTRKQLQDQEIRAELNKHFGHPSQAVFDDEADKTGELRDS DFSNEQFSKLPMFINSGLAMDGLFDDSEDESDKLSYPWDGTQSYSLFNVSPSCSSFNSPC RDSVSPPKSLFSQRPQRMRSRSRSFSRHRSCSRSPYSRSRSRSPGSRSSSRSCYYYESSH YRHRTHRNSPLYVRSRSRSPYSRRPRYDSYEEYQHERLKREEYRREYEKRESERAKQRER QRQKAIEERRVIYVGKIRPDTTRTELRDRFEVFGEIEECTVNLRDDGDSYGFITYRYTCD AFAALENGYTLRRSNETDFELYFCGRKQFFKSNYADLDSNSDDFDPASTKSKYDSLDFDS LLKEAQRSLRR

[0229] 如本文所用,术语“PGC1-α”包括由细胞天然表达的PGC1-α的任何变体或异型体。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体2的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体1的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体2的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体3的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体4的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体5的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体6的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体7的表达。在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体8的表达。因此,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体9的表达。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂可增加PGC1-α异型体1、异型体2、异型体3、异型体4、异型体5、异型体6、异型体7、异型体8和异型体9的表达。除非另外指示,否则异型体1和异型体2两者在本文中统称为“PGC1-α”。

[0230] 在一些方面,与参考细胞(例如,未与miR-485抑制剂接触的相应细胞)中的表达和/或活性相比,使细胞与miR-485抑制剂接触使所述细胞中PGC1-α蛋白和/或PGC1-α基因的表达和/或活性增加至少约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6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9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60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍或至少约100倍或更多倍。

[0231] 不受任一种理论的束缚,在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂通过降低miR-485(例如miR-485-3p)的表达和/或活性来增加PGC1-α蛋白和/或PGC1-α基因的表达。

[0232] III.可用于本公开的miRNA-485抑制剂

[0233] 本文公开了能够抑制miR-485活性的化合物(miR-485抑制剂)。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含编码或包含核苷酸分子的核苷酸序列,所述核苷酸分子包含至少一个miR-485结合位点,其中所述核苷酸分子不编码蛋白质。如本文所述,在一些方面,miR-485结合位点与靶miRNA核酸序列(即,miR-485)至少部分互补,使得miR-485抑制剂与miR-485核酸序列杂交。

[0234] 在一些方面,本文公开的miR抑制剂的miR-485结合位点与miR-485(例如,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结合位点与miR-485

(例如,miR-485-3p)的核酸序列完全互补。

[0235] miR-485发夹前体可产生miR-485-5p和miR-485-3p。在本公开的上下文中,“miR-485”涵盖miR-485-5p和miR-485-3p两者,除非另外说明。人成熟miR-485-3p具有序列5'-GUCAUACACGGCUCU CCUCUCU-3'(SEQ ID NO:1;miRBase登录号MIMAT0002176)。miR-485-3p的5'末端子序列5'-UCAUACA-3'(SEQ ID NO:49)是种子序列。人成熟miR-485-5p具有序列5'-AGAGGCUGGCCGUGAUGAA UUC-3'(SEQ ID NO:33;miRBase登录号MIMAT0002175)。miR-485-5p的5'末端子序列5'-GAGGCUG-3'(SEQ ID NO:50)是种子序列。

[0236] 如本领域技术人员显而易见的,人成熟miR-485-3p与其它物种具有显著序列相似性。例如,小鼠成熟miR-485-3p与人成熟miR-485-3p的不同之处在于5'端和3'端各自的单个氨基酸(即,在5'端具有额外“A”并且在3'端缺失“C”)。小鼠成熟miR-485-3p具有以下序列:5'-AGUCAUACACGGCUCUCCUCUC-3'(SEQ ID NO:34;miRBase登录号MIMAT0003129;下划线部分对应于与人成熟miR-485-3p的重叠)。小鼠成熟miR-485-5p的序列与人的序列同一:5'-agaggcuggccgugaugaauuc-3'(SEQ ID NO:33;miRBase登录号MIMAT0003128)。在某些方面,本文公开的miR-485抑制剂能够结合来自人和小鼠两者的miR-485-3p和/或miR-485-5p。

[0237] 在一些方面,miR-485结合位点是与miR-485-3p的序列(或其子序列)互补(例如,完全互补)的单链多核苷酸序列。在一些方面,miR-485-3p子序列包含种子序列。因此,在某些方面,miR-485结合位点与SEQ ID NO:49中所示的核酸序列具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列互补性。在某些方面,miR-485结合位点与miR-485-3p互补,除了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配。在其它方面,miR-485结合位点与SEQ ID NO:1中所示的核酸序列完全互补。

[0238] 在一些方面,miR-485结合位点是与miR-485-5p的序列(或其子序列)互补(例如,完全互补)的单链多核苷酸序列。在一些方面,miR-485-5p子序列包含种子序列。在某些方面,miR-485结合位点与SEQ ID NO:50中所示的核酸序列具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列互补性。在某些方面,miR-485结合位点与miR-485-5p互补,除了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配。

[0239] miRNA的种子区域与靶mRNA形成紧密双链体。大多数miRNA与靶mRNA的3'非翻译区(UTR)不完全碱基配对,而miRNA的5'近端“种子”区域提供大部分配对特异性。不受任何理论束缚,据信前九个miRNA核苷酸(涵盖种子序列)提供更大的特异性,而此区域3'的miRNA核糖核苷酸允许较低的序列特异性并因此耐受较高程度的错配碱基配对,其中位置2-7是最重要的。因此,在本公开的特定方面,miR-485结合位点包含在miR-485的种子序列的整个长度上完全互补(即,100%互补)的子序列。

[0240] 可用于本公开上下文中的miRNA序列和miRNA结合序列(抑制剂)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。

[0241] 在一些方面，本公开的miRNA结合序列可在本文提供的序列表中的那些序列的5'端、3'端或5'端和3'端两者处包含额外的核苷酸，只要经修饰的序列仍然能够与miR-485特异性结合。在一些方面，本公开的miRNA结合序列相对于所提供的序列表中的那些序列可在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核苷酸上不同，只要经修饰的序列仍然能够与miR-485特异性结合。

[0242] 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。

[0243] 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。

[0244] 在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂的长度是约6至约30个核苷酸。在某些方面，本文公开的miR-485抑制剂的长度是7个核苷酸。在其它方面，本文公开的miR-485抑制剂的长度是8个核苷酸。在一些方面，miR-485抑制剂的长度是9个核苷酸。在一些方面，本公开的miR-485抑制剂的长度是10个核苷酸。在某些方面，miR-485抑制剂的长度是11个核苷酸。在其它方面，miR-485抑制剂的长度是12个核苷酸。在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂的长度是13个核苷酸。在某些方面，本文公开的miR-485抑制剂的长度是14个核苷酸。在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂的长度是15个核苷酸。在其它方面，miR-485抑制剂的长度是16个核苷酸。在某些方面，本公开的miR-485抑制剂的长度是17个核苷酸。在一些方面，miR-485抑制剂的长度是18个核苷酸。在一些方面，miR-485抑制剂的长度是19个核苷酸。在某些方面，miR-485抑制剂的长度是20个核苷酸。在其它方面，本公开的miR-485抑制剂的长度是21个核苷酸。在一些方面，miR-485抑制剂的长度是22个核苷酸。

[0245] 在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂包含与选自SEQ ID NO:2至30的序列至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或约100％同一的核苷酸序列。在某些方面，miR-485抑制剂包含选自由SEQ ID NO:2至30组成的组的核苷酸序列，其中所述核苷酸序列可任选地包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配。

[0246] 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'-GAGCC GUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:8)、5'-AGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:9)、5'-GAGAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:10)、5'-GGA GAGCCGUGUAUGA-3'(SEQ ID NO:11)、5'-AGGAGAGCCGUGU AUGA-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)。

[0247] 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'-GCCG UGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:20)、5'-AGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:21)、5'-GAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:22)、5'-AGAGCC GUGUAUGAC-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'-GAGGAGA GCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:27)、5'-AGAGGAGAGCCGUGU AUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:29)。

[0248] 在一些方面,所述miRNA抑制剂具有选自由以下组成的组的序列:5'-TGTATGA-3'(SEQ ID NO:30)、5'-GTGTATGA-3'(SEQ ID NO:51)、5'-CGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:52)、5'-CCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:53)、5'-GCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:54)、5'-AGCCGTGTA TGA-3'(SEQ ID NO:55)、5'-GAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:35)、5'-AGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:56)、5'-GAGAGCCGTG TATGA-3'(SEQ ID NO:57)、5'-GGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:58)、5'-AGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:59)、5'-GAGG AGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:60)、5'-AGAGGAGAGCCGTG TATGA-3'(SEQ ID NO:61)、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGA-3'(SEQ ID NO:62)、5'-TGTATGAC-3'(SEQ ID NO:63)、5'-GTGTATG AC-3'(SEQ ID NO:64)、5'-CGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:65)、5'-CCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:66)、5'-GCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:67)、5'-AGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:68)、5'-GAG CCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:69)、5'-AGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:70)、5'-GAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:71)、5'-GGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:72)、5'-AGGAGAG CCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:73)、5'-GAGGAGAGCCGTGTATG AC-3'(SEQ ID NO:74)、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:75)和5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:76)。

[0249] 在一些方面,本文公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂)包含与5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77)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'-AGAGGAGAGCCGUGU AUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77)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'-AGAGGAGAGCCGUGU AUGAC-3'(SEQ ID NO:28)或5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'(SEQ ID NO:77),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:

77)。在某些方面,miRNA抑制剂包含核苷酸序列5'-AGAGGAGAG CCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:28)。

[0250] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含本文公开的序列,例如SEQ ID NO:2至30中的任一个,以及在N末端的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个额外核酸,在C末端的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个额外核酸,或两者。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含本文公开的序列,例如SEQ ID NO:2至30中的任一个,以及在N末端的一种额外核酸和/或在C末端的一个额外核酸。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含本文公开的序列,例如SEQ ID NO:2至30中的任一个,以及在N末端的一个或两个额外核酸和/或在C末端的一个或两个额外核酸。在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含本文公开的序列,例如SEQ ID NO:2至30中的任一个,以及在N末端的一至三个额外核酸和/或在C末端的一至三个额外核酸。在一些方面,miR-485抑制剂包含5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(SEQ ID NO:29)。

[0251] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂包含一个miR-485结合位点。在其它方面,本文公开的miR-485抑制剂包含至少两个miR-485结合位点。在某些方面,miR-485抑制剂包含三个miR-485结合位点。在一些方面,miR-485抑制剂包含四个miR-485结合位点。在一些方面,miR-485抑制剂包含五个miR-485结合位点。在某些方面,miR-485抑制剂包含六个或更多个miR-485结合位点。在一些方面,所有的miR-485结合位点都是相同的。在一些方面,所有的miR-485结合位点都是不同的。在一些方面,至少一个miR-485结合位点是不同的。在一些方面,所有的miR-485结合位点都是miR-485-3p结合位点。在其它方面,所有的miR-485结合位点都是miR-485-5p结合位点。在其它方面,miR-485抑制剂包含至少一个miR-485-3p结合位点和至少一个miR-485-5p结合位点。

[0252] III.a.经化学修饰的多核苷酸

[0253] 在一些方面,本文公开的miR-485抑制剂包含多核苷酸,所述多核苷酸包含至少一个经化学修饰的核苷和/或核苷酸。当本公开的多核苷酸经化学修饰时,所述多核苷酸可被称为"经修饰的多核苷酸"。

[0254] "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。

[0255] 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。

[0256] 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。

[0257] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)经化学修饰。如本文所用,关于多核苷酸,术语"化学修饰"或适当时"经化学修饰的"是指相对于腺苷(A)、鸟苷(G)、尿苷(U)、胸苷(T)或胞苷(C)核糖核苷或脱氧核糖核苷在它们的位置、模式、百分比或群体中

的一个或多个方面(包括但不限于其核碱基、糖、主链或它们的任何组合)的修饰。

[0258] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)可具有全部或任何同一核苷类型的均一化学修饰,或通过在全部或任何同一核苷类型中的相同起始修饰的向下滴定而产生的修饰群体,或全部或任何同一核苷类型的测量百分比的化学修饰但伴有随机并入。在其它方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)可在整个多核苷酸中具有两种、三种或四种同一核苷类型的均一化学修饰(如所有尿苷和所有胞嘧啶等以相同方式修饰)。

[0259] 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。

[0260] 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。

[0261] 在一些方面,多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)包含至少两个(例如,2、3、4、5、6、7、8、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、18、20个或更多个)经修饰的核碱基的组合。

[0262] 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96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%。

[0263] (i)碱基修饰

[0264] 在某些方面,化学修饰在本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)中的核碱基处。在一些方面,至少一个经化学修饰的核苷是经修饰的尿苷(例如,假尿苷(ψ)、2-硫尿苷(s2U)、1-甲基-假尿苷(m1ψ)、1-乙基-假尿苷(e1ψ)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。

[0265] 在一些方面,对于特定修饰,对本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)进行均一修饰(例如,完全修饰,在整个序列中修饰)。例如,可用统一类型的碱基修饰,例如5-甲基-胞苷(m5C)均一修饰多核苷酸,这意味着多核苷酸序列中的所有胞嘧啶残基都被5-甲基-胞苷(m5C)置换。类似地,可通过用经修饰的核苷(如以上列出的那些中的任一者)置换针对序列中存在的任何类型的核苷残基均一地修饰多核苷酸。

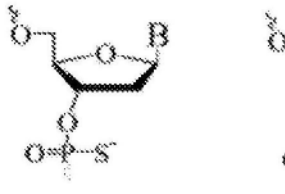
[0266] 在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)包含至少两个(例如,2、3、4个或更多个)经修饰的核碱基的组合。在一些方面,本公开的多核苷酸(例如,miR-485抑制剂)中至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约

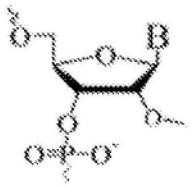
97％、至少约98％、至少约99％或约100％的核碱基类型是经修饰的核碱基。

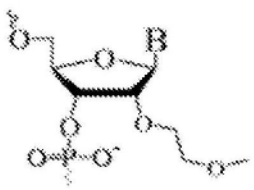
[0267] (ii)主链修饰

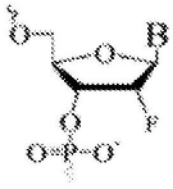
[0268] 在一些方面，本公开的多核苷酸(即，miR-485抑制剂)可包含核苷之间的任何有用的连键。可用于本公开的组合物的此类连键(包括主链修饰)包括但不限于以下：3'-亚烷基膦酸酯、3'-氨基氨基磷酸酯、含烯烃的主链、氨基烷基氨基磷酸酯、氨基烷基磷酸三酯、硼烷磷酸酯、$-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$、$-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$、$-CH_2-NH-CH_2-$、手性膦酸酯、手性硫代磷酸酯、甲酰基和硫代甲酰基主链、亚甲基(甲基亚氨基)、亚甲基甲酰基和硫代甲酰基主链、亚甲基亚氨基和亚甲基肼基主链、吗啉代连键、$-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$、具有杂原子核苷间连键的寡核苷、次膦酸酯、氨基磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代磷酸酯核苷间连键、硫代磷酸酯、磷酸三酯、PNA、硅氧烷主链、氨基磺酸酯主链、硫化亚砜和砜主链、磺酸酯和磺酰胺主链、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯以及硫羰基氨基磷酸酯。

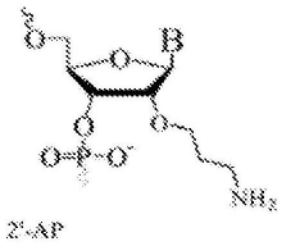
[0269]

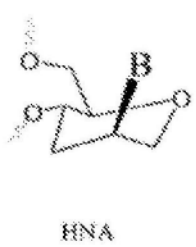




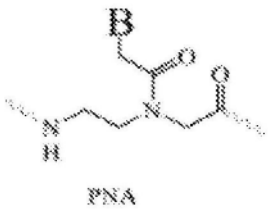


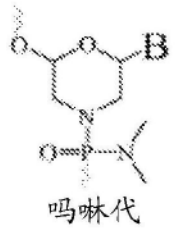


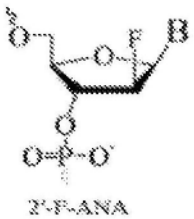


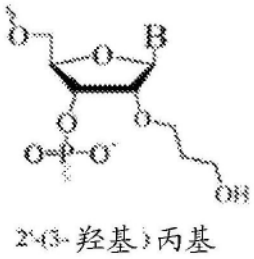


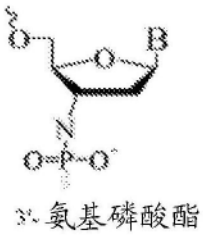


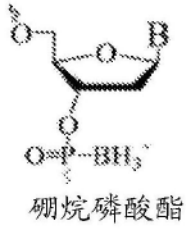












[0270] 在一些方面，以上公开的主链连键的存在增加本公开的多核苷酸(即，miR-485抑制剂)的稳定性和对降解的抗性。

[0271] 在一些方面，本公开的多核苷酸(即，miR-485抑制剂)中至少约5％、至少约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96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的主链连键经修饰(例如,它们全部是硫代磷酸酯)。

[0272] 在一些方面,可包含在本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)中的主链修饰包括二氨基磷酸酯吗啉代低聚物(PMO)和/或硫代磷酸酯(PS)修饰。

[0273] (iii)糖修饰

[0274] 可并入本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)中的经修饰的核苷和核苷酸可在核酸的糖上进行修饰。在一些方面,糖修饰增加miR-485抑制剂与miR-485核酸序列结合的亲和力。在miR-485抑制剂中并入增强亲和力的核苷酸类似物(如LNA或2'-取代的糖)可减小miR-485抑制剂的长度和/或大小。

[0275] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)中至少约5%、至少约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96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的核苷酸含有糖修饰(例如,LNA)。

[0276] 在一些方面,本公开的多核苷酸中的至少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)。

[0277] 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,以便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。

[0278] 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。

[0279] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,mir-485抑制剂)中存在的核苷酸类似物包含例如2'-O-烷基-RNA单元、2'-OMe-RNA单元、2'-O-烷基-SNA、2'-氨基-DNA单元、2'-氟-DNA单元、LNA单元、阿拉伯核酸(ANA)单元、2'-氟-ANA单元、HNA单元、INA(嵌入核酸)单元、2'MOE单元或它们的任何组合。在一些方面,LNA是例如氧基-LNA(如β-D-氧基-LNA或α-L-氧

基-LNA)、氨基-LNA(如β-D-氨基-LNA或α-L-氨基-LNA)、硫代-LNA(如β-D-硫代O-LNA或α-L-硫代-LNA)、ENA(如β-D-ENA或α-L-ENA)或它们的任何组合。在其它方面,可包含在本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)中的核苷酸类似物包括锁定核酸(LNA)、解锁核酸(UNA)、阿拉伯核酸(ABA)、桥联核酸(BNA)和/或肽核酸(PNA)。

[0280] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)可包含经修饰的RNA核苷酸类似物(例如,LNA)和DNA单元两者。在一些方面,miR-485抑制剂是缺口聚物(gapmer)。参见例如,美国专利号8,404,649;8,580,756;8,163,708;9,034,837;所述专利全部以引用的方式整体并入本文。在一些方面,miR-485抑制剂是micromir。参见美国专利申请公布号US20180201928,其以引用的方式整体并入本文。

[0281] 在一些方面,本公开的多核苷酸(即,miR-485抑制剂)可包含修饰以防止被核酸内切酶和核酸外切酶快速降解。修饰包括但不限于例如(a)末端修饰,例如5'端修饰(磷酸化、去磷酸化、缀合、反向连接等)、3'端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接等);(b)碱基修饰,例如用修饰的碱基、稳定性碱基、去稳定性碱基或与扩增的配偶体库碱基配对的碱基、或缀合碱基置换;(c)糖修饰(例如,在2'位置或4'位置)或糖的置换;以及(d)核苷间连键修饰,包括磷酸二酯连键的修饰或置换。

[0282] IV.载体和递送系统

[0283] 在一些方面,本公开的miR-485抑制剂可使用本领域中已知的任何相关递送系统例如施用于处于脱发风险的受试者。在某些方面,递送系统是载体。因此,在一些方面,本公开提供了包含本公开的miR-485抑制剂的载体。

[0284] 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。ADEASYTM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PADEASYTM的BJ5183大肠杆菌细胞。PADEASYTM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PADEASYTM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。

[0285] 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-XTM第四代包装系统)。

[0286] 本领域已知的任何AAV载体均可用于本文公开的方法中。AAV载体可包含已知载体或者可包含其变体、片段或融合物。在一些方面,AAV载体选自由以下组成的组:AAV 1型(AAV1)、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AVV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、牛AAV、虾AVV、蛇AVV以及它们的任何组合。

[0287] 在一些方面,AAV载体源自选自由以下组成的组的AAV载体:AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AVV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AVV、蛇AVV以及它们的任何组合。

[0288] 在一些方面,AAV载体是源自选自由以下组成的组的至少两种AAV载体的嵌合载体:AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AVV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AVV、蛇AVV以及它们的任何组合。

[0289] 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。

[0290] 在一些方面,AAV载体包含来自第一AAV(例如,AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AVV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AVV、蛇AVV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、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AVV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AVV、蛇AVV或它们的任何衍生物)的第二反向末端重复序列。

[0291] 在一些方面,AVV载体包含选自由以下组成的组的AAV载体的一部分:AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、山羊AVV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV、绵羊AAV、虾AVV、蛇AVV以及它们的任何组合。在一些方面,AAV载体包含AAV2。

[0292] 在一些方面,AVV载体包含剪接受体位点。在一些方面,AVV载体包含启动子。本领域已知的任何启动子均可用于本公开的AAV载体中。在一些方面,启动子是RNA Pol III启动子。在一些方面,RNA Pol III启动子选自由以下组成的组:U6启动子、H1启动子、7SK启动子、5S启动子、腺病毒2(Ad2)VAI启动子以及它们的任何组合。在一些方面,启动子是巨细胞病毒立即早期基因(CMV)启动子、EF1a启动子、SV40启动子、PGK1启动子、Ubc启动子、人β肌动蛋白启动子、CAG启动子、TRE启动子、UAS启动子、Ac5启动子、多角体启动子、CaMKIIa启动子、GAL1启动子、GAL10启动子、TEF启动子、GDS启动子、ADH1启动子、CaMV35S启动子或Ubi启动子。在一个具体方面,启动子包括U6启动子。

[0293] 在一些方面,AAV载体包含组成型活性启动子(组成型启动子)。在一些方面,组成型启动子选自由以下组成的组:次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、β-肌动蛋白启动子、巨细胞病毒(CMV)、猿病毒(例如,SV40)、乳头瘤病毒、腺病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、劳斯肉瘤病毒、逆转录病毒长末端重复序列(LTR)、鼠干细胞病毒(MSCV)

和单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。

[0294] 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。

[0295] 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)。

[0296] 在一些方面，本文公开的miR-485抑制剂与递送剂一起施用。可使用的递送剂的非限制性实例包括外泌体、类脂质、脂质体、脂质复合物、脂质纳米颗粒、细胞外囊泡、聚合化合物、肽、蛋白质、细胞、纳米颗粒模拟物、纳米管、胶束、病毒载体或缀合物。

[0297] 因此，在一些方面，本公开还提供了包含本公开的miRNA抑制剂(即，miR-485抑制剂)和递送剂的组合物。在一些方面，递送剂包含例如可自组装成胶束或并入胶束中的载体单元。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

[0298] [WP]-L1-[CC]-L2-[AM](式I)

[0299] 或

[0300] [WP]-L1-[AM]-L2-[CC](式II)

[0301] 其中

[0302] WP是水溶性生物聚合物部分；

[0303] CC是带正电荷(即，阳离子)的载体部分；

[0304] AM是佐剂部分；并且，

[0305] L1和L2独立地是任选的接头，并且

[0306] 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，当混合在一起时，miRNA抑制剂和阳离子载体单元能够彼此缔合(例如，通过共价键或非价键)以形成胶束。

[0307] 在一些方面，包含本公开的miRNA抑制剂(即，miR-485抑制剂)的组合物通过离子键与阳离子载体单元相互作用。

[0308] 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(烯烃醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚甘油、聚磷腈、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] 

，(式III)，

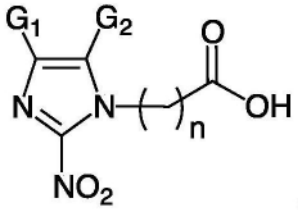
[0310] 其中n是1-1000。

[0311] 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。

[0312] 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。

[0313] 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：

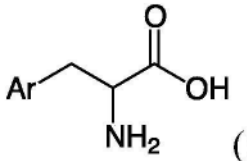
[0314] 

，(式 IV)，

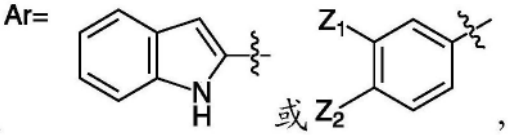
[0315] 其中G1和G2各自是H、芳族环或1-10烷基，或者G1和G2一起形成芳族环，并且其中n是1-10。

[0316] 在一些方面，所述佐剂部分包含硝基咪唑。在一些方面，所述佐剂部分包含甲硝唑、替硝唑、尼莫唑、地美硝唑、普瑞玛尼、奥硝唑、美格唑、阿扎硝唑、苄硝唑或它们的任何组合。在一些方面，所述佐剂部分包含氨基酸。

[0317] 在一些方面，所述佐剂部分包含

[0318] 

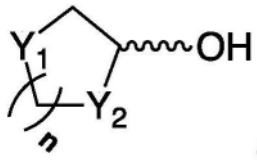
(式 V)，

[0319] 其中Ar是 

，并且

[0320] 其中Z1和Z2各自是H或OH。

[0321] 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] 

(式 VI),

[0323] 其中Y1和Y2各自是C、N、O或S,并且其中n是1或2。

[0324] 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。

[0325] 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。

[0326] 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。

[0327] 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。

[0328] 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:28),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。

[0329] 本公开还提供了包含本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂)的胶束,其中所述miRNA抑制剂和递送剂彼此缔合。

[0330] 在一些方面,所述缔合是共价键、非共价键或离子键。在一些方面,当在溶液中与本文公开的miR-485抑制剂混合时,阳离子载体单元的阳离子载体部分的正电荷足以形成胶束,其中所述溶液中阳离子载体单元的阳离子载体部分的正电荷与miR-485抑制剂(或包含所述抑制剂的载体)的负电荷的总离子比率是约1:1。

[0331] 在一些方面,阳离子载体单元能够保护本公开的miRNA抑制剂(即,miR-485抑制剂)免于酶促降解。参见PCT公布号WO2020/261227,所述公布以引用的方式整体并入本文。

[0332] V.药物组合物

[0333] 在一些方面,本公开还提供了适合施用于受试者的包含本文公开的miR-485抑制剂(例如,包含miR-485抑制剂的多核苷酸或载体)的药物组合物。所述药物组合物通常包含

本文所述的miR-485抑制剂(例如,多核苷酸或载体)和呈适合施用于受试者的形式的药学上可接受的赋形剂或载体。药学上可接受的赋形剂或载体部分地由所施用的特定组合物以及由用于施用组合物的特定方法决定。

[0334] 因此,存在多种合适的药物组合物制剂,所述药物组合物制剂包含本公开的miR-485抑制剂。(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.第18版(1990))。药物组合物通常被配制为无菌并且完全遵循美国食品与药品管理局的所有良好生产规范(GMP)条例。

[0335] VI.药盒

[0336] 本公开还提供了药盒或制造产品,所述药盒或制造产品包括本公开的miRNA抑制剂(例如,本文公开的多核苷酸、载体或药物组合物)和任选的使用说明书,例如,根据本文公开的方法的使用说明书。在一些方面,所述药盒或制造产品包括在一个或多个容器中的miR-485抑制剂(例如,本公开的载体(例如AAV载体)、多核苷酸或药物组合物)。在一些方面,所述药盒或制造产品包括miR-485抑制剂(例如,本公开的载体(例如AAV载体)、多核苷酸或药物组合物)和手册。本领域技术人员将容易地认识到,本公开的miR-485抑制剂(例如,本公开的载体、多核苷酸和药物组合物或它们的组合)可容易地并入本领域熟知的已确定的药盒形式之一中。

[0337] 通过说明而不是通过限制的方式提供以下实例。

[0338] 实施例

[0339] 实施例1:miR-485抑制剂的制备

[0340] (a)炔烃修饰的酪氨酸的合成:产生炔烃修饰的酪氨酸作为用于合成阳离子载体单元的组织特异性靶向部分(TM,参见图1)以将本公开的胶束引导至BBB中的LAT1转运蛋白的中间体。

[0341] 将N-(叔丁氧基羰基)-L-酪氨酸甲酯(Boc-Tyr-OMe)(0.5g,1.69mmol)和K_2CO_3(1.5当量,2.54mmol)于乙腈(4.0ml)中的混合物逐滴添加至炔丙基溴(1.2当量,2.03mmol)。将反应混合物在60℃下加热过夜。反应后,使用水:乙酸乙酯(EA)萃取反应混合物。然后,使用盐水溶液洗涤有机层。将粗物质通过快速柱(于己烷10%中的EA)纯化。接下来,将所得产物溶解于1,4-二噁烷(1.0ml)和6.0M HCl(1.0ml)中。将反应混合物在100℃下加热过夜。接下来,通过EA除去并提取二噁烷。将NaOH水溶液(0.5M)添加至混合物中直至pH值变为7。通过蒸发器浓缩反应物并在0℃下以12,000rpm离心。用去离子水洗涤沉淀并冻干。

[0342] (b)聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)(PEG-PLL)的合成:此合成步骤产生了本公开的阳离子载体单元的水溶性生物聚合物(WP)和阳离子载体(CC)(参见图1)。

[0343] 通过Lys(TFA)-NCA与作为大分子引发剂的单甲氧基PEG(MeO-PEG)的开环聚合合成聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)。简言之,将MeO-PEG(600mg,0.12mmol)和Lys(TFA)-NCA(2574mg,9.6mmol)分别溶解于含有1M硫脲和DMF(或NMP)的DMF中。通过微型注射器将Lys(TFA)-NCA溶液滴入MeO-PEG溶液中,并将反应混合物在37℃下搅拌4天。用氩气和真空吹扫反应瓶。所有反应均在氩气氛中进行。反应后,将混合物沉淀到过量的乙醚中。将沉淀物重新溶解于甲醇中并再次沉淀到冷乙醚中。然后将其过滤,并在真空中干燥后获得白色粉末。对于PEG-PLL(TFA)中TFA基团的脱保护,遵循下一步骤。

[0344] 将MeO-PEG-PLL(TFA)(500mg)溶解于甲醇(60mL)中,并在搅拌下将1N NaOH(6mL)

滴入聚合物溶液中。将混合物在搅拌下在37℃下保持1天。将反应混合物用10mM HEPES和蒸馏水透析4次。冻干后得到白色PEG-PLL粉末。

[0345] (b)叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)(N_3-PEG-PLL)的合成:此合成步骤产生了本公开的阳离子载体单元的水溶性生物聚合物(WP)和阳离子载体(CC)(参见图1)。

[0346] 叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸)通过Lys(TFA)-NCA与叠氮基-PEG(N_3-PEG)的开环聚合合成。简言之,将N_3-PEG(300mg,0.06mmol)和Lys(TFA)-NCA(1287mg,4.8mmol)分别溶解于含有1M硫脲和DMF(或NMP)的DMF中。通过微型注射器将Lys(TFA)-NCA溶液滴入N_3-PEG溶液中,并将反应混合物在37℃下搅拌4天。用氩气和真空吹扫反应瓶。所有反应均在氩气氛中进行。反应后,将混合物沉淀到过量的乙醚中。将沉淀物重新溶解于甲醇中并再次沉淀到冷乙醚中。然后将其过滤,并在真空中干燥后获得白色粉末。对于PEG-PLL(TFA)中TFA基团的脱保护,遵循下一步骤。

[0347] 将N_3-PEG-PLL(500mg)溶解于甲醇(60mL)中,并在搅拌下将1NNaOH(6mL)滴入聚合物溶液中。将混合物在搅拌下在37℃下保持1天。将反应混合物用10mM HEPES和蒸馏水透析4次。冻干后得到白色N_3-PEG-PLL粉末。

[0348] (c)(甲氧基或)叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸/烟酰胺/巯基丙酰胺)(N_3-PEG-PLL(Nic/SH))的合成:在此步骤中,将组织特异性佐剂部分(AM,参见图1)连接至本公开的阳离子载体单元的WP-CC组分。阳离子载体单元中使用的组织特异性佐剂部分(AM)是烟酰胺(维生素B3)。此步骤将产生图1中描绘的阳离子载体单元的WP-CC-AM组分。

[0349] 叠氮基-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸/烟酰胺/巯基丙酰胺)(N_3-PEG-PLL(Nic/SH))在EDC/NHS存在下通过N_3-PEG-PLL和烟酸的化学改性合成。将N_3-PEG-PLL(372mg,25.8μmol)和烟酸(556.7mg,针对PEG-PLL的NH2 1.02当量)分别溶解于去离子水和甲醇(1:1)的混合物中。将EDC·HCl(556.7mg,针对N_3-PEG-PLL的NH_2 1.5当量)添加至烟酸溶液中,并将NHS(334.2mg,针对PEG-PLL的NH21.5当量)逐步添加至混合物中。

[0350] 将反应混合物添加至N_3-PEG-PLL溶液中。将反应混合物在搅拌下保持在37℃持续16小时。16小时后,将3,3'-二硫代二丙酸(36.8mg,0.1当量)溶解于甲醇中,将EDC·HCl(40.3mg,0.15当量)和NHS(24.2mg,0.15当量)各自溶解于去离子水中。然后,将NHS和EDC·HCl依次添加至3,3'-二硫代二丙酸溶液中。添加粗N_3-PEG-PLL(Nic)溶液后,将混合物溶液在37℃下搅拌4小时。

[0351] 为了纯化,将混合物用甲醇透析2小时,添加DL-二硫苏糖醇(DTT,40.6mg,0.15当量),然后激活30分钟。

[0352] 为了除去DTT,将混合物依次用甲醇、去离子水中的50%甲醇、去离子水透析

[0353] (d)苯丙氨酸-聚(乙二醇)-b-聚(L-赖氨酸/烟酰胺/巯基丙酰胺)(Phe-PEG-PLL(Nic/SH))的合成:在此步骤中,将组织特异性靶向部分(TM)连接至在前一步骤中合成的WP-CC-AM组分。通过步骤(a)中产生的中间体与步骤(c)的产物的反应产生了TM组分(苯丙氨酸)。

[0354] 为了靶向血管中的脑内皮组织,作为LAT1靶向氨基酸,在铜催化剂存在下通过N_3-PEG-PLL(Nic/SH)与炔烃修饰的酪氨酸之间的点击反应引入苯丙氨酸。简言之,将N_3-PEG-PLL(Nic/SH)(130mg,6.5μmol)和炔烃修饰的苯丙氨酸(5.7mg,4.0当量)溶解于去离子水(或50mM磷酸钠缓冲液)中。然后,将CuSO4·H20(0.4mg,25mol%)和三(3-羟丙基三唑基甲

基)胺(THPTA,3.4mg,1.2当量)溶解于去离子水中并添加N_3-PEG-PLL(Nic/SH)溶液。然后,将抗坏血酸钠(3.2mg,2.5当量)添加至混合物溶液中。将反应混合物在室温下在搅拌下保持16小时。反应后,将混合物转移至透析膜(MWCO=7,000)中并用去离子水透析1天。冻干后获得最终产物。

[0355] (e)聚离子复合物(PIC)胶束制备-一旦如上所述产生了本公开的阳离子载体单元,就产生了胶束。本实施例中描述的胶束包含与反义寡核苷酸有效载荷组合的阳离子载体单元。

[0356] 通过混合MeO-或Phe-PEG-PLL(Nic)和miRNA来制备纳米尺寸的PIC胶束。将PEG-PLL(Nic)以0.5mg/mL浓度溶解于HEPES缓冲液(10mM)中。然后以2:1(v/v)的miRNA抑制剂(SEQ ID NO:28)(485ASO-001)与聚合物比率将不含RNA酶的游离水中的miRNA溶液(22.5μM)与聚合物溶液混合。

[0357] 通过优化胶束形成条件,即聚合物(本公开的载体)中的胺与抗miRNA(有效载荷)中的磷酸酯之间的比率来确定聚合物与抗miRNA的混合比率。将聚合物(载体)和抗miRNA(有效载荷)的混合物通过多涡旋以3000rpm剧烈混合90秒,并在室温下保持30分钟以使胶束稳定。

[0358] 在使用前将胶束(10μM的抗miRNA浓度)储存在4℃。使用相同方法制备MeO-或Phe-胶束,并且在胶束制备过程中通过混合两种聚合物还制备了不同量的含Phe胶束(25%至75%)。

[0359] 实施例2:材料和方法

[0360] 除非另外提供,否则以下描述的实施例使用一种或多种以下材料和方法:

[0361] 用于C57BL/6J小鼠中的体内毛发生长的测定

[0362] C57BL/6J小鼠在6周龄时获自DBL Co.Ltd.动物实验室并使其适应新环境一周。为了观察同步的休止期,通过使用电动剪毛器从每只小鼠去除毛发,并在休止期通过脱毛膏从背侧剃毛。肌内(IM)注射媒介物对照(PBS),除非另有说明,或在(PD PD0和PD7)肌内(IM)注射miR-485抑制剂-485ASO-001(0.3mpk和0.6mpk)两次。通过数字显微照片监测和记录皮肤色素沉着和毛发生长的外观,实验者对处理条件不知情。还基于色素沉着水平和毛干密度将进展分配0至6的值,其中0表示无毛发生长(并且无色素沉着),并且更高的数字对应于更暗的皮肤和更大的密集毛发生长区域。评分是盲法进行的。代表不同分数的图像以毛发再生定量量表(0-6)呈现,其中0级=皮肤粉红色,无色素沉着;1级=<30%的皮肤区域显示变暗,但没有可见的毛发;2级=30%-70%的皮肤区域显示变暗,没有可见的毛发;3级=>70%的皮肤区域显示变暗,或30%的毛发可见;4级=>70%的皮肤区域显示变暗,并且30%-70%的毛发可见;5级=>70%的皮肤区域显示变暗,并且>70%的毛发可见;并且6级=>90%的皮肤区域显示变暗,>90%的毛发可见。

[0363] 组织染色,皮肤和毛囊组织结构的测量

[0364] 将所有组的背侧皮肤在PD10和PD16在4% PFA中固定,并用苏木精和伊红(H&E)染色进行评估。对真皮和皮下组织中的HF的数量进行计数(横截面)。从可见显微镜视野(3个视野)获取真皮和皮下组织的厚度,至少进行7次测量。通过Motic images plus 2.0ML分析图像从背侧皮肤的纵截面和横截面测量毛囊长度和毛球直径。

[0365] 实时PCR

[0366] 使用小和大RNA分离试剂盒(Macherey Nagel,Dren)分离总RNA。用核酸定量系统(Nanodrop.Thermo Scientific Inc.)测量所收集的RNA的浓度。使用miScript II RT试剂盒(Qiagen,Hilden,Germany)合成cDNA。为了分析,使用TOPREALTMqPCR 2X PreMIX(Enzynomics,Korea)在CFX连接系统(Bio-Rad)上通过TaqMan miRNA分析进行miR-485-3p的表达。使用Taq Man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。引物如下:

[0367] 探针:FAM-CGAGGTCGACTTCCTAGA-NFQ.miR-485 3p正向:5’CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA-3’。通过$2^{-\Delta\Delta C}_{T}$分析相对基因表达。

[0368] 蛋白质印迹

[0369] 在脱毛后第10天和第16天收获皮肤样品。通过在含有蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物(Cell Signaling Technology,目录号5872)的冰冷RIPA缓冲液(iNtRON Biotechnology)中均质化来制备小鼠皮肤组织裂解物。通过在4℃下以13,000rpm离心15分钟来去除组织碎片,并收集上清液。将裂解物在含有5%β-巯基乙醇(Fisher Scientific)的1xSDS(Fisher Scientific)负载缓冲液中煮沸5分钟。然后使样品在MOPS SDS运行缓冲液(Invitrogen)中在PAGE 8%、12% Bis-Tris凝胶(Invitrogen)上进行SDS-PAGE并转移至PVDF膜,并与以下第一抗体一起孵育:兔抗CD36(Abcam,目录号ab80080,1:1000)、兔抗VEGF-A(Abcam,目录号ab51745,1:1000)、兔抗Wnt3a(IBL,目录号11088,1:1000)、兔抗β-肌动蛋白(Abcam,目录号ab1997,1:100)、抗肌动蛋白(Santa Cruz,目录号sc-47778)。使用增强的化学发光系统对结果进行可视化,并通过光密度分析(Image J软件,NIH)进行定量。所有实验独立进行至少3次。

[0370] 免疫荧光染色

[0371] 将C57BL/6J小鼠皮肤组织包埋在冷冻的组织包埋剂(OTC化合物,Sakura Finetek Japan Co.,Ltd.)中,并用冷冻切片生产系统(Cryostat,Leica Camera AG)制备冷冻切片载玻片。用4% PFA固定15分钟后,用PBS洗涤组织,并使用通过向PBS中添加5%脱脂乳、1%驴血清和0.1% TritonX-100获得的封闭溶液使其反应1小时。接着,使用通过用封闭溶液将CD36抗体溶液(Invitrogen目录号PA1-16813)稀释50倍获得的第一抗体溶液,使组织在室温下反应1小时或在4℃下反应过夜。用PBS洗涤3次后,使用通过用封闭溶液将FITC标记的抗小鼠IgG抗体(Invitrogen Corp.)稀释200倍获得第二抗体溶液,使组织在室温下反应1小时。在与DAPI溶液反应后,将组织用PBS洗涤3次,并用抗褪色试剂(Prolong Gold Antifade Reagent)和盖玻片密封。使用荧光显微镜(Olympus Corp.)观察组织。

[0372] 实施例3.miR-485抑制剂的剂量依赖性毛发生长促进作用的分析

[0373] 为了开始评价miR-485抑制剂(485ASO-001)(如实施例1中所示制备)对脱毛的小鼠的毛发再生作用,购买六周龄C57BL/6J小鼠并使其适应新环境一周。为了观察同步的休止期,通过使用脱毛膏从每只小鼠去除毛发。然后将动物分成五组(n=6)以评价miR-485抑制剂(485ASO-001)的毛发再生作用。通过一次性肌内注射施用阴性对照(PBS)和485ASO-001(0.1mpk、0.3mpk和0.6mpk)。在脱毛后(pd.)在处理后第5天(图2A)、第7天(图2B)、第9天(图2C)、第12天(图2D)、第14天(图2E)和第16天(图2F)拍摄小鼠的数码照片并根据0-6的评分经由形态学观察来分析毛发生长区域(图2G)。

[0374] 如图2G所示,与PBS处理的对照组相比,在485ASO-001(0.3mpk和0.6mpk)处理的小

鼠组中在第7天和第12天观察到毛发生长分数的显著增加。此外，与485ASO-001(0.1mpk和0.3mpk)处理的小鼠组相比，485ASO-001(0.6mpk)处理的小鼠组显示更多的毛发再生(图2G)。

[0375] 此外，将C57BL/6J小鼠分成五组(n＝5)以评价miR-485抑制剂(485ASO-001)的毛发再生作用。阴性对照(PBS)和阳性对照(2％米诺地尔)以及485ASO-001(0.3mpk和0.6mpk)通过两次(PD0和PD7)肌内注射施用。在脱毛后(pd.)在处理后第5天(图4D)、第7天(图4E)、第10天(图4F)、第12天(图4G)、第14天(图4H)和第16天(图4I)拍摄小鼠的数码照片并根据0-6的评分经由形态学观察来分析毛发生长区域(图4J)。与PBS处理的对照组和阳性对照米诺地尔处理组相比，在485ASO-001两次重复肌内注射(0.3mpk和0.6mpk)处理的小鼠组中，在第7天、第10天、第12天、第14天和第16天观察到毛发生长评分的显著增加(图4J)。此外，与485ASO-001(0.3mpk-两次)处理的小鼠组相比，485ASO-001(0.6mpk-两次)处理的小鼠组显示更多的毛发再生长(图4J)。

[0376] 上述结果证明miR-485抑制剂(485ASO-001)在诱导毛发生长中的剂量依赖性功效。例如，结果显示miR-485抑制剂(485ASO-001)增强了适于上镜头的小鼠中生长期毛发生长的早期指示(参见例如，图4D-4J)。特别地，与PBS处理的对照组和米诺地尔处理组相比，miR-485抑制剂485ASO-001)(0.6mpk-两次)处理的小鼠组显示出强烈活化和维持生长期毛发生长(图4D-4J)。这些结果表明miR-485抑制剂(485ASO-001)活化从休止期至生长期的转变，并且因此促进了毛发生长。

[0377] 实施例4:miR-485抑制剂对毛发密度的剂量依赖性作用的分析

[0378] 为了进一步评估如实施例1中所示制备的miR-485抑制剂(485ASO-001)对如实施例1中所述用PBS和485ASO-001处理的脱毛的小鼠的毛发再生作用，将用485ASO-001(0.1mpk、0.3mpk、0.6mpk)处理后的毛发密度与PBS处理的对照组进行比较。在第12天(3A)和第16天(图3B)使用Kong,Bom-Viewer Plus软件(Bomtech ElectronicsCo.,Ltd.,Seoul,Korea)，在肩胛间皮肤的相同区域(3.6mm^2)中获取每只小鼠的皮肤镜图像。通过分析图像(200倍放大倍数;实际面积,3.6mm^2)评价毛发密度。

[0379] 如图3C所示，与PBS处理的对照组相比，在485ASO-001(0.6mpk)处理的小鼠组中在第12天和第16天观察到毛发密度的显著增加。与485ASO-001(0.1mpk)和485ASO-001(0.3mpk)处理的小鼠组相比，485ASO-001(0.6mpk)处理的小鼠组显示增加的毛发密度。

[0380] 上述结果证明miR-485抑制剂(485ASO-001)在增加毛发密度中的剂量依赖性功效。

[0381] 实施例5:miR-485抑制剂对毛发长度的剂量依赖性作用的分析

[0382] 为了进一步评估如实施例1中制备的miR-485抑制剂(485ASO-001)对如实施例1中所述用PBS和485ASO-001处理的脱毛的小鼠的毛发再生作用，将用485ASO-001(0.1mpk、0.3mpk、0.6mpk)处理后的毛发长度与PBS处理的对照组进行比较。在处理后，在第16天(图4A)和第21天(图4B)从脱毛的背侧肩胛间区域中的代表性区域拔去毛发，并计算每只小鼠30根毛发的平均毛发长度。

[0383] 如图4C所示，与PBS处理的对照组相比，在485ASO-001(0.3mpk和0.6mpk)处理的小鼠组中在第16天观察到毛发长度的显著增加。

[0384] 上述结果证明miR-485抑制剂(485ASO-001)在增加毛发长度中的剂量依赖性功

效。

[0385] 实施例6:miR-485-3p在皮肤发育和毛囊周期循环中的表达

[0386] 为了测试miR-485抑制剂(485ASO-001)对miR-485-3p(FW7_模拟物)表达水平的影响,在从早期生长期至晚期生长期的鼠毛发周期的pd10(图5A)和pd16(图5B)获得组织样品。与早期生长期相比,在成年毛发周期的晚期生长期生长阶段期间,miRNA表达降低。与(485ASO-001)(0.3mpk-两次)和PBS处理的对照组相比,在pd10(p＝0.01)和pd16(p＝0.03)观察到miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.6mpk-两次)处理的小鼠组中观察到miRNA表达的显著降低。上述结果表明miR-485抑制剂(485ASO-001)对miR-485-3p表达的剂量依赖性下调。

[0387] 实施例7:miR-485抑制剂对皮肤和毛囊密度的剂量依赖性作用的分析

[0388] 通过染色H&E进一步评估miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.3mpk和0.6mpk)对毛发生长的作用(图6A、图6B、图7A、图7B)。在脱毛后第10天在真皮(p＝0.03)(图6C)、皮下组织(p＝0.0001)(图6D)、毛囊直径(p＝0.001)(图6E)、毛球直径(p＝0.01)(图6F)、真皮中的毛囊密度(p<0.0009)(图6G)和皮下组织中的毛囊密度(p<0.0009)(图6H)中观察到显著增加。与PBS处理的对照处理组相比,在485ASO-001(0.6mpk-两次)处理的小鼠组中在皮下组织(p＝0.0003)(图7C)、毛囊直径(p＝0.008)(图7F)、真皮中的毛囊密度(p<0.0001)(图7G)和皮下组织中的毛囊密度(p<0.0001)(图7H)中观察到显著增加。与米诺地尔处理的小鼠组相比,485ASO-001(0.6mpk)处理的小鼠组显示在脱毛后第10天皮下组织中的毛囊数目增加(p<0.001)(图6H)和脱毛后第16天真皮中的毛囊数目增加(p＝0.004)(图7G)。与对照相比,用miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.3mpk和0.6mpk)(p<0.001)处理以剂量依赖性方式增加毛囊数目(图6G、图6H、图7G、图7H)。尽管与阴性对照相比,米诺地尔处理也显著(p<0.01)增加毛囊数量,但这种增加低于用miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.6mpk)处理情况下的增加(图6G、图6H)。与对照组相比,miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.6mpk)和米诺地尔处理显著增加真皮厚度(p<0.03和p<0.04),但米诺地尔处理在真皮和皮下组织厚度方面的增加低于miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.6mpk)(p<0.001)处理(图6C、图6D)。在脱毛后第10天,与对照组和米诺地尔处理组相比,miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.6mpk)处理显著增加毛球直径(p<0.01)。在脱毛后第16天,与对照相比,用miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.3mpk和0.6mpk)(p<0.001和0.0003)处理以剂量依赖性方式增加皮下组织的厚度。

[0389] 实施例8:miR-485抑制剂增加Wnt和β-连环蛋白蛋白质表达

[0390] 通过蛋白质印迹评估miR-485抑制剂(485ASO-001)对Wnt3a和β-连环蛋白蛋白质表达的影响。Wnt/β-连环蛋白信号传导特异性地参与毛囊形态发生、再生和生长。Wnt3a由于能够活化毛乳头(DP)细胞中的Wnt/β-连环蛋白信号传导途径而诱导毛发生长。β-连环蛋白在真皮乳头中表达并促进生长期诱导和持续时间,以及角质形成细胞调控和分化。miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.6mpk)上调Wnt3a(图9B)和β-连环蛋白(图9C)的表达。与皮肤和毛囊发育有关的β-连环蛋白是Wnt信号传导途径中的重要分子。上述结果证明miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.6mpk)显著促进毛干的伸长和分化。

[0391] 实施例9:miR-485抑制剂增加CD36和VEGF-A蛋白质表达

[0392] 通过蛋白质印迹评估miR-485抑制剂-485ASO-001对CD36和血管内皮生长因子-A(VEGF-A)蛋白质表达的影响。与PBS对照组相比,用miR-485抑制剂-485ASO-001(0.6mpk)处理上调CD36(图8B)和VEGF-A(图8C)的蛋白质表达水平。VEGF-A是最有效且特异性的血管生

长因子,并且是生理和病理性血管生成(毛细血管形成)中的关键调控因子。VEGF-A水平通过转录控制和mRNA稳定性来调控。

[0393] 鼠毛皮毛囊的间充质由称为真皮鞘(DS)的毛囊内衬平滑肌组成。DS调节毛囊中与毛发周期循环相关的毛细血管。进行免疫荧光实验以评估miR-485抑制剂(485ASO-001)(0.6mpk)对DS影响的血管生成中CD36表达的影响。免疫荧光结果(图10B)显示在miR-485抑制剂(485ASO-001)处理的毛囊中表达CD36的细胞的DS增加。这可能与血管生成相关,特别是在生长期毛囊处。

[0394] ***

[0395] 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。

[0396] 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。

[0397] 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。

[0398] 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。

[0399] 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> miRNA-485抑制剂用于诱导毛发生长的用途

<130> 4366.037PC02

<150> US 63/130,121

<151> 2020-12-23

<160> 80

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 1

gucauacacg gcucuccucu cu 22

<210> 2

<211> 7

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 2

uguauga 7

<210> 3

<211> 8

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 3

guguauga 8

<210> 4

<211> 9

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

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

<223> 合成
<400> 9
agagccgugu auga 14
<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 10
gagagccgug uauga 15
<210> 11
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 11
ggagagccgu guauga 16
<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 12
aggagagccg uguauga 17
<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 13
gaggagagcc guguauga 18
<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

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

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

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 29
gagaggagag ccguguauga c 21
<210> 30
<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 30
tgtatga 7
<210> 31
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 31

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

130 135 140

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

<210> 32
<211> 429
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 32

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

Gly Leu Val Asp Glu Lys Ala Leu Ala Gln Ala Leu Lys Glu Gly Arg
260 265 270
Ile Arg Gly Ala Ala Leu Asp Val His Glu Ser Glu Pro Phe Ser Phe
275 280 285
Ser Gln Gly Pro Leu Lys Asp Ala Pro Asn Leu Ile Cys Thr Pro His
290 295 300
Ala Ala Trp Tyr Ser Glu Gln Ala Ser Ile Glu Met Arg Glu Glu Ala
305 310 315 320
Ala Arg Glu Ile Arg Arg Ala Ile Thr Gly Arg Ile Pro Asp Ser Leu
325 330 335
Lys Asn Cys Val Asn Lys Asp His Leu Thr Ala Ala Thr His Trp Ala
340 345 350
Ser Met Asp Pro Ala Val Val His Pro Glu Leu Asn Gly Ala Ala Tyr
355 360 365
Arg Tyr Pro Pro Gly Val Val Gly Val Ala Pro Thr Gly Ile Pro Ala
370 375 380
Ala Val Glu Gly Ile Val Pro Ser Ala Met Ser Leu Ser His Gly Leu
385 390 395 400
Pro Pro Val Ala His Pro Pro His Ala Pro Ser Pro Gly Gln Thr Val
405 410 415
Lys Pro Glu Ala Asp Arg Asp His Ala Ser Asp Gln Leu
420 425

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 33
agaggcuggc cgugaugaau uc 22

<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 34
agucauacac ggcucuccuc uc 22

<210> 35

<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 35
gagccgtgta tga 13
<210> 36
<211> 472
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 36

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

195 200 205

Asp Gly Val Tyr Lys Val Phe Asn Gly Lys Asp Asn Ile Ser Lys Val
210 215 220

Ala Ile Ile Asp Thr Tyr Lys Gly Lys Arg Asn Leu Ser Tyr Trp Glu
225 230 235 240

Ser His Cys Asp Met Ile Asn Gly Thr Asp Ala Ala Ser Phe Pro Pro
245 250 255

Phe Val Glu Lys Ser Gln Val Leu Gln Phe Phe Ser Ser Asp Ile Cys
260 265 270

Arg Ser Ile Tyr Ala Val Phe Glu Ser Asp Val Asn Leu Lys Gly Ile
275 280 285

Pro Val Tyr Arg Phe Val Leu Pro Ser Lys Ala Phe Ala Ser Pro Val
290 295 300

Glu Asn Pro Asp Asn Tyr Cys Phe Cys Thr Glu Lys Ile Ile Ser Lys
305 310 315 320

Asn Cys Thr Ser Tyr Gly Val Leu Asp Ile Ser Lys Cys Lys Glu Gly
325 330 335

Arg Pro Val Tyr Ile Ser Leu Pro His Phe Leu Tyr Ala Ser Pro Asp
340 345 350

Val Ser Glu Pro Ile Asp Gly Leu Asn Pro Asn Glu Glu Glu His Arg
355 360 365

Thr Tyr Leu Asp Ile Glu Pro Ile Thr Gly Phe Thr Leu Gln Phe Ala
370 375 380

Lys Arg Leu Gln Val Asn Leu Leu Val Lys Pro Ser Glu Lys Ile Gln
385 390 395 400

Val Leu Lys Asn Leu Lys Arg Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Trp Leu
405 410 415

Asn Glu Thr Gly Thr Ile Gly Asp Glu Lys Ala Asn Met Phe Arg Ser
420 425 430

Gln Val Thr Gly Lys Ile Asn Leu Leu Gly Leu Ile Glu Met Ile Leu
435 440 445

Leu Ser Val Gly Val Val Met Phe Val Ala Phe Met Ile Ser Tyr Cys
450 455 460

Ala Cys Arg Ser Lys Thr Ile Lys
465 470

<210> 37

<211> 288

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 37

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

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

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

Pro Ser Lys Ala Phe Ala Ser Pro Val Glu Asn Pro Asp Asn Tyr Cys
260 265 270
Phe Cys Thr Glu Lys Ile Ile Ser Lys Asn Cys Thr Ser Tyr Gly Val
275 280 285
Leu Asp Ile Ser Lys Cys Lys Glu Gly Arg Pro Val Tyr Ile Ser Leu
290 295 300
Pro His Phe Leu Tyr Ala Ser Pro Asp Val Ser Glu Pro Ile Asp Gly
305 310 315 320
Leu Asn Pro Asn Glu Glu Glu His Arg Thr Tyr Leu Asp Ile Glu Pro
325 330 335
Ile Thr Gly Phe Thr Leu Gln Phe Ala Lys Arg Leu Gln Val Asn Leu
340 345 350
Leu Val Lys Pro Ser Glu Lys Ile Gln Val Leu Lys Asn Leu Lys Arg
355 360 365
Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Trp Leu Asn Glu Thr Gly Thr Ile Gly
370 375 380
Asp Glu Lys Ala Asn Met Phe Arg Ser Gln Val Thr Gly Lys Ile Asn
385 390 395 400
Leu Leu Gly Leu Ile Glu Met Ile Leu Leu Ser Val Gly Val Val Met
405 410 415
Phe Val Ala Phe Met Ile Ser Tyr Cys Ala Cys Arg Ser Lys Thr Ile
420 425 430
Lys

<210> 39
<211> 412
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 39

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

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

Glu Met Ile Leu Leu Ser Val Gly Val Val Met Phe Val Ala Phe Met
385 390 395 400
Ile Ser Tyr Cys Ala Cys Arg Ser Lys Thr Ile Lys
405 410

<210> 40
<211> 798
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 40

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

Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys Cys Thr Ser Lys Lys
225 230 235 240
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 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
305 310 315 320
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
385 390 395 400
Ser Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Glu Asn Lys Asp Val Ser
405 410 415
Ser Asp Trp Gln Gly Gln Ile Cys Ser Ser Thr Asp Ser Asp Gln Cys
420 425 430
Tyr Leu Arg Glu Thr Leu Glu Ala Ser Lys Gln Val Ser Pro Cys Ser
435 440 445
Thr Arg Lys Gln Leu Gln Asp Gln Glu Ile Arg Ala Glu Leu Asn Lys
450 455 460
His Phe Gly His Pro Ser Gln Ala Val Phe Asp Asp Glu Ala Asp Lys
465 470 475 480
Thr Gly Glu Leu Arg Asp Ser Asp Phe Ser Asn Glu Gln Phe Ser Lys
485 490 495
Leu Pro Met Phe Ile Asn Ser Gly Leu Ala Met Asp Gly Leu Phe Asp
500 505 510
Asp Ser Glu Asp Glu Ser Asp Lys Leu Ser Tyr Pro Trp Asp Gly Thr
515 520 525
Gln Ser Tyr Ser Leu Phe Asn Val Ser Pro Ser Cys Ser Ser Phe Asn

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

<210> 41
<211> 271
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成

<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> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<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
625 630 635 640
Ser Tyr Glu Glu Tyr Gln His Glu Arg Leu Lys Arg Glu Glu Tyr Arg
645 650 655
Arg Glu Tyr Glu Lys Arg Glu Ser Glu Arg Ala Lys Gln Arg Glu Arg
660 665 670
Gln Arg Gln Lys Ala Ile Glu Glu Arg Arg Val Ile Tyr Val Gly Lys
675 680 685
Ile Arg Pro Asp Thr Thr Arg Thr Glu Leu Arg Asp Arg Phe Glu Val
690 695 700
Phe Gly Glu Ile Glu Glu Cys Thr Val Asn Leu Arg Asp Asp Gly Asp
705 710 715 720
Ser Tyr Gly Phe Ile Thr Tyr Arg Tyr Thr Cys Asp Ala Phe Ala Ala
725 730 735
Leu Glu Asn Gly Tyr Thr Leu Arg Arg Ser Asn Glu Thr Asp Phe Glu
740 745 750
Leu Tyr Phe Cys Gly Arg Lys Gln Phe Phe Lys Ser Asn Tyr Ala Asp
755 760 765
Leu Asp Ser Asn Ser Asp Asp Phe Asp Pro Ala Ser Thr Lys Ser Lys
770 775 780
Tyr Asp Ser Leu Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu Ala Gln Arg Ser
785 790 795 800
Leu Arg Arg

<210> 43
<211> 786
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 43
Met Asp Glu Gly Tyr Phe Cys Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Gln Pro
1 5 10 15
Leu Cys Pro Asp Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Val Asn
20 25 30
Asp Leu Asp Thr Asp Ser Phe Leu Gly Gly Leu Lys Trp Cys Ser Asp
35 40 45

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

355 360 365

Phe Gly Asp His Asp Tyr Cys Gln Ser Ile Asn Ser Lys Thr Glu Ile
370 375 380

Leu Ile Asn Ile Ser Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Glu Asn
385 390 395 400

Lys Asp Val Ser Ser Asp Trp Gln Gly Gln Ile Cys Ser Ser Thr Asp
405 410 415

Ser Asp Gln Cys Tyr Leu Arg Glu Thr Leu Glu Ala Ser Lys Gln Val
420 425 430

Ser Pro Cys Ser Thr Arg Lys Gln Leu Gln Asp Gln Glu Ile Arg Ala
435 440 445

Glu Leu Asn Lys His Phe Gly His Pro Ser Gln Ala Val Phe Asp Asp
450 455 460

Glu Ala Asp Lys Thr Gly Glu Leu Arg Asp Ser Asp Phe Ser Asn Glu
465 470 475 480

Gln Phe Ser Lys Leu Pro Met Phe Ile Asn Ser Gly Leu Ala Met Asp
485 490 495

Gly Leu Phe Asp Asp Ser Glu Asp Glu Ser Asp Lys Leu Ser Tyr Pro
500 505 510

Trp Asp Gly Thr Gln Ser Tyr Ser Leu Phe Asn Val Ser Pro Ser Cys
515 520 525

Ser Ser Phe Asn Ser Pro Cys Arg Asp Ser Val Ser Pro Pro Lys Ser
530 535 540

Leu Phe Ser Gln Arg Pro Gln Arg Met Arg Ser Arg Ser Arg Ser Phe
545 550 555 560

Ser Arg His Arg Ser Cys Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Ser Arg Ser
565 570 575

Arg Ser Pro Gly Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Cys Tyr Tyr Tyr Glu
580 585 590

Ser Ser His Tyr Arg His Arg Thr His Arg Asn Ser Pro Leu Tyr Val
595 600 605

Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Arg Pro Arg Tyr Asp Ser
610 615 620

Tyr Glu Glu Tyr Gln His Glu Arg Leu Lys Arg Glu Glu Tyr Arg Arg
625 630 635 640

Glu Tyr Glu Lys Arg Glu Ser Glu Arg Ala Lys Gln Arg Glu Arg Gln
645 650 655

Arg Gln Lys Ala Ile Glu Glu Arg Arg Val Ile Tyr Val Gly Lys Ile
660 665 670

Arg Pro Asp Thr Thr Arg Thr Glu Leu Arg Asp Arg Phe Glu Val Phe
675 680 685
Gly Glu Ile Glu Glu Cys Thr Val Asn Leu Arg Asp Asp Gly Asp Ser
690 695 700
Tyr Gly Phe Ile Thr Tyr Arg Tyr Thr Cys Asp Ala Phe Ala Ala Leu
705 710 715 720
Glu Asn Gly Tyr Thr Leu Arg Arg Ser Asn Glu Thr Asp Phe Glu Leu
725 730 735
Tyr Phe Cys Gly Arg Lys Gln Phe Phe Lys Ser Asn Tyr Ala Asp Leu
740 745 750
Asp Ser Asn Ser Asp Asp Phe Asp Pro Ala Ser Thr Lys Ser Lys Tyr
755 760 765
Asp Ser Leu Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu Ala Gln Arg Ser Leu
770 775 780
Arg Arg
785

<210> 44
<211> 289
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<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> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<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
145 150 155 160
Leu Ser Tyr Asn Glu Cys Ser Gly Leu Ser Thr Gln Asn His Ala Asn
165 170 175
His Asn His Arg Ile Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu Asn
180 185 190
Ser Trp Ser Asn Lys Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln
195 200 205
Arg Arg Pro Cys Ser Glu Leu Leu Lys Tyr Leu Thr Thr Asn Asp Asp
210 215 220
Pro Pro His Thr Lys Pro Thr Glu Asn Arg Asn Ser Ser Arg Asp Lys
225 230 235 240
Cys Thr Ser Lys Lys Lys Ser His Thr Gln Ser Gln Ser Gln His Leu
245 250 255
Gln Ala Lys Pro Thr Thr Leu Ser Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Pro
260 265 270
Asn Leu Phe Leu
275

<210> 46
<211> 138
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 46

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

50 55 60

Phe Glu Lys Ile Asp Glu Glu Asn Glu Ala Asn Leu Leu Ala Val Leu
65 70 75 80

Thr Glu Thr Leu Asp Ser Leu Pro Val Asp Glu Asp Gly Leu Pro Ser
85 90 95

Phe Asp Ala Leu Thr Asp Gly Asp Val Thr Thr Asp Asn Glu Ala Ser
100 105 110

Pro Ser Ser Met Pro Asp Gly Thr Pro Pro Pro Gln Glu Ala Glu Glu
115 120 125

Pro Ser Leu Val Arg Thr Leu Pro Thr Val
130 135

<210> 47

<211> 301

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<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> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<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

225 230 235 240

His Glu Glu Arg Lys Thr Lys Arg Pro Ser Leu Arg Leu Phe Gly Asp

245 250 255

His Asp Tyr Cys Gln Ser Ile Asn Ser Lys Thr Glu Ile Leu Ile Asn

260 265 270

Ile Ser Gln Glu Leu Gln Asp Ser Arg Gln Leu Glu Asn Lys Asp Val

275 280 285

Ser Ser Asp Trp Gln Gly Gln Ile Cys Ser Ser Thr Asp Ser Asp Gln

290 295 300

Cys Tyr Leu Arg Glu Thr Leu Glu Ala Ser Lys Gln Val Ser Pro Cys

305 310 315 320

Ser Thr Arg Lys Gln Leu Gln Asp Gln Glu Ile Arg Ala Glu Leu Asn

325 330 335

Lys His Phe Gly His Pro Ser Gln Ala Val Phe Asp Asp Glu Ala Asp

340 345 350

Lys Thr Gly Glu Leu Arg Asp Ser Asp Phe Ser Asn Glu Gln Phe Ser

355 360 365

Lys Leu Pro Met Phe Ile Asn Ser Gly Leu Ala Met Asp Gly Leu Phe

370 375 380

Asp Asp Ser Glu Asp Glu Ser Asp Lys Leu Ser Tyr Pro Trp Asp Gly

385 390 395 400

Thr Gln Ser Tyr Ser Leu Phe Asn Val Ser Pro Ser Cys Ser Ser Phe

405 410 415

Asn Ser Pro Cys Arg Asp Ser Val Ser Pro Pro Lys Ser Leu Phe Ser

420 425 430

Gln Arg Pro Gln Arg Met Arg Ser Arg Ser Arg Ser Phe Ser Arg His
435 440 445
Arg Ser Cys Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro
450 455 460
Gly Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Cys Tyr Tyr Tyr Glu Ser Ser His
465 470 475 480
Tyr Arg His Arg Thr His Arg Asn Ser Pro Leu Tyr Val Arg Ser Arg
485 490 495
Ser Arg Ser Pro Tyr Ser Arg Arg Pro Arg Tyr Asp Ser Tyr Glu Glu
500 505 510
Tyr Gln His Glu Arg Leu Lys Arg Glu Glu Tyr Arg Arg Glu Tyr Glu
515 520 525
Lys Arg Glu Ser Glu Arg Ala Lys Gln Arg Glu Arg Gln Arg Gln Lys
530 535 540
Ala Ile Glu Glu Arg Arg Val Ile Tyr Val Gly Lys Ile Arg Pro Asp
545 550 555 560
Thr Thr Arg Thr Glu Leu Arg Asp Arg Phe Glu Val Phe Gly Glu Ile
565 570 575
Glu Glu Cys Thr Val Asn Leu Arg Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Gly Phe
580 585 590
Ile Thr Tyr Arg Tyr Thr Cys Asp Ala Phe Ala Ala Leu Glu Asn Gly
595 600 605
Tyr Thr Leu Arg Arg Ser Asn Glu Thr Asp Phe Glu Leu Tyr Phe Cys
610 615 620
Gly Arg Lys Gln Phe Phe Lys Ser Asn Tyr Ala Asp Leu Asp Ser Asn
625 630 635 640
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> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 49
ucauaca 7

<210> 50

<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 50
gaggcug 7
<210> 51
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 51
gtgtatga 8
<210> 52
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 52
cgtgtatga 9
<210> 53
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 53
ccgtgtatga 10
<210> 54
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 54
gccgtgtatg a 11

<210> 55
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 55
agccgtgtat ga 12
<210> 56
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 56
agagccgtgt atga 14
<210> 57
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 57
gagagccgtg tatga 15
<210> 58
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 58
ggagagccgt gtatga 16
<210> 59
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 59

aggagagccg tgtatga 17

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 60

gaggagagcc gtgtatga 18

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 61

gagaggagag ccgtgtatga 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 62

gagaggagag ccgtgtatga 20

<210> 63

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 63

tgtatgac 8

<210> 64

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 64
gtgtatgac 9
<210> 65
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 65
cgtgtatgac 10
<210> 66
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 66
ccgtgtatga c 11
<210> 67
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 67
gccgtgtatg ac 12
<210> 68
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 68
agccgtgtat gac 13
<210> 69
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成
<400> 69
gagccgtgta tgac 14
<210> 70
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 70
agagccgtgt atgac 15
<210> 71
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 71
gagagccgtg tatgac 16
<210> 72
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 72
ggagagccgt gtatgac 17
<210> 73
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 73
aggagagccg tgtatgac 18
<210> 74
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成
<400> 74
gaggagagcc gtgtatgac 19
<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 75
agaggagagc cgtgtatgac 20
<210> 76
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 76
gagaggagag ccgtgtatga c 21
<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 77
agaggagagc cgtgtatgac 20
<210> 78
<211> 476
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 78

Met	Ser	Gly	Pro	Thr	Trp	Leu	Pro	Pro	Lys	Gln	Pro	Glu	Pro	Ala	Arg
1				5				10					15		
Ala	Pro	Gln	Gly	Arg	Ala	Ile	Pro	Arg	Gly	Thr	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro
			20				25					30			

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

340 345 350
Ala Met Gly Lys Ala Tyr His Pro Gly Cys Phe Thr Cys Val Val Cys
355 360 365
His Arg Gly Leu Asp Gly Ile Pro Phe Thr Val Asp Ala Thr Ser Gln
370 375 380
Ile His Cys Ile Glu Asp Phe His Arg Lys Phe Ala Pro Arg Cys Ser
385 390 395 400
Val Cys Gly Gly Ala Ile Met Pro Glu Pro Gly Gln Glu Glu Thr Val
405 410 415
Arg Ile Val Ala Leu Asp Arg Ser Phe His Ile Gly Cys Tyr Lys Cys
420 425 430
Glu Glu Cys Gly Leu Leu Leu Ser Ser Glu Gly Glu Cys Gln Gly Cys
435 440 445
Tyr Pro Leu Asp Gly His Ile Leu Cys Lys Ala Cys Ser Ala Trp Arg
450 455 460
Ile Gln Glu Leu Ser Ala Thr Val Thr Thr Asp Cys
465 470 475

<210> 79
<211> 105
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 79

Ser Gly Pro Thr Trp Leu Pro Pro Lys Gln Pro Glu Pro Ala Arg Ala
1 5 10 15
Pro Gln Gly Arg Ala Ile Pro Arg Gly Thr Pro Gly Pro Pro Pro Ala
20 25 30
His Gly Ala Val Leu Pro Gly Pro Arg Gly Thr Gly Gly Ser Gly Ala
35 40 45
Gly Val Gly Gly Val Pro Trp Ser Thr Pro Ala His Ala Gly Ala Pro
50 55 60
Cys Arg Gln Gly Gly Pro Ser Pro Trp Lys Pro Gly Arg Arg Asp Arg
65 70 75 80
Leu Ala Glu Gln His Ala Gly Arg Ala Glu Trp Gly Ser Gly Ser Cys
85 90 95
Val Thr Ala Thr Arg Pro Thr Gly Ile
100 105

<210> 80

<211> 80
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成
<400> 80

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

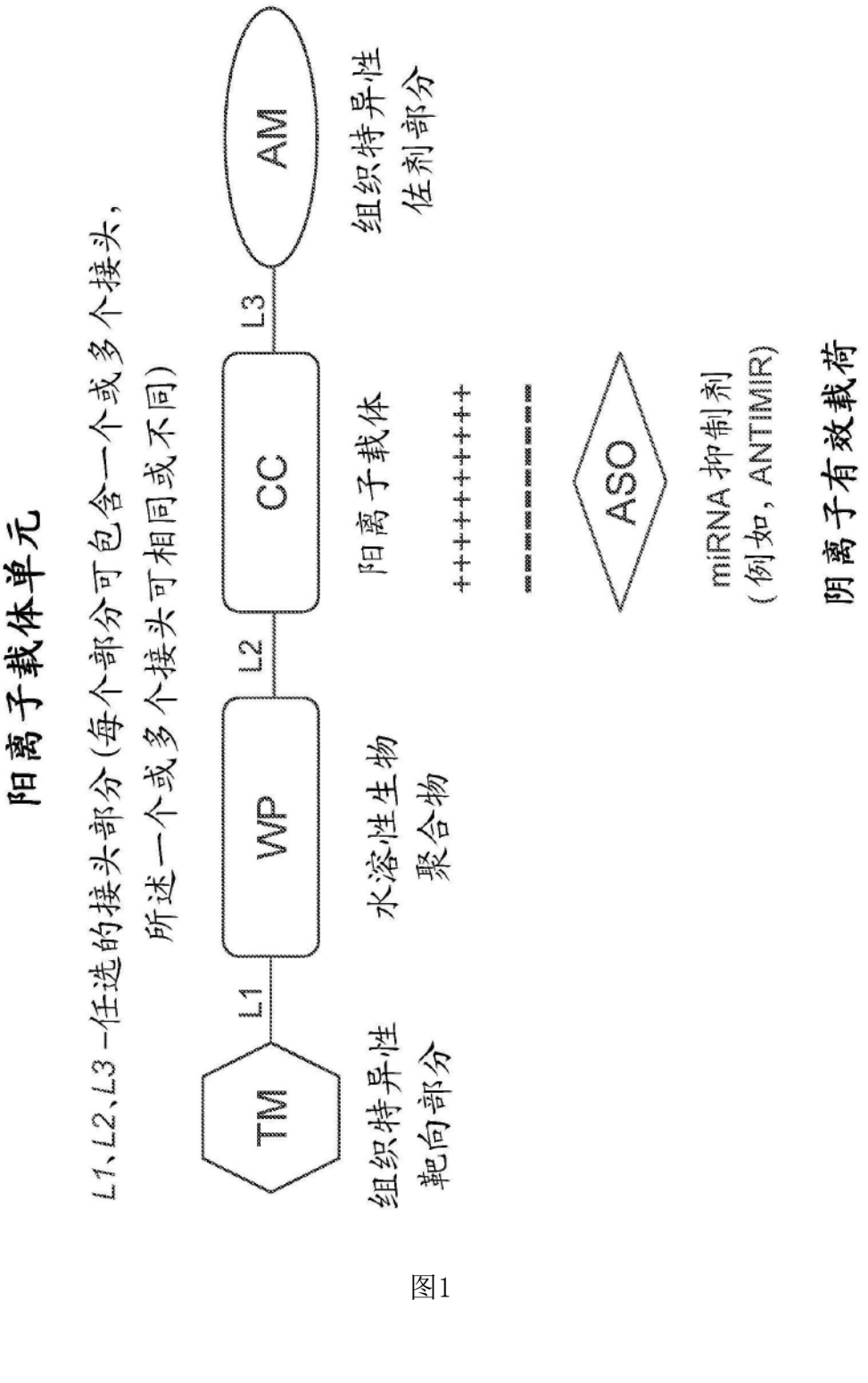

阳离子载体单元
L1、L2、L3 –任选的接头部分(每个部分可包含一个或多个接头，
所述一个或多个接头可相同或不同)
TM
L1
WP
L2
CC
L3
AM
组织特异性
靶向部分
水溶性生物
聚合物
阳离子载体
组织特异性
佐剂部分
ASO
miRNA 抑制剂
(例如，ANTIMIR)
阴离子有效载荷

图1

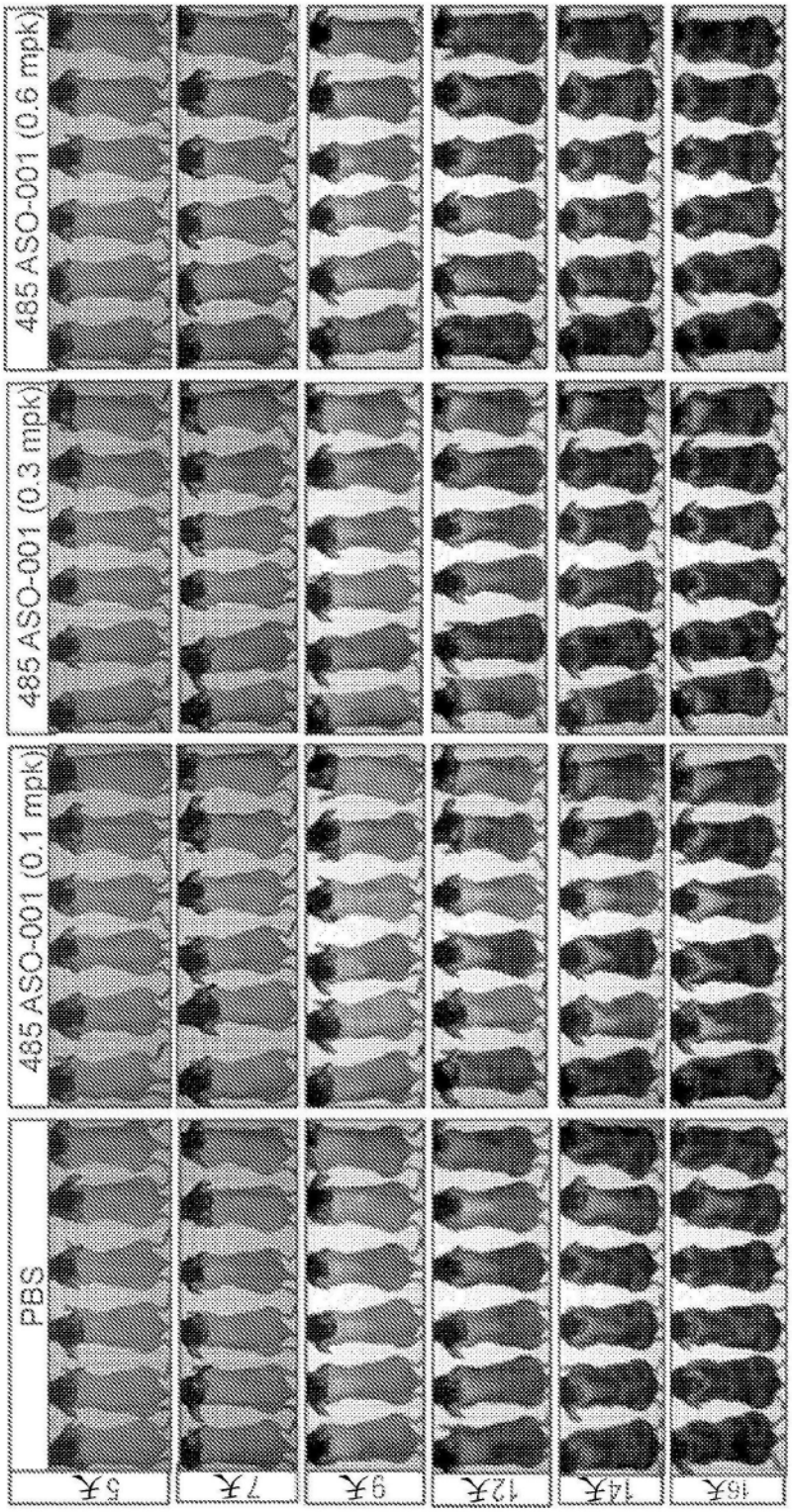


图 2A
图 2B
图 2C
图 2D
图 2E
图 2F

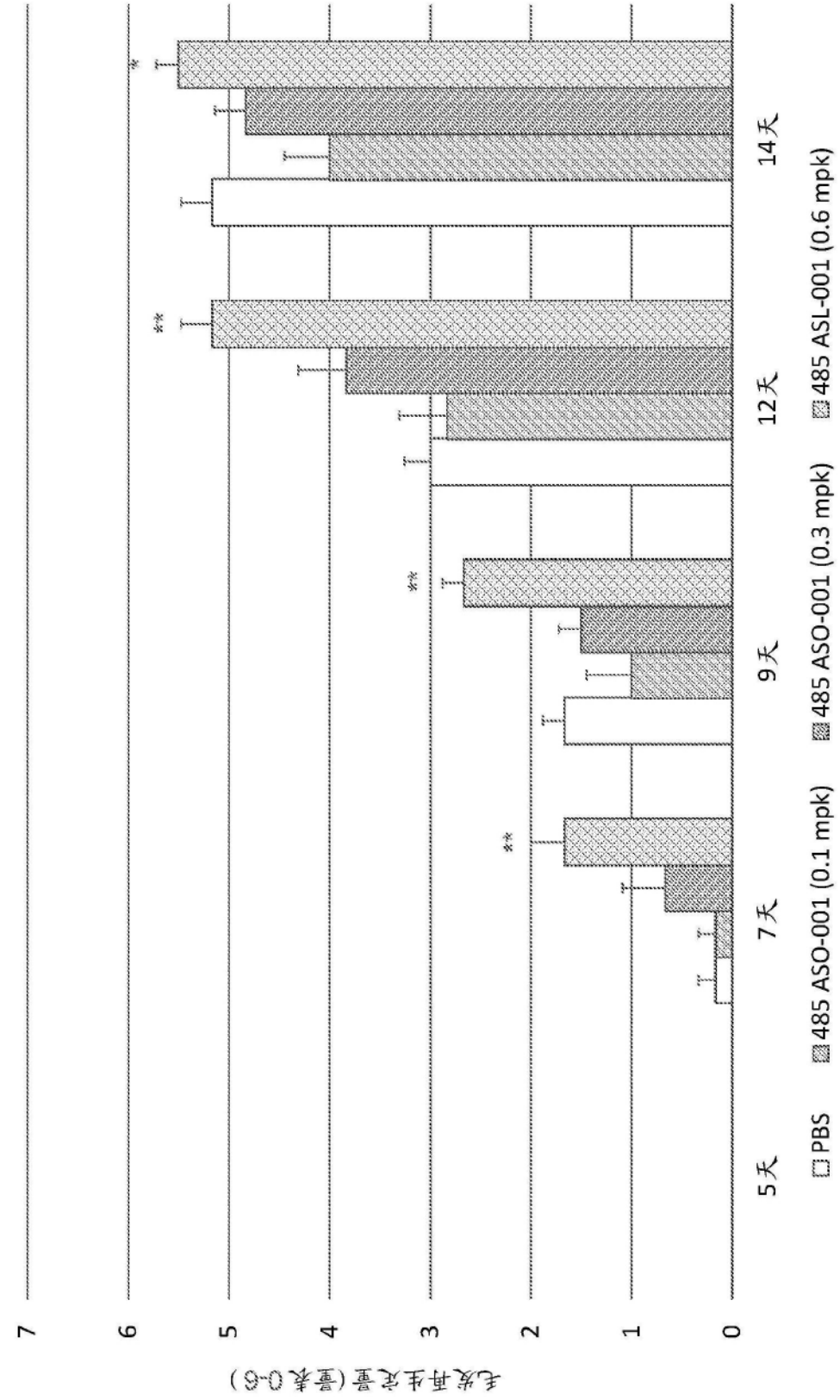

毛发再生定量(量表0-6)
0
1
2
3
4
5
6
7
5天
7天
9天
12天
14天
PBS
485 ASO-001 (0.1 mpk)
485 ASO-001 (0.3 mpk)
485 ASL-001 (0.6 mpk)
*
**
**
**

图2G

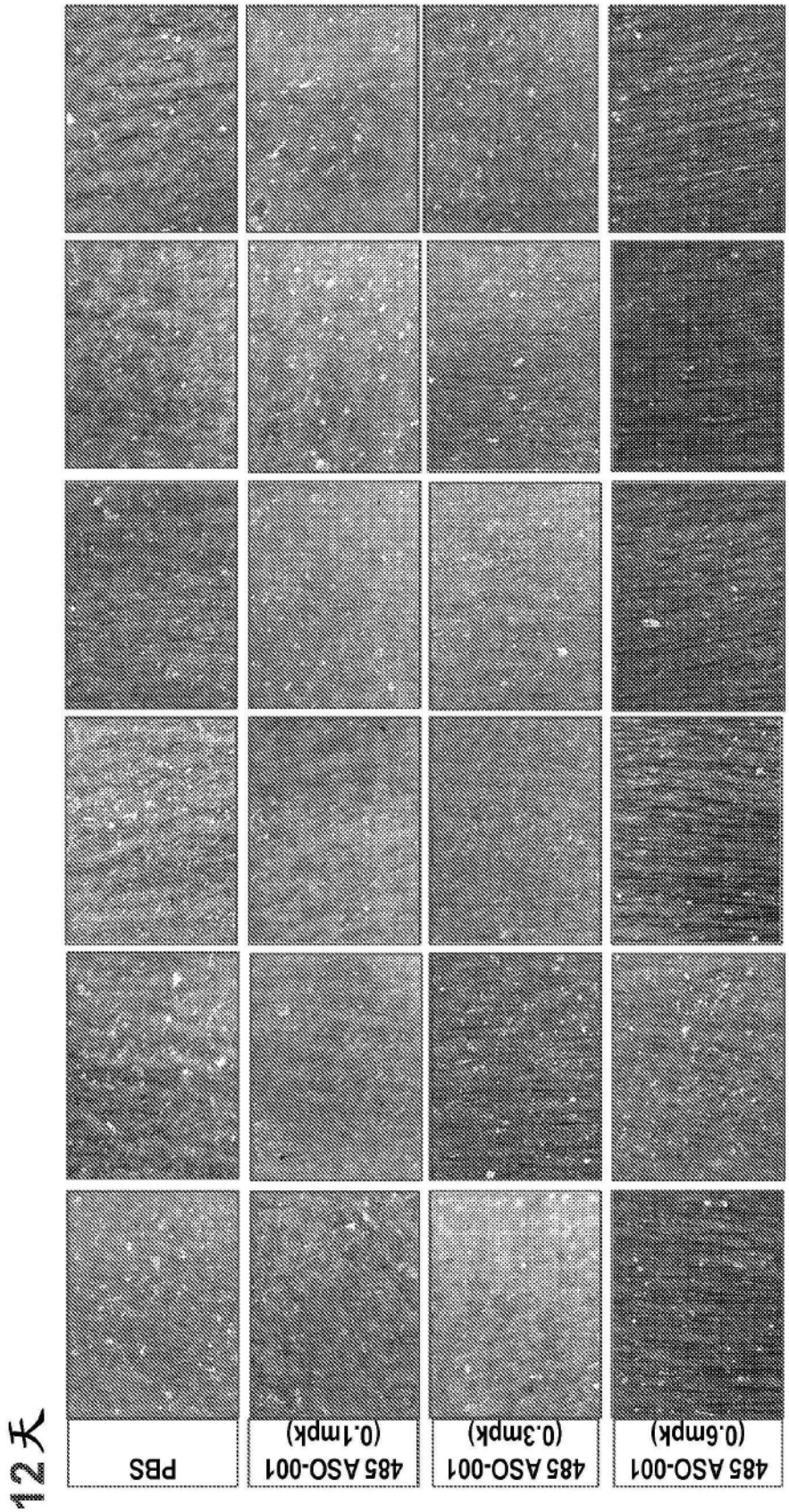


图3A

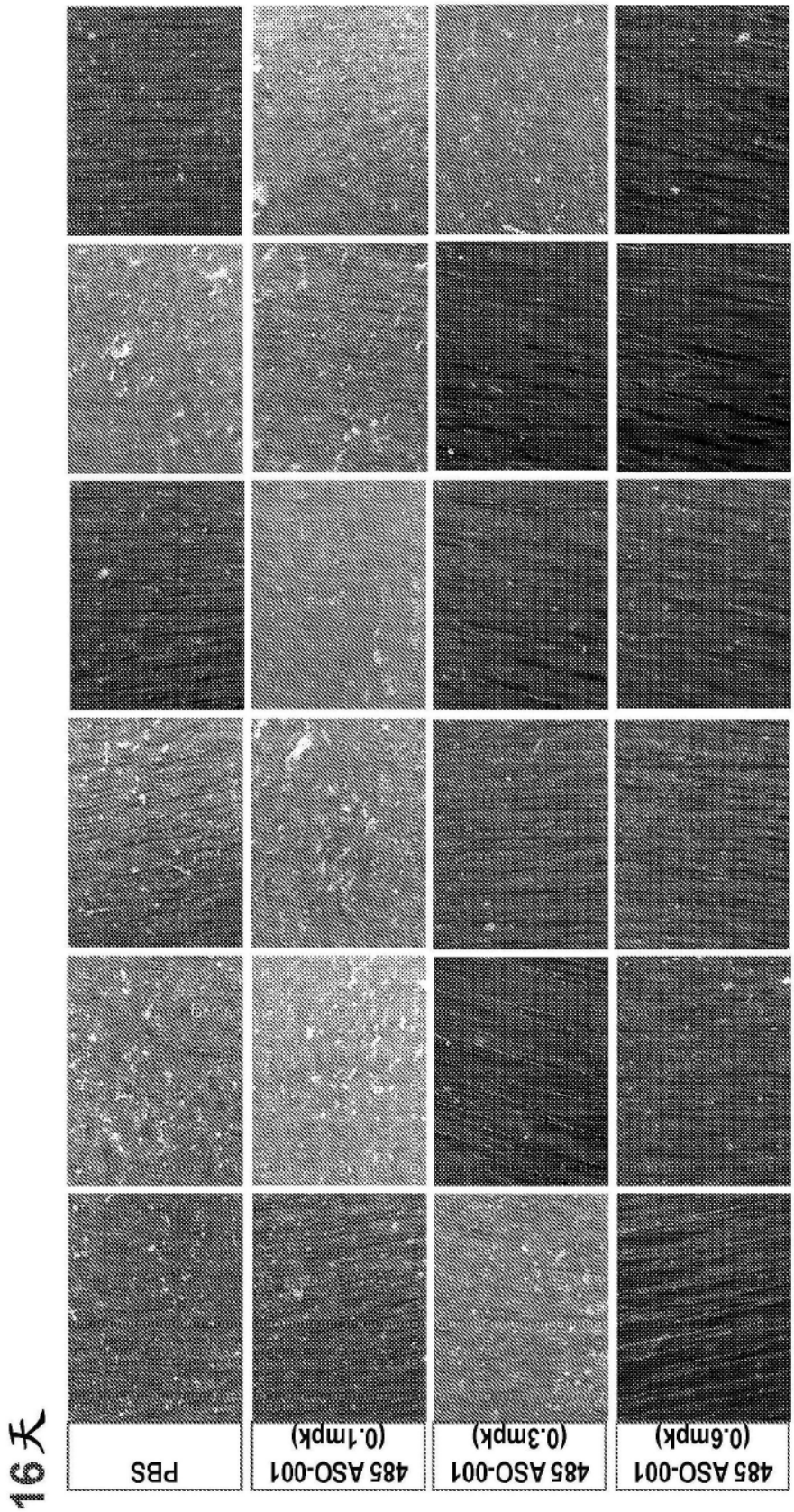


图3B

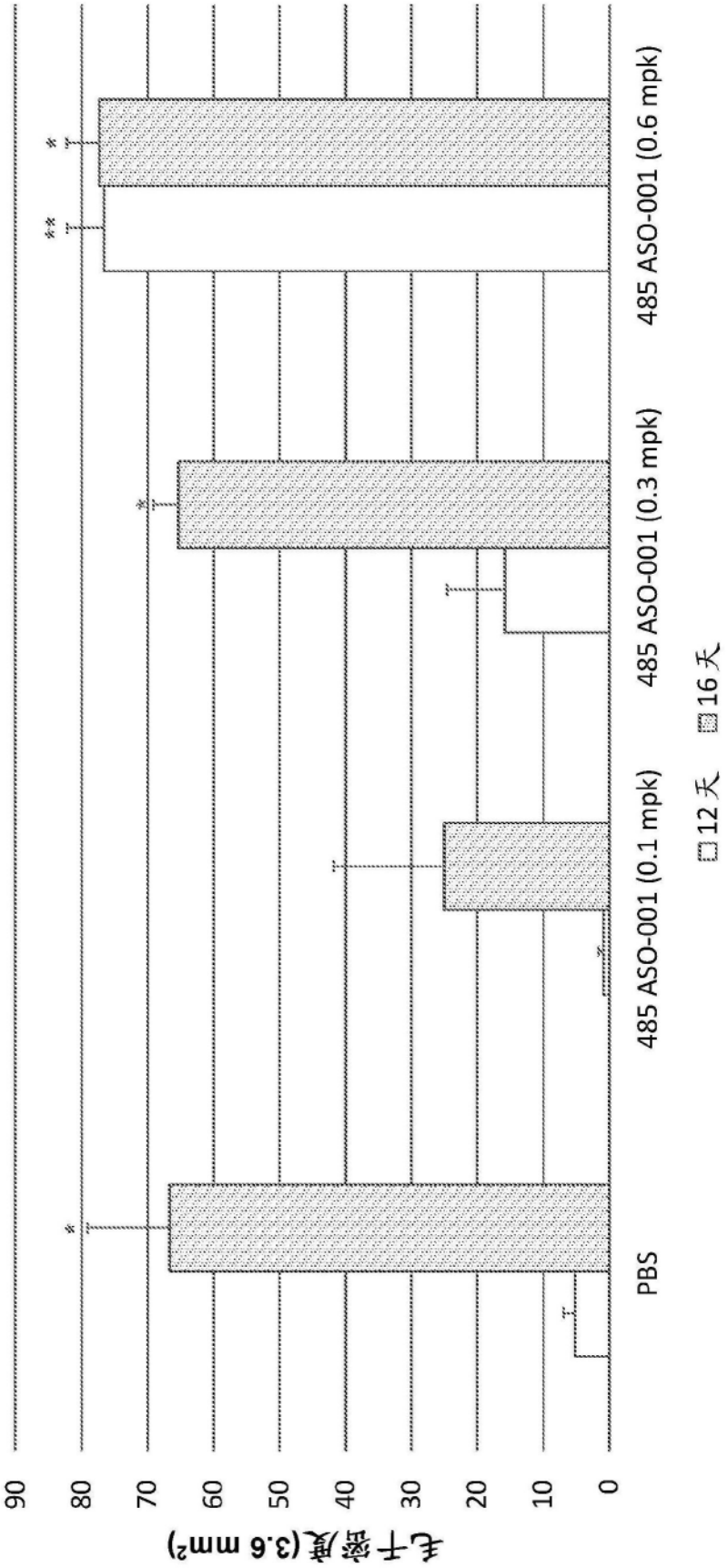

毛干密度(3.6 mm²)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PBS
485 ASO-001 (0.1 mpk)
485 ASO-001 (0.3 mpk)
485 ASO-001 (0.6 mpk)
12 天
16 天
*
**

图3C

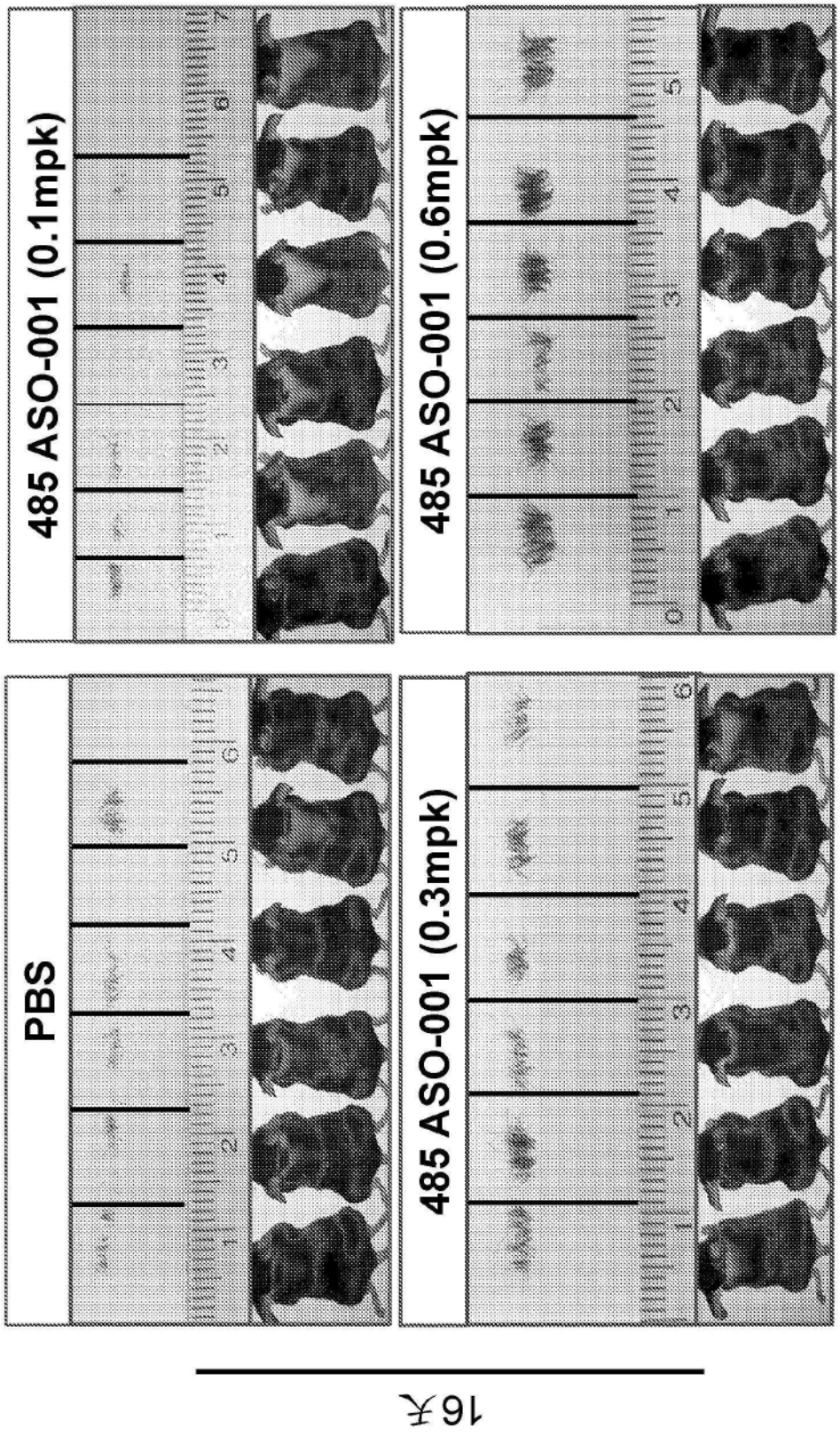


图4A

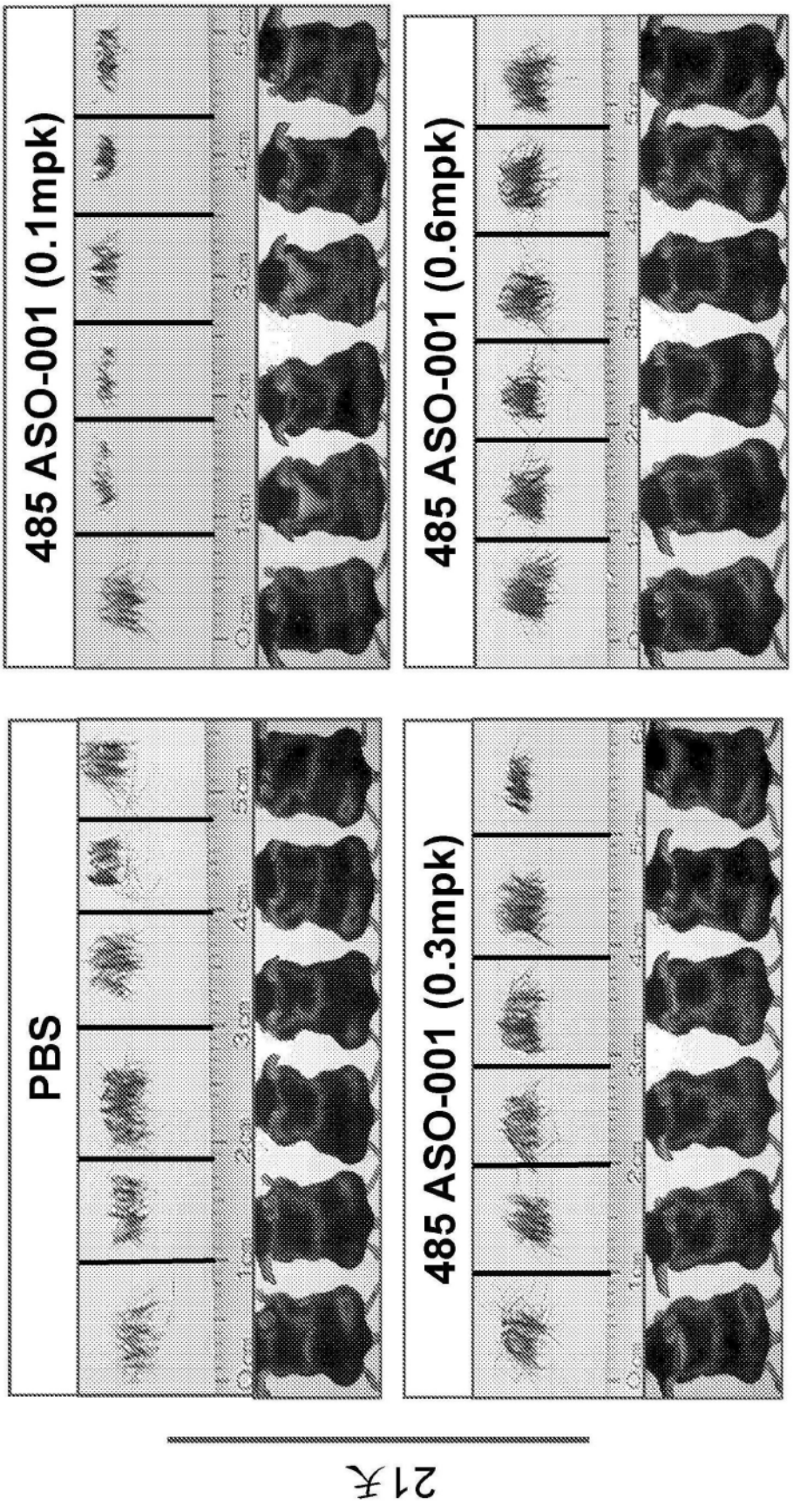


图4B

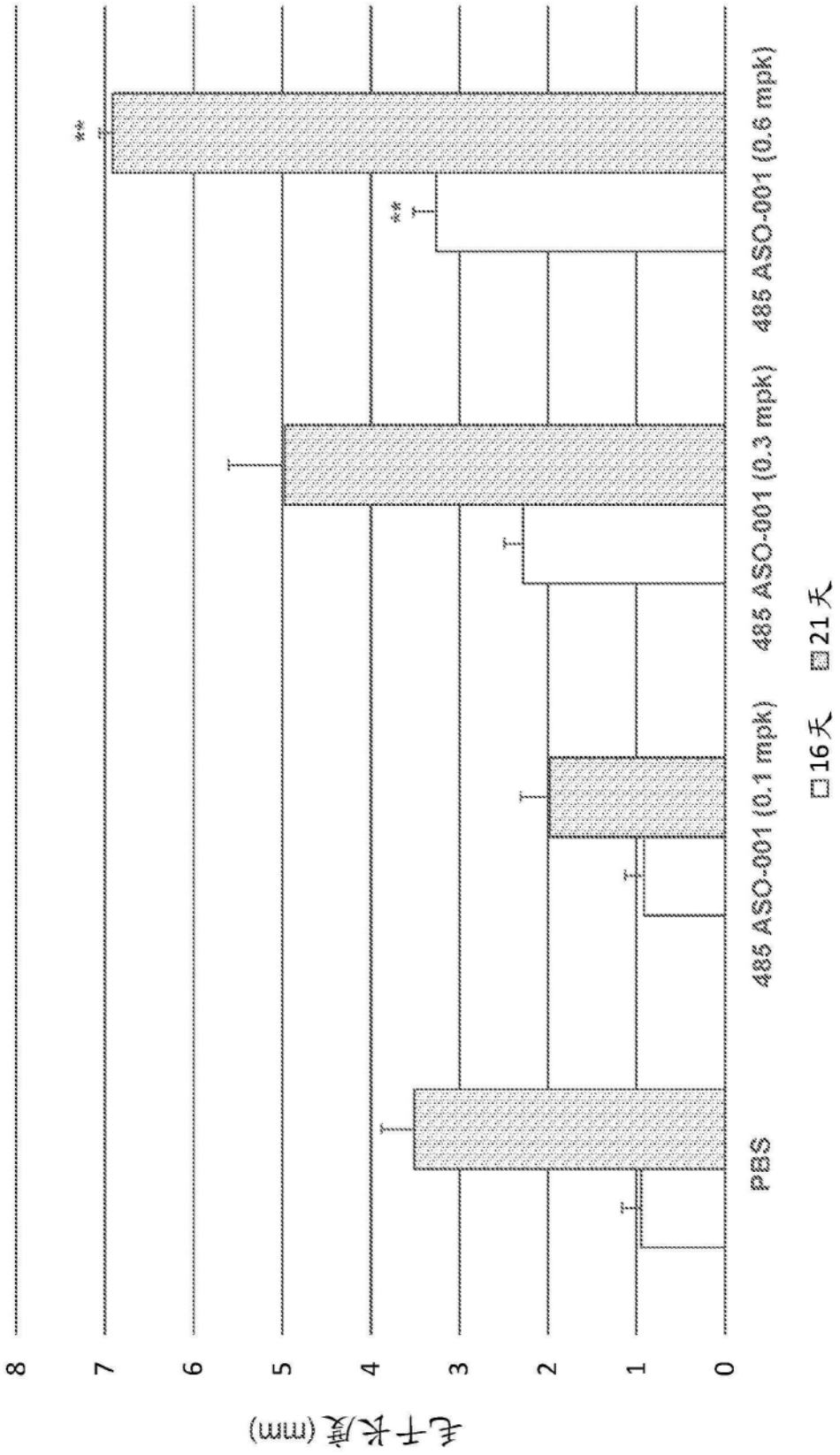

毛干长度 (mm)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
PBS
485 ASO-001 (0.1 mpk)
485 ASO-001 (0.3 mpk)
485 ASO-001 (0.6 mpk)
16天
21天
**
**

图4C

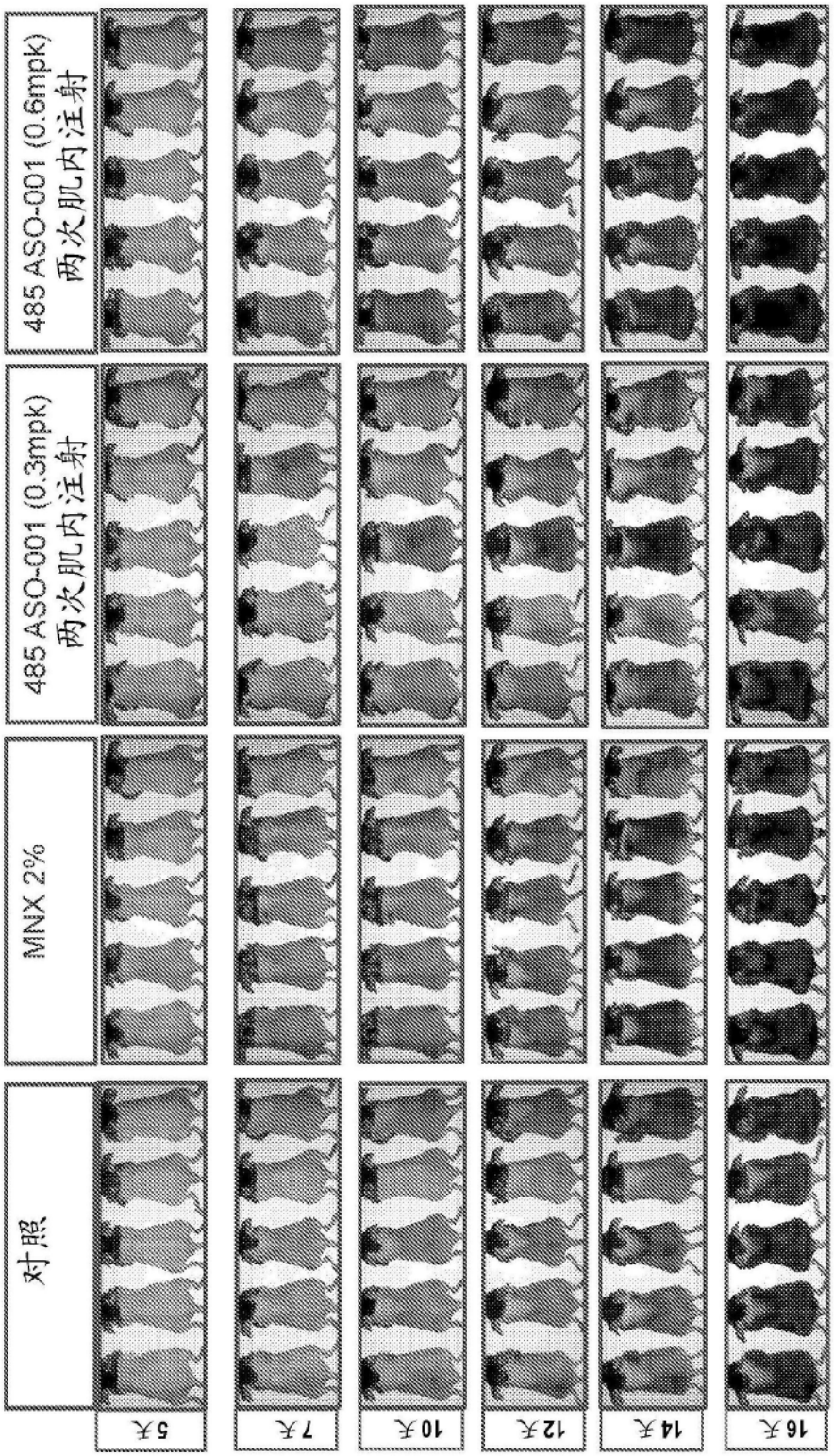


图 4D 图 4E 图 4F 图 4G 图 4H 图 4I

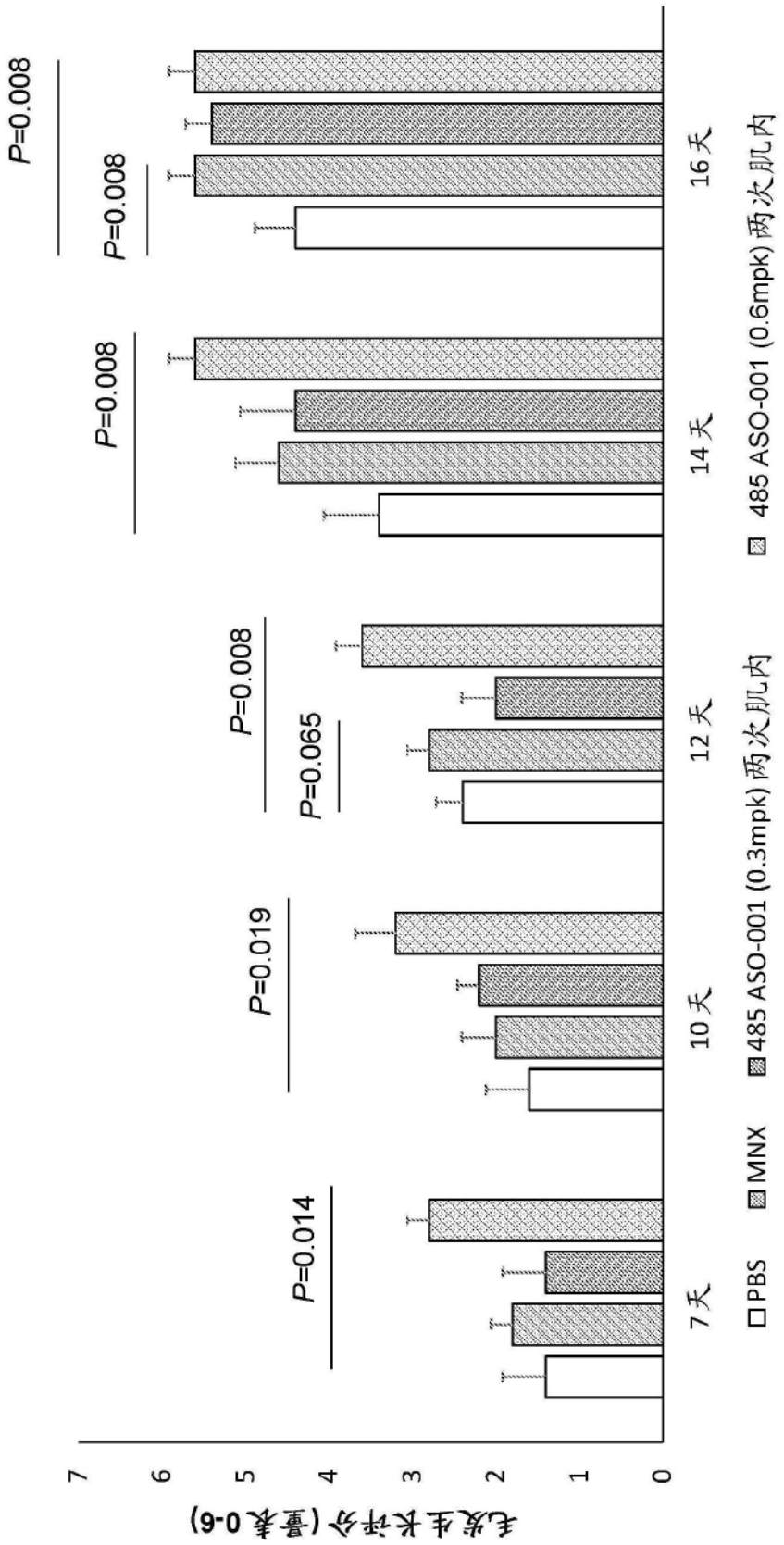

毛发生长评分（量表0-6）
0
1
2
3
4
5
6
7
7天
10天
12天
14天
16天
P=0.014
P=0.019
P=0.065
P=0.008
P=0.008
P=0.008
P=0.008
PBS
MNX
485 ASO-001 (0.3mpk) 两次肌内
485 ASO-001 (0.6mpk) 两次肌内

图4J

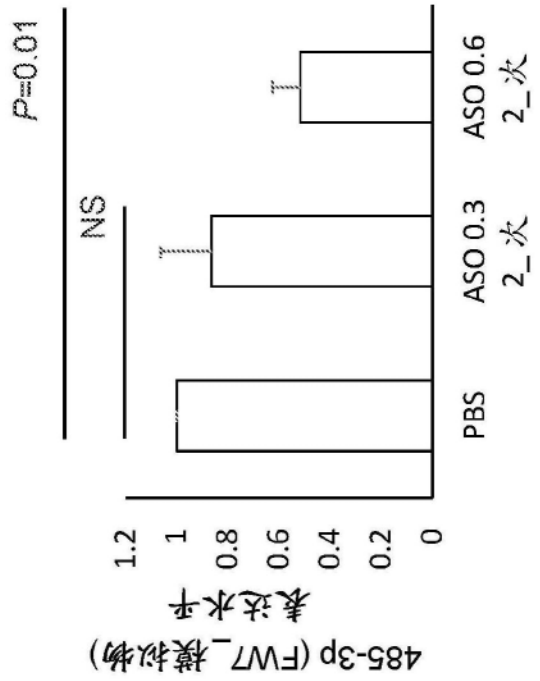

P=0.01
NS
485-3p (FW7_模拟物)
表达水平
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PBS
ASO 0.3 2_次
ASO 0.6 2_次

图5A

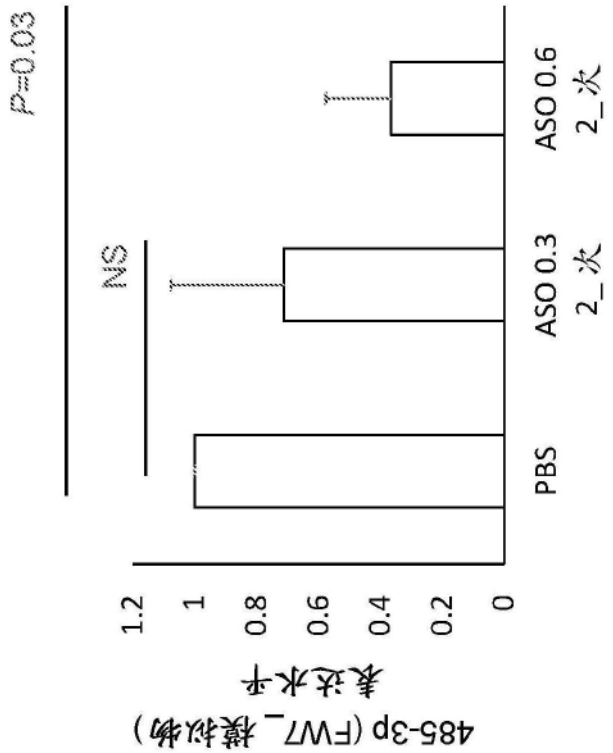

P=0.03
NS
485-3p (FW7_模拟物)
表达水平
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PBS
ASO 0.3 2_次
ASO 0.6 2_次

图5B

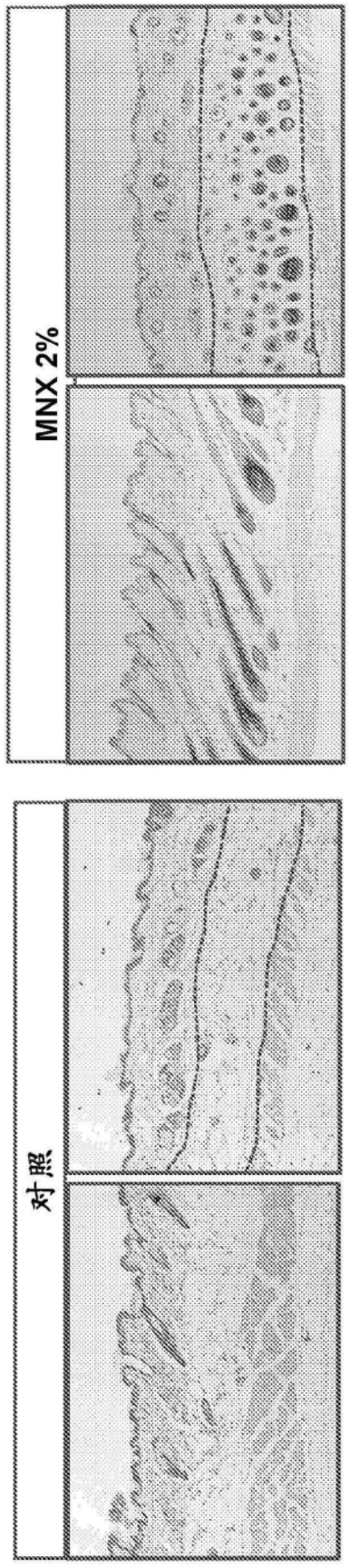


图6A

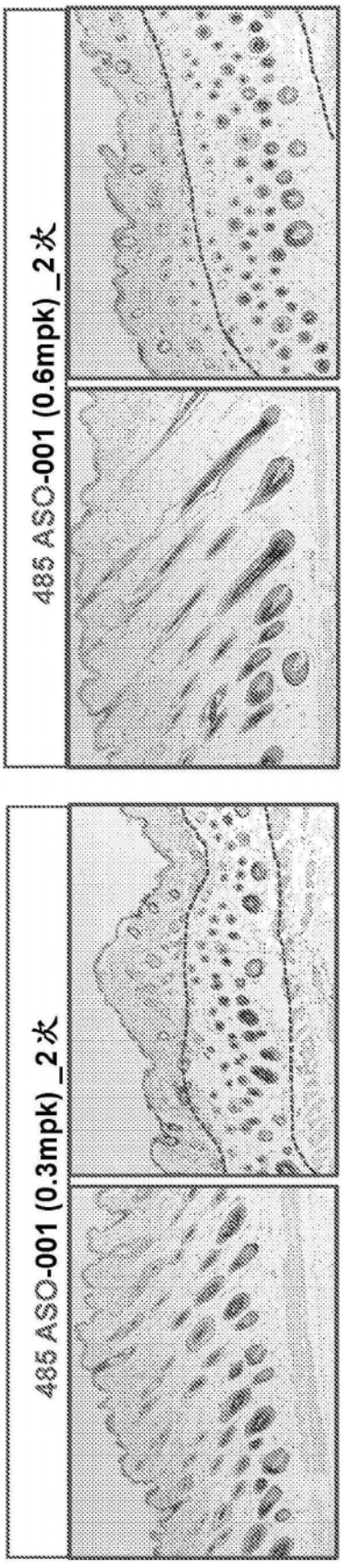


图6B

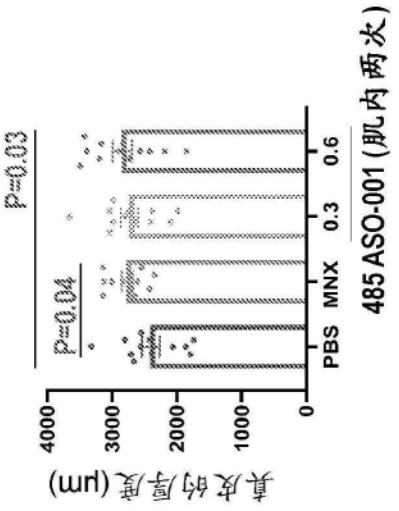

真皮的厚度 (μm)
4000
3000
2000
1000
0
P=0.03
P=0.04
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图6C

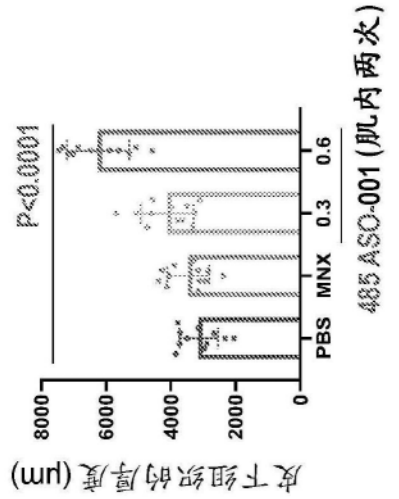

皮下组织的厚度 (μm)
8000
6000
4000
2000
0
P<0.0001
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图6D

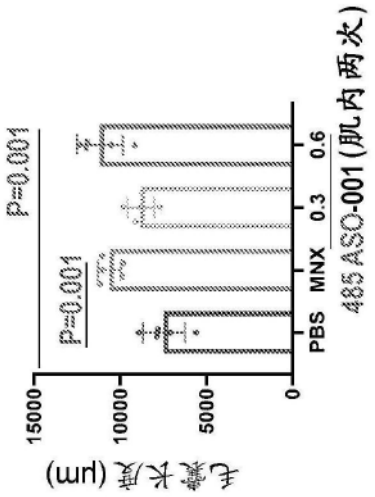

P=0.001
P=0.001
毛囊长度 (μm)
15000
10000
5000
0
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图6E

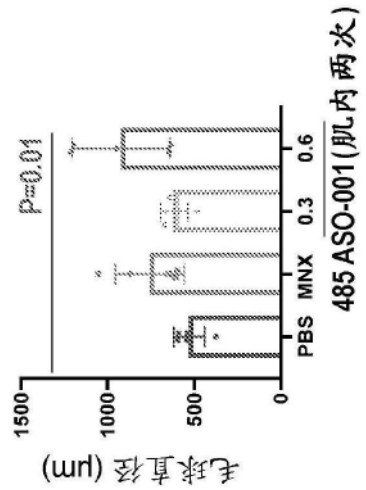

P=0.01
毛球直径 (μm)
1500
1000
500
0
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图6F

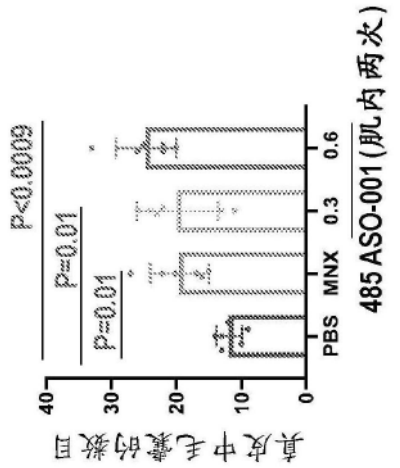

真皮中毛囊的数目
0
10
20
30
40
P<0.0009
P=0.01
P=0.01
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图6G

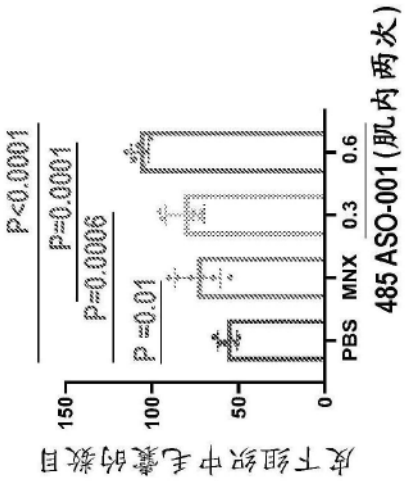

皮下组织中毛囊的数目
0
50
100
150
P<0.0001
P=0.0001
P=0.0006
P=0.01
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图6H

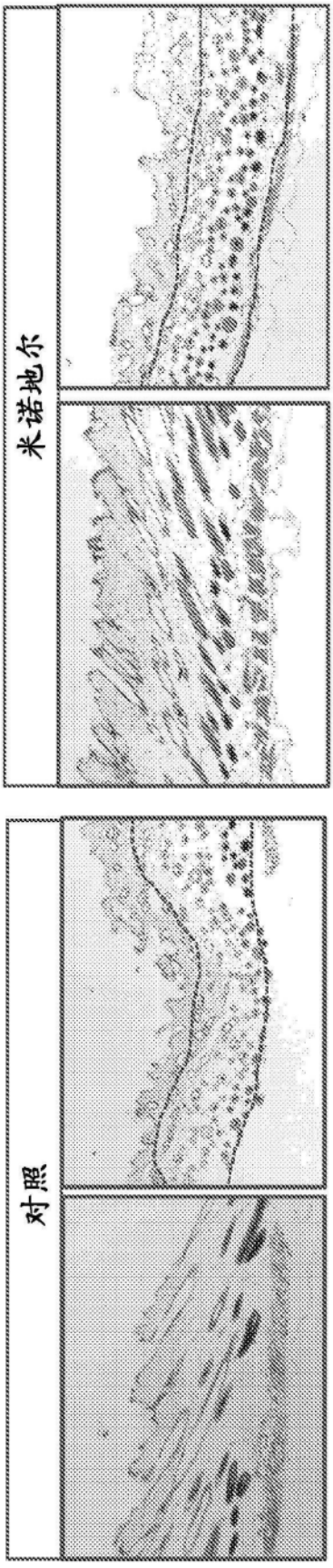


图7A

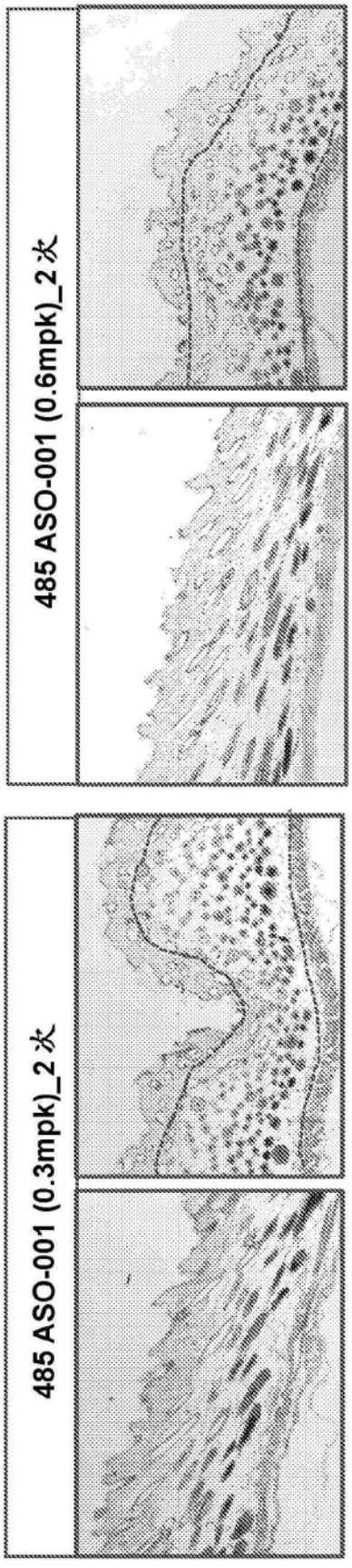


图7B

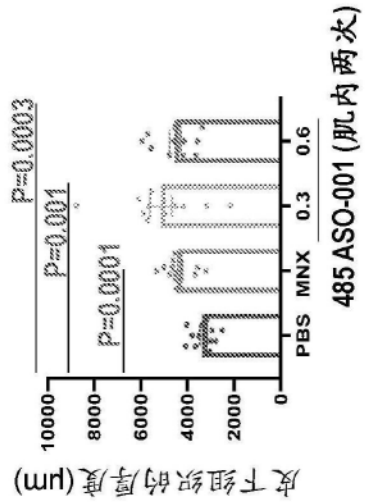

皮下组织的厚度(μm)
10000
8000
6000
4000
2000
0
P=0.0003
P=0.001
P=0.0001
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图7C

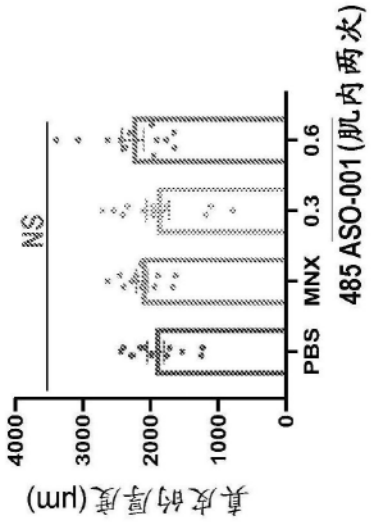

真皮的厚度(μm)
4000
3000
2000
1000
0
NS
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图7D

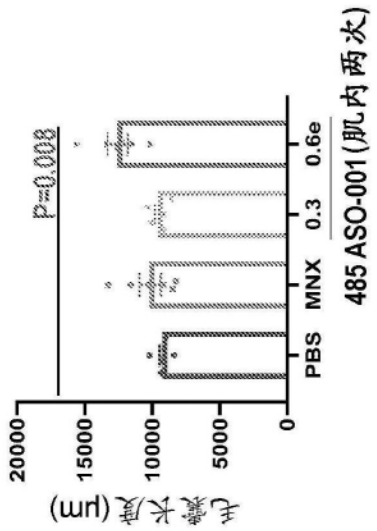

毛囊长度 (μm)
20000
15000
10000
5000
0
P=0.008
PBS
MNX
0.3
0.6e
485 ASO-001 (肌内两次)

图7E

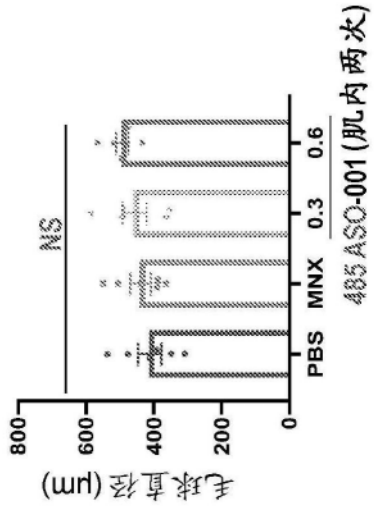

毛球直径 (μm)
800
600
400
200
0
NS
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图7F

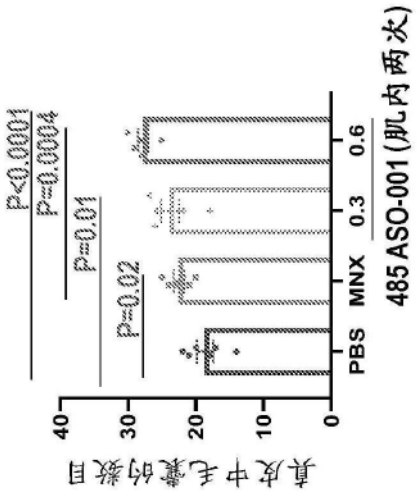

真皮中毛囊的数目
0
10
20
30
40
P<0.0001
P=0.0004
P=0.01
P=0.02
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001 (肌内两次)

图7G

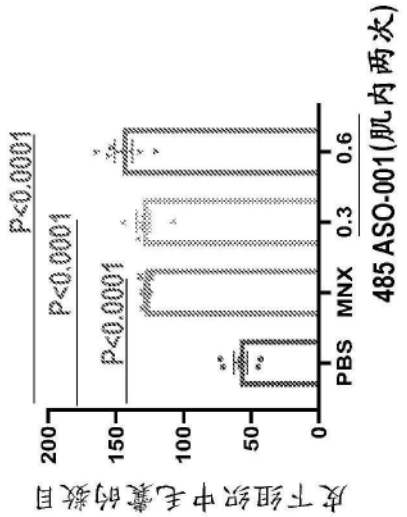

皮下组织中毛囊的数目
0
50
100
150
200
P<0.0001
P<0.0001
P<0.0001
PBS
MNX
0.3
0.6
485 ASO-001(肌内两次)

图7H

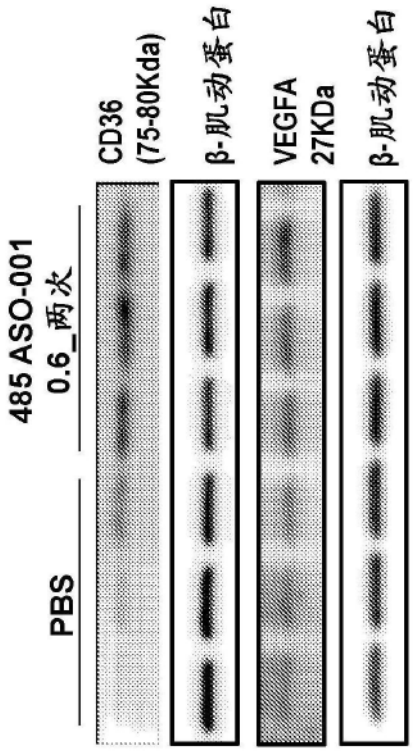

PBS
485 ASO-001 0.6_两次
CD36 (75-80Kda)
β-肌动蛋白
VEGFA 27KDa
β-肌动蛋白

图8A

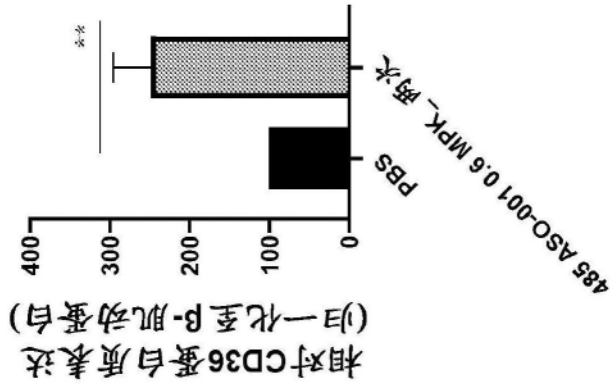

相对CD36蛋白质表达 (归一化至β-肌动蛋白)
400
300
200
100
0
**
PBS
485 ASO-001 0.6 MPK_两次

图8B

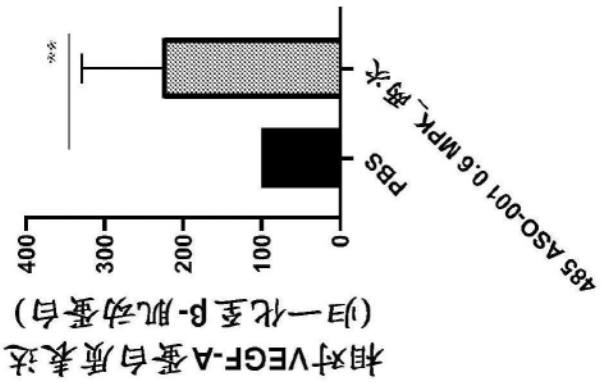

相对VEGF-A蛋白质表达
(归一化至β-肌动蛋白)
400
300
200
100
0
PBS
485 ASO-001 0.6 MPK_两次
***

图8C

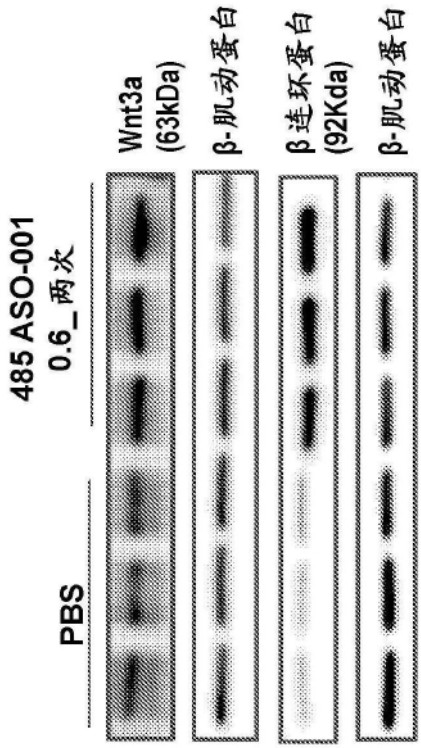

PBS
485 ASO-001
0.6_两次
Wnt3a
(63kDa)
β-肌动蛋白
β连环蛋白
(92Kda)
β-肌动蛋白

图9A

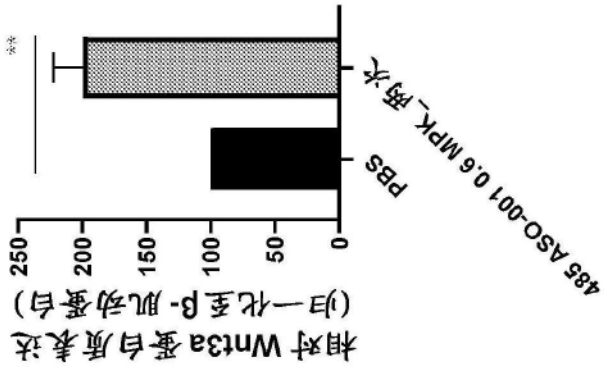

相对Wnt3a蛋白质表达
(归一化至β-肌动蛋白)
250
200
150
100
50
0
PBS
485 ASO-001 0.6 MPK_药水
**

图9B

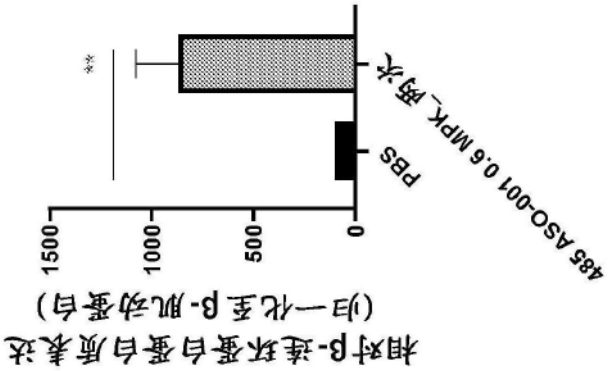

相对β-连环蛋白蛋白质表达
(归一化至β-肌动蛋白)
1500
1000
500
0
PBS
485 ASO-001 0.6 MPK_药水
**

图9C

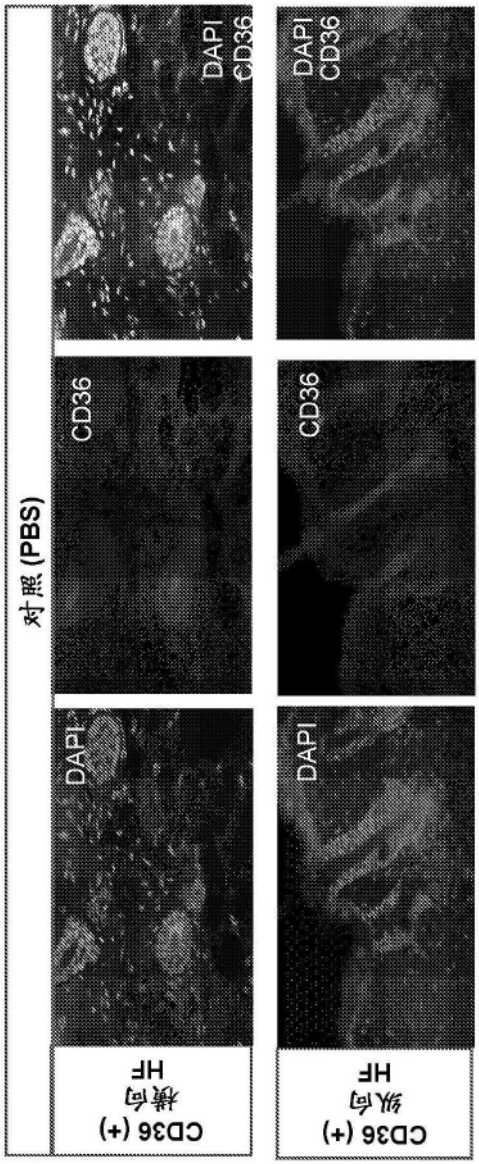

对照 (PBS)
CD36 (+)
横向
HF
CD36 (+)
纵向
HF
DAPI
CD36
DAPI
CD36
CD36
CD36
DAPI
DAPI

图10A

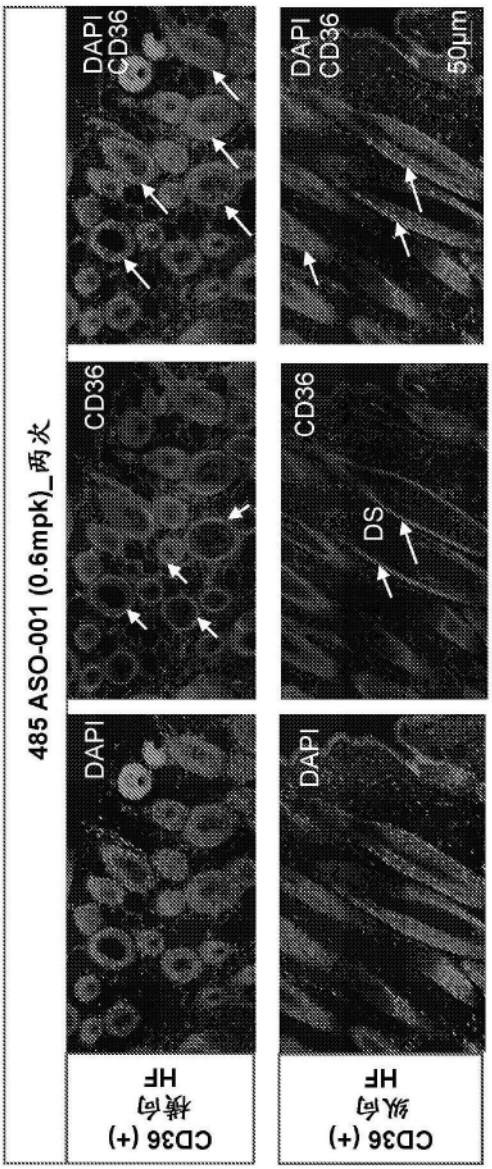


图10B