



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109715218 A

(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201780057449.3

(22)申请日 2017.07.17

(30)优先权数据

62/363,512 2016.07.18 US

62/419,852 2016.11.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/042400 2017.07.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/017483 EN 2018.01.25

(71)申请人 嘉安生物治疗有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 巴万吉特·考尔·布拉尔

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

C12N 15/84(2006.01)

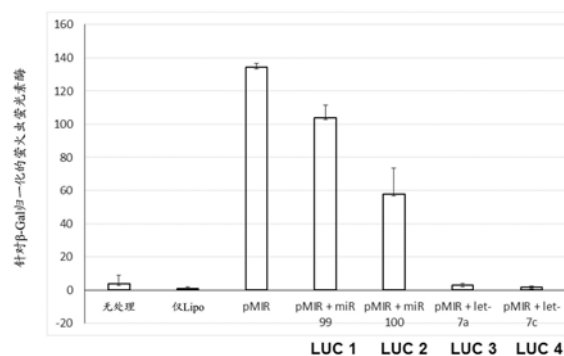
权利要求书7页 说明书48页
序列表38页 附图18页

(54)发明名称

用于治疗心脏疾病的组合物和方法

(57)摘要

本文公开的内容包括微小RNA拮抗剂、包含一种或更多种这样的微小RNA拮抗剂的治疗性组合物,以及用微小RNA拮抗剂治疗和/或改善心脏疾病和/或肌营养不良紊乱的方法。还包括组合物,其中向患有或怀疑患有心脏疾病和/或肌营养不良紊乱的受试者提供本文公开的治疗性组合物和另外的治疗剂。特别地,本文公开的一些实施方案涉及用于短暂地施用微小RNA拮抗剂的混合物以促进心肌细胞增殖和心脏再生的组合物和方法。



1. 一种组合物,所述组合物包含多种微小RNA(miR)拮抗剂,其中所述多种miR拮抗剂包含一种或更多种miR-99a拮抗剂、一种或更多种miR-100-5p拮抗剂、一种或更多种miR-Let-7a-5p拮抗剂和一种或更多种miR-Let-7c-5p拮抗剂。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中以下的一项或更多项适用:

a. 所述一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包含反义miR-99a,所述反义miR-99a包含与选自由SEQ ID NO 47、48、50、52和54组成的组的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列;

b. 所述一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-100-5p,所述反义miR-100-5p包含与选自由SEQ ID NO 46、49、51、53和55组成的组的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列;

c. 所述一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-Let-7a-5p,所述反义miR-Let-7a-5p包含与选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列;和

d. 所述一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-Let-7c-5p,所述反义miR-Let-7c-5p包含与选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的组合物,其中以下的一项或更多项适用:

a. 所述一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包含反义miR-99a,所述反义miR-99a包含相对于选自由SEQ ID NO:47、48、50、52和54组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列;

b. 所述一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-100-5p,所述反义miR-100-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:46、49、51、53和55组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列;

c. 所述一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-Let-7a-5p,所述反义miR-Let-7a-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列;和

d. 所述一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-Let-7c-5p,所述反义miR-Let-7c-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。

4. 根据权利要求2至3中任一项所述的组合物,其中反义miR中的至少一种包含选自由以下组成的组的一种或更多种化学修饰:修饰的核苷间连接、修饰的核苷酸和修饰的糖部分及其组合。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述一种或更多种化学修饰包含修饰的核苷间连接。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述修饰的核苷间连接选自由以下组成的组:硫代磷酸酯、2'-O甲氧基乙基(MOE)、2'-氟代、烷基膦酸酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代膦酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酸酯、羧甲基酯及其组合。

7. 根据权利要求5至6中任一项所述的组合物,其中所述修饰的核苷间连接包含硫代磷酸酯核苷间连接。

8. 根据权利要求4至7中任一项所述的组合物,其中所述一种或更多种化学修饰中的至少一种包含修饰的核苷酸。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述修饰的核苷酸包含锁核酸(LNA)化学修饰、肽核酸(PNA)、阿拉伯糖核酸(FANA)、其类似物、衍生物或组合。

10. 根据权利要求8至9中任一项所述的组合物,其中所述修饰的核苷酸包含锁核酸(LNA)。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述锁核酸(LNA)被掺入到修饰的反义miR的一端或两端。

12. 根据权利要求4至11中任一项所述的组合物,其中所述一种或更多种化学修饰中的至少一种包含修饰的糖部分。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述修饰的糖部分是2'-O-甲氧基乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、双环糖部分或其组合。

14. 根据权利要求12至13中任一项所述的组合物,其中所述修饰的糖部分包含2'-O-甲基糖部分。

15. 根据权利要求8至14中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

16. 一种表达盒,所述表达盒包含编码一种或更多种miR-99a拮抗剂、一种或更多种miR-100-5p拮抗剂、一种或更多种miR-Let-7a-5p拮抗剂和一种或更多种miR-Let-7c-5p拮抗剂的核苷酸序列。

17. 根据权利要求16所述的表达盒,其中以下的一项或更多项适用:

a. 所述一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包含反义miR-99a,所述反义miR-99a包含与选自由SEQ ID NO 47、48、50、52和54组成的组的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列;

b. 所述一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-100-5p,所述反义miR-100-5p包含与选自由SEQ ID NO 46、49、51、53和55组成的组的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列;

c. 所述一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-Let-7a-5p,所述反义miR-Let-7a-5p包含与选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列;和

d. 所述一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-Let-7c-5p,所述反义miR-Let-7c-5p包含与选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列。

18. 根据权利要求16至17中任一项所述的表达盒,其中以下的一项或更多项适用:

a. 所述一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包含反义miR-99a,所述反义miR-99a包含相对于选自由SEQ ID NO:47、48、50、52和54组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列;

b. 所述一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-100-5p,所述反义miR-100-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:46、49、51、53和55组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列;

c. 所述一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-Let-7a-5p,所述反

义miR-Let-7a-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列;和

d.所述一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包含反义miR-Let-7c-5p,所述反义miR-Let-7c-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。

19.根据权利要求17至18中任一项所述的表达盒,其中反义miR中的至少一种包含选自由以下组成的组的一种或更多种化学修饰:修饰的核苷间连接、修饰的核苷酸和修饰的糖部分及其组合。

20.根据权利要求19所述的表达盒,其中所述一种或更多种化学修饰包含修饰的核苷间连接。

21.根据权利要求20所述的表达盒,所述修饰的核苷间连接选自由以下组成的组:硫代磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基(MOE)、2'-氟代、烷基膦酸酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代膦酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酸酯、羧甲基酯及其组合。

22.根据权利要求20至21中任一项所述的表达盒,其中所述修饰的核苷间连接包含硫代磷酸酯核苷间连接。

23.根据权利要求17至22中任一项所述的表达盒,其中所述一种或更多种化学修饰中的至少一种包含修饰的核苷酸

24.根据权利要求23所述的表达盒,其中所述修饰的核苷酸包含锁核酸(LNA)化学修饰、肽核酸(PNA)、阿拉伯糖核酸(FANA)、其类似物、衍生物或组合。

25.根据权利要求23至24中任一项所述的表达盒,其中所述修饰的核苷酸包含锁核酸(LNA)。

26.根据权利要求25所述的表达盒,其中所述锁核酸(LNA)被掺入到修饰的反义miR的一端或两端。

27.根据权利要求20至26中任一项所述的表达盒,其中所述一种或更多种化学修饰中的至少一种包含修饰的糖部分。

28.根据权利要求27所述的表达盒,其中所述修饰的糖部分是2'-O-甲氧基乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、双环糖部分或其组合。

29.根据权利要求27至28中任一项所述的表达盒,其中所述修饰的糖部分包含2'-O-甲基糖部分。

30.一种克隆或表达载体,所述克隆或表达载体包含根据权利要求16至29中任一项所述的表达盒。

31.根据权利要求30所述的克隆或表达载体,其中所述克隆或表达载体是病毒载体。

32.根据权利要求31所述的克隆或表达载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体或腺相关病毒(AAV)载体。

33.根据权利要求30至32中任一项所述的克隆或表达载体,其中所述克隆或表达载体包含

i.与SEQ ID NO:59-64中列出的核苷酸序列中的每一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列;

ii.与SEQ ID NO:86-89中列出的核苷酸序列中的每一个具有至少80%、85%、90%、

95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列;或

iii. 与a)和b)中所示的SEQ ID NO中列出的核苷酸序列中的每一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列。

34. 根据权利要求30至33中任一项所述的克隆或表达载体,其中所述克隆或表达载体包含与SEQ ID NO:85的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列。

35. 一种治疗性组合物,所述治疗性组合物包含有效量的至少一种治疗剂和以下的一种或更多种:

- a) 包含多种微小RNA(miR)拮抗剂的根据权利要求1至15中任一项所述的组合物;
- b) 根据权利要求16至29中任一项所述的表达盒;和
- c) 根据权利要求30至34中任一项所述的克隆或表达载体。

36. 根据权利要求35所述的治疗性组合物,其中所述至少一种治疗剂选自以下组成的组:艾地苯醌、依普利酮、VECTTOR、AVI-4658、Ataluren/PTC124/Translarna、BMN044/PRO044、CAT-1004、微小肌养蛋白AAV基因疗法(SGT-001)、半乳糖凝集素-1疗法(SB-002)、LTBB4(SB-001)、rAAV2.5-CMV-小肌养蛋白、谷氨酰胺、NFKB抑制剂、肌聚糖、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)及其组合。

37. 根据权利要求35至36中任一项所述的治疗性组合物,其中所述治疗性组合物是药物组合物。

38. 一种用于治疗受试者的心脏疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用或提供适于治疗所述心脏疾病的治疗性组合物,其中

- (a) 所述治疗性组合物是根据权利要求1至15中任一项所述的组合物;
- (b) 所述治疗性组合物包含根据权利要求16至29中任一项所述的表达盒;和/或
- (c) 所述治疗性组合物包含根据权利要求30至34中任一项所述的克隆或表达载体。

39. 一种用于促进受试者的心肌再生的方法,所述方法包括向所述受试者施用或提供治疗性组合物,其中

- (a) 所述治疗性组合物是根据权利要求1至15中任一项所述的组合物;
- (b) 所述治疗性组合物包含根据权利要求16至29中任一项所述的表达盒;和/或
- (c) 所述治疗性组合物包含根据权利要求30至34中任一项所述的克隆或表达载体。

40. 根据权利要求38至39中任一项所述的方法,所述方法还包括将所述受试者鉴定或选择为患有或怀疑患有心脏疾病。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述心脏疾病是心肌梗塞、缺血性心脏病、扩张性心肌病、心力衰竭(例如充血性心力衰竭)、缺血性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、酒精性心肌病、病毒性心肌病、心动过速介导的心肌病、应激诱导的心肌病、淀粉样变心肌病、致心律失常性右心室发育不良、左心室致密化不全、心内膜弹力纤维增生症、主动脉狭窄、主动脉返流、二尖瓣狭窄、二尖瓣返流、二尖瓣脱垂、肺动脉狭窄、肺动脉返流、三尖瓣狭窄、三尖瓣返流、先天性紊乱、遗传性紊乱或其组合。

42. 一种调节心肌细胞和/或肌细胞增殖的方法,所述方法包括

- 1) 将治疗性组合物引入心肌细胞中,其中
- (a) 所述治疗性组合物是根据权利要求1至15中任一项所述的组合物;

(b) 所述治疗性组合物包含根据权利要求16至29中任一项所述的表达盒;和/或

(c) 所述治疗性组合物包含根据权利要求30至34中任一项所述的克隆或表达载体;和

2) 允许从步骤(1)获得的所述心肌细胞分裂,从而调节所述心肌细胞或肌细胞的增殖。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述引入包括用至少一种表达盒或至少一种病毒载体转染所述心肌细胞和/或肌细胞,所述至少一种表达盒或至少一种病毒载体包含编码所述多种miR拮抗剂的核酸序列。

44. 根据权利要求42至43中任一项所述的方法,所述方法还包括测量所述心肌细胞和/或肌细胞的增殖。

45. 根据权利要求42至44中任一项所述的方法,其中与缺少编码所述多种miR拮抗剂的核酸序列的对照心肌细胞相比,所述心肌细胞和/或肌细胞的增殖被增加。

46. 根据权利要求42至45中任一项所述的方法,其中所述心肌细胞和/或肌是体内的。

47. 根据权利要求42至45中任一项所述的方法,其中所述心肌细胞和/或肌是离体的。

48. 根据权利要求42至47中任一项所述的方法,其中所述心肌细胞和/或肌在人类受试者中。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述人类受试者患有心脏疾病。

50. 根据权利要求38至49中任一项所述的方法,其中所述多种miR拮抗剂由相同的表达盒或载体编码。

51. 根据权利要求38至49中任一项所述的方法,其中所述多种miR拮抗剂由不同的表达盒或载体编码。

52. 根据权利要求38至51中任一项所述的方法,其中所述载体是病毒载体。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体或腺相关病毒(AAV)载体。

54. 根据权利要求38至53中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用有效量的至少一种另外的治疗剂或至少一种另外的疗法,用于组合疗法。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述至少一种另外的治疗剂或治疗性疗法选自由以下组成的组:艾地苯醌、依普利酮、VECTTOR、AVI-4658、Ataluren/PTC124/Translarna、BMN044/PRO044、CAT-1004、微小肌养蛋白AAV基因疗法(SGT-001)、半乳糖凝集素-1疗法(SB-002)、LTBB4(SB-001)、rAAV2.5-CMV-小肌养蛋白、谷氨酰胺、NFkB抑制剂、肌聚糖、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)表达、通过CRISPR/Cas9系统进行的基因组编辑、旨在再引入功能性重组形式的肌养蛋白基因的任何基因递送疗法、外显子跳跃治疗剂、无义突变的通读策略、基于细胞的疗法、肌养相关蛋白的上调、肌生成抑制蛋白的抑制、抗炎剂/抗氧化剂、机械支持装置、用于肌营养不良的任何标准疗法及其组合。

56. 根据权利要求54至55中任一项所述的方法,其中所述至少一种另外的治疗剂或疗法包含生物药物。

57. 根据权利要求54至55中任一项所述的方法,其中所述至少一种另外的治疗剂或疗法包含基因疗法或治疗性基因调节剂。

58. 根据权利要求54至57中任一项所述的方法,其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法中的每一种以单独的制剂被施用。

59. 根据权利要求54至58中任一项所述的方法,其中所述治疗性组合物和所述至少一

种另外的治疗剂或疗法被顺序施用。

60. 根据权利要求54至58中任一项所述的方法, 其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法被相伴施用。

61. 根据权利要求54至58中任一项所述的方法, 其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法被轮流施用。

62. 根据权利要求54至57中任一项所述的方法, 其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法以单一制剂被一起施用。

63. 一种用于治疗肌营养不良 (MD) 紊乱的方法, 所述方法包括向受试者施用或提供治疗性组合物, 其中

(a) 所述治疗性组合物是根据权利要求1至15中任一项所述的组合物;

(b) 所述治疗性组合物包含根据权利要求16至29中任一项所述的表达盒; 和/或

(c) 所述治疗性组合物包含根据权利要求30至34中任一项所述的克隆或表达载体,

并且其中所述治疗性组合物的施用与有效量的至少一种另外的治疗剂或至少一种另外的疗法组合进行, 以提供组合疗法。

64. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述肌营养不良紊乱与肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、腓骨肌萎缩症 (CMT)、先天性肌营养不良 (CMD)、杜氏肌营养不良 (DMD)、埃-德二氏肌营养不良 (EDMD)、遗传性和内分泌性肌病、肌肉代谢性疾病、线粒体肌病 (MM)、肌强直性肌营养不良 (MMD)、脊髓-延髓性肌肉萎缩症 (SBMA) 或其组合相关。

65. 一种用于增加心脏细胞增殖和/或增加肌肉结构和/或功能和/或再生所涉及的蛋白的表达和/或活性的方法, 所述方法包括将 (1) 治疗性组合物和 (2) 至少一种另外的治疗剂或疗法的组合与所述心脏细胞接触或提供给所述心脏细胞, 其中

(a) 所述治疗性组合物是根据权利要求1至15中任一项所述的组合物;

(b) 所述治疗性组合物包含根据权利要求16至29中任一项所述的表达盒; 和/或

(c) 所述治疗性组合物包含根据权利要求30至34中任一项所述的克隆或表达载体。

66. 一种用于抑制或减少靶微小RNA (miR) 的表达的方法, 所述方法包括将治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法的组合与心脏细胞接触或提供给心脏细胞, 其中

(a) 所述治疗性组合物是根据权利要求1至15中任一项所述的组合物;

(b) 所述治疗性组合物包含根据权利要求16至29中任一项所述的表达盒; 和/或

(c) 所述治疗性组合物包含根据权利要求30至34中任一项所述的克隆或表达载体。

67. 根据权利要求65至66中任一项所述的方法, 其中所述心脏细胞选自由心脏成纤维细胞、心肌细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞 (VSMC) 组成的组。

68. 根据权利要求65至67中任一项所述的方法, 其中所述心脏细胞选自由心肌细胞和骨骼肌细胞组成的组。

69. 根据权利要求63至68中任一项所述的方法, 其中所述至少一种另外的治疗剂或治疗性疗法选自由以下组成的组: 艾地苯醌、依普利酮、VECTTOR、AVI-4658、Ataluren/PTC124/Translarna、BMN044/PRO044、CAT-1004、微小肌养蛋白AAV基因疗法 (SGT-001)、半乳糖凝集素-1疗法 (SB-002)、LTBB4 (SB-001)、rAAV2.5-CMV-小肌养蛋白、谷氨酰胺、NFkB抑制剂、肌聚糖、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 表达调节、通过CRISPR/Cas9系统进行的基因组编辑、旨在再引入功能性重组形式的肌养蛋白基因的任何

基因递送疗法、外显子跳跃治疗剂、无义突变的通读策略、基于细胞的治疗、肌养相关蛋白的上调、肌生成抑制蛋白的抑制、抗炎剂/抗氧化剂、机械支持装置、用于肌营养不良的任何标准疗法及其组合。

70. 根据权利要求63至69中任一项所述的方法, 其中所述至少一种另外的治疗剂或疗法包含生物药物。

71. 根据权利要求63至70中任一项所述的方法, 其中所述至少一种另外的治疗剂或疗法包含基因疗法或治疗性基因调节剂。

72. 根据权利要求63至71中任一项所述的方法, 其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法中的每一种以单独的制剂被施用。

73. 根据权利要求63至72中任一项所述的方法, 其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法被顺序施用。

74. 根据权利要求63至72中任一项所述的方法, 其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法被相伴施用。

75. 根据权利要求63至72中任一项所述的方法, 其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法被轮流施用。

76. 根据权利要求63至71中任一项所述的方法, 其中所述治疗性组合物和所述至少一种另外的治疗剂或疗法以单一制剂被施用。

77. 一种微小RNA (miR) 拮抗剂, 其中所述miR拮抗剂包含

(a) 与选自SEQ ID NO 47、48、50、52和54组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列;

(b) 与选自SEQ ID NO 46、49、51、53和55组成的组的核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列; 或

(c) 与选自SEQ ID NO: 37、39和40-45组成的组的核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列; 或

(d) 与选自SEQ ID NO: 37、39和40-45组成的组的核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。

用于治疗心脏疾病的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年7月18日提交的美国临时专利申请序列第62/363,512号和2016年11月9日提交的美国临时专利申请序列第62/419,852号的优先权的权益。上述申请的公开内容明确地通过引用以其整体(包括任何附图)并入本文。

[0003] 关于联邦赞助研究的声明

[0004] 本申请部分地是根据国家卫生研究院的国家心脏、肺和血液研究所授予的批准号R41HL134387和GRANT12233027由政府支持进行的。政府在本发明中拥有某些权利。

[0005] 对序列表的引用

[0006] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。序列表作为标题为“Sequence_Listing_JAANB001W0”的文件提供,所述文件创建于2017年7月5日,大小为约59KB。电子格式的序列表中的信息通过引用以其整体并入本文。

[0007] 领域

[0008] 本申请的方面涉及生物化学和医学领域。更具体地,本文公开了新颖的微小RNA(microRNA)拮抗剂、包含一种或更多种这样的微小RNA拮抗剂的治疗性组合物,以及用这样的微小RNA拮抗剂治疗和/或改善心脏疾病(cardiac disease)和/或肌营养不良紊乱的方法。还包括了组合疗法,其中向患有或怀疑患有其中需要心肌再生的心脏疾病和/或肌营养不良紊乱的受试者提供本文公开的治疗性组合物和另外的治疗剂。

[0009] 背景

[0010] 心脏病(heart disease)包括一系列紊乱,包括但不限于其中需要心肌再生的心肌病、心肌梗塞和缺血性心脏病。缺血性心脏病是工业化世界中发病率和死亡率的主要原因。心脏病谱系内的紊乱被认为是由不同细胞类型(诸如心肌细胞)经由一组复杂的生物化学途径的改变的致病性变化引起的。例如,与心脏病相关的某些病理变化可以通过导致心肌细胞肥大和受损的心肌细胞的存活和收缩的心肌细胞基因表达的改变来解释。因此,心脏病治疗发展中的一个持续挑战是通过例如促进心脏内的内源性心肌细胞分裂和修复受损的心肌来鉴定适合各种类型心脏病的有效疗法。

[0011] 肌营养不良(MD)是多于30种遗传疾病的集合,其特征不在于控制运动的骨骼肌的进行性无力(progressive weakness)和退化。一些形式的MD在婴儿期或儿童期出现,而另一些可能在中年或更晚才出现。这些紊乱在肌肉无力的分布和程度(某些形式的MD也影响心肌)、发作年龄、进展速度和遗传模式方面有所不同。

[0012] 具体地说,杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy,DMD)是最普遍的遗传性神经肌肉紊乱之一。由肌养蛋白(dystrophin)基因中的突变引起的DMD的特征在于进行性肌肉无力和耗损,这是由于肌养蛋白的缺乏,导致骨骼肌和心肌退化,随后纤维化。患有DMD的人群的常见死因是心肌病和心力衰竭。由于目前没有可用的治疗,存在对预防患有DMD的患者的肌肉退化的安全且有效的疗法的需求。成人肌细胞的不能自我再生构成DMD的一个主要临床问题。由于缺乏可以被施用以成功刺激心肌再生的药物或细胞辅助治疗,这种情况更加复杂。目前,没有针对DMD的完全恢复肌养蛋白的治愈疗法。由于患者具有不良

预后,导致过早死亡,开发新的治疗方法的重要医疗需求仍未得到满足。

[0013] 概述

[0014] 本节提供了本公开内容的一般性概述,并且没有全面描述其全部范围或所有特征。

[0015] 本公开内容一般性地涉及用于治疗心脏疾病和/或肌营养不良紊乱的组合物和方法。本公开内容的一些实施方案涉及特异性靶向许多感兴趣的微小RNA,包括miR-9a-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p、Let-7c-5p的拮抗剂的治疗和递送系统的设计。在一些实施方案中,本文公开的组合物和方法允许心肌再生和治疗心脏病,诸如,例如心肌梗塞或其中需要心肌再生的任何心脏损伤。不受任何特定理论的约束,认为受损的心肌细胞的再生可潜在地导致心脏病发作后心肌缺血性损伤的逆转。

[0016] 在一个方面,本文公开了包括多种微小RNA(miR)拮抗剂的组合物的实施方案,其中多种miR拮抗剂包括一种或更多种miR-99a拮抗剂、一种或更多种miR-100-5p拮抗剂、一种或更多种miR-Let-7a-5p拮抗剂和一种或更多种miR-Let-7c-5p拮抗剂。根据本公开内容的该方面和其他方面的组合物的实施方案的实施可以包括以下特征中的一个或多个。

[0017] 在一些实施方案中,一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包括反义miR-99a(anti-miR-99a),该反义miR-99a包含与选自由SEQ ID NO 47、48、50、52和54组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-100-5p(anti-miR-100-5p),该反义miR-100-5p包含与选自由SEQ ID NO 46、49、51、53和55组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7a-5p(anti-miR-Let-7a-5p),该反义miR-Let-7a-5p包含与选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7c-5p(anti-miR-Let-7c-5p),该反义miR-Let-7c-5p包含与选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包括反义miR-99a,该反义miR-99a包含相对于选自由SEQ ID NO:47、48、50、52和54组成的组的序列具有一个或多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-100-5p,该反义miR-100-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:46、49、51、53和55组成的组的序列具有一个或多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7a-5p,该反义miR-Let-7a-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的序列具有一个或多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7c-5p,该反义miR-Let-7c-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的序列具有一个或多个错配的核碱基的核苷酸序列。

[0019] 在本文公开的组合物和各种实施方案中,至少一种反义miR包括选自由以下组成的组的一种或更多种化学修饰:修饰的核苷间连接(internucleoside linkage)、修饰的核

苷酸和修饰的糖部分及其组合。在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰包括修饰的核苷间连接。在一些实施方案中,修饰的核苷间连接选自以下组成的组:硫代磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基(MOE)、2'-氟代、烷基膦酸酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代膦酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酸酯(acetamidate)、羧甲基酯及其组合。在一些实施方案中,修饰的核苷间连接包括硫代磷酸酯核苷间连接。在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰中的至少一种包括修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包括锁核酸(LNA)化学修饰、肽核酸(PNA)、阿拉伯糖核酸(arabino-nucleic acid;FANA)、其类似物、衍生物或组合。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包括锁核酸(LNA)。在一些实施方案中,锁核酸(LNA)被掺入到修饰的反义miR的一端或两端。在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰中的至少一种包括修饰的糖部分。在一些实施方案中,修饰的糖部分是2'-O-甲氧基乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、双环糖部分或其组合。在一些实施方案中,修饰的糖部分包含2'-O-甲基糖部分。在本文公开的组合物的一些实施方案中,组合物还被配制成药物制剂。

[0020] 在一个方面,本文公开了表达盒的实施方案,该表达盒包含编码一种或更多种miR-99a拮抗剂、一种或更多种miR-100-5p拮抗剂、一种或更多种miR-Let-7a-5p拮抗剂和一种或更多种miR-Let-7c-5p拮抗剂的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包括反义miR-99a,该反义miR-99a包含与选自SEQ ID NO 47、48、50、52和54组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-100-5p,该反义miR-100-5p包含与选自SEQ ID NO 46、49、51、53和55组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7a-5p,该反义miR-Let-7a-5p包含与选自SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7c-5p,该反义miR-Let-7c-5p包含与选自SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。

[0021] 在本文公开的表达盒的各种实施方案中,以下的一项或更多项适用。在一些实施方案中,一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包括反义miR-99a,该反义miR-99a包含相对于选自SEQ ID NO:47、48、50、52和54组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-100-5p,该反义miR-100-5p包含相对于选自SEQ ID NO:46、49、51、53和55组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7a-5p,该反义miR-Let-7a-5p包含相对于选自SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7c-5p,该反义miR-Let-7c-5p包含相对于选自SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。

[0022] 在本文公开的表达盒的各种实施方案中,以下的一项或更多项适用。在一些实施方案中,反义miR中的至少一种包括选自以下组成的组的一种或更多种化学修饰:修饰的核苷间连接、修饰的核苷酸和修饰的糖部分及其组合。在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰包括修饰的核苷间连接。在一些实施方案中,修饰的核苷间连接选自以下组成的组:硫代磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基(MOE)、2'-氟代、烷基磷酸酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酸酯、羧甲基酯及其组合。在一些实施方案中,修饰的核苷间连接包括硫代磷酸酯核苷间连接。在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰中的至少一种包括修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包括锁核酸(LNA)化学修饰、肽核酸(PNA)、阿拉伯糖核酸(FANA)、其类似物、衍生物或组合。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包括锁核酸(LNA)。在一些实施方案中,锁核酸(LNA)被掺入到修饰的反义miR的一端或两端。在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰中的至少一种包括修饰的糖部分。在一些实施方案中,修饰的糖部分是2'-O-甲氧基乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、双环糖部分或其组合。在一些实施方案中,修饰的糖部分包含2'-O-甲基糖部分。在一些实施方案中,根据该方面的组合物是药物组合物。

[0023] 在一个方面,本申请的一些实施方案涉及包含如本文公开的表达盒的克隆载体或表达载体。在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包含表达盒,该表达盒包含编码一种或更多种miR-99a拮抗剂、一种或更多种miR-100-5p拮抗剂、一种或更多种miR-Let-7a-5p拮抗剂和一种或更多种miR-Let-7c-5p拮抗剂的核苷酸序列。在一些实施方案中,克隆载体或表达载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体或腺相关病毒(AAV)载体。在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包含与SEQ ID NO: 59-64中列出的核苷酸序列中的每一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列;或者与SEQ ID NO:86-89中列出的核苷酸序列中的每一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列;或者与a)和b)中所示的SEQ ID NO中列出的核苷酸序列中的每一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包含表达盒,该表达盒包含与SEQ ID NO:85的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。

[0024] 在一个方面,本文公开了治疗性组合物的实施方案,该治疗性组合物包含有效量的至少一种治疗剂和以下中的一种或更多种:(a)包含如本文公开的多种微小RNA(miR)拮抗剂的组合物;(b)如本文公开的表达盒;和(c)如本文公开的克隆或表达载体。在一些实施方案中,治疗性组合物还被配制成药物制剂。

[0025] 在一些实施方案中,至少一种治疗剂选自以下组成的组:艾地苯醌(Idebenone)、依普利酮(Eplerenone)、VECTTOR、AVI-4658、Ataluren/PTC124/Translarna、BMN044/PRO044、CAT-1004、微小肌养蛋白(MicroDystrophin) AAV基因疗法(SGT-001)、半乳糖凝集素-1(Galectin-1)疗法(SB-002)、LTBB4(SB-001)、rAAV2.5-CMV-小肌养蛋白(minidystrophin)、谷氨酰胺、NFKB抑制剂、肌聚糖(Sarcoglycan)、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)(delta(35kDa dystrophin-associated glycoprotein))、胰岛素样生长因子-1

(IGF-1) 及其组合。在一些实施方案中,根据该方面的治疗性组合物是药物组合物。

[0026] 在一个方面,本公开内容的一些实施方案涉及一种用于治疗受试者的心脏疾病的方法。方法包括向受试者施用或提供适于治疗心脏疾病的治疗性组合物,其中 (a) 治疗性组合物是包含如本文公开的多种微小RNA (miR) 拮抗剂的组合物; (b) 治疗性组合物包含如本文公开的表达盒;或 (c) 治疗性组合物包含如本文公开的克隆或表达载体。在一些实施方案中,方法还包括将受试者鉴定为患有或怀疑患有心脏疾病。在一些实施方案中,心脏疾病是心肌梗塞、缺血性心脏病、扩张性心肌病、心力衰竭 (例如充血性心力衰竭)、缺血性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、酒精性心肌病、病毒性心肌病、心动过速介导的心肌病、应激诱导的心肌病、淀粉样变心肌病、致心律失常性右心室发育不良、左心室致密化不全 (noncompaction)、心内膜弹力纤维增生症、主动脉狭窄、主动脉返流、二尖瓣狭窄、二尖瓣返流、二尖瓣脱垂、肺动脉狭窄、肺动脉狭窄、肺动脉返流、三尖瓣狭窄、三尖瓣返流、先天性紊乱、遗传性紊乱或其组合。

[0027] 在另一方面,本公开内容的一些实施方案涉及一种用于促进受试者的心肌再生的方法。方法包括向受试者施用或提供治疗性组合物,其中 (a) 治疗性组合物是包含如本文公开的多种微小RNA (miR) 拮抗剂的组合物; (b) 治疗性组合物包含如本文公开的表达盒;或 (c) 治疗性组合物包含如本文公开的克隆或表达载体。在一些实施方案中,方法还包括将受试者鉴定或选择为患有或怀疑患有心脏疾病。在一些实施方案中,心脏疾病是心肌梗塞、缺血性心脏病、心力衰竭 (例如充血性心力衰竭)、缺血性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、酒精性心肌病、病毒性心肌病、心动过速介导的心肌病、应激诱导的心肌病、淀粉样变心肌病、致心律失常性右心室发育不良、左心室致密化不全、心内膜弹力纤维增生症、主动脉狭窄、主动脉返流、二尖瓣狭窄、二尖瓣返流、二尖瓣脱垂、肺动脉狭窄、肺动脉狭窄、肺动脉返流、三尖瓣狭窄、三尖瓣返流、先天性紊乱、遗传性紊乱或其组合。在一些其他特定实施方案中,心脏疾病是其中需要心肌再生的缺血性心脏病。

[0028] 在又另一方面,本文公开的一些实施方案涉及一种调节心肌细胞和/或肌细胞的增殖的方法。方法包括 (1) 将治疗性组合物引入心肌细胞中,其中 (a) 治疗性组合物是包含如本文公开的多种微小RNA (miR) 拮抗剂的组合物; (b) 治疗性组合物包含如本文公开的表达盒;或 (c) 治疗性组合物包含如本文公开的克隆或表达载体;和 (2) 允许从 (1) 获得的心肌细胞分裂,从而调节心肌细胞或肌细胞的增殖。在一些实施方案中,将治疗性组合物引入心肌细胞中包括用至少一种表达盒或至少一种病毒载体转染心肌细胞和/或肌细胞,所述至少一种表达盒或至少一种病毒载体包含编码多种miR拮抗剂的核酸序列。在一些实施方案中,方法还包括测量心肌细胞和/或肌细胞的增殖。在一些实施方案中,与缺乏编码多种miR拮抗剂的核酸序列的对照心肌细胞相比,心肌细胞和/或肌细胞的增殖被增加。在一些实施方案中,心肌细胞和/或肌是体内的。在一些其他实施方案中,心肌细胞和/或肌是离体的。在一些实施方案中,心肌细胞和/或肌是人类受试者的。在一些实施方案中,人类受试者患有心脏疾病。

[0029] 本文公开的方法的实施方案的实施可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂由相同的表达盒或载体编码。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂由不同的表达盒或载体编码。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体或腺相关病毒 (AAV) 载体。在一些实施方案中,病毒载体是腺相关病

毒 (AAV) 载体。

[0030] 在一些实施方案中,方法还包括向受试者施用有效量的至少一种另外的治疗剂或至少一种另外的疗法,用于组合疗法。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂或治疗性疗法选自由以下组成的组:艾地苯醌、依普利酮、VECTTOR、AVI-4658、Ataluren/PTC124/Translarna、BMN044/PRO044、CAT-1004、微小肌养蛋白AAV基因疗法 (SGT-001)、半乳糖凝集素-1疗法 (SB-002)、LTBB4 (SB-001)、rAAV2.5-CMV-小肌养蛋白、谷氨酰胺、NFKB抑制剂、肌聚糖、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 表达、通过CRISPR/Cas9系统进行的基因组编辑、旨在再引入功能性重组形式的肌养蛋白基因的任何基因递送疗法、外显子跳跃治疗剂、无义突变的通读策略、基于细胞的疗法、肌养相关蛋白 (utrophin) 的上调、肌生成抑制蛋白 (myostatin) 的抑制、抗炎剂/抗氧化剂、机械支持装置、用于肌营养不良的任何标准疗法及其组合。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂或疗法包含生物药物。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂或疗法包含基因疗法或治疗性基因调节剂。

[0031] 在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法中的每一种以单独的制剂被施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法被顺序施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法被相伴施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法被轮流施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法以单一制剂被一起施用。

[0032] 在一个方面,本文公开了用于治疗肌营养不良 (MD) 紊乱的方法的实施方案。方法包括向受试者施用或提供治疗性组合物,其中 (a) 治疗性组合物是包含如本文公开的多种微小RNA (miR) 拮抗剂的组合物; (b) 治疗性组合物包含如本文公开的表达盒;或 (c) 治疗性组合物包含如本文公开的克隆或表达载体,并且其中治疗性组合物的施用与有效量的至少一种另外的治疗剂或至少一种另外的疗法组合进行,以提供组合疗法。在一些实施方案中,肌营养不良紊乱与肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、腓骨肌萎缩症 (CMT)、先天性肌营养不良 (CMD)、杜氏肌营养不良 (DMD)、埃-德二氏肌营养不良 (Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, EDMD)、遗传性和内分泌性肌病、肌肉代谢性疾病、线粒体肌病 (MM)、肌强直性肌营养不良 (MMD)、脊髓-延髓性肌肉萎缩症 (SBMA) 或其组合相关。

[0033] 本文还公开了用于增加心脏细胞的增殖和/或增加肌肉结构和/或功能和/或再生所涉及的蛋白的表达和/或活性的方法的实施方案,包括将 (1) 治疗性组合物和 (2) 至少一种另外的治疗剂或疗法的组合与心脏细胞接触或提供给心脏细胞,其中 (a) 治疗性组合物是包含如本文公开的多种微小RNA (miR) 拮抗剂的组合物; (b) 治疗性组合物包含如本文公开的表达盒;或 (c) 治疗性组合物包含如本文公开的克隆或表达载体。在一些实施方案中,心脏细胞选自由心脏成纤维细胞、心肌细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞 (VSMC) 组成的组。在一些实施方案中,心脏细胞选自由心肌细胞和骨骼肌细胞组成的组。

[0034] 本文还公开了用于抑制或减少靶微小RNA (miR) 的表达的方法的实施方案,包括将 (1) 治疗性组合物和 (2) 至少一种另外的治疗剂或疗法的组合与心脏细胞接触或提供给心脏细胞,其中 (a) 治疗性组合物是包含如本文公开的多种微小RNA (miR) 拮抗剂的组合物; (b) 治疗性组合物包含如本文公开的表达盒;或 (c) 治疗性组合物包含如本文公开的克隆或表达载体。在一些实施方案中,心脏细胞选自由心脏成纤维细胞、心肌细胞、内皮细胞和血

管平滑肌细胞 (VSMC) 组成的组。在一些实施方案中,心脏细胞选自由心肌细胞和骨骼肌细胞组成的组。

[0035] 根据本公开内容的前述方面的方法的实施方案的实施可以包括以下特征中的一个或更多个。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂或治疗性疗法选自由以下组成的组:艾地苯醌、依普利酮、VECTTOR、AVI-4658、Ataluren/PTC124/Translarna、BMN044/PR0044、CAT-1004、微小肌养蛋白AAV基因疗法 (SGT-001)、半乳糖凝集素-1疗法 (SB-002)、LTBB4 (SB-001)、rAAV2.5-CMV-小肌养蛋白、谷氨酰胺、NFkB抑制剂、肌聚糖、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 表达调节、通过CRISPR/Cas9系统进行的基因组编辑、旨在再引入功能性重组形式的肌养蛋白基因的任何基因递送疗法、外显子跳跃治疗剂、无义突变的通读策略、基于细胞的治疗、肌养相关蛋白的上调、肌生成抑制蛋白的抑制、抗炎剂/抗氧化剂、机械支持装置、用于肌营养不良的任何标准疗法及其组合。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂或疗法包括生物药物。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂或疗法包括基因疗法或治疗性基因调节剂。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法中的每一种以单独的制剂被施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法被顺序施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法被相伴施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法被轮流施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和至少一种另外的治疗剂或疗法以单一制剂被施用。

[0036] 本文公开的内容还包括微小RNA (miR) 拮抗剂。在一些实施方案中,miR拮抗剂包括 (a) 与选自由SEQ ID NO 47、48、50、52和54组成的组的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列; (b) 与选自由SEQ ID NO 46、49、51、53和55组成的组的核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列;或 (c) 与选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列;或 (d) 与选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。

[0037] 前述概述仅是说明性的,并不旨在以任何方式进行限制。除了本文描述的说明性实施方案和特征之外,本公开内容的其他方面、实施方案、目的和特征将从附图、详细描述和权利要求书中变得完全明显。

[0038] 附图简述

[0039] 图1是非限制性的示例性克隆载体设计的示意图,该克隆载体设计包含编码分别在H1启动子和U6启动子的控制下表达Let-7a-5p和miR-99a-5p抑制序列的经修饰的发夹Zip构建体的核苷酸序列。在该示例性说明中,载体还包含分别在H1和U6启动子的调控下编码Let-7c-5p和miR-100-5p抑制序列的核苷酸序列。

[0040] 图2A-2B描绘性地总结了心脏MRI成像实验的结果,其中观察到对照GFP病毒 (图2A) 与JBT-miR1 (图2B) 的心脏MRI图像,当与表达GFP的病毒相比,在心内注射JBT-miR1后3周,具有永久性LAD结扎的CD1小鼠中的左心室 (LV) 的延迟钆增强 (late gadolinium enhancement) 降低。

[0041] 图3是含有萤火虫萤光素酶报告物基因的非限制性的示例性pMIR-REPORT™萤光素

酶miRNA表达报告物载体的示意图。

[0042] 图4是含有 β -半乳糖苷酶报告物基因的非限制性的示例性pMIR-REPORTTM miRNA β -半乳糖苷酶表达报告物载体的示意图。

[0043] 图5是在HeLa细胞中进行的实验的结果的示意性总结,证明了HeLa细胞内的内源性miR (Let-7a-5p,miR-99a,miR-100-5p,miR-Let-7c5p,miR-Let-7a-5p) 可以结合下文实施例5中描述的相应LUC报告物构建体,并抑制萤光素酶活性。

[0044] 图6是在HeLa细胞中进行的实验的结果的示意性总结,说明JRX0111、JRX0112、JRX0114、JRX0116、JRX0118miR-99a (miR-99) 反义miR被发现以剂量依赖性方式 (Log-10M) 增加萤光素酶构建体1 (LUC 1,miR-99a) 活性,该构建体含有与克隆到pMIR-REPORTTM萤光素酶 (pMIR) 的多克隆位点中的miR-99a互补的miR结合序列。

[0045] 图7是在HeLa细胞中进行的实验的结果的示意性总结,证明JRX0110、JRX0113、JRX0115、JRX0117、JRX0119miR-100-5p反义miR被观察到以剂量依赖性方式 (Log-10M) 增加萤光素酶构建体2 (LUC 2,miR-100-5p) 活性,该构建体含有与克隆到pMIR-REPORTTM萤光素酶 (pMIR) 的多克隆位点中的miR-100-5p互补的miR结合序列。

[0046] 图8A-8B示意性总结了在HeLa细胞中进行的实验的结果,证明JRX0101、JRX0103、JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108、JRX0109Let-7a-5p miR-Let-7a-5p反义miR被发现以剂量依赖性方式 (Log-10M) 增加萤光素酶构建体3 (LUC 3,let-7a) 活性。LUC 3含有与克隆到pMIR-REPORTTM萤光素酶 (pMIR) 的多克隆位点中的miR-Let-7a-5p互补的miR结合序列。

[0047] 图9A-9B示意性总结了在HeLa细胞中进行的实验的结果,证明JRX0100、JRX0102、JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108、JRX0109Let-7c-5p miR-Let-7c5p反义miR被观察到以剂量依赖性方式 (Log-10M) 增加萤光素酶构建体4 (LUC 4,let-7c) 活性。LUC 4含有与克隆到pMIR-REPORTTM萤光素酶 (pMIR) 的多克隆位点中的miR-Let-7c5p互补的miR结合序列。

[0048] 图10是在新生大鼠心室心肌细胞中进行的实验的结果的示意性总结,证明了实验结果表明,观察到JRX0111、JRX0112、JRX0114、JRX0116、JRX0118miR-99a反义miR以剂量依赖性方式 (Log-10M) 增加萤光素酶构建体1 (LUC 1,miR-99) 活性。

[0049] 图11是在新生大鼠心室心肌细胞中进行的实验的结果的示意性总结,证明JRX0110、JRX0113、JRX0115、JRX0117、JRX0119miR-100-5p反义miR被观察到以剂量依赖性方式 (Log-10M) 增加萤光素酶构建体2 (LUC 2,miR-100) 活性。

[0050] 图12A-12B示意性地总结了在新生大鼠心室心肌细胞中进行的实验的结果,证明JRX0101、JRX0103、JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108、JRX0109Let-7a-5p miR-Let-7a-5p反义miR被发现以剂量依赖性方式 (Log-10M) 增加萤光素酶构建体3 (LUC 3,let-7a) 活性。

[0051] 图13A-13B示意性地总结了在新生大鼠心室心肌细胞中进行的实验的结果,证明JRX0100、JRX0102、JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108、JRX0109Let-7c-5p miR-Let-7c5p反义miR被观察到以剂量依赖性方式 (Log-10M) 增加萤光素酶构建体4 (LUC 4,let-7c) 活性。

[0052] 结合附图,本公开内容的前述和其他特征将依据以下描述和所附权利要求变得完

全明显。应理解,这些附图仅描绘了根据本公开内容的几个实施方案,而不应被视为对其范围的限制;将通过使用附图以另外的特性和细节描述本公开内容。

[0053] 详述

[0054] 本公开内容一般性涉及新颖的微小RNA拮抗剂、包括一种或更多种这样的微小RNA拮抗剂的治疗性组合物、以及用这样的微小RNA拮抗剂治疗和/或改善心脏疾病和/或肌营养不良紊乱的方法。还包括组合疗法,其中本文公开的治疗性组合物和另外的治疗剂被提供给患有或怀疑患有心脏疾病和/或肌营养不良紊乱的受试者。具体地说,本文公开的一些实施方案涉及合成寡核苷酸miR-99A-5P、miR-100-5P、Let-7a-5p和Let-7c-5p拮抗剂和/或病毒递送的miR-99A-5P、miR-100-5P、Let-7a-5p和Let-7c-5p拮抗剂、化学治疗剂和生物剂的各种组合用于治疗心脏疾病和/或肌营养不良紊乱的用途。例如,本文公开的一些实施方案描述了两种腺病毒AAV2/9递送系统(本文中称为JBT-miR1和JBT-miR2),以及具有miR-99a-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p、Let-7c-5p拮抗剂的多种变体的对应表达载体,这些表达载体能够抑制相应的靶微小RNA。本文还提供了多种合成寡核苷酸拮抗剂,其被设计用于单独地或组合地特异性靶向miR-99a-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p和Let-7c-5p。

[0055] 在以下详细描述中参考附图,这些附图构成了本文的一部分。在详细描述、附图和权利要求书中描述的说明性实施方案并不意味着限制。在不脱离这里呈现的主题的精神或范围的情况下,可以使用其他实施方案,并且可以进行其他改变。容易理解的是,如本文一般描述的以及在附图中示出的,本公开内容的实施方案可以以各种不同的配置来布置、替换、组合和设计,所有这些都是明确预期的,并且是本公开内容的一部分。

[0056] 一些定义

[0057] 除非另有定义,否则本文使用的所有专门术语、符号和其他科学术语或术语(terminology)旨在具有本公开内容所属领域的技术人员根据本公开内容阅读时通常理解的含义。在一些情况中,为了清楚和/或便于参考,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文包括这些定义不一定被解释为代表与本领域通常理解的术语的实质性不同。本文描述或引用的许多技术和程序由本领域技术人员充分理解并使用常规方法通常采用。(参见,例如Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第2版,J.Wiley&Sons(New York,N.Y.1994);Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Press(Cold Springs Harbor,N.Y.1989))。

[0058] 除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一种/个(a)”、“一种/个(an)”和“该/所述(the)”包括复数指代物。例如,术语“分子”包括一种或更多种分子,包括它们的混合物。如在本公开内容和所附权利要求书中使用,术语“和/或”可以是单数或包含性的。例如,“A和/或B”在本文中用于包括以下所有备选方案:“A”、“B”以及“A和B”。

[0059] 如本文使用的术语“约”具有其通常的含义,大约。如果从上下文来看,近似程度不清楚,则“约”是指在所提供值的加或减10%内,或四舍五入到最近的有效数字,在所有情况中都包括所提供的值。在提供范围的情况下,它们包括边界值。

[0060] “施用”是指向受试者提供药物试剂(pharmaceutical agent)或组合物,并且包括但不限于由医学专业人员施用和自我施用。

[0061] “肠胃外施用”是指通过注射或输注施用。肠胃外施用包括但不限于皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、动脉内施用和颅内施用。“皮下施用”是指在紧挨着皮肤下面给药。“静

脉施用”是指施用到静脉中。“动脉内施用”是指施用到动脉中。

[0062] 术语“氨基酸”指天然存在的氨基酸和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸酯/盐和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,例如与氢、羧基、氨基和R基团结合的碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这样的类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化合物。术语“非天然存在的氨基酸”和“非天然氨基酸”指自然界中不存在的氨基酸类似物、合成氨基酸和氨基酸模拟物。

[0063] 氨基酸可以通过其通常已知的三字母符号或通过IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号在本文被提及。同样地,核苷酸可以通过其通常接受的单字母代码被提及。

[0064] “反义化合物”是指具有允许与靶核酸杂交的核碱基序列的化合物。在某些实施方案中,反义化合物是具有与靶核酸互补的核碱基序列的寡核苷酸。

[0065] 术语“互补(complementary)”或“互补性(complementarity)”指多核苷酸中的核酸与第二多核苷酸中的另一核酸形成碱基对的能力。例如,序列A-G-T与序列T-C-A互补。互补性可以是部分的,其中只有一些核酸根据碱基配对匹配,或者是完全的,其中所有核酸根据碱基配对匹配。术语“蛋白”、“肽”和“多肽”可互换使用,表示氨基酸聚合物或一组两种或更多种相互作用或结合的氨基酸聚合物。如本文使用的这些术语涵盖其中一个或更多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0066] 短语“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定核酸序列,保守修饰的变体指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸,或者在核酸不编码氨基酸序列的情况下,指基本相同的核苷酸序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在其中丙氨酸被密码子指定的每个位置处,该密码子可被更改为上述对应密码子中的任一个,而不更改编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,它们是保守修饰变异的一种。编码多肽的本文描述的核酸序列中的任一个也描述了核酸的每个可能的沉默变异。本领域的普通技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG和TGG之外,AUG通常是甲硫氨酸的唯一密码子,TGG通常是色氨酸的唯一密码子)可被修饰以产生功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的所有沉默变异就其表达产物而言隐含在每个所描述的序列中,但就实际探针序列而言不隐含在每个所描述的序列中。另外或可选地,变体可以包括与参考多核苷酸相比,5'端、3'端和/或一个或多个内部位点处的缺失、取代、添加一个或多个核苷酸。变体和参考多核苷酸之间的序列的相似性和/或差异可以使用本领域已知的常规技术检测,例如聚合酶链式反应(PCR)和杂交技术。变体多核苷酸还包括合成衍生的多核苷酸,诸如例如通过使用定点诱变生成的那些多核苷酸。通常,由本领域技术人员已知的序列比对程序确定的,本文公开的特定多核苷酸的变体,包括但不限于miRNA,将与参考多核苷酸具有至少约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、

约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的序列同一性。

[0067] 在两个或更多个核酸或蛋白的上下文中,术语“同一(identical)”或“百分比同一性(percent identity)”指相同或具有指定的百分比的核苷酸或氨基酸是相同的两个或更多个序列或子序列(例如,当跨比较窗或指定的区域进行比较并比对以获得最大对应时,跨指定的区域约60%序列同一性,65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性),如使用具有以下所述的缺省参数的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法或通过手动比对和目测测量的。参见例如NCBI网站ncbi.nlm.nih.gov/BLAST。然后,这样的序列被称为是“基本同一的”。该定义还涉及或可以应用于测试序列的互补物。该定义还包括具有缺失和/或添加的序列,以及具有取代的那些序列。序列同一性通常跨越至少约50个氨基酸或核苷酸的长度的区域或跨越50-100个氨基酸或核苷酸的长度的区域或跨越给定序列的整个长度存在。

[0068] 如本文使用的,术语“构建体”旨在指任何重组核酸分子,诸如表达盒、质粒、粘粒、病毒、自主复制的多核苷酸分子、噬菌体、或能够基因组整合或自主复制的源自任何来源的线性或环状、单链或双链DNA或RNA多核苷酸分子,包括其中一个或更多个核酸序列已经以功能操作方式连接,例如可操作地连接的核酸分子。

[0069] 术语“转染(transfection)”或“转染(transfecting)”被定义为使用非病毒或基于病毒的方法将核酸分子引入细胞的过程。核酸分子可以是编码完整蛋白或其功能部分的序列。通常,核酸载体包含蛋白表达所必需的元件(例如启动子、转录起始位点等)。转染的非病毒方法包括不使用病毒DNA或病毒颗粒作为递送系统将核酸分子引入细胞中的任何合适的转染方法。示例性非病毒转染方法包括但不限于磷酸钙转染、脂质体转染、核转染、声穿孔(sonoporation)、通过热休克的转染、磁转染和电穿孔。对于基于病毒的方法,本领域已知的有用的病毒载体中的任一种都可以在本文描述的方法中使用。病毒载体的实例包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、慢病毒和腺相关病毒载体。在一些方面,按照本领域已知的标准程序,使用逆转录病毒载体将核酸分子引入细胞中。

[0070] 当关于核酸或蛋白的部分使用时,术语“异源的”表示核酸或蛋白包含在自然界中彼此不在相同关系中发现的两个或更多个子序列。例如,核酸通常是重组产生的,具有被布置成产生新的功能性核酸的来自不相关基因的两个或更多个序列,例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区。类似地,异源蛋白表示该蛋白包含在自然界中彼此不在相同关系中发现的两个或更多个子序列(例如,融合蛋白)。

[0071] 术语“基因”广泛地用于指编码蛋白或可以转录成功能RNA的核酸分子的任何区段。基因可以包括被转录但不是最终、成熟和/或功能RNA转录物的一部分的序列,并且编码蛋白的基因还可以包括被转录但未被翻译的序列,例如5'非翻译区(5'-UTR)、3'非翻译区(3'-UTR)、内含子等。此外,基因可以任选地还包含其表达所需的调控序列,并且这样的序列可以是例如不被转录或翻译的序列。基因可以从多种来源获得,包括从感兴趣的来源克隆或从已知或预测的序列信息合成,并且可以包括设计成具有期望的参数的序列。

[0072] 术语“核苷间连接”是指相邻核苷之间的共价连接。

[0073] 术语“核碱基”是指能够与另一个核碱基非共价配对的杂环部分。

[0074] “核苷”是指与糖相连的核碱基。“连接的核苷”是指通过共价连接连接的核苷。“核苷酸”是指具有共价连接到核苷的糖部分的磷酸基团的核苷。

[0075] “miR拮抗剂”是指被设计为干扰或抑制miRNA的活性的剂。在某些实施方案中,miR拮抗剂包含靶向miRNA的反义化合物。在某些实施方案中,miR拮抗剂包含具有与miRNA或其前体的核碱基序列互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,miR拮抗剂包含干扰或抑制miRNA活性的小分子等。

[0076] “miR-9a-5p拮抗剂”是指被设计为干扰或抑制miR-9a-5p的活性的剂。“miR-100-5p拮抗剂”是指被设计为干扰或抑制miR-100-5p的活性的剂。“Let-7a-5p拮抗剂”是被设计为干扰或抑制Let-7a-5p的活性的剂。“Let-7c-5p拮抗剂”是指被设计为干扰或抑制Let-7c-5p的活性的剂。

[0077] “修饰的寡核苷酸”是指相对于天然存在的末端、糖、核碱基和/或核苷间连接具有一种或更多种化学修饰的寡核苷酸。

[0078] “修饰的核苷间连接”是指天然存在的核苷间连接的任何变化。

[0079] “硫代磷酸酯核苷间连接”是指核苷之间的键,其中非桥连原子中的一个硫原子。

[0080] “修饰的糖”是指天然糖的取代和/或任何变化。

[0081] “修饰的核碱基”是指天然核碱基的任何取代和/或变化。

[0082] “5-甲基胞嘧啶”是指用附接到5'位的甲基修饰的胞嘧啶。

[0083] “2'-O-甲基糖”或“2'-OMe糖”是指在2'位具有O-甲基修饰的糖。

[0084] “2'-O-甲氧基乙基糖”或“2'-MOE糖”是指在2'位具有O-甲氧基乙基修饰的糖。

[0085] “2'-O-氟代糖”或“2'-F糖”是指具有2'位氟代修饰的糖。

[0086] “双环糖部分”是指通过两个非双生环原子的桥接修饰的糖。

[0087] “2'-O-甲氧基乙基核苷”是指具有2'-O-甲氧基乙基糖修饰的2'-修饰的核苷。

[0088] “2'-氟代核苷”是指具有2'-氟代糖修饰的2'-修饰核苷。

[0089] “2'-O-甲基”核苷是指具有2'-O-甲基糖修饰的2'-修饰的核苷。

[0090] “双环核苷”是指具有双环糖部分的2'-修饰核苷。

[0091] 如本文使用的,术语“miR”、“mir”和“miRNA”可互换使用,并且指微小RNA,一类能够与编码RNA杂交并调控其表达的小RNA分子。在某些实施方案中,miRNA是pre-miRNA被酶Dicer裂解的产物。如本文提供的这些术语指形成双链RNA的核酸,当在与基因或靶基因相同的细胞中表达时,该双链RNA具有降低或抑制基因或靶基因表达的能力。杂交形成双链分子的核酸的互补部分通常具有基本或完全的同源性。在一个实施方案中,“微小RNA”指与靶基因具有基本或完全同源性并形成双链miRNA的核酸。在一些实施方案中,本公开内容的miRNA通过与互补的细胞mRNA相互作用抑制基因表达,从而干扰互补mRNA的表达。在一些实施方案中,本公开内容的双链miRNA的长度为至少约15-50个核苷酸(例如,双链miRNA的每个互补序列的长度为15-50个核苷酸,并且双链miRNA的长度为约15-50个碱基对)。在一些实施方案中,长度为20-30个碱基核苷酸,优选地长度为约20-25或约24-29个核苷酸,例如长度为20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。在本公开内容的一些实施方案中,微小RNA选自由以下组成的组或基本上类似于选自由以下组成的组的微小RNA:miR-9a-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p和Let-7c-5p。

[0092] 如本文使用的,术语“反义miRNA(anti-miRNA)”与术语“反义miR(anti-miR)”可互换使用,其指能够干扰或抑制一种或更多种靶微小RNA的一种或更多种活性的寡核苷酸。在

一些实施方案中,反义miRNA是化学合成的寡核苷酸。在一些实施方案中,反义miRNA是小分子。在一些实施方案中,反义miRNA是miR反义分子。“种子区(seed region)”是指成熟miRNA序列的5'末端的核苷酸2至6或2至7。

[0093] 术语“miRNA前体(miRNA precursor)”是指源自基因组DNA并且包含含有一个或多个miRNA序列的非编码的结构化RNA的转录物。例如,在某些实施方案中,miRNA前体是pre-miRNA。在某些实施方案中,miRNA前体是pri-miRNA。

[0094] “pre-miRNA”或“pre-miR”是指含有miRNA的具有发夹结构的非编码RNA。在某些实施方案中,pre-miRNA是pri-miR经由被称为Drosha的双链RNA特异性核糖核酸酶裂解的产物。不希望受任何特定理论的束缚,认为在细胞质中,pre-miRNA发夹被RNA酶III酶Dicer(RNase III enzyme Dicer)裂解。这种内切核糖核酸酶与发夹的5'和3'端相互作用,并切下连接3'和5'臂的环,产生长度约22个核苷酸的不完美的miRNA:miRNA双链体。尽管双链体的任一条链可能潜在地充当功能性miRNA,但认为通常只有一条链掺入到RNA诱导的沉默复合物(RISC)中,在该复合物中miRNA与其mRNA靶相互作用。剩余的链—正义链—被降解。RNA诱导的沉默复合物,或RISC,是一种多蛋白复合物,具体地核糖核蛋白,其掺入一条链的单链RNA(ssRNA)片段,诸如微小RNA(miRNA),或双链小干扰RNA(siRNA)。

[0095] “调节”是指功能或活性的扰动。在某些实施方案中,调节意味着基因表达的增加。在某些实施方案中,调节意味着基因表达的减少。如本文使用的术语“微小RNA调节剂”指能够调节微小RNA(例如,Let-7a、Let-7c、miR-100、miR-99)的表达水平的剂。在一些实施方案中,微小RNA调节剂由核酸编码。在其他实施方案中,微小RNA调节剂是小分子(例如,化学化合物或合成的微小RNA分子)。在一些实施方案中,与不存在微小RNA调节剂的表达水平相比,微小RNA调节剂降低了微小RNA的表达水平。在微小RNA调节剂相对于不存在调节剂时降低了微小RNA的表达水平的情况下,微小RNA调节剂是微小RNA的拮抗剂。在一些实施方案中,与不存在微小RNA调节剂的表达水平相比,微小RNA调节剂提高了微小RNA的表达水平。在微小RNA调节剂相对于不存在调节剂时增加微小RNA的表达水平的情况下,微小RNA调节剂是微小RNA的激动剂。

[0096] 如本文使用的,术语“心肌细胞”包括从心肌获得的或存在于心肌(诸如人类心肌)中的任何细胞,和/或物理上和/或功能上与心肌相关联的任何细胞。在本文公开的一些实施方案中,心肌细胞(myocardial cell)是心肌细胞(cardiomyocyte)。

[0097] 术语“核苷酸”包括天然存在的核苷酸以及非天然存在的核苷酸。因此,“核苷酸”不仅包括已知的含嘌呤和嘧啶杂环的分子,还包括杂环类似物及其互变异构体。其他类型的核苷酸的非限制性实例是含有以下的分子:腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、嘌呤、黄嘌呤、二氨基嘌呤、8-氧代-N6-甲基腺嘌呤、7-脱氮黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N4,N4-桥亚乙基胞嘧啶(N4,N4-ethanocytosin)、N6,N6-桥亚乙基-2,6-二氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-(C3-C6)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、假异胞嘧啶、2-羟基-5-甲基-4-三唑并吡啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、肌苷和US5,432,272中描述的“非天然存在的”核苷酸。术语“核苷酸”旨在涵盖这些实例及其类似物和互变异构体中的每一个和全部。

[0098] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换使用并且指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物,以及它们的互补物。术语“多核苷酸”包括核苷酸的线性序列。术语“核苷酸”通常指多核苷酸的单个单元,例如单体。核苷酸可以是核糖核苷酸、

脱氧核糖核苷酸或其修饰形式。本文考虑的多核苷酸的实例包括单链和双链DNA、单链和双链RNA(包括siRNA)以及具有单链和双链DNA和RNA混合物的杂交分子。术语还涵盖了含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸,所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的,具有与参考核酸相似的结合性质,并且以与参考核苷酸相似的方式代谢。这样的类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯和2'-O-甲基核糖核苷酸。因此,术语“核酸”和“多核苷酸”涵盖包含磷酸二酯键或修饰的连接的核酸,诸如磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、羧甲基酯、乙酰胺酸酯、氨基甲酸酯、硫醚、桥接氨基磷酸酯、桥接亚甲基膦酸酯、桥接氨基磷酸酯、桥接亚甲基膦酸酯、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、二硫代磷酸酯、桥接硫代磷酸酯或磺内酯连接,以及这样的连接的组合。术语“核酸”和“多核苷酸”还具体包括由除了五种生物存在的碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)之外的碱基构成的核酸。

[0099] 本文使用的术语“可操作地连接”表示两个或更多个序列之间的功能连接。例如,感兴趣的多核苷酸和调控序列(例如启动子)之间的可操作连接是允许表达感兴趣的多核苷酸的功能连接。在这个意义上,术语“可操作地连接”指调控区和待转录的编码序列的定位,使得调控区对于调控感兴趣编码序列的转录或翻译是有效的。在本文公开的一些实施方案中,术语“可操作地连接”表示一种构型,其中调控序列被放置于相对于编码多肽或功能RNA的序列的适当位置,使得控制序列指导或调控编码多肽的mRNA、多肽和/或功能RNA的表达或细胞定位。因此,如果启动子能够介导核酸序列的转录,则启动子与核酸序列可操作地连接。可操作地连接的元件可以是连续的或非连续的。

[0100] 如本文可互换使用的术语“启动子”、“启动子区”或“启动子序列”指能够结合RNA聚合酶以启动基因在5'至3' (“下游”)方向转录的核酸序列。启动子的特定序列通常决定启动子的强度。例如,强启动子导致高转录起始率。当RNA聚合酶与启动子的结合是基因转录的直接原因时,该基因被启动子“控制”或“调控”。启动子或启动子区通常为RNA聚合酶和转录正常启动所必需的其他因子提供识别位点。启动子可以从基因的基因组拷贝的5'非翻译区(5' UTR)中分离出来。可选地,启动子可以通过改变已知的DNA元件来合成产生或设计。还考虑了将一个启动子的序列与另一个启动子的序列结合的嵌合启动子。启动子可以用作调控元件,用于调节可操作地连接的多核苷酸分子诸如例如多肽或功能RNA序列的编码序列的表达。除了被RNA聚合酶以及优选地其他转录因子识别的序列之外,启动子可以含有调控序列元件诸如影响可操作连接的基因的转录的顺式元件或增强子结构域。在一些实施方案中,启动子可以是“组成型的”。在一些实施方案中,启动子可以以“组织特异性”或“组织优选”的方式调控,使得它仅在一种或更多种特定组织类型中转录可操作的连接编码区方面有活性。在一些实施方案中,为了治疗性目的,启动子可以是支持心肌和骨骼肌细胞中的转录的组织特异性启动子。这方面的进一步信息可以在例如PCT专利公布W02004041177A2中找到,该专利公布通过引用整体并入。在一些实施方案中,启动子可以包含“天然存在的”或“合成地”组装的核酸序列。

[0101] 转染基因的表达可以在宿主细胞中瞬时地或稳定地发生。在“瞬时表达”期间,转染的核酸不整合到宿主细胞基因组中,并且在细胞分裂期间不转移到子细胞中。由于其表达仅限于转染的细胞,基因的表达可能会随着时间的推移而丢失。相反,当基因与赋予转染细胞选择优势的另一个基因共转染时,可以发生转染基因的稳定表达。这样的选择优势可

以是对呈现给细胞的某种毒素的耐受性。转染基因的表达还可以通过转座子介导的插入到宿主基因组中来实现。在转座子介导的插入期间,基因以可预测的方式定位在两个转座子接头序列之间,这允许插入宿主基因组中以及随后的切除。

[0102] 本文可互换使用的术语“抑制剂”、“阻遏物”或“拮抗剂”或“下调剂”指与对照相比,导致靶基因的表达或活性水平可检测地降低的物质、剂或分子。被抑制的表达或活性可以是对照中的表达或活性的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更低。在一些实施方案中,与对照相比,抑制是1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。在一些实施方案中,拮抗剂是反义miR。

[0103] 如本文使用的,“治疗”指对患者表现出的或患者可能易受其影响的疾病、紊乱或生理状况做出应答的临床介入。治疗的目的包括但不限于减轻或预防症状、减缓或停止疾病、紊乱或状况的进展或恶化和/或疾病、紊乱或状况的缓解。“治疗”指治疗性治疗和预防性或预防措施中的一种或两种。需要治疗的受试者包括已经受到疾病或紊乱或不希望的生理状况影响的那些受试者,以及其中将要预防疾病或紊乱或不希望的生理状况的那些受试者。在本公开内容的一些实施方案中,术语“治疗”、“疗法”和“改善”指症状例如神经退行性紊乱或神经元损伤的严重程度的任何降低。如本文使用的,术语“治疗”和“预防”不意图是绝对术语。治疗可以指任何延迟发作、症状的改善和患者存活率的提高、存活时间或存活率增加等,或其组合。治疗的效果可以与未接受治疗的个体或个体池(pool of individuals)进行比较,或者与治疗前或治疗期间不同时间的同一患者进行比较。在一些实施方案中,与例如施用前的个体或未经治疗的对照个体相比,个体中疾病或紊乱的严重程度可以被降低至少10%。在一些实施方案中,个体中疾病或紊乱的严重程度被降低了至少25%、50%、75%、80%或90%,或在一些实施方案中,使用标准诊断技术不再能检测到。

[0104] 如本文使用的,术语“有效量”或“治疗有效量”指足以实现有益或期望的生物学和/或临床结果的量。在一些实施方案中,该术语指足以改善给定紊乱或症状的治疗剂的量。例如,对于给定参数,治疗有效量可以显示与对照相比的至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%的增加或减少。治疗效力也可以表示为“-倍”增加或减少。例如,治疗有效量可以相对于对照具有至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多的效果。

[0105] 术语“受试者”、“患者”、“需要治疗的个体”和类似术语可互换使用,并且除非说明,否则它们指的是作为治疗、观察或实验的对象的哺乳动物受试者。如本文使用的,“哺乳动物”指属于哺乳动物纲的受试者,并且包括但不限于人类、家畜和农场动物、动物园动物、运动动物(sport animal)和宠物动物。哺乳动物的非限制性实例包括人类和非人灵长类动物、小鼠、大鼠、绵羊、狗、马、猫、牛、山羊、猪和其他哺乳动物物种。在一些实施方案中,哺乳动物是人类。然而,在一些实施方案中,哺乳动物不是人类。该术语不一定表示受试者已被诊断患有特定疾病或紊乱,但通常指在医疗监督下的受试者。“疑似患有…的受试者”是指表现出疾病或状况的一种或更多种临床指标的受试者。在某些实施方案中,疾病或状况是肌营养不良(MD)紊乱。

[0106] “靶核酸”、“靶RNA”、“靶RNA转录物”和“核酸靶”都是指能够被拮抗剂靶向的核酸。“靶向(targeting)”是指设计和选择将与靶核酸杂交并诱导期望的效果的核碱基序列的过程。“靶向(targeted to)”是指具有将允许与靶核酸杂交以诱导期望的效果的核碱基序列。

在某些实施方案中,期望的效果是靶核酸的减少。

[0107] 如本文使用的,术语“变体”指具有与参考多核苷酸(或多肽)基本相似的序列的多核苷酸(或多肽)。在多核苷酸的情况中,与参考多核苷酸相比,变体可以在5'端、3'端和/或一个或多个内部位点处具有一个或多个多核苷酸的缺失、取代、添加。变体和参考多核苷酸之间序列的相似性和/或差异可以使用本领域已知的常规技术检测,例如聚合酶链式反应(PCR)和杂交技术。变体多核苷酸还包括合成衍生的多核苷酸,诸如例如通过使用定点诱变生成的那些多核苷酸。通常,多核苷酸的变体,包括但不限于DNA,可以与参考多核苷酸具有至少约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的序列同一性,如由本领域技术人员通过已知的序列比对程序确定的。在多肽的情况中,与参考多肽相比,变体可以具有一个或多个氨基酸的缺失、取代、添加。变体和参考多肽之间序列的相似性和/或差异可以使用本领域已知的常规技术检测,例如免疫印迹。通常,多肽的变体可以与参考多肽具有至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的序列同一性,如由本领域普通技术人员通过已知的序列比对程序确定的。

[0108] 如本文使用的,“包含”与“包括”、“含有”或“特征在于”同义,并且是包含性的或开放式的,并且不排除另外的、未引用的要素或方法步骤。如本文使用的,“由…组成”不包括在要求保护的组合物或方法中未指定的任何要素、步骤或成分。如本文使用的,“基本上由…组成”不排除不实质上影响要求保护的组合物或方法的基本和新型特征的材料或步骤。本文中术语“包含”的任何叙述,特别是在组合物组分的描述或方法步骤的描述中,应理解为涵盖那些基本上由叙述的组分或步骤组成和由叙述的组分或步骤组成的组合物和方法。

[0109] 在本文描述的方法或过程的一些实施方案中,步骤可以以任何顺序执行,除非明确叙述了时间或操作顺序。此外,在一些实施方案中,指定的步骤可以同时执行,除非明确的权利要求语言叙述它们被单独执行。例如,在一些实施方案中,要求保护的做X的步骤和要求保护的做Y的步骤可以在单个操作中同时进行,并且所得到的过程将落入要求保护的过程的字面范围内。

[0110] 章节标题,如(a)、(b)、(i)等仅仅是为了便于阅读说明书和权利要求书而呈现,因为它们在本文中仅用于组织目的且不应被解释为限制所描述的主题。说明书或权利要求书中标题的使用不要求步骤或要素按字母顺序或数字顺序或它们呈现的顺序执行。本申请中引用的所有文件或文件的一部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册和论文,在此通过引用以其整体明确并入。

[0111] 如本领域普通技术人员将理解的,出于任何和所有目的,诸如就提供书面描述而言,本文公开的所有范围也涵盖任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何列出的范围可以容易地被识别为充分描述并且能够将相同的范围分成至少相等的两半、三份、四份、五份、十份等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可以容易地分成下三分之一(lower third)、中三分之一(middle third)和上三分之一(upper third)等。如本领域技术人员还将理解的,诸如“高达”、“至少”、“大于”、“小于”等的所有语言都包括所列举的数字,并且指可以随后被分成如上讨论的子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,

范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1-3个物品的组指具有1、2或3个物品的组。类似地,具有1-5个物品的组指具有1、2、3、4或5个物品的组,依此类推。

[0112] I. 心脏疾病和微小核糖核酸(miRNA)

[0113] 心脏疾病或心脏病是一种存在多种类别或类型的疾病(例如缺血性心肌病(ICM)、扩张性心肌病(DCM)、主动脉狭窄(AS)),并且许多疾病需要独特的治疗策略。因此,心脏病不是一种单一的疾病,而是由不同的细胞类型(例如心肌细胞)通过不同的发病机制引起的一系列紊乱。心脏病治疗的挑战一直是针对特定心脏病类型的特定疗法,以最大限度地提高有效性和降低毒性。因此,心脏病分类(分类)的改进是心脏病治疗进展的核心。如本文使用的,心脏疾病涵盖以下非限制性实例:心力衰竭(例如充血性心力衰竭)、缺血性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、酒精性心肌病、病毒性心肌病、心动过速介导的心肌病、应激诱导的心肌病、淀粉样变心肌病、致心律失常性右心室发育不良、左心室致密化不全、心内膜弹力纤维增生症、主动脉狭窄、主动脉返流、二尖瓣狭窄、二尖瓣返流、二尖瓣脱垂、肺动脉狭窄、肺动脉返流、三尖瓣狭窄、三尖瓣返流、先天性紊乱、遗传性紊乱或其组合。

[0114] 心脏细胞再生:在整个20世纪,人类的心脏被认为是有丝分裂后最后分化的器官,受伤后无法修复。这在2001年在心肌梗塞后心肌细胞中的有丝分裂很明显时受到了挑战。其他人的研究证实,成年哺乳动物心脏在损伤时可以引发原始再生应答,成熟分化的单核哺乳动物心肌细胞在应用靶向特定信号传导途径的化合物后重新进入细胞周期。

[0115] miRNA(也称为miR)是在植物、动物和一些病毒中保守的小的非编码RNA分子,其在RNA沉默和基因表达的转录后调控中发挥作用。它们在1993年被发现,是基因调控的重要且进化的组分。它们通过碱基配对和沉默mRNA分子中的互补序列发挥作用,从而调节靶蛋白表达和下游信号传导途径。人类基因组中存在可以靶向60%的人类基因的1000种已知的miR。在动物中,miRNA通过两种RNA酶III酶Drosha和Dicer由较大的初级转录物(pri-miRNA或pri-miR)通过大约60-bp发夹前体(pre-miRNA或pre-miR)加工成成熟形式(miRNA)。成熟的miRNA被装载到50核糖核蛋白复合物(RISC)中,在这里,它通常通过碱基对相互作用来指导靶mRNA的下调。pri-miRNA由RNA聚合酶II转录,并被预测以可诱导的方式被转录因子调控。虽然一些miRNA示出了普遍存在的表达,但其他miRNA只表现出有限的发育阶段特异性、组织特异性或细胞类型特异性表达模式。

[0116] 如下文更详细描述,先前在心肌组织中进行的测量已经表明miRNA在心肌生长、纤维化和重塑中起调控作用。具体地说,核糖核酸干扰(RNAi)技术是开发心脏病的新疗法的一个密集研究领域,研究表明腺相关病毒(AAV)在体内递送寡核苷酸的效用。两种单独的表达微小RNA(miR) let-7a/let-c和miR-99/100的拮抗剂的AAV2/9病毒可以在单次注射后诱导缺血性小鼠心脏中心肌细胞的增殖持续长达3个月。对用病毒递送的miR拮抗剂治疗的小鼠心脏细胞和组织的转录和翻译分析示出了与参与心脏发育、增殖以及肌肉结构和功能的基因和蛋白的表达中的差异,表明通过靶向这些miR,人类心肌细胞和DMD模型中可能会出现类似的再生效应。

[0117] RNAi技术可以采取多种形式,但是它通常以碱基对短发夹(sh)RNA(shRNA)的形式在细胞内实施,该RNA通过内源性miR途径被加工成大约20个碱基对的小干扰RNA。与miR互补的序列的病毒递送是常见方法。AAV载体在心血管肌肉基因递送中是最佳的,因为它们a)不含编码病毒蛋白的序列来刺激免疫应答,b)不需要主动细胞分裂来进行表达,和c)由于

它们的重组基因在体内肌细胞中的稳定、长期表达而具有与腺病毒载体相比的显著优势。基因的病毒递送正在开发用于治疗DMD,并且包括作为LGMD疗法的AAV1- γ -肌聚糖载体,用于递送小肌养蛋白的重组(r) AAV2.5载体,以及rAAV,恒河猴血清型74。

[0118] 如本文描述的,miRNA拮抗剂抑制靶miRNA的活性的机制不以任何方式受限制。例如,在一些实施方案中,基于核酸的拮抗剂可以与靶miRNA序列形成双链体,并阻止成熟miRNA产物从其前体进行适当加工,或者可以阻止成熟miRNA与其靶基因结合,或者可以导致pri-miRNA、pre-miRNA或成熟miRNA的降解,或者可以通过一些其他机制起作用。

[0119] let-7a/c和miR-100/99:通过研究斑马鱼和新生小鼠中心脏再生的机制,科学家已经发现心脏再生是主要由心肌细胞介导的过程,这一过程发生在成熟心肌细胞脱分化之后,然后是增殖和进一步再分化。表观遗传重塑和细胞周期控制是控制这一再生过程的两个关键步骤。Aguirre等人(CellStem Cell.2014;15(5):589-604)报道了一项非常相关的研究,该研究调查了心脏再生的潜在机制,并鉴定了密切参与斑马鱼心脏再生的一系列miR。聚焦于在脊椎动物中表现出显著表达变化并在序列和3' UTR结合位点上保守的那些miR,导致了鉴定了在两个明确定义的基因组位置处聚簇的两个miR家族(miR-99/100,let-7a/c)。miR-99a/Let-7c-5p簇在调控脊椎动物心肌发生中的共同作用支持了这一发现。基于MIRANDA的miR-UTR结合预测显示miR-99/100与斑马鱼FNTB(法呢基转移酶的 β 亚基)和SMARCA5(染色质亚家族a的SWI/SNF相关基质相关肌动蛋白依赖性调节剂,成员5)之间的强相互作用,将miR家族与心肌细胞的细胞周期和表观遗传控制联系起来。有趣的是,miR-99/100和let-7a/c水平在早期哺乳动物心脏发育过程中是低的,并促进心脏质量快速增长,但在后期发育中呈指数级增长,伴随FNTB和SMARCA5蛋白水平相应降低,以阻断进一步的心肌细胞增殖。对受损的人类心脏组织的死后分析表明,这些miR构成了成年人心脏再生的保守障碍。对新生小鼠心肌细胞的RNA-seq转录组分析将两种病毒递送的拮抗剂转化为let-7a/c和miR-99/100,揭示了参与表观遗传重塑、去甲基化、心脏发育、增殖以及出乎意料的代谢途径以及肌肉结构和功能的基因的差异。事实上,miR-let 7a/c和miR-99/100抑制分别靶向1072和47个基因。

[0120] 参与肌肉结构和功能的许多选择性基因包括肌动蛋白/肌球蛋白、NFKB抑制因子结合Ras-样2(NFKB inhibitor interacting Ras-like 2)、肌聚糖、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)和IGF-1,它们是针对肌营养不良的当前的治疗靶点(参见下表1)。用抑制剂处理的小鼠心脏的器官培养物的半定量质谱鉴定了代谢和线粒体过程是关键因素,同时也强调了参与肌肉收缩的细胞骨架和蛋白的变化,如表2中示出的。

[0121] 表1:新生小鼠心肌细胞中Let-7a-5p的所选靶基因的非限制性实例

[0122]

靶基因	代表性转录物	基因名称
IGF2BP3	NM_006547	胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白3
COL24A1	NM_152890	胶原蛋白, XXIV型, $\alpha 1$
TMEM135	NM_001168724	跨膜蛋白135
CHD9	NM_025134	染色质域解旋酶DNA结合蛋白9
IGF1R	NM_000875	胰岛素样生长因子1受体
IGF2BP2	NM_001007225	胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白2
ACTA1	NM_001100	肌动蛋白, $\alpha 1$, 骨骼肌
FKBP10	NM_021939	FK506结合蛋白10, 65 kDa
ACVR1B	NM_004302	激活素A受体, IB型
MYO5B	NM_001080467	肌球蛋白VB
INSR	NM_000208	胰岛素受体
ITGB8	NM_002214	整合素, $\beta 8$
FRS2	NM_001042555	成纤维细胞生长因子受体底物2
ACVR1C	NM_001111031	激活素A受体, IC型
COL3A1	NM_000090	胶原蛋白, III型, $\alpha 1$
NGF	NM_002506	神经生长因子(β 多肽)
COL4A6	NM_001847	胶原蛋白, IV型, $\alpha 6$
CTHRC1	NM_138455	含胶原蛋白三螺旋重复1
IRS2	NM_003749	胰岛素受体底物2
NOS1	NM_000620	一氧化氮合酶1 (神经元)
MYRIP	NM_015460	肌球蛋白VIIA和Rab相互作用蛋白
COL11A1	NM_001190709	胶原蛋白, XI型, $\alpha 1$
NKIRAS2	NM_001001349	NF κ B抑制因子结合Ras样2(NF κ B inhibitor interacting Ras-like 2)
SMAD2	NM_001003652	SMAD家族成员2
TTL	NM_153712	微管蛋白酪氨酸连接酶
SGCD	NM_000337	肌聚糖、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)
COL14A1	NM_021110	胶原蛋白, XIV型, $\alpha 1$
COL1A1	NM_000088	胶原蛋白, I型, $\alpha 1$
COL15A1	NM_001855	胶原蛋白, XV型, $\alpha 1$
FNDC3B	NM_001135095	含纤连蛋白III型域3B
COL4A5	NM_000495	胶原蛋白, IV型, $\alpha 5$
MFAP3L	NM_001009554	微丝相关蛋白3样
ACVR2B	NM_001106	激活素A受体, IIB型
RPS6KA3	NM_004586	核糖体蛋白S6激酶, 90kDa, 多肽3

[0123] 表2:成年小鼠心脏的器官培养物中蛋白的表达。

[0124]

项目	计数	计数	%	P值
心肌收缩		15	9.1	3.00E-10
肥厚性心肌病 (HCM)		14	8.5	9.00E-09
扩张性心肌病		14	8.5	2.80E-08
	计数	计数	%	P值
肌肉收缩		11	6.7	3.80E-10
肌肉系统过程		11	6.7	1.20E-09
横纹肌收缩		8	4.8	2.70E-09
	计数	计数	%	P值
肌原纤维		14	8.5	1.20E-10
可收缩纤维		14	8.5	2.10E-10
可收缩纤维部分		13	7.9	8.60E-10
肌节		12	7.3	5.20E-09
角蛋白丝		11	6.7	7.40E-09
肌球蛋白丝		7	4.2	1.80E-08
中间丝		14	8.5	2.10E-08
中间丝细胞骨架		14	8.5	2.70E-08
横纹肌粗丝		5	3	1.70E-06
肌肉肌球蛋白复合物		5	3	5.10E-06
细胞骨架部分		27	16.4	5.30E-06
肌球蛋白II复合物		5	3	1.20E-05
肌动蛋白细胞骨架		13	7.9	1.30E-05
横纹肌细丝		4	2.4	6.90E-05
细胞骨架		31	18.8	7.80E-05
肌球蛋白复合物		7	4.2	1.20E-04

[0125] II. 肌营养不良

[0126] 肌营养不良 (MD) 是多于30种遗传疾病的集合, 所述遗传疾病的特征在于控制运动的骨骼肌的进行性无力和退化。一些形式的MD在婴儿期或儿童期出现, 而另一些可能直到中年或更晚才出现。这些紊乱在肌肉无力的分布和程度 (一些形式的MD也影响心肌)、发作年龄、进展速度和遗传模式方面有所不同。

[0127] 杜氏肌营养不良 (DMD) 是一种进行性的X连锁隐性遗传性肌肉耗损疾病, 导致严重残疾和过早死亡。DMD是由X染色体的短臂上的一个21.2条带上的突变引起的, 影响到携带该遗传缺陷母亲的一半男性婴儿。这个基因负责产生细胞质肌养蛋白, 这是将肌肉纤维的细胞骨架通过细胞膜连接到周围的细胞外基质的蛋白质复合体的重要组成部分。没有肌养蛋白, 肌肉就会退化。该疾病的主要症状是由局灶性纤维化引起的肌肉无力、呼吸问题和早期舒张功能障碍, 所述局灶性纤维化进展成扩张性心肌病 (DCM), 大多数患者并发心力衰竭和心律失常。目前对DMD的治疗仅仅是症状性的。下表3提供了目前治疗杜氏肌营养不良的标准方法的非限制性实例的列表。

[0128] 表3: 杜氏肌营养不良 (DMD) 的标准疗法

[0129]

干预	时间/使用	实例/限制
皮质类固醇	年龄<4岁	泼尼松(Prednisone)、泼尼松龙(Prednisolone)、地夫可特(Deflazacort)/行为变化、身高增加失败、体重增加、骨质疏松、糖耐量受损、血压变化、免疫/肾上腺抑制、消化不良/消化性溃疡、白内障和皮肤变化、类库欣氏症特征(cushingoid feature)、眼红反射、骨折、感染。
营养	年龄<4岁	钙和维生素D摄入、受控的钠摄入/体重控制。
呼吸护理	有症状	通气机/用抗生素管理胸部感染。
心脏护理	年龄5-10岁	ACE抑制剂、 β 阻断剂、利尿剂(HF发作)。在严重的心脏功能障碍的情况下考虑的抗凝疗法,以预防全身性血栓栓塞事件。如果发生室性心律失常,则引入抗心律失常治疗(具有可能的负性肌力作用)。每五年进行超声心动图和ECG。
矫形术	可变的	夹板疗法、膝-踝-足矫形器、融合。
社会心理	可变的	社会(信息、倡导和建议)和心理支持
恢复	诊断时	物理治疗师和职业治疗师。适度的主动锻炼。

[0130] 已经存在针对DMD和选择性干预研究的超过200项临床研究,并取得了成果。下表4提供了以前报道过的干预性DMD试验的选择性临床研究疗法的非限制性实例。目前临床发展中的DMD治疗性方法包括:1)旨在再引入功能性重组形式的肌养蛋白基因的基因递送疗法,2)外显子跳跃,3)无义突变的通读策略,4)基于细胞的治疗,5)肌养相关蛋白的上调、肌生成抑制蛋白的抑制、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)表达,6)批准的商业产品和7)抗炎剂/抗氧化剂。

[0131] 表4:先前已经报道结果的选择性临床研究剂干预性DMD试验

[0132]

疗法	阶段	临床试验标识符:	主要发现/状态
艾地苯醌	IIa III	NCT00654784 NCT01027884	呼吸治疗对呼气峰流量的影响(对于PEF, $p = 0.039$) [62]。减少呼吸功能的损失。
依普利酮	II	NCT01521546	左心室周向应变比安慰剂更低的下

[0133]

			降
VECTTOR		NCT01874275	在美国被指示用于慢性顽固性疼痛和手术后创伤性疼痛。考虑用于标签外使用的设备。
AVI-4658	II	NCT01396239	6 分钟步行测试增加, 丧失行走的发生降低[66-67]。新的肌养蛋白表达(p=0.0203)。α-肌聚糖和一氧化氮合酶的恢复。
AVI -4658	I/II	NCT00844597	
Ataluren/PTC124/Translarna	II. III	NCT00264888 NCT00592553	欧盟批准用于无义突变 DMD。
BMN 044/PRO044	I/II	NCT01037309	肌养蛋白表达增加。
CAT-1004	I/II	NCT02439216	I 阶段显示安全, 且没有不良事件
rAAV2.5-CMV- 小 肌 养 蛋 白	I	NCT00428935	未能在肌肉纤维中建立长期转基因表达。
谷氨酰胺	III	NCT00296621 NCT00018109	没有疾病改善效果。 没有疾病改善效果。

[0134] 寻找有效治疗的主要问题是需要针对身体中不同的肌肉、需要长期效果、纤维化的问题以及不同版本的药物应对不同突变的必要性。尽管基因疗法可以实现长期表达,但由于病毒载体无法携带大尺寸的肌养蛋白cDNA,肌养蛋白表达的恢复变得复杂。较小版本的肌养蛋白(小肌养蛋白和微小肌养蛋白)已经被开发出来以解决这个问题。对于肢带肌营养不良2D型(LGMD),临床试验已显示出有希望的结果。通过CRISPR/Cas9系统进行的基因组编辑已经在临床前小鼠模型中展现了令人鼓舞的发现,但在人类中还不可能。

[0135] 尽管有许多研究性疗法,肌养蛋白蛋白的完全恢复是不可实现的。迫切需要寻找在DMD患者中增加代偿基因和蛋白质的表达并再生两种内源性心肌的替代治疗性策略。

[0136] 有趣的是,在心脏病发作后不发生病理重构的心脏再生的脊椎动物(包括新生小鼠),过心肌细胞去分化和增殖治愈,说明了两个重要事实:1) 心肌细胞代表了比干细胞更大且更有效的再生性前体库,和2) 再生是哺乳动物心脏的固有特性并且可以导致成人的功能恢复,尽管效率不高。

[0137] III. 本公开内容的组合物

[0138] 微小RNA拮抗剂

[0139] 本文公开的内容包括了包括多种微小RNA(miR)拮抗剂的组合物的实施方案。如本文使用的,“miR拮抗剂”指被设计为干扰或抑制miRNA活性的剂。在某些实施方案中,miR拮抗剂包含靶向miRNA的反义化合物。在某些实施方案中,miR拮抗剂包含修饰的寡核苷酸,所述修饰的寡核苷酸具有与miRNA或其前体的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在其他实施方案中,miR拮抗剂包含干扰或抑制miRNA活性的小分子或类似物。在一些实施方案中,miR拮抗剂是miR-99a拮抗剂。在一些实施方案中,miR拮抗剂是miR-100-5p拮抗剂。在一些实施方案中,miR拮抗剂是miR-Let-7a-5p拮抗剂。在一些实施方案中,miR拮抗剂是miR-Let-7c-5p拮抗剂。本文公开的miR拮抗剂可用于例如提供预防、抑制或减少靶基因在例如心肌(例如心肌组织、心肌细胞)中的表达的组合物和方法。因此,本文公开的一些实施方案涉及本公开内容的miR拮抗剂在用于评估和治疗心脏疾病,包括心力衰竭的方法中的用途。

[0140] 根据本公开内容的该方面和其他方面的组合物的实施方案的实施可以包括以下特征中的一个或更多个。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂包括4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50种miR拮抗剂或者在由上述值中任何两个所限定的范围内的多种拮抗剂。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂包括选自以下中的一种或更多种:miR-99a拮抗剂、miR-100-5p拮抗剂、miR-Let-7a-5p拮抗剂、miR-Let-7c-5p拮抗剂及其组合。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂包括一种或更多种miR-99a拮抗剂、一种或更多种miR-100-5p拮抗剂、一种或更多种miR-Let-7a-5p拮抗剂和一种或更多种miR-Let-7c-5p拮抗剂。在一些实施方案中,在多种miR拮抗剂中,每种miR拮抗剂组的数量相同。在一些实施方案中,在多种miR拮抗剂中,每种miR拮抗剂组的数量不相同。

[0141] 因此,在一些实施方案中,多种miR拮抗剂包括至少一种miR拮抗剂,所述至少一种miR拮抗剂包含与本文公开的miR拮抗剂中的一种或更多种具有或具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或这些值中任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。例如,在一些实施方案中,miR拮抗剂包含以下或由以下组成:与本文公开的miR拮抗剂中一种或更多种具有至少约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%或更多序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,miR拮抗剂包含以下或由以下组成:与本文公开的miR拮抗剂中的一种或更多种具有至少约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%或更多序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,miR拮抗剂包含以下或由以下组成:与本文公开的miR拮抗剂中一种或更多种具有约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约100%或这些值中任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。

[0142] 在一些实施方案中,一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包括反义miR-99a,该反义miR-99a包含与选自由SEQ ID NO 47、48、50、52和54组成的组的序列具有至少约或具有约80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-100-5p,该反义miR-100-5p包含与选自由SEQ ID NO46、49、51、53和55组成的组的序列具有至少约或具有约80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7a-5p,该反义miR-Let-7a-5p包含与选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的序列具有至少约或具有约80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7c-5p,该反义miR-Let-7c-5p包含与选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的序列具有至少约或具有约80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%或100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。

[0143] 在本文公开的组合物的一些实施方案中,以下的一项或更多项适用。在一些实施方案中,一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包括反义miR-99a,该反义miR-99a包含相对于选自由SEQ ID NO:47、48、50、52和54组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-100-5p,该反义miR-100-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:46、49、51、53和55组成

的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7a-5p,该反义miR-Let-7a-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7c-5p,该反义miR-Let-7c-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的序列具有一个或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。

[0144] 在一些实施方案中,多种miR拮抗剂包括至少一种miR拮抗剂,该至少一种miR拮抗剂包含相对于本文公开的miR拮抗剂中的一种或更多种的核苷酸序列具有或具有约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或这些值中的任何两个之间的范围的错配的核碱基的核苷酸序列。例如,在一些实施方案中,miR拮抗剂包含以下或由以下组成:相对于本文公开的miR拮抗剂中的一种或更多种的核苷酸序列具有至少约1、至少约2、至少约3、至少约4、至少约5或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,miR拮抗剂包含以下或由以下组成:相对于本文公开的miR拮抗剂中一种或更多种的核苷酸序列具有至少约6、至少约7、至少约8、至少约9、至少约10或更多个错配的核碱基的核苷酸序列。

[0145] 因此,在一些实施方案中,一种或更多种miR-99a拮抗剂中的至少一种包括反义miR-99a,该反义miR-99a包含相对于选自由SEQ ID NO:47、48、50、52和54组成的组的核苷酸序列具有或具有约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或这些值中的任何两个之间的范围的错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种miR-100-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-100-5p,该反义miR-100-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:46、49、51、53和55组成的组的核苷酸序列具有或具有约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或这些值中的任何两个之间的范围的错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7a-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7a-5p,该反义miR-Let-7a-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:37、39和40-45组成的组的核苷酸序列具有或具有约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或这些值中的任何两个之间的范围的错配的核碱基的核苷酸序列。在一些实施方案中,一种或更多种Let-7c-5p拮抗剂中的至少一种包括反义miR-Let-7c-5p,该反义miR-Let-7c-5p包含相对于选自由SEQ ID NO:36、38和40-45组成的组的核苷酸序列具有或具有约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或这些值中的任何两个之间的范围的错配的核碱基的核苷酸序列。

[0146] 在本文公开的组合物各种实施方案中,反义miR中的至少一种包括本文描述的一种或更多种化学修饰。合适的化学修饰包括但不限于对核碱基、糖和/或核苷间连接的修饰。由于期望的性质诸如例如增强的细胞摄取、增强的对其他寡核苷酸或核酸靶的亲和力和在核酸酶存在下增强的稳定性,修饰的核碱基、糖和/或核苷间连接可以相对于未修饰的形式选择。因此,在本文公开的组合物的一些实施方案中,反义miR中的至少一种包括选自由以下组成的组的一种或更多种化学修饰:修饰的核苷间连接、修饰的核苷酸和修饰的糖部分及其组合。

[0147] 在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰包括修饰的核苷间连接。通常,修饰的核苷间连接可以是本领域已知的任何核苷间连接。合适的修饰的核苷间连接的非限制性实例包括硫代磷酸酯、2'-O-甲氧基乙基(MOE)、2'-氟代、烷基磷酸酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酸酯、羧甲基酯及其组合。在一些实施方案中,修饰的核苷间连接包括磷原子。在一些实施方案中,修饰的核苷间连接不包

含磷原子。在某些这样的实施方案中,核苷间连接由短链烷基核苷间连接形成。在某些这样的实施方案中,核苷间连接由环烷基核苷间连接形成。在某些这样的实施方案中,核苷间连接由混合的杂原子和烷基核苷间连接形成。在某些这样的实施方案中,核苷间连接由混合的杂原子和环烷基核苷间连接形成。在某些这样的实施方案中,核苷间连接由一个或更多个短链杂原子核苷间连接形成。在某些这样的实施方案中,核苷间连接由一个或更多个杂环核苷间连接形成。在某些这样的实施方案中,核苷间连接具有酰胺主链。在某些这样的实施方案中,核苷间连接具有混合的N、O、S和CH₂组成部分。在一些实施方案中,反义miR中的至少一种包括修饰的核苷间连接,所述修饰的核苷间连接为硫代磷酸酯核苷间连接。

[0148] 在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰中的至少一种包括修饰的核苷酸。修饰的核苷酸通常可以是任何修饰的核苷酸,并且可以是例如锁核酸(LNA)化学修饰、肽核酸(PNA)、阿拉伯糖核酸(FANA)、其类似物、衍生物或组合。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含5-甲基胞嘧啶。在一些实施方案中,修饰的核苷酸选自5-羟甲基胞嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤。在某些实施方案中,修饰的核苷酸选自7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟苷、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。在某些实施方案中,修饰的核苷酸选自5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包含多环杂环。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包含三环杂环。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包含吩噻嗪衍生物。在某些实施方案中,吩噻嗪可以被进一步修饰以形成本领域中已知的为G-钳夹(G-clamp)的核碱基。

[0149] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸包括锁核酸(LNA)。在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰包括至少一种锁核酸(LNA)化学修饰,以增强效力、特异性和作用的持续时间,并拓宽寡核苷酸的施用途径。这可以通过用LNA核碱基取代碱基核苷酸序列中的一些核碱基来实现。LNA修饰的核苷酸序列可以具有与亲本核碱基相似的大小,或者可以更大或优选地更小。在一些实施方案中,LNA修饰的核苷酸序列含有少于约70%、少于约65%、更优选少于约60%、少于约55%、最优选少于约50%、少于约45%的LNA核碱基,并且它们的大小在约5和25个核苷酸之间,更优选在约12和20个核苷酸之间。在一些实施方案中,锁核酸(LNA)被掺入到修饰的反义miR的一端或两端。

[0150] 在一些实施方案中,一种或更多种化学修饰包括至少一种修饰的糖部分。在一些实施方案中,糖修饰的核苷是2'-修饰的核苷,其中糖环在天然核糖或2'-脱氧核糖的2'碳处被修饰。在一些实施方案中,2'-修饰的核苷具有双环糖部分。在某些这样的实施方案中,双环糖部分是 α 构型的D糖。在某些这样的实施方案中,双环糖部分是 β 构型的D糖。在某些这样的实施方案中,双环糖部分是 α 构型的L糖。在某些这样的实施方案中,双环糖部分是 β 构型的L糖。

[0151] 在一些实施方案中,双环糖部分包含2'和4'碳原子之间的桥基。在某些这样的实施方案中,桥基包含1至8个连接的双自由基基团。在某些实施方案中,双环糖部分包含1至4个连接的双自由基基团。在某些实施方案中,双环糖部分包含2或3个连接的双自由基基团。在某些实施方案中,双环糖部分包含2个连接的双自由基基团。在某些实施方案中,连接的双自由基基团选自-O-、-S-、-N(R₁)-、-C(R₁)(R₂)-、-C(R₁)=C(R₁)-、-C(R₁)=N-、-C(=NR₁)-、-Si(R₁)(R₂)-、-S(=O)₂-、-S(=O)-、-C(=O)-和-C(=S)-;其中每个R₁和R₂独立地是H、羟基、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的

C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、C₅-C₇脂环基、取代的C₅-C₇脂环基、卤素、取代的氧基(-O-)、氨基、取代的氨基、叠氮基、羧基、取代的羧基、酰基、取代的酰基、CN、硫醇、取代的硫醇、磺酰基(S(=O)₂-H)、取代的磺酰基、亚磺酰基(S(=O)-H)或取代的亚磺酰基；并且每个取代基基团独立地是卤素、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、氨基、取代的氨基、酰基、取代的酰基、C₁-C₁₂氨基烷基、C₁-C₁₂氨基烷氧基、取代的C₁-C₁₂氨基烷基、取代的C₁-C₁₂氨基烷氧基或保护基。

[0152] 在一些实施方案中，双环糖部分用选自以下的双自由基在2'和4'碳原子之间桥接：-O-(CH₂)_p-、-O-CH₂-、-O-CH₂CH₂-、-O-CH(烷基)-、-NH-(CH₂)_p-、-N(烷基)-(CH₂)_p-、-O-CH(烷基)-、-(CH(烷基))-(CH₂)_p-、-NH-O-(CH₂)_p-、-N(烷基)-O-(CH₂)_p-或-O-N(烷基)-(CH₂)_p-，其中p是1、2、3、4或5并且每个烷基基团可以被进一步取代。在某些实施方案中，p是1、2或3。

[0153] 在一些实施方案中，2'-修饰的核苷包含选自以下的2'-取代基：卤代、烯丙基、氨基、叠氮基、SH、CN、OCN、CF₃、OCF₃、O-、S-或N(R_m)-烷基；O-、S-或N(R_m)-烯基；O-、S-或N(R_m)-炔基；O-亚烷基-O-烷基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基、O-芳烷基、O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)或O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)，其中每个R_m和R_n独立地是H、氨基保护基团或取代的或未取代的C₁-C₁₀烷基。这些2'-取代基可以进一步被独立选自羟基、氨基、烷氧基、羧基、苄基、苯基、硝基(NO₂)、硫醇、硫代烷氧基(S-烷基)、卤素、烷基、芳基、烯基和炔基的一个或更多个取代基取代。

[0154] 在一些实施方案中，2'-修饰的核苷包含选自以下的2'-取代基：F、NH₂、N₃、OCF₃、O-CH₃、O(CH₂)₃NH₂、CH₂-CH=CH₂、O-CH₂-CH=CH₂、OCH₂CH₂OCH₃、O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、-O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂和N-取代的乙酰胺(O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n))，其中每个R_m和R_n独立地是H、氨基保护基团或取代的或未取代的C₁-C₁₀烷基。

[0155] 在一些实施方案中，2'-修饰的核苷包含选自以下的2'-取代基：F、OCF₃、O-CH₃、OCH₂CH₂OCH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂、O(CH₂)₂O(CH₂)₂N-(CH₃)₂和O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃。

[0156] 在一些实施方案中，2'-修饰的核苷包含选自以下的2'-取代基：F、O-CH₃和OCH₂CH₂OCH₃。

[0157] 在一些实施方案中，糖修饰的核苷是4'-硫代修饰的核苷。在某些实施方案中，糖修饰的核苷是4'-硫代-2'-修饰的核苷。4'-硫代修饰的核苷具有其中4'-O被4'-S替代的β-D-核糖核苷。4'-硫代-2'-修饰的核苷是2'-OH被2'-取代基替代的4'-硫代修饰的核苷。合适的2'-取代基包括2'-OCH₃、2'-O-(CH₂)₂-OCH₃和2'-F。

[0158] 因此，在本公开内容的一些实施方案中，修饰的糖部分是2'-O-甲氧基乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、双环糖部分或其组合。在一些实施方案中，修饰的糖部分包括2'-O-甲基糖部分。

[0159] 表达盒

[0160] 在一些实施方案中，本文描述的miR拮抗剂中一种或更多种由表达盒编码和表达。因此，在一个方面，本公开内容的一些实施方案涉及表达盒，该表达盒包括编码本文描述的一种或更多种miR拮抗剂的核苷酸序列。如本文使用的，“表达”指通过转录将多核苷酸的遗

传信息转化为RNA的过程,该过程通常由酶RNA聚合酶催化,并且在RNA编码多肽的情况下,通过在核糖体上的mRNA的翻译将多核苷酸转化为蛋白以产生编码的蛋白。如本文使用的术语“表达盒”指编码基因、蛋白或功能性RNA的核酸构建体,所述核酸构建体可操作地连接到表达控制元件诸如启动子,和任选地影响基因的转录或翻译的任何其他核酸序列或其组合,诸如但不限于转录终止子、核糖体结合位点、剪接位点或剪接识别序列、内含子、增强子、聚腺苷酸化信号、内部核糖体进入位点等。

[0161] 克隆载体和表达载体

[0162] 在相关方面,本文描述的miR拮抗剂中的一种或更多种可以由克隆载体或表达载体编码和/或表达。因此,本申请的一些实施方案涉及包括本文公开的表达盒的克隆载体或表达载体。如本文使用的,术语“载体”指用于将遗传物质传递给宿主细胞的核酸构建体,通常是质粒或病毒。载体可以是例如病毒、质粒、粘粒或噬菌体。如本文使用的载体可以由DNA或RNA构成。在一些实施方案中,载体由DNA构成。在一些实施方案中,载体由RNA构成。术语“载体”包括克隆载体和表达载体,以及病毒载体和整合载体。“表达载体”是当其存在于合适的环境中时,能够指导由载体携带的基因或由一个或多个基因编码的蛋白的表达的载体。载体优选能够自主复制。通常,表达载体包含转录启动子、基因和转录终止子。基因表达通常置于启动子的控制之下,并且称基因与启动子“可操作地连接”。

[0163] 因此,在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包括表达盒,该表达盒包括编码本文描述的一种或更多种miR拮抗剂的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包括表达盒,该表达盒包括编码一种或更多种miR-99a拮抗剂、一种或更多种miR-100-5p拮抗剂、一种或更多种miR-Let-7a-5p拮抗剂和一种或更多种miR-Let-7c-5p拮抗剂的核苷酸序列。

[0164] 在一些实施方案中,克隆载体或表达载体是病毒载体。如本文使用的,“病毒载体”是能够将另一种核酸转运到细胞中的病毒衍生的核酸分子。当病毒载体存在于合适的环境中时,病毒载体能够指导由载体携带的基因、一个或多个基因编码的一种或更多种蛋白的表达。病毒载体的实例包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体和腺相关病毒载体。

[0165] 因此,在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体或腺相关病毒(AAV)载体或任何血清型。如本文使用的,术语“血清型(serotype)”或“血清变型(serovar)”是细菌或病毒物种内或不同个体的免疫细胞间的不同变异。这些微生物、病毒或细胞基于它们的细胞表面抗原被分类在一起,允许将生物体的流行病学分类到亚物种水平。通常,AAV载体可以是任何现有的AAV载体,并且可以是例如选自以下组成的组:血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9和10或由其衍生的嵌合AAV,这将甚至更好地适合于感兴趣组织中的高效转导。转染后,AAV在宿主中只引发轻微的免疫反应(如果有的话)。因此,AAV载体非常适合基因治疗方法。据报道,对于小鼠中的转导,AAV血清型6和AAV血清型9是特别合适的。对于向人类的基因转移,AAV血清型1、6、8和9通常是优选的。还假设AAV包装治疗性基因的能力被限制在大约4.9kb,而较长的序列导致AAV颗粒的截断。在一些实施方案中,AAV载体是AAV2/9载体,例如交叉包装到AAV衣壳中的AAV2反向末端重复(ITR)序列。

[0166] 在一些实施方案中,本文公开了克隆载体或表达载体,该克隆载体或表达载体与本文公开的载体中的一种或更多种具有或具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%、100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性。例如,在一些实施方案中,克隆载体或表达载体包含以下或由以下组成:与JBT-miR1的完整序列(SEQ ID NO:85)具有至少约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%或更多序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,载体包含以下或由以下组成:与JBT-miR2的核苷酸序列具有至少约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%或更多序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,载体包含以下或由以下组成:与JBT-miR1的完整序列(SEQ ID NO:85)或JBT-miR 2具有约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。

[0167] 在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包括与SEQ ID NO:59-64中列出的核苷酸序列中的每一个具有或具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包括与SEQ ID NO:86-89中列出的核苷酸序列中的每一个具有或具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包括与SEQ ID NO:59-64和SEQ ID NO:86-89中列出的核苷酸序列中的每一个具有或具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文公开的克隆载体或表达载体包括与SEQ ID NO:8的核苷酸序列具有或具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或这些值中的任何两个之间的范围的序列同一性的核苷酸序列。

[0168] 治疗性组合物和药物制剂

[0169] 在另一方面,本文公开了治疗性组合物的实施方案,该治疗性组合物包括有效量的至少一种治疗剂和以下的一种或更多种:a)包含本文公开的多种微小RNA(miR)拮抗剂的组合物;b)本文公开的表达盒;和本文公开的克隆或表达载体。

[0170] 虽然这些剂可以作为原料施用,但是考虑到它们的效力,优选将其作为药物制剂呈现。因此,在本文公开的组合物的一些实施方案中,组合物还被配制成药物制剂。如本文使用的术语“药物制剂”指适于施用至个体的包括药剂的组合物。例如,根据本公开内容的一些方面和实施方案的药物制剂可以包含本文公开的反义miR拮抗剂和无菌水溶液。例如,用于人类使用的本公开内容的药物制剂包含该剂以及一种或更多种可接受的载体和任选的其他治疗性成分。载体必须在与制剂的其他成分相容的意义上是“可接受的”,并且对其受体无害或对活性剂的抑制功能无害。理想的是,药物制剂不应包括氧化剂和已知与剂不相容的其他物质。

[0171] 因此,本文公开的一些实施方案涉及包括本文描述的治疗性组合物和药学上可接受的载体的药物制剂。制剂还可以包含另外的成分,诸如稀释剂、稳定剂、赋形剂和佐剂。如本文使用的,“药学上可接受的”载体、赋形剂、稀释剂、佐剂或稳定剂是以所用剂量和浓度对暴露于其的细胞或受试者无毒的那些(优选惰性的),或者具有由熟练的专业人员确定的可接受的毒性水平的那些。

[0172] 缓冲剂也可以包括在药物制剂中,以为制剂提供合适的pH值。合适的这样的材料

包括磷酸钠和乙酸盐。氯化钠或甘油可用于使制剂与血液等渗。如果需要,制剂可以在惰性气氛诸如氮气下填充到容器中,或者可以含有抗氧化剂,并且方便地以单位剂量或多剂量形式存在,例如在密封安瓿中。

[0173] 载体、稀释剂和佐剂可以包括抗氧化剂,诸如抗坏血酸;低分子量多肽(例如,少于约10个残基);蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如TweenTM、PluronicTM或聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中,生理学上可接受的载体是水性pH缓冲溶液。

[0174] 通常,本文公开的药物制剂可以通过本领域已知的任一种方法和技术制备。例如,固体剂型可以通过湿法制粒、干法制粒、直接压片等制备。在一些实施方案中,本公开内容的固体剂型可以被包衣或以其他方式复合以提供赋予延长作用的优势的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内部剂量组分和外部剂量组分,后者呈在前者上的包封(envelope)的形式。在一些实施方案中,两种组分可以通过肠溶层被分开,该肠溶层用以抵抗在胃中崩解并且允许内部组分完整通过进入十二指肠中或延迟释放。在这些情况中,多种材料可以被用于这样的肠溶层或包衣,这样的材料包括大量聚合的酸以及聚合的酸与如虫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素的这样材料的混合物。

[0175] 待施用的表达载体和/或一种或更多种miRNA拮抗剂的滴度将根据例如特定的表达载体、施用模式、治疗目标、个体和被靶向的细胞类型而变化,并且可以通过本领域中的标准方法来确定。

[0176] 对于本领域普通技术人员来说明显的是,待施用的表达载体和/或一种或更多种miRNA拮抗剂的适用的体内剂量和特定施用模式将根据年龄、体重、痛苦的严重程度和所治疗的动物物种、所使用的特定表达载体以及使用表达载体和/或一种或更多种miRNA拮抗剂的具体用途而变化。有效剂量水平,即实现期望结果所需的剂量水平的确定可以由本领域普通技术人员使用常规药理学方法来完成。通常,产品的人类临床应用开始于较低的剂量水平,剂量水平增加,直到达到期望的效果。可选地,可接受的体外研究可以用于建立使用已建立的药理学方法通过本方法鉴定的组合物的适用剂量和施用途径。

[0177] 例如,剂量方案可被调节以提供最佳期望应答。例如,可以施用单次剂量,或可以随时间施用多个分次剂量,或者剂量可以如治疗情境的迫切需求指示的按比例减少或增加。为了容易施用和剂量的一致性,以剂量单位形式配制胃肠外组合物和制剂是特别有利的。如本文使用的剂量单位形式指适于作为用于待被治疗的哺乳动物受试者的单一剂量的物理上的分散单位;每一个单位含有被计算与所需的药物载体一起产生期望的治疗效果的预先确定的量的活性化合物。本公开内容的剂量单位形式的规格由以下决定并直接取决于以下:(a) 治疗剂的独特特性和要达到的特定治疗或预防效果,以及(b) 混合这样的活性化合物用于治疗个体的敏感性的技术中固有的局限性。

[0178] 因此,技术人员将理解,基于本文提供的公开内容,剂量和给药方案根据治疗领域周知的方法调整。即,最大可耐受剂量可以被容易地确定,并且向患者提供可检测的治疗益处的有效量也可以被确定,如向患者提供可检测的治疗益处而施用每种剂的时间要求可以被确定。因此,虽然在本文中举例说明了某个剂量和施用方案,这些实例绝不限在实践本

公开内容时可以被提供至患者的剂量和施用方案。

[0179] 应注意到,剂量值可以随着待被减轻的状况的类型和严重性变化,并且可以包括单剂量或多剂量。还应理解,对于任何特定受试者,具体剂量方案应根据个体需要和施用组合物或监督组合物的施用的人士的专业判断随时间调整,并且本文列出的剂量范围仅是示例性的并且不意图限制所要求保护的组合物的范围或实践。例如,剂量可以基于药代动力学或药效学参数调整,所述参数可以包括临床作用诸如毒性作用和/或实验值。因此,本公开内容涵盖如技术人员确定的患者内的剂量递增(intra-patient dose-escalation)。确定治疗剂的适当剂量和施用方案是相关技术领域周知的并且将被理解为一旦提供了本文公开的教导,则由技术人员掌握。

[0180] 本文公开的表达载体和/或miRNA拮抗剂可施用于有需要的受试者(例如人类)。施用途没有特别限制。例如,治疗有效量的重组病毒可以通过本领域的标准途径施用于受试者。途径的非限制性实例包括肌内、阴道内、静脉内、腹膜内、皮下、表皮、皮内、直肠、眼内、肺、颅内、骨内、口腔、经颊或经鼻。在一些实施方案中,重组病毒通过肌内注射施用于受试者。在一些实施方案中,重组病毒通过阴道内注射施用于受试者。在一些实施方案中,表达载体和/或miRNA拮抗剂通过肠胃外途径(例如,通过静脉内、肌内或皮下注射)、通过表面划痕(surface scarification)或通过接种到受试者的体腔中而施用于受试者。在一些实施方案中,表达载体和/或miRNA拮抗剂被施用到肌细胞,诸如心肌细胞。

[0181] 当通过注射施用这些小miR寡核苷酸拮抗剂时,施用可以通过连续输注,或者通过单次或多次推注来进行。施用的miR拮抗剂的剂量将根据诸如患者的年龄、体重、性别、一般医疗状况和既往病史等因素而变化。通常,希望向受体提供在从约1pg/kg至10mg/kg(剂的量/患者的体重)的范围内的分子的剂量,但也可以施用更低或更高的剂量。

[0182] 在一些实施方案中,可能希望将治疗剂靶向递送到心脏,同时限制治疗剂递送到其他器官。这可以通过本领域已知的多种方法中的任一种来完成。在一些实施方案中,将本文描述的治疗性组合物或药物制剂递送到心脏包括冠状动脉输注。在某些实施方案中,冠状动脉输注涉及将导管插入通过股动脉并将导管穿过主动脉到达冠状动脉的起点。在又一些其他实施方案中,将治疗剂靶向递送到心脏涉及使用抗体-鱼精蛋白融合蛋白,诸如先前描述的那些(Song E等人,Nature Biotechnology,2005),以递送本文公开的小miR寡核苷酸拮抗剂。

[0183] 表达载体和/或miRNA拮抗剂的实际施用可以通过使用将表达载体和/或miRNA拮抗剂转运到受试者的靶组织中的任何物理方法来完成。例如,表达载体和/或miRNA拮抗剂可以被注射到肌肉、血流和/或直接注射到肝脏中。药物制剂可以被制备成可注射制剂或通过透皮转运递送到肌肉的局部制剂(topical formulation)。

[0184] 对于肌内注射,可以使用于佐剂诸如芝麻油或花生油中或于水性丙二醇中的溶液,以及无菌水溶液。如果需要,这样的水溶液可以被缓冲,并且液体稀释剂首先与盐水或葡萄糖等渗。表达载体和/或miRNA拮抗剂作为游离酸(DNA含有酸性磷酸基团)或药理学上可接受的盐的溶液可以在水中制备,适当地与表面活性剂诸如羟丙基纤维素混合。表达载体和/或miRNA拮抗剂的分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备。在普通贮存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0185] 待使用的表达载体和/或miRNA拮抗剂可以以液体或冷冻干燥形式使用(与一种或

更多种合适的防腐剂和/或保护剂组合,以在冷冻干燥过程中保护病毒)。对于基因疗法(例如,可以通过具体基因产物改善的神经紊乱的基因疗法),向需要这样的治疗的宿主施用治疗有效剂量的表达治疗性蛋白的重组病毒。本文公开的表达载体和/或miRNA拮抗剂在制造用于诱导宿主中的免疫或向宿主提供基因疗法的药物中的用途在本申请的范围內。

[0186] 在表达载体和/或miRNA拮抗剂的人类剂量已经针对至少一些状况被确定的情况中,可以使用那些相同的剂量或在所确定的人类剂量的约0.1%和500%之间,更优选在约25%和250%之间的剂量。在没有确定人类剂量的情况下,如新发现的药物制剂的情况,合适的人类剂量可以从ED₅₀或ID₅₀值或从体外或体内研究获得的其他合适的值推断出来,这些值通过动物中的毒性研究和效力研究获得。

[0187] 治疗有效量的表达载体和/或miRNA拮抗剂可以在不同的时间点施用于受试者。例如,表达载体和/或miRNA拮抗剂可以在被病毒感染之前、期间或之后施用于受试者。表达载体和/或miRNA拮抗剂也可以在疾病(例如癌症)发生之前、期间或之后施用于受试者。在一些实施方案中,表达载体和/或miRNA拮抗剂在癌症缓解期间施用于受试者。在一些实施方案中,表达载体和/或miRNA拮抗剂在被病毒感染之前施用,用于免疫预防。

[0188] 可选地或另外地,表达载体和/或miRNA拮抗剂的给药频率可以变化。例如,表达载体和/或miRNA拮抗剂可以约每周一次、约每两周一次、约每月一次、约每六个月一次、约每年一次、约每两年一次、约每三年一次、约每四年一次、约每五年一次、约每六年一次、约每七年一次、约每八年一次、约每九年一次、约每十年一次、或约每十五年一次施用于受试者。在一些实施方案中,表达载体和/或miRNA拮抗剂每周至多约一次、每两周至多约一次、每月至多约一次、每六个月至多约一次、每年至多约一次、每两年至多约一次、每三年至多约一次、每四年至多约一次、每五年至多约一次、每六年至多约一次、每七年至多约一次、每八年至多约一次、每九年至多约一次、每十年至多约一次、或每十五年至多约一次施用于受试者。

[0189] 在一些实施方案中,提供了药物试剂盒,其中试剂盒包含:前述治疗性组合物和药物制剂中的任一种,以及(a)指示该制剂适用于在心肌细胞,诸如例如心肌细胞中抑制与心脏病相关的基因的功能和/或(b)提供施用药物制剂的指导和书面信息。

[0190] IV. 本公开内容的方法

[0191] 本文公开的一些实施方案涉及用于治疗受试者的心脏疾病的方法。方法包括向受试者施用或提供适于治疗心脏疾病的治疗性组合物,其中(a)治疗性组合物是包含本文公开的多种微小RNA(miR)拮抗剂的组合物;(b)治疗性组合物包含本文公开的表达盒;或(c)治疗性组合物包含本文公开的克隆或表达载体。

[0192] 本公开内容的一些实施方案涉及用于促进受试者的心肌再生的方法。方法包括向受试者施用或提供治疗性组合物,其中(a)治疗性组合物是包含本文公开的多种微小RNA(miR)拮抗剂的组合物;(b)治疗性组合物包含本文公开的表达盒;或(c)治疗性组合物包含本文公开的克隆或表达载体。

[0193] 在一些实施方案中,如本文公开的用于在受试者中治疗心脏疾病或促进心肌再生的方法任选地包括将受试者鉴定或选择为患有或怀疑患有心脏疾病的过程。在一些实施方案中,鉴定或选择的过程在施用所有治疗性组合物和治疗剂或疗法之前进行。在一些实施方案中,鉴定或选择的过程在施用治疗性组合物和治疗剂或疗法中的至少一种之前进行。

[0194] 在一些实施方案中,心脏疾病是心肌梗塞、缺血性心脏病、心力衰竭(例如充血性心力衰竭)、缺血性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、酒精性心肌病、病毒性心肌病、心动过速介导的心肌病、应激诱导的心肌病、淀粉样变心肌病、心律失常性右心室发育不良、左心室致密化不全、心内膜弹力纤维增生症、主动脉狭窄、主动脉返流、二尖瓣狭窄、二尖瓣返流、二尖瓣脱垂、肺动脉狭窄、肺动脉狭窄、肺动脉返流、三尖瓣狭窄、三尖瓣返流、先天性紊乱、遗传性紊乱或其组合。在一些特定实施方案中,心脏疾病是心肌梗塞。在一些其他特定实施方案中,心脏疾病是缺血性心脏病,其中需要心肌再生。在又一些其他特定实施方案中,心脏疾病是杜氏肌营养不良。

[0195] 在另一方面,本文公开了用于调节心肌细胞和/或肌细胞增殖的方法的实施方案。方法包括(1)将治疗性组合物引入心肌细胞中,其中(a)治疗性组合物是包含本文公开的多种微小RNA(miR)拮抗剂的组合物;(b)治疗性组合物包含本文公开的表达盒;或(c)治疗性组合物包含本文公开的克隆或表达载体;和(2)允许从(1)获得的心肌细胞分裂,从而调节心肌细胞或肌细胞的增殖。在一些实施方案中,将治疗性组合物引入心肌细胞中包括用至少一种表达盒或至少一种病毒载体转染心肌细胞和/或肌细胞,所述至少一种表达盒或至少一种病毒载体包含编码多种miR拮抗剂的核酸序列。在一些实施方案中,方法还包括测量心肌细胞和/或肌细胞的增殖。在一些实施方案中,与缺乏编码多种miR拮抗剂的核酸序列的对照心肌细胞和/或肌细胞相比,心肌细胞和/或肌细胞的增殖被增加。

[0196] 在本文公开的方法的一些实施方案中,施用步骤可以在细胞培养物中的细胞上(即离体的)或在活体中的细胞上进行。因此,在一些实施方案中,心肌细胞和/或肌细胞是体内的。在一些其他实施方案中,心肌细胞和/或肌肉是离体的。在一些实施方案中,心肌细胞和/或肌肉是人类受试者的。在一些实施方案中,人类受试者被选择或鉴定为患有心脏疾病。

[0197] 在本文公开的方法的一些实施方案中,在治疗性组合物或药物制剂包括包含编码本文公开的多种miR拮抗剂的核苷酸序列的表达盒或载体的情况下,多种miR拮抗剂可以由一种或更多种表达盒或载体编码。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂由单个表达盒或载体编码。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂由2、3、4、5、6或更多种表达盒或载体编码。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂可以由相同类型的表达盒或载体编码。在一些实施方案中,多种miR拮抗剂可以由不同类型的表达盒或载体编码。

[0198] 在本文公开的方法的一些实施方案中,在治疗性组合物或药物制剂包括克隆载体或表达载体的情况下,载体可以衍生自病毒、质粒、粘粒、噬菌体或其任何组合。在一些实施方案中,载体是整合载体。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体或腺相关病毒(AAV)载体。在一些实施方案中,病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一些实施方案中,病毒载体是AAV2/9载体。

[0199] 在一个方面,本文公开了用于增加心脏细胞的增殖和/或增加参与肌肉结构和/或功能和/或再生的蛋白的表达和/或活性的方法的实施方案。方法包括将(1)治疗性组合物和(2)至少一种另外的治疗剂或疗法的组合与心脏细胞接触或提供给心脏细胞,其中(a)治疗性组合物是包含本文公开的多种微小RNA(miR)拮抗剂的组合物;(b)治疗性组合物包含本文公开的表达盒;或(c)治疗性组合物包含本文公开的克隆或表达载体。在相关方面,本文公开的一些实施方案涉及用于抑制或减少靶微小RNA(miR)的表达的方法。方法包括将

(1) 治疗性组合物和 (2) 至少一种另外的治疗剂或疗法的组合与心脏细胞接触或提供给心脏细胞, 其中 (a) 治疗性组合物是包含本文公开的多种微小RNA (miR) 拮抗剂的组合物; (b) 治疗性组合物包含本文公开的表达盒; 或 (c) 治疗性组合物包含本文公开的克隆或表达载体。在根据前述方面的方法中, 心脏细胞通常可以是任何心脏细胞。适合于本文公开的方法的心脏细胞的非限制性实例包括心脏成纤维细胞、心肌细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞 (VSMC)。在一些实施方案中, 心脏细胞是心肌细胞或骨骼肌细胞。在一些另外的实施方案中, 心脏细胞是心肌细胞。在一些实施方案中, (miR) 靶基因是与心脏疾病相关的基因。

[0200] 在又另一方面, 本文公开了用于治疗肌营养不良 (MD) 紊乱的方法的实施方案, 包括向受试者施用或提供治疗性组合物, 其中 (a) 治疗性组合物是包含本文公开的多种微小RNA (miR) 拮抗剂的组合物; (b) 治疗性组合物包含本文公开的表达盒; 或 (c) 治疗性组合物包含本文公开的克隆或表达载体, 并且其中治疗性组合物的施用与有效量的至少一种另外的治疗剂或至少一种另外的疗法组合进行, 以提供组合疗法。在一些实施方案中, 其中肌营养不良紊乱与肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、腓骨肌萎缩症 (CMT)、先天性肌营养不良 (CMD)、杜氏肌营养不良 (DMD)、埃-德二氏肌营养不良 (EDMD)、遗传性和内分泌性肌病、肌肉代谢疾病、线粒体肌病 (MM)、肌强直性肌营养不良 (MMD)、脊髓-延髓性肌肉萎缩症 (SBMA) 或其组合相关。

[0201] V. 组合疗法

[0202] 在一些实施方案中, 包括本文公开的微小RNA拮抗剂的治疗性组合物和药物制剂可以与一种或更多种另外的治疗剂组合使用, 所述微小RNA拮抗剂诸如序列表中提供的那些、或包括本文公开的微小RNA拮抗剂的组合的那些、或包含编码本文公开的一种或更多种微小RNA拮抗剂的核苷酸序列的表达盒、或包含一种或更多种这样的表达盒的载体。在一些实施方案中, 包括本文公开的微小RNA拮抗剂的治疗性组合物和药物制剂可以与一种或更多种治疗性疗法组合使用, 所述微小RNA拮抗剂诸如序列表中提供的那些、或包括本文公开的微小RNA拮抗剂的组合的那些、或包含编码本文公开的一种或更多种微小RNA拮抗剂的核苷酸序列的表达盒、或包含一种或更多种这样的表达盒的载体。

[0203] 一般来说, 用于肌营养不良的任何药理学或非药理学治疗性方法都可以适当地用作本文公开的方法中的另外的治疗剂和疗法。可以与本文公开的微小RNA拮抗剂、或包括本文公开的微小RNA拮抗剂的组合的组合物或制剂、或包含编码本文公开的一种或更多种微小RNA拮抗剂的核苷酸序列的表达盒、或包含一种或更多种这样的表达盒的载体组合使用的另外的治疗剂和疗法的实例包括但不限于艾地苯醌、依普利酮、VECTTOR、AVI-4658、Ataluren/PTC124/Translarna、BMN044/PRO044、CAT-1004、用于MD的任何基因疗法, 包括微小肌养蛋白AAV基因疗法 (SGT-001)、半乳糖凝集素-1疗法 (SB-002)、LTBB4 (SB-001)、rAAV2.5-CMV-小肌养蛋白、谷氨酰胺、NFKB抑制剂、肌聚糖、 δ (35kDa肌养蛋白相关糖蛋白)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 表达、通过CRISPR/Cas9系统进行的基因组编辑、旨在再引入功能性重组形式的肌养蛋白基因的任何基因递送疗法、外显子跳跃治疗剂、无义突变的通读策略、基于细胞的疗法、肌养相关蛋白的上调、肌生成抑制蛋白的抑制、抗炎剂/抗氧化剂、机械支持装置、用于肌营养不良的任何标准疗法及其组合。

[0204] 适用于本公开内容的方法的另外的治疗剂还包括但不限于抗血小板疗法、血栓溶解、原发性血管成形术、肝素 (heparin)、硫酸镁、胰岛素、阿司匹林 (aspirin)、降胆固醇药

物、血管紧张素受体阻滞剂 (ARB) 和血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂。具体地说,当用于治疗患有慢性心力衰竭和高危急性心肌梗塞患者时,ACE抑制剂有明显的益处;这可能是因为它们抑制血管紧张素II产生炎性细胞因子。另外的治疗剂和疗法的非限制性列表包括ACE抑制剂,诸如卡托普利 (Captopril)、依那普利 (Enalapril)、赖诺普利 (Lisinopril) 或喹那普利 (Quinapril);血管紧张素II受体阻断剂,诸如缬沙坦 (Valsartan); β -阻断剂,诸如卡维地洛 (Carvedilol)、美托洛尔 (Metoprolol) 和比索洛尔 (bisoprolol);血管扩张剂(通过NO),诸如肼屈嗪 (Hydralazine)、二硝酸异山梨醇酯和单硝酸异山梨醇酯;他汀类 (Statins),诸如辛伐他汀 (Simvastatin)、阿托伐他汀 (Atrovastatin)、氟伐他汀 (Fluvastatin)、洛伐他汀 (Lovastatin)、瑞舒伐他汀 (Rosuvastatin) 或普伐他汀 (pravastatin);抗凝药物,诸如阿司匹林、华法林 (Warfarin) 或肝素;或变力剂 (Inotropic agent),诸如多巴酚丁胺 (Dobutamine)、多巴胺 (Dopamine)、米力农 (Milrinone)、氨利酮 (Amrinone)、硝普钠 (Nitroprusside)、硝酸甘油 (Nitroglycerin) 或奈西利肽 (nesiritide);强心苷 (Cardiac Glycosides),诸如地高辛 (Digoxin);抗心律失常剂,诸如钙通道抑制剂,例如维拉帕米 (Verapamil) 和地尔硫卓 (Diltiazem) 或III类抗心律失常剂,例如胺碘酮 (Amiodarone)、索他洛尔 (Sotalol) 或多非利特 (defetilide);利尿剂,诸如环利尿剂 (Loop diuretics),例如呋塞米 (Furosemide)、布美他尼 (Bumetanide) 或托拉塞米 (Torsemide),噻嗪类利尿剂,例如氢氯噻嗪 (hydrochlorothiazide)、醛固酮拮抗剂,例如螺内酯 (Spironolactone) 或依普利酮。可选地或另外地,心脏疾病的其他治疗也是合适的,诸如起搏器、除颤器、机械循环支持,诸如反搏装置 (主动脉内球囊泵或非侵入性反搏)、心肺辅助装置或左心室辅助装置;外科手术,诸如心脏移植、心肺移植或心肾移植;或免疫抑制剂,诸如霉酚酸酯、硫唑嘌呤 (Azathioprine)、环孢菌素 (Cyclosporine)、西罗莫司 (Sirolimus)、他克莫司 (Tacrolimus)、皮质类固醇抗胸腺细胞球蛋白,例如胸腺球蛋白 (Thymoglobulin) 或ATGAM、OKT3、IL-2受体抗体,例如巴利昔单抗 (Basiliximab) 或达利珠单抗 (Daclizumab) 也是合适的。

[0205] 在一些实施方案中,另外的治疗剂或疗法中的至少一种包括生物药物。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂或疗法包含基因疗法或治疗性基因调节剂。如本文使用的,治疗性基因调节指在不同阶段中的一个阶段改变基因的表达的实践,目的是减轻某种形式的病痛。它不同于基因疗法,因为基因调节寻求改变内源性基因的表达,例如通过引入编码新调节蛋白的基因,而基因疗法涉及引入其产物直接帮助受体的基因。基因表达的调节可以在转录水平上由DNA结合剂介导,该DNA结合剂可以是例如人工转录因子、小分子或合成寡核苷酸。可选地或另外地,它也可以通过RNA干扰在转录后介导。

[0206] 本文公开的治疗性组合物、药物制剂和另外的治疗剂或疗法可以被配制成适合特定预期用途的最终药物制剂。在一些实施方案中,治疗性组合物和另外的治疗剂或疗法以单一制剂被施用。在一些实施方案中,治疗性组合物和另外的治疗剂或疗法中的每一种以单独的制剂被施用。在本文公开的方法的一些实施方案中,治疗性组合物和/或另外的治疗剂或疗法以单个剂量被施用于受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物和/或另外的治疗剂或疗法以多个剂量被施用于受试者。在一些实施方案中,剂量彼此相等。在一些实施方案中,剂量彼此不同。在一些实施方案中,治疗性组合物和/或另外的治疗剂或疗法以随着时间逐渐增加的剂量被施用于受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物和/或另外的治疗

剂或疗法以随着时间逐渐减少的剂量被施用。

[0207] 治疗性组合物和药物制剂与一种或更多种另外的治疗剂或疗法的施用顺序可以变化。在一些实施方案中,本文公开的治疗性组合物或药物制剂可以在施用所有另外的治疗剂或疗法之前被施用。在一些实施方案中,本文公开的治疗性组合物或药物制剂可以在至少一种另外的治疗剂或疗法之前被施用。在一些实施方案中,本文公开的治疗性组合物或药物制剂与一种或更多种另外的治疗剂或疗法可以被相伴施用。在又一个其他实施方案中,本文公开的治疗性组合物或药物制剂可以在施用至少一种另外的治疗剂或疗法之后被施用。在一些实施方案中,本文公开的治疗性组合物或药物制剂可以在施用所有另外的治疗剂或疗法之后被施用。在又一些实施方案中,本文公开的治疗性组合物或药物制剂和至少一种另外的治疗剂或疗法被轮流施用(例如,循环疗法)。例如,在一些实施方案中,本文公开的治疗性组合物或药物制剂和至少一种另外的治疗剂或疗法被循环地施用于受试者。循环疗法涉及施用第一活性剂或疗法持续一段时间,随后施用第二活性剂或疗法持续一段时间,并重复这种顺序施用。循环疗法可以减少对一种或更多种疗法的耐受性的发展、避免或减少一种或更多种疗法的副作用、和/或提高治疗效力。

[0208] 在一些实施方案中,间歇疗法是连续疗法的替代方案。例如,间歇疗法可以使用持续6个月的时间段,然后停止6个月的时间段。在一些实施方案中,一种或更多种治疗剂或疗法被提供持续一个月,随后停止一个月。在一些实施方案中,一种或更多种治疗剂或疗法被提供持续三个月,随后停止三个月。因此,如上所述,本文公开的治疗性组合物或药物制剂中的一种或更多种可以在施用一种或更多种另外的治疗剂或疗法之前、期间和/或之后提供。

[0209] 在本说明书中提到的所有出版物和专利申请通过引用并入本文,其程度与每个单独出版物或专利申请被具体地和单独地指示通过引用并入的程度相同。

[0210] 没有承认本文引用的任何参考文献构成现有技术。对参考文献的讨论陈述了它们的作者的主张,并且申请人保留对引用文件的准确性和相关性提出质疑的权利。将清楚地理解,尽管在本文中提及了许多信息来源,包括科学期刊文章、专利文件和教科书,但该参考文献并不构成对任何这些文件形成本领域公知常识的部分的承认。

[0211] 本文给出的一般方法的讨论仅用于说明目的。阅读本公开内容后,其他替代方法和替代方案对本领域技术人员来说将是明显的,并且将包括在本申请的精神和范围内。

实施例

[0212] 另外的实施方案在以下实施例中进一步详细地公开,这些实施例不意图以任何方式限制本公开内容或权利要求的范围。

[0213] 实施例1

[0214] 用于特定微小RNA的抑制性寡核苷酸的设计

[0215] 该实施例证明了可用作miR-99a-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p和Let-7c-5p的拮抗剂的合成寡核苷酸的设计和组成。

[0216] 分析了以下人类微小RNA的核苷酸序列:miR-99a-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p和Let-7c-5p。这些微小RNA的序列和互补拮抗剂的序列在下表5中示出。粗体突出显示的碱基对应于let-7a-5p和let-7c-5p之间的碱基差异、或miR-99a-5p和miR-100-5p之间的碱基差

异。所有微小RNA的种子序列通常被认为是从5'端开始的碱基2-8。不希望受任何特定理论的束缚,微小RNA的种子序列中的核碱基被认为是对决定哪些mRNA将被微小RNA靶向做出最大贡献的碱基。在下表5中列出的序列中,种子序列用下划线标出。

[0217] 表5:人类miR-99-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p和Let-7c-5p的核苷酸序列以及可以被掺入到任何合适的载体(例如用于心肌生成的病毒载体)中的互补的抑制序列。

[0218]

>hsa-let-7a-5p MIMAT0000062 5'-UGA <u>GGU AGU</u> AGG UUG UAU <u>AGUU</u> -3' 正义 (SEQ ID NO: 1) 3'-ACU CCA UCA UCC AAC AUA <u>UCAA</u> -5' 反义 (SEQ ID NO: 2)	
>hsa-let-7c-5p MIMAT0000064 5'-UGA <u>GGU AGU</u> AGG UUG UAU <u>GGUU</u> -3' 正义 (SEQ ID NO: 3) 3'-ACU CCA UCA UCC AAC AUA <u>CCAA</u> -5' 反义 (SEQ ID NO: 4)	
>hsa-miR-99a-5p MIMAT0000097 5'- <u>AAC CCG UAG</u> AUC CGA <u>UCU</u> UGUG-3' 正义 (SEQ ID NO: 5) 3'-UUG GGC AUC UAG GCU <u>AGA</u> ACAC-5' 反义 (SEQ ID NO: 6)	
>hsa-miR-100-5p MIMAT0000098 5'- <u>AAC CCG UAG</u> AUC CGA <u>ACU</u> UGUG-3' 正义 (SEQ ID NO: 7) 3'-UUG GGC AUC UAG GCU <u>UGA</u> ACAC-5' 反义 (SEQ ID NO: 8)	

[0219] 为了进一步评估序列保守性,还检查了来自不同哺乳动物物种的对应微小RNA同源物。如下表6所示,观察到来自不同哺乳动物物种的miR-99a-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p和Let-7c-5p的核苷酸序列显示出高度的序列同源性。Let-7a-5p的核苷酸序列跨所分析的所有物种100%同源。Let-7c-5p的核苷酸序列跨所分析的所有物种也100%同源。来自狗的miR-99a-5p序列缺少核碱基#,否则所有其他序列都是同源的。狗丢失了miR-100miRNA,否则所有其他序列都是同源的。

[0220] 表6:miR-99a-5p、miR-100-5p、Let-7a-5p和Let-7c-5p同源物的序列同源性。Dre:斑马鱼(Danio rerio)(斑马鱼(zebrafish))、Hsa:智人(Homo sapiens)(人类(human))、Ptr:黑猩猩(Pan troglodytes)(黑猩猩(chimpanzee))、Cfa:家犬(Canis familiaris)(狗(dog))、Ssc:野猪(Sus scrofa)(小型猪(minipig))、Rno:褐家鼠(Rattus norvegicus)(大鼠(rat))、Mmu:小家鼠(Mus musculus)(小鼠(mouse))。

[0221]

dre-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	(SEQ ID NO: 9)
mmu-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	(SEQ ID NO: 10)
rno-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	(SEQ ID NO: 11)
ssc-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	(SEQ ID NO: 12)
ptr-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	(SEQ ID NO: 13)
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	(SEQ ID NO: 14)
cfa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	(SEQ ID NO: 15)
dre-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	(SEQ ID NO: 16)
mmu-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	(SEQ ID NO: 17)
rno-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	(SEQ ID NO: 18)
ssc-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	(SEQ ID NO: 19)
ptr-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	(SEQ ID NO: 20)
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	(SEQ ID NO: 21)
cfa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	(SEQ ID NO: 22)
dre-miR-99a-5p	AACCCGUGAUCCGAUCUUGUG	22 (SEQ ID NO: 23)
mmu-miR-99a-5p	AACCCGUGAUCCGAUCUUGUG	22 (SEQ ID NO: 24)
rno-miR-99a-5p	AACCCGUGAUCCGAUCUUGUG	22 (SEQ ID NO: 25)
cfa-miR-99a	AACCCGUGAUCCGAUCUUGU	21 (SEQ ID NO: 26)
ssc-miR-99a	AACCCGUGAUCCGAUCUUGUG	22 (SEQ ID NO: 27)
ptr-miR-99a	AACCCGUGAUCCGAUCUUGUG	22 (SEQ ID NO: 28)
hsa-miR-99a-5p	AACCCGUGAUCCGAUCUUGUG	22 (SEQ ID NO: 29)
dre-miR-100-5p	AACCCGUGAUCCGAACUUGUG	(SEQ ID NO: 30)
mmu-miR-100-5p	AACCCGUGAUCCGAACUUGUG	(SEQ ID NO: 31)
rno-miR-100-5p	AACCCGUGAUCCGAACUUGUG	(SEQ ID NO: 32)
ssc-miR-100	AACCCGUGAUCCGAACUUGUG	(SEQ ID NO: 33)
ptr-miR-100	AACCCGUGAUCCGAACUUGUG	(SEQ ID NO: 34)
hsa-miR-100-5p	AACCCGUGAUCCGAACUUGUG	(SEQ ID NO: 35)

[0222] 设计了总共二十(20)种反义miR寡核苷酸化合物,包括针对let-7a-5p/let-7c-5p家族的十种和针对miR-99a-5p/miR-100-5p家族的十种。靶向Let-7c-5p的两种反义miR设计是JRX0100和JRX0102,并且可以用于抑制Let-7a-5p。靶向Let-7a-5p的两种反义miR设计是JRX0101和JRX0103,并且可以用于抑制Let-7a-5p。靶向let-7a-5p和Let-7c-5p二者的六种反义miR设计是JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108和JRX0109。靶向miR-100a的五种反义miR设计是JRX0110、JRX0113、JRX0115、JRX0117和JRX0119。靶向miR-99a的五种反义miR设计是JRX0111、JRX0112、JRX0114、JRX0116和JRX0118。在这个实验中,设计使用锁核酸(LNA)化学修饰(+),其中2'-O-氧通过亚甲基连接基桥接到4'位置以形成刚性双环,锁定在C3'-内式(RNA)糖构象中,允许抵抗核酸酶降解并对其互补RNA碱基具有极高的亲和力。这些修饰特别地被掺入到分子的每一端(如表7中的序列中(+)所示的),以例如通过增强对核酸外切酶的耐受性而获得稳定性,并被掺入到与种子互补的区域中以增加对其靶向的miR的亲和力并因此增加作为微小RNA抑制剂的效力。反义miR的骨架是硫代磷酸酯(由下表7中的*表示),以能够在动物中广泛分布。这种类型的骨架通过RISC复合物中特定的微小RNA的空间封阻起作用。反义miR寡核苷酸化合物被小心地保持相对短,以避免形成异源双链体的可能性,但足够长以有效地结合血浆蛋白并防止它们被过滤出肾脏循环,并因此改

进它们的生物分布特性。下表7示出了20种反义miR设计及其相应的靶微小RNA的汇总。

[0223] 如表7所示,一些miR-7家族的反义miR与感兴趣的let-7c-5p和c同种型100%同源,并将抑制这两个成员。相比之下,由于一个碱基在这些miR中的位置不同,miR-99a-5p和miR-100家族的反义miR各自只与一个家族成员100%同源。然而,实际上,为这两个家族中的每一个设计的所有反义miR都可以抑制两个感兴趣的家族的成员,因为与靶识别类似,种子区域(碱基2-8)是用于确定反义miR活性的最重要的区域。

[0224] 表7. 本文公开的二十种反义miR设计的总结

[0225]

名称	靶	长度	LNA PLUS 的数量	DNA的 链段	种子 中LNA 的数量*	命名/序列/结构	命名/ 序列/结构	SEQ ID NO
JRX0100	let-7c	19	9	3	5	+C*+C*A*T*+A*C*A*A*+C*C*T *A*+C*T*+A*C*+C*+T*+C	CCATACAACCTA CTACCTC	36
JRX0101	let-7a	19	9	3	5	+C*+T*A*T*A*+C*A*A*C*+C*T *A*+C*+T*A*C*+C*+T*+C	CTATACAACCTA CTACCTC	37
JRX0102	let-7c	18	9	3	5	+C*+A*T*A*C*A*+A*C*C*T*A* +C*T*+A*+C*C*+T*+C	CATACAACCTAC TACCTC	38
JRX0103	let-7a	18	9	3	5	+T*+A*T*A*C*+A*A*C*+C*T*A* *C*+T*+A*+C*C*+T*+C	TATACAACCTACT ACCTC	39
JRX0104	let-7a/c	17	9	3	5	+A*T*A*C*A*+A*C*C*+T*A*+C *T*+A*+C*C*+T*+C	ATACAACCTACT ACCTC	40
JRX0105	let-7a/c	17	9	3	5	+A*+T*A*C*A*+A*C*+C*T*A*+ C*T*+A*C*+C*+T*+C	ATACAACCTACT ACCTC	41
JRX0106	let-7a/c	16	8	3	5	+T*+A*C*A*A*+C*C*T*A*+C*T *A*+C*C*+T*+C	TACAACCTACTA CCTC	42
JRX0107	let-7a/c	16	8	3	5	+T*+A*C*A*A*+C*C*T*A*+C*T *A*+C*+C*+T*+C	TACAACCTACTA CCTC	43
JRX0108	let-7a/c	15	8	3	5	+A*+C*A*A*C*+C*T*A*+C*T*+ A*+C*C*+T*+C	ACAACCTACTAC CTC	44
JRX0109	let-7a/c	15	9	3	6	+A*+C*A*A*+C*C*T*A*+C*+T* +A*C*+C*+T*+C	ACAACCTACTAC CTC	45
JRX0110	miR-100	19	9	3	5	+C*+A*A*G*+T*T*C*G*+G*A*T *C*+T*A*+C*G*+G*+G*+T	CAAGTTCGGATC TACGGGT	46
JRX0111	miR-99	19	9	3	5	+C*+A*A*G*+T*T*C*G*+G*A*T *C*+T*+A*C*G*+G*+G*+T	CAAGATCGGATC TACGGGT	47
JRX0112	miR-99	18	9	3	5	+A*+A*G*+A*T*C*G*+G*A*T*C *+T*A*+C*+G*G*+G*+T	AAGATCGGATCT ACGGGT	48
JRX0113	miR-100	18	9	3	5	+A*+A*G*+T*T*C*G*+G*A*T*C *T*+A*+C*+G*G*+G*+T	AAGTTCGGATCT ACGGGT	49
JRX0114	miR-99	17	9	3	5	+A*+G*A*T*C*+G*G*A*+T*C*+ T*A*+C*+G*G*+G*+T	AGATCGGATCTA CGGGT	50
JRX0115	miR-100	17	9	3	5	+A*+G*T*T*C*+G*G*+A*T*C*+ T*A*+C*G*+G*+G*+T	AGTTCGGATCTA CGGGT	51
JRX0116	miR-99	16	8	3	5	+G*+A*T*C*G*+G*A*T*C*+T*A* *+C*+G*G*+G*+T	GATCGGATCTAC GGGT	52
JRX0117	miR-100	16	8	3	5	+G*+T*T*C*G*+G*A*T*C*+T*A* *+C*G*+G*+G*+T	GTTCGGATCTAC GGGT	53
JRX0118	miR-99	15	8	3	5	+A*+T*C*G*G*+A*T*C*+T*A*+ C*+G*G*+G*+T	ATCGGATCTACG GGT	54
JRX0119	miR-100	15	9	3	6	+T*+T*C*G*+G*A*T*C*+T*+A* +C*G*+G*+G*+T	TTCGGATCTACG GGT	55

[0226] 如下文进一步详细描述,这些合成的反义miR的抑制活性可以随后通过使用商业报告物载体系统pMIR-REPORT™ miRNA表达报告物载体系统来评估,该系统由Applied Biosystems®提供(参见例如图3)(零件号AM5795,Applied Biosystems)。在该系统中,感兴趣的微小RNA结合位点被插入到位于报告物萤光素酶的编码序列下游的多克隆位点。

[0227] 实施例2

[0228] 腺病毒载体JBT-miR1的设计

[0229] 本实施例总结了实验结果,示出使用RNAi技术设计表达微小RNA miR-99a、miR-100-5p、miR-Let-7a-5p和miR-Let-7c-5p的抑制序列的修饰的发夹Zip构建体和载体。在该实验中,RNAi技术以碱基对短发夹(sh)RNA(shRNA)的形式在靶细胞内实施,该shRNA通过内

源性miR途径被加工成大约20个碱基对的小干扰RNA。小发夹RNA或短发夹RNA (shRNA) 通常被定义为具有紧密发夹转角的人工RNA分子,该人工RNA分子可以被用于通过RNA干扰 (RNAi) 沉默靶基因表达。为了评估反义miR-99/100和反义Let-7a/c在小鼠心脏中再生心肌的潜在治疗性用途,表达针对Let-7a/c和miR-99/100的互补抑制序列的两种重组病毒通过将AAV2反向末端重复 (ITR) 序列交叉包装到AAV9衣壳中制成 (AAV2/9)。AAV2/9血清型具有明显的心脏向性。针对miR的互补序列的病毒递送是一种常见的方法。在该实验中,AAV载体被选择为在心血管基因疗法中是最佳的,因为它们a) 不含刺激免疫应答的病毒蛋白编码序列,b) 不需要活跃的细胞分裂来使表达发生,以及c) 相对于腺病毒载体具有明显优势,因为它们在内心肌细胞中是稳定的、长期表达重组基因。

[0230] 在该实验中,修饰的发夹Zip构建体 (1) 分别在H1启动子和U6启动子下表达Let-7a-5p和miR-99a-5p抑制序列;和 (2) 分别在H1启动子和U6启动子的调控下表达Let-7c-5p和miR-100-5p抑制序列。下表8中提供了插入到pAV-4in1shRNA-GFP载体中以生成病毒载体JBT-miR1的反义miR拮抗剂的核苷酸序列和环序列的总结。在该实验中,编码前述拮抗剂的核苷酸序列被克隆到pAV-4in1shRNA-GFP载体中 (图1)。对应于四个miR抑制序列的核苷酸序列被插入到pAV-4in1shRNA-GFP载体的载体ITR位点之间,并且特别地在BamH1和HindIII克隆位点内,并被环序列TGTGCTT (SEQ ID NO:56) 分开。在所得载体中,每个抑制序列的表达由交替的人类U6启动子或H1启动子调控,驱动针对miR-99a-5p、100、Let-7a-5p和Let-7c的短发夹RNA (shRNA) 的表达。

[0231] 如图1所示,在载体中还插入了CMV启动子,驱动绿色荧光蛋白 (GFP) 报告物的表达,这进而允许在各种组织中检测以用于临床前研究,接着为多瘤病毒结合位点的猿猴病毒40 (SV40) 序列,其在复制起点启动DNA复制,允许在表达SV40大T的哺乳动物细胞中复制。然而,预期这些序列也可以从设计用于在人类药物中使用的载体适当地去除。

[0232] 具有AAV2 ITR序列的载体基因组通过AAV-293细胞的三重转染被交叉包装到AAV9衣壳中 (J.Fraser Wright, Human Gene Therapy, 20:698-706, July 2009), 并且然后通过碘克沙醇梯度离心纯化。然后通过基于qPCR的测定确定AAV载体的滴度,所述滴度被定义为病毒基因组 (vg) / ml。在该实验中,使用以下引物扩增小鼠U6启动子: 5' - TCGCACAGACTTGTGGGAGAA-3' (SEQ ID NO:57) (正向) 和5' CGCACATTAAGCCTCTATAGTTACTAGG-3' (SEQ ID NO:58) (反向)。

[0233] 携带对应表达盒的已知拷贝数的质粒被用于构建标准曲线用于定量。病毒由Vigene Biosciences Inc. (Rockville, MD) 使用制造商推荐的安全预防措施和程序制造和测序。

[0234] 表8:插入到pAV-4in1shRNA-GFP载体的BamH1和HindIII克隆位点以生成病毒载体JBT-miR1的反义miR拮抗剂的核苷酸序列和环序列的总结。

[0235]

靶	发夹	SEQ ID NO
let-7a-5p	GTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTCAAGAGAAC TATACAACCTACTACCTCATTTTT	59
miR-99a-5p	GAACCCGTAGATCCGATCTTGTGTCAAGAGCAC AAGATCGGATCTACGGGTTTTTTT	60
(H1-)let-7a-5p & (U6)-miR-99a- 5p	GTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTCAAGAGAAC TATACAACCTACTACCTCATTTTTGAGCTCAAAA AAACCCGTAGATCCGATCTTGTGCTCTTGACACA AGATCGGATCTACGGGTTC	61
let-7c-5p	GTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTTCAAGAGAAC CATACAACCTACTACCTCATTTTT	62
miR-100-5p	GAACCCGTAGATCCGAACCTTGTGTCAAGAGCAC AAGTTCGGATCTACGGGTTTTTTT	63
(H1-)let-7C-5p & (U6)-miR- 100-5p	GTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTTCAAGAGAAC CATACAACCTACTACCTCATTTTTGAGCTCAAAA AAACCCGTAGATCCGAACCTTGTGCTCTTGACAC AAGTTCGGATCTACGGGTTC	64

[0236] JBT-miR1病毒载体设计的核苷酸序列在序列表中的SEQ ID NO:85列出。

[0237] 如以上实施例1中描述的,设计了总计二十(20)种反义miR寡核苷酸化合物。这些反义miR寡核苷酸化合物的序列在下表9中示出。下表9中公开的反义miR寡核苷酸化合物的序列的任何组合可以被插入到pAV-4in1shRNA-GFP载体的BamHI和HindIII克隆位点中,以生成用于miR-99a、miR-100-5p、Let-7a-5p和Let-7c-5p抑制的其他病毒递送系统。

[0238] 表9

[0239]

靶	长度	LNA PLUS 的数量	DNA的 链段	种子 中LNA的 数量*	序列	SEQ ID NO
let-7c	19	9	3	5	CCATACAACCTACTACCTC	65
let-7a	19	9	3	5	CTATACAACCTACTACCTC	66
let-7c	18	9	3	5	CATACAACCTACTACCTC	67
let-7a	18	9	3	5	TATACAACCTACTACCTC	68
let-7a/c	17	9	3	5	ATACAACCTACTACCTC	69
let-7a/c	17	9	3	5	ATACAACCTACTACCTC	70
let-7a/c	16	8	3	5	TACAACCTACTACCTC	71
let-7a/c	16	8	3	5	TACAACCTACTACCTC	72
let-7a/c	15	8	3	5	ACAACCTACTACCTC	73
let-7a/c	15	9	3	6	ACAACCTACTACCTC	74
miR-100	19	9	3	5	CAAGTTCGGATCTACGGGT	75
miR-99	19	9	3	5	CAAGATCGGATCTACGGGT	76
miR-99	18	9	3	5	AAGATCGGATCTACGGGT	77
miR-100	18	9	3	5	AAGTTCGGATCTACGGGT	78
miR-99	17	9	3	5	AGATCGGATCTACGGGT	79
miR-100	17	9	3	5	AGTTCGGATCTACGGGT	80
miR-99	16	8	3	5	GATCGGATCTACGGGT	81
miR-100	16	8	3	5	GTTTCGGATCTACGGGT	82
miR-99	15	8	3	5	ATCGGATCTACGGGT	83
miR-100	15	9	3	6	TTCGGATCTACGGGT	84

[0240] JBT-miR1病毒载体设计的核苷酸序列在序列表中的SEQ ID NO:85列出。

[0241] 实施例3

[0242] 病毒载体JBT-miR1在体内心肌中的抑制活性

[0243] 本实施例总结了实验结果,证明如实施例2中描述地构建的病毒载体JBT-miR1可以降低CD1小鼠中的LV的延迟钆增强。

[0244] 在该实验中,将CD1小鼠用氯胺酮(100mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)麻醉,并用压力通气机(Kent Scientific,CT)进行插管。在整个程序中,动物通过气管进行插管,并用室内空气机械通气(呼吸速率55-65次呼吸/分钟,潮气量2.5ml)(Model 687-Harvard Apparatus)。从胸骨中线向左腋窝切开一个皮肤切口,并且用沿胸骨左侧的1厘米的横向切口开放胸部,在第3和第4根肋骨之间切开以暴露LV。然后可以鉴定升主动脉和主肺动脉(main pulmonary artery),并且LAD位于左心室和右心室(RV)之间。LAD闭塞通过将8-0 PROLENE®缝线结扎线捆系在一段PE-10管上进行。LAD的灌注区域的漂白,以及肢体导联EKG导联上的急性ST段抬高,以及LV变白将证明血管闭塞。

[0245] 然后,以在60μl盐水中稀释的 6×10^{11} vg/小鼠的剂量,使用具有合并的30号针的胰岛素注射器通过心内注射到环绕梗塞区的心肌中来施用JBT-miR1或对照病毒。将小鼠放置3周,并然后经受心脏MRI。如表10中示出的,观察到与表达GFP的病毒相比,发现用JBT-miR1转化的小鼠在心内注射JBT-miR1后3周,在具有永久性LAD结扎的CD1小鼠中的LV的延迟钆增强降低。

[0246] 表10:

ID	BW	AAV	LV质量	LGE MI大小
	(g)		(mg)	(% LV质量)
GFP 对照				
10	36	GFP 对照	162.5	10.68
11	36	GFP 对照	165.9	27.59
平均值	36		164.2	19.14
SD	0		2.4	11.96
JBT				
13	39	JBT	204.0	14.31
14	36	JBT	156.8	10.90
平均值	38		180.4	12.61
SD	2		33.4	2.41

[0248] 图2A-2B描绘性地总结了心脏MRI成像实验的结果,其中对照GFP病毒(图2A)与JBT-miR1(图2B)的心脏MRI图像证明了,当与表达GFP的病毒相比,在心内注射载体JBT-miR1后3周,具有永久性LAD结扎的CD1小鼠中的LV的延迟钆增强降低。对于这种模型,体重约30-40克的雄性CD1小鼠(8-12周龄)像先前一样经受永久性缺血。在该实验中,MRI在水平Bruker Biospec® 7T/20MRI系统(Bruker, Germany)上对麻醉小鼠(SA Instruments, NY)进行。对于舒张末期(ED)和收缩末期(ES)图像,体积数据由隔室面积和切片厚度(1mm)的乘积确定。LVED和ES体积(EDV和ESV)是根据所有切片的总和和导出的EF来计算的。EDV乘以心肌比重 γ (1.055g/cm³)来计算LV质量。MI大小:选择每个切片的ED图像进行疤痕描绘。将MR图

像中对比增强的区域的大小相对于从TTC染色获得的对应区域作图。梗塞大小表示为LV质量的%。

[0249] 如表11中说明的,二维(2D)超声心动图分析示出了与表达GFP的病毒相比,在心内注射JBT-miR1后3周,具有永久性LAD结扎的CD1小鼠的心输出量显著增加。在该实验中,通过使用Hewlett-Packard/Phillips 5500机器和15-MHz换能器,在第5天和第14天和第21天对麻醉小鼠进行2D-Echo。

[0250] 表11:

ID	类型	心输出量($\mu\text{L}/\text{min}$)		
		5天	2周	3周
10	AAV-GFP	11537.2	7951.7	12984.0
11	AAV-GFP	16287.7	9265.4	15015.0
12	AAV-GFP	10833.1	13410.9	10848.0
平均值		12886.0	10209.3	12949.0
SD		2966.9	2849.4	2083.7
13	AAV-JBT-miR1	18893.2	22919.6	23414.6
14	AAV-JBT-miR1	17134.0	13918.5	22494.0
16	AAV-JBT-miR1	13492.2	14359.3	18612.0
17	AAV-JBT-miR1	5670.0	8409.5	21129.6
平均值		13797.4	14901.7	21412.6
SD		5866.5	5991.6	2089.7
T检验				
GFP对JBT				
		0.8001	0.2346	0.0044

[0252] 实施例4

[0253] 病毒载体JBT-miR2的设计

[0254] 本实施例总结了实验结果,示出名为JBT-miR2的另一种病毒载体的设计,这种病毒载体表达了可以比zip (JBT-miR1) 更优越的tough decoy (也称为TuD) (Takeshi等人, 2009)。简而言之,四种120个碱基的寡核苷酸序列被插入到载体的ITR位点之间并在BamH1和HindIII克隆位点中,以生成当插入病毒递送系统中时能够抑制let-7和miR-99a-5p家族的TuD。在下面示出的前述寡核苷酸的核苷酸序列中,粗体字符对应于各自的miR结合位点。

[0255] let-7a-5p

GACGGCGCTAGGATCATCAACA**ACTATACAACCAATGTACTACCTCACA**

[0256] AGTATTCTGGTCACAGAATACAACA**ACTATACAACCAATGTACTACCTCACA**
GATGATCCTAGCGCCGTC (SEQ ID NO: 86).

[0257] let-7a-5p反向互补物

GACGGCGCTAGGATCATCTTGT**GAGGTAGTACATTGGTTGTATAGTTGT**

[0258] TGTATTCTGTGACCAGAATACTTGT**GAGGTAGTACATTGGTTGTATAGTTGTG**
ATGATCCTAGCGCCGTC (SEQ ID NO: 87)

[0259] miR-99a-5p

GACGGCGCTAGGATCATCAACCACAAGATCGGAAATGTCTACGGGTACAAGTA
[0260] TTCTGGTCACAGAATAACAACCACAAGATCGGAAATGTCTACGGGTACAAGATG
ATCCTAGCGCCGTC (SEQ ID NO: 88)

[0261] miR-99a-5p反向互补物

GACGGCGCTAGGATCATCTTGTACCCGTAGACATTTCGGATCTTGTGGT
[0262] TGTATTCTGTGACCAGAATACTTGTACCCGTAGACATTTCGGATCTTGTGGTTG
ATGATCCTAGCGCCGTC (SEQ ID NO: 89).

[0263] 在一些实验中,限制位点被添加到寡核苷酸中,这继而有助于将它们亚克隆到合适的载体中。这些序列的5'端邻近启动子序列(例如U6启动子)被克隆,并且3'端针对PolII终止序列(例如TTTTT)被克隆。

[0264] 实施例5

[0265] 反义miR寡核苷酸的体外生物活性

[0266] 本实施例总结了使用pMIR-REPORT™ miRNA表达报告物载体系统(零件号AM5795, Applied Biosystems®)进行以评估针对let-7a/c和miR-99/100的微小RNA(miR)拮抗剂(反义miR)在离体大鼠新生的心室心肌细胞和HeLa细胞中的活性的实验的结果。pMIR-REPORT™ miRNA表达报告物载体系统由实验萤火虫萤光素酶报告物载体和相关的β-gal报告物对照质粒组成。通过将预测的miRNA靶序列插入到位于报告物的编码序列下游的多克隆位点,这些载体经常被用于对miRNA功能进行准确、定量的评估。该系统还经常被用于评估siRNA靶位点和分析3'UTR序列对基因表达的影响。

[0267] 不受任何特定理论的束缚,认为当转染到HeLa细胞或大鼠新生的心室心肌细胞中时,未修饰的pMIR-REPORT™应具有最大萤光素酶活性。换句话说,通过将预测的针对miR-99(萤光素酶报告物1,LUC 1)、miR-100(萤光素酶报告物2,LUC 2)和Let-7a-5p(萤光素酶报告物3,LUC 3)和Let-7c-5p(萤光素酶报告物4,LUC 4)的miRNA靶序列插入到pMIR-REPORT™的多克隆位点中,所得载体(LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4)的萤光素酶活性将显著低于单独的pMIR-REPORT™。

[0268] 如上文描述地构建的修饰的萤光素酶miRNA表达报告物载体,即pMIR-REPORT LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4;所述报告物载体可以被用于对miRNA功能进行准确、定量的评估,使得HeLa细胞和心肌细胞中的内源性miR成员的抑制将导致与单独的LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4载体相比的萤光素酶活性的剂量依赖性增加。

[0269] 方法

[0270] 设计了微小RNA miR-99、miR-100、Let-7a-5p和Let-7c-5p的互补序列,并克隆到pMIR-REPORT™ miRNA表达报告物载体系统的多克隆位点中。所得的载体分别命名为LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4表达载体。将HeLa细胞在96孔组织培养板中培养,并使用Lipofectamine®2000试剂(Life Technologies)用50ng/孔的修饰的LUC载体(即LUC 1、LUC 2、LUC 3或LUC 4载体)的纯化DNA和10ng/孔的β-半乳糖苷酶(β-gal)报告物质粒、以及反义增加浓度的miR(0-50nM)共转染长达5小时。类似地,将新生大鼠心室心肌细胞在24孔组织培养板中培养,并用500ng/孔的LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4DNA以及100ng/孔的β-gal报告物质粒共转染,以确认转染效率。转染后48小时,收获转染的细胞,并测定细胞裂解物

的萤光素酶活性和 β -gal活性。将萤光素酶活性针对 β -gal归一化,并表示为相对于单独的LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4质粒的活化倍数。

[0271] 图3示意性地示出了pMIR-REPORT™萤光素酶miRNA表达报告物载体,该载体含有在花椰菜病毒(CMV)启动子/终止系统的控制下的萤火虫萤光素酶报告物基因。萤光素酶基因的3' UTR含有多克隆位点,用于插入预测的miRNA结合靶或其他核苷酸序列。通过将预测的miRNA靶序列插入pMIR-REPORT载体的多克隆位点中,萤光素酶报告物可以经受模拟miRNA靶的调控。

[0272] 图4示意性地示出了携带报告物基因β-半乳糖苷酶的pMIR-REPORT™ miRNA β-半乳糖苷酶表达报告物载体,其被设计用于转染归一化。通常,来自该对照质粒的β-gal表达可被用于使由于细胞活力和转染效率的差异而引起的变化性归一化。

[0273] miR-99、miR-100、Let-7a-5p和let-7c的pMIR-REPORT™载体的构建：

[0274] 以下寡核苷酸(粗体)从Integrated DNA Technologies (IDT), San Diego购买。将对应于与miRNA互补的序列的miRNA结合位点加下划线,这些位点随后被插入萤光素酶基因的编码序列的下游。

```
[0275] >hsa-miR-99a-5p MIMAT0000097
```

5'-AAC CCG UAG AUC CGA UCU UGUG-3' (SEQ ID NO: 90)

[0276] CACA AGA TCG GAT CTA CGG GTT (SEQ ID NO: 91)

[0277] 99a正向引物:

[0278] 5'-AACACTAGTCACAAGATCGGATCTACGGGTTAAGCTTGTT-3' (SEQ ID NO: 92)

[0279] 99a反向引物:

[0280] **5'-AACAAAGCTTAACCCGUAGAUCCGAUCUUGUGACTAGTGTT-3'** (SEO ID NO: 93)

[0281] >hsa-miR-100-5p MIMAT0000098

5'-AAC CCG UAG AUC CGA ACU UGUG-3' (SEQ ID NO: 94)

[0282] CACA AGT TCG GAT CTA CGG GTT (SEQ ID NO: 95)

[0283] 100正向引物:

[0284] **5'-AACACTAGTCACAAGTTCGGATCTACGGGTTAAGCTTGTT-3'** (SEQ ID NO: 96)

[0285] 100反向引物:

[0286] **5'-AACAAAGCTTAACCCGUAGAUCCGAACUUGUGACTAGTGTT-3'** (SEQ ID NO: 97)

[0287] >hsa-let-7a-5p MIMAT0000062

5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGUU-3' (SEO ID NO: 98)

[0288] AACT ATA CAA CCT ACT ACC TCA (SEQ ID NO: 99)

[0289] LET7A正向引物:

[0290] **5'-AACACTAGTAACCTATACAACCTACTACCTCAAAGCTTGTT-3'** (SEQ ID NO: 100)

[0291] LET7A反向引物:

[0292] **5'-AACAAAGCTTUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUACTAGTGTT-3'** (SEQ ID NO: 101)

[0293] >hsa-let-7c-5p MIMAT0000064

5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU GGUU-3' (SEQ ID NO: 102)

[0294] AACC ATA CAA CCT ACT ACC TCA (SEQ ID NO: 103)

[0295] LET7C正向引物:

[0296] 5'-AACACTAGTAACCATACAACCTACTACCTCAAAGCTTGTT-3' (SEO ID NO: 104)

[0297] LET7C反向引物:

[0298] **5'-AACAAGCTTUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUACTAGTGTT-3'** (SEQ ID NO: 105)

[0299] 载体含有以下有序的元件:5'-萤光素酶-多克隆位点(MCS),允许将对应于期望的miRNA结合位点的核苷酸序列插入到其3' UTR中。MCS含有以下有序的限制位点:5'-SpeI-HindIII。SpeI (ACTAGT) 和HindIII (AAGCTT) 被选为限制酶,因为它们相同的缓冲液(NEB2)中都良好地发挥作用。寡核苷酸含有以下有序的元件:5'-AAC-SpeI位点-(miRNA结合位点)-HindIII位点-GTT-3'。核苷酸AAC(和GTT)是额外的核苷酸,允许限制酶更有效地结合。

[0300] 针对miR-99、miR-100、Let-7a-5p和Let-7c-5p的pMIR-REPORT™萤光素酶载体(分别为LUC1、LUC2、LUC3和LUC4)的核苷酸序列在序列表的SEQ ID NO:106-109中列出。

[0301] Hela转染:Hela细胞在具有厄尔平衡盐溶液(Earle's Balanced Salt Solution)的最低必需培养基(HyClone™)中培养,其补充有2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、1nM非必需氨基酸和10%FBS(PAA)以及青霉素链霉素(penicillin streptomycin)。转染前24小时,将细胞铺板于96孔板(1×10^4 细胞/孔)中的不含抗生素的含血清培养基中,并且在转染时处于在30-70%之间的汇合。

[0302] 然后,使用最终体积为200μl/孔的Opti-MEM®培养基和正常生长培养基,根据制造商的说明,使用Lipofectamine 2000(Life Technologies,Cat#11668-019),以0.1、1、10或50纳摩尔/升(nM),用50ng/孔的LUC报告物质粒和10ng/孔的β-gal报告物质粒转染细胞2小时。报告物质粒(pMIR-REPORT™或LUC质粒)单独转染。

[0303] 以下示出Hela细胞在2×96孔中的典型的板设置,其中每个板的第6列标识用于转染的LUC载体。

[0304] 表12:具有萤光素酶报告物1miR-99(LUC 1)和萤光素酶报告物2miR-100(LUC2)的板1

[0305]

JRX0-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.1n A	111	112	114	116	118	LUC 1	111	112	114	116	118	Lipo
1 B	111	112	114	116	118	LUC 1	111	112	114	116	118	Lipo
10 C	111	112	114	116	118	LUC 1	111	112	114	116	118	Lipo
50 D	111	112	114	116	118	LUC 1	111	112	114	116	118	Lipo
0.1nM E	110	113	115	117	119	LUC 2	110	113	115	117	119	pMIR
1 F	110	113	115	117	119	LUC 2	110	113	115	117	119	pMIR
10 G	110	113	115	117	119	LUC 2	110	113	115	117	119	pMIR
50 H	110	113	115	117	119	LUC 2	110	113	115	117	119	pMIR

[0306] 表13:具有萤光素酶报告物3 Let-7a-5p(LUC 3)和萤光素酶报告物4Let-7c-5p(LUC4)的板2

[0307]

JRX0-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.1nM	101	103	104	105	106	LUC	107	108	109	101	103	Lipo
A			(10nM)	(10nM)	(10nM)	3	(10nM)	(10nM)	(10nM)			
1	101	103	104	105	106	LUC	107	108	109	101	103	Lipo
B			(10nM)	(10nM)	(10nM)	3	(10nM)	(10nM)	(10nM)			
10	101	103	104	105	106	LUC	107	108	109	101	103	Lipo
C			(50 nM)	(50nM)	(50nM)	3	(50nM)	(50nM)	(50nM)			
5	101	103	104	105	106	LUC	107	108	109	101	103	Lipo
D			(50 nM)	(50nM)	(50nM)	3	(50nM)	(50nM)	(50nM)			
0.1nM	100	102	104	105	106	LUC	107	108	109	100	102	pMIR
E			(10nM)	(10nM)	(10nM)	4	(10nM)	(10nM)	(10nM)			
1	100	102	104	105	106	LUC	107	108	109	100	102	pMIR
F			(10nM)	(10nM)	(10nM)	4	(10nM)	(10nM)	(10nM)			
10	100	102	104	105	106	LUC	107	108	109	100	102	pMIR
G			(50nM)	(50nM)	(50nM)	4	(50nM)	(50nM)	(50nM)			
50	100	102	104	105	106	LUC	107	108	109	100	102	pMIR
H			(50nM)	(50nM)	(50nM)	4	(50nM)	(50nM)	(50nM)			

[0308] 心肌细胞转染:分离新生大鼠心肌细胞,并以80,000个细胞/孔(24孔)的密度铺板在Primaria™包被的板上。接种后24小时,使用最终体积为600μl/孔的Opti-MEM®培养基和正常生长培养基,根据制造商的说明,使用Lipofectamine® 2000 (Life Technologies, Cat#11668-019),以0.1、1、3、10或50纳摩尔/升(nM),用500ng/孔的LUC报告物质粒和100ng/孔的β-gal报告物质粒转染细胞5小时。报告物质粒(pMIR-REPORT™或LUC质粒)单独转染。

[0309] 心肌细胞的典型的板设置如下:

[0310] 板1荧光素酶报告物1 (LUC1) miR-99

[0311]

0nM	LUC 1	LUC 1	114 (3nM)	116 (3nM)	LUC 1 (3nM)	Lipo
0.1nM	JRX0111	JRX0112	JRX0114	JRX0116	JRX0118	Lipo
10nM	JRX0111	JRX0112	JRX0114	JRX0116	JRX0118	pMIR
50nM	JRX0111	JRX0112	JRX0114	JRX0116	JRX0118	pMIR

[0312] 板2荧光素酶报告物2 (LUC 2) miR-100

[0313]

0nM	LUC 2	LUC 2	JRX0115 (3nM)	JRX0117 (3nM)	JRX0119 (3nM)	Lipo
0.1nM	JRX0110	JRX0113	JRX0115	JRX0117	JRX0119	Lipo
10nM	JRX0110	JRX0113	JRX0115	JRX0117	JRX0119	pMIR
50nM	JRX0110	JRX0113	JRX0115	JRX0117	JRX0119	pMIR

[0314] 板3荧光素酶报告物3 (LUC 3) let-7a

[0315]

0nM	LUC 3	LUC 3	104 (3nm)	106 (3nM)	108 (3nM)	Lipo
0.1nM	JRX0101	103	104 (10nm)	106 (10nm)	108 (10nM)	Lipo
10nM	JRX0101	103	105 (3nm)	107 (3nM)	109 (3nM)	pMIR
50nM	JRX0101	103	105 (10nm)	107 (10nM)	109 (10nM)	pMIR

[0316] 板4荧光素酶报告物4 (LUC 4) let07c

[0317]

0nM	LUC 4	LUC 4	JRX0104 (3nm)	JRX0106 (3nM)	JRX0108 (3nM)	Lipo
0.1nM	JRX0100	JRX0102	JRX0104 (10nm)	JRX0106 (10nm)	JRX0108 (10nM)	Lipo
10nM	JRX0100	JRX0102	JRX0105 (3nm)	JRX0107 (3nM)	JRX0109 (3nM)	pMIR

50nM	JRX0100	JRX0102	JRX0105 (10nM)	JRX0107 (10nM)	JRX0109 (10nM)	pMIR
------	---------	---------	----------------	----------------	----------------	------

[0318] 重复以上实验。

[0319] 启动子活性测定

[0320] 将细胞在37℃生长,并且在转染后48小时收获,用于在正常生长培养基中使用One-Glo™ Luc (Promega™#E6110)、**Beta-Glo®**Luc (Promega™#E4720)和Glo裂解缓冲液(Promega™#E2661)的萤光素酶和β-gal测定。萤光素酶活性使用Biotek Synergy™ HT测量。启动子活性表示为相对于单独的萤光素酶1、2、3或4质粒的倍数,并针对β-gal活性水平归一化。

[0321] 统计学分析

[0322] 将萤光素酶活性针对β-gal归一化,并且数据被表示为单独的相应LUC载体的活化倍数。Hela实验的倍数数据代表单个实验。重复实验以确认结果。由于细胞是在同一天培养和转染的,所以来自两个单独心肌细胞实验的倍数数据被合并。数据以平均标准偏差呈现。使用GraphPad Prism 7软件以萤光素酶活性的归一化倍数增加(x轴)对反义miR的log-10M浓度(y轴)绘图。

[0323] 结果

[0324] 进行了对萤光素酶构建体的测试实验,确认与未修饰的pMIR-REPORT载体相比,萤光素酶构建体1(LUC 1,miR-99)、萤光素酶构建体2(LUC 2,miR-100)、萤光素酶构建体3(LUC 3,let-7a)和萤光素酶构建体4(LUC 4,let-7c)具有显著更低的萤光素酶活性,表明Hela细胞内的内源性miR(Let-7a-5p miR-99a,miR-100-5p,miR-Let-7c5p,miR-Let-7a-5p)可以结合相应LUC构建体并抑制萤光素酶活性。在该实验中,Hela细胞用LUC构建体中的每一种转染,并且然后用对应的反义miR处理。预期反义miR将与Hela细胞中对应的内源性微小RNA竞争。当被转染到Hela细胞或大鼠新生心室心肌细胞中时,观察到未修饰的pMIR-REPORT™提供最大的萤光素酶活性。通过将预测的针对miR-99(萤光素酶报告物1,LUC 1)、miR-100(萤光素酶报告物2,LUC 2)和Let-7a-5p(萤光素酶报告物3,LUC 3)和Let-7c-5p(萤光素酶报告物4,LUC 4)的miRNA靶序列插入多克隆位点中,萤光素酶活性显著低于单独的pMIR-REPORT™。修饰的pMIR-REPORT LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4萤光素酶miRNA表达报告物载体可被用于对miRNA功能进行准确、定量的评估,使得Hela细胞和心肌细胞中内源性miR成员的抑制将导致与单独的LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4载体相比的萤光素酶活性的剂量依赖性增加。不受任何特定理论的束缚,认为反义miR通过RISC复合物中的特定微小RNA的空间封阻起作用,并增加相应的萤光素酶启动子活性。该测试实验的结果示意性地总结在图5中。

[0325] 在随后对Hela细胞进行的实验中,观察到JRX0111、JRX0112、JRX0114、JRX0116、JRX0118miR-99a反义miR以剂量依赖性方式增加萤光素酶构建体1(LUC 1,miR-99)活性(图6)。

[0326] 以类似的方式,如图7中示出的,观察到JRX0110、JRX0113、JRX0115、JRX0117、JRX0119miR-100-5p反义miR以剂量依赖性方式增加Hela细胞中萤光素酶构建体2(LUC 2,miR-100)活性。

[0327] 类似地,还发现JRX0101、JRX0103、JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108、JRX0109Let-7a-5p miR-Let-7a-5p反义miR以剂量依赖性方式增加Hela细胞中萤光素酶构

建体3 (LUC 3, Let-7a) 活性 (图8A-8B); 并且观察到JRX0100、JRX0102、JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108、JRX0109Let-7c-5p miR-Let-7c5p反义miR以剂量依赖性方式增加Hela细胞中萤光素酶构建体4 (LUC 4, let-7c) 活性 (图9A-9B)。

[0328] 在用新生大鼠心室心肌细胞进行的各种实验中, 观察到JRX0111、JRX0112、JRX0114、JRX0116、JRX0118miR-99a反义miR以剂量依赖性方式增加萤光素酶构建体1 (LUC 1, miR-99) 活性 (图10); 观察到JRX0110、JRX0113、JRX0115、JRX0117、JRX0119miR-100-5p反义miR以剂量依赖性方式增加萤光素酶构建体2 (LUC 2, miR-100) 活性 (图11); 观察到JRX0101、JRX0103、JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108、JRX0109Let-7a-5p miR-Let-7a-5p反义miR以剂量依赖性方式增加萤光素酶构建体3 (LUC 3, let-7a) 活性 (图12A-12B), 并且还发现JRX0100、JRX0102、JRX0104、JRX0105、JRX0106、JRX0107、JRX0108、JRX0109Let-7c-5p miR-Let-7c5p反义miR以剂量依赖性方式增加萤光素酶构建体4 (LUC 4, let-7c) 活性 (图13A-13B)。

[0329] 结论

[0330] 综上所述, 以上呈现的实验数据证明了特定的反义miR的效力、特异性和活性。发现与pMIR-REPORT™空质粒相比, 修饰的质粒LUC 1、LUC 2、LUC 3和LUC 4显示出显著较低的萤光素酶活性。还观察到来自对应miR家族的每一种拮抗剂剂量依赖性地活化它们各自的LUC报告物质粒。此外, 显示出, 被设计成抑制以下微小RNA miR-99、miR-100、Let-7a-5p和Let-7c-5p的反义miR在被测试的两个细胞类型中以不同的效率结合到它们的特异性靶mRNA。

[0331] 本文公开的所有参考文献, 包括但不限于期刊文章、教科书、专利和专利申请, 通过引用本文讨论的主题并且以其整体并入本文。贯穿本公开内容, 各种信息来源被引用并通过引用并入。信息来源包括, 例如, 科学期刊文章、专利文件、教科书和万维网浏览器不活跃的页面地址。提及这样的信息来源仅是为了在提交时提供对现有技术总体状况的说明。虽然每一个信息来源的内容和教导可以被本领域的技术人员依赖和使用来制作和使用本文公开的实施方案, 但是在特定信息来源中的任何讨论和评论都不应该被认为是承认这样的评论被广泛接受为该领域的一般意见。

序列表

<110> 嘉安生物治疗有限责任公司

巴万吉特·考尔·布拉尔

<120> 用于治疗肌营养不良的组合物和方法

<130> JAANB.001W0

<150> 62/419852

<151> 2016-11-09

<150> 62/363512

<151> 2016-07-18

<160> 109

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> hsa-let-7a-5p MIMAT0000062正义

<400> 1

ugagguagua gguuguauag uu

22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> hsa-let-7a-5p MIMAT0000062反义

<400> 2

acuccaucau ccaacauauc aa

22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> hsa-let-7c-5p MIMAT0000064正义

<400> 3

ugagguagua gguuguaugg uu

22

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-let-7c-5p MIMAT0000064反义	
<400> 4	
acuccaucau ccaacauacc aa	22
<210> 5	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-miR-99a-5p MIMAT0000097正义	
<400> 5	
aacccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 6	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-miR-99a-5p MIMAT0000097反义	
<400> 6	
uugggcaucu aggcuaagaac ac	22
<210> 7	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-miR-100-5p MIMAT0000098正义	
<400> 7	
aacccguaga uccgaacuug ug	22
<210> 8	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-miR-100-5p MIMAT0000098反义	
<400> 8	
uugggcaucu aggcugaac ac	22
<210> 9	
<211> 22	

<212> RNA	
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> dre-let-7a-5p	
<400> 9	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 10	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> mmu-let-7a-5p	
<400> 10	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 11	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> rno-let-7a-5p	
<400> 11	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 12	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 野猪 (Sus scrofa)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> ssc-let-7a-5p	
<400> 12	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 13	

<211> 22	
<212> RNA	
<213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> ptr-let-7a-5p	
<400> 13	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 14	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> hsa-let-7a-5p	
<400> 14	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 15	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 家犬 (Canis familiaris)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> cfa-let-7a-5p	
<400> 15	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 16	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> dre-let-7c-5p	
<400> 16	
ugagguagua gguuguaugg uu	22

<210> 17	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> mmu-let-7c-5p	
<400> 17	
ugagguagua gguuguaugg uu	22
<210> 18	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> rno-let-7c-5p	
<400> 18	
ugagguagua gguuguaugg uu	22
<210> 19	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 野猪 (Sus scrofa)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> ssc-let-7c-5p	
<400> 19	
ugagguagua gguuguaugg uu	22
<210> 20	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> ptr-let-7c-5p	
<400> 20	

ugagguagua gguuguaugg uu	22
<210> 21	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> hsa-let-7c-5p	
<400> 21	
ugagguagua gguuguaugg uu	22
<210> 22	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 家犬 (Canis familiaris)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> cfa-let-7c-5p	
<400> 22	
ugagguagua gguuguaugg uu	22
<210> 23	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> dre-miR-99a-5p	
<400> 23	
aacccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 24	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> mmu-miR-99a-5p	

<400> 24	
aacccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 25	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> rno-miR-99a-5p	
<400> 25	
aacccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 26	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 家犬 (Canis familiaris)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> cfa-miR-99a	
<400> 26	
aacccguaga uccgaucuug u	21
<210> 27	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 野猪 (Sus scrofa)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> ssc-miR-99a	
<400> 27	
aacccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 28	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	

<223> ptr-miR-99a	
<400> 28	
aacccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 29	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> hsa-miR-99a-5p	
<400> 29	
aacccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 30	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> dre-miR-100-5p	
<400> 30	
aacccguaga uccgaacuug ug	22
<210> 31	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> mmu-miR-100-5p	
<400> 31	
aacccguaga uccgaacuug ug	22
<210> 32	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)	
<220>	
<221> misc_feature	

<222> (0) ... (0)	
<223> rno-miR-100-5p	
<400> 32	
aacccguaga uccgaacuug ug	22
<210> 33	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 野猪 (Sus scrofa)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> ssc-miR-100	
<400> 33	
aacccguaga uccgaacuug ug	22
<210> 34	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> ptr-miR-100	
<400> 34	
aacccguaga uccgaacuug ug	22
<210> 35	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (0) ... (0)	
<223> hsa-miR-100-5p	
<400> 35	
aacccguaga uccgaacuug ug	22
<210> 36	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	

<223> JRX0100	
<400> 36	
ccatacaacc tactacctc	19
<210> 37	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0101	
<400> 37	
ctatacaacc tactacctc	19
<210> 38	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0102	
<400> 38	
catacaacct actacctc	18
<210> 39	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0103	
<400> 39	
tatacaacct actacctc	18
<210> 40	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0104	
<400> 40	
atacaacctc ctacctc	17
<210> 41	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>	
<223> JRX0105	
<400> 41	
atacaaccta ctacctc	17
<210> 42	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0106	
<400> 42	
tacaacctac tacctc	16
<210> 43	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0107	
<400> 43	
tacaacctac tacctc	16
<210> 44	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0108	
<400> 44	
acaacctact acctc	15
<210> 45	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0109	
<400> 45	
acaacctact acctc	15
<210> 46	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0110	
<400> 46	
caagttcgga tctacgggt	19
<210> 47	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0111	
<400> 47	
caagatcgga tctacgggt	19
<210> 48	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0112	
<400> 48	
aagatcggat ctacgggt	18
<210> 49	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0113	
<400> 49	
aagttcggat ctacgggt	18
<210> 50	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0114	
<400> 50	
agatcggatc tacgggt	17
<210> 51	
<211> 17	

<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0115	
<400> 51	
agttcggatc tacgggt	17
<210> 52	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0116	
<400> 52	
gatcggatct acgggt	16
<210> 53	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0117	
<400> 53	
gttcggatct acgggt	16
<210> 54	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0118	
<400> 54	
atcggatcta cgggt	15
<210> 55	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> JRX0119	
<400> 55	
ttcggatcta cgggt	15
<210> 56	

<211> 7	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 环序列 (Loop sequence)	
<400> 56	
tgtgctt	7
<210> 57	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 用于小鼠U6启动子的正向引物	
<400> 57	
tcgcacagac ttgtgggaga a	21
<210> 58	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 用于小鼠U6启动子的反向引物	
<400> 58	
cgcacattaa gcctctatag ttactagg	28
<210> 59	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 载体JBT-miR1中的let-7a-5p序列	
<400> 59	
gtgaggtagt aggttgata gtttcaagag aactatacaa cctactacct cattttt	57
<210> 60	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 载体JBT-miR1中的miR-99a-5p序列	
<400> 60	
gaacccgtag atccgatctt gtgtcaagag cacaagatcg gatctacggg ttttttt	57

<210> 61
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 载体JBT-miR1中的 (H1-) let-7a-5p & (U6) -miR-99a-5p
<400> 61
gtgaggtagt aggttgata gtttcaagag aactatacaa cctactacct catttttgag 60
ctcaaaaaaaaa cccgtagatc cgatcttggtg ctcttgacac aagatcggat ctacgggttc 120
<210> 62
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 载体JBT-miR1中的let-7c-5p序列
<400> 62
gtgaggtagt aggttgatg gtttcaagag aaccatacaa cctactacct cattttt 57
<210> 63
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 载体JBT-miR1中的miR-100-5p序列
<400> 63
gaacccgtag atccgaactt gtgtcaagag cacaagttcg gatctacggg tttttt 57
<210> 64
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 载体JBT-miR1中的 (H1-) let-7C-5p & (U6) -miR-100-5p
<400> 64
gtgaggtagt aggttgatg gtttcaagag aaccatacaa cctactacct catttttgag 60
ctcaaaaaaaaa cccgtagatc cgaacttggtg ctcttgacac aagttcggat ctacgggttc 120
<210> 65
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> let-7c抑制剂序列	
<400> 65	
ccatacaacc tactacctc	19
<210> 66	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> let-7a抑制剂序列	
<400> 66	
ctatacaacc tactacctc	19
<210> 67	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> let-7c抑制剂序列	
<400> 67	
catacaacct actacctc	18
<210> 68	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> let-7a抑制剂序列	
<400> 68	
tatacaacct actacctc	18
<210> 69	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> let-7a/c抑制剂序列	
<400> 69	
atacaaccta ctacctc	17
<210> 70	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>	
<223> let-7a/c抑制剂序列	
<400> 70	
atacaaccta ctacctc	17
<210> 71	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> let-7a/c抑制剂序列	
<400> 71	
tacaacctac tacctc	16
<210> 72	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> let-7a/c抑制剂序列	
<400> 72	
tacaacctac tacctc	16
<210> 73	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> let-7a/c抑制剂序列	
<400> 73	
acaacctact acctc	15
<210> 74	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> let-7a/c抑制剂序列	
<400> 74	
acaacctact acctc	15
<210> 75	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-100抑制剂序列	
<400> 75	
caagttcgga tctacgggt	19
<210> 76	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-99抑制剂序列	
<400> 76	
caagatcgga tctacgggt	19
<210> 77	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-99抑制剂序列	
<400> 77	
aagatcggat ctacgggt	18
<210> 78	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-100抑制剂序列	
<400> 78	
aagttcggat ctacgggt	18
<210> 79	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-99抑制剂序列	
<400> 79	
agatcggatc tacgggt	17
<210> 80	
<211> 17	

<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-100抑制剂序列	
<400> 80	
agttcggatc tacgggt	17
<210> 81	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-99抑制剂序列	
<400> 81	
gatcggatct acgggt	16
<210> 82	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-100抑制剂序列	
<400> 82	
gttcggatct acgggt	16
<210> 83	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-99抑制剂序列	
<400> 83	
atcggatcta cgggt	15
<210> 84	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> miR-100抑制剂序列	
<400> 84	
ttcggatcta cgggt	15
<210> 85	

<211> 6558

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 病毒载体JBT-miR1

<400> 85

```

cggcctcagt gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac tccatcacta ggggttcctg 60
cggccgcacg cgtctagtta ttaatagtaa tcgaattcgt gttactcata gcagatcacc 120
gctgctcgtc aactgaggcg cccaggcagt caggggactt cgtcgcccgg cctcagttag 180
cgagcgcgca gcgagggagt ggcccacttc atcactaggc gttcctgcgg ccgcacgcgt 240
ctagttcact catagtaatc gaacttcgcg ttactcataa cagtgaacgc tgacgtcatc 300
aaccgcgtcc aaggaatcgc gggcccagtg tcactaggcg gggaacaccc agcgcgcgtg 360
cgccctggca ggaagatggc tgcgagggac aggggagtgg cgccccgcaa tattttccat 420
gtcggctatg tgttcttggg aaatcaccat aaacgtgaaa tgtctttgga tttgggaatc 480
ttataagttt ctgtatgaga ccactcggat ccgtgaggtg gtaggttgta tagtttcaag 540
agaactatac aacctactac ctcatTTTTG agtcaaaaa aaaccgtag atccgatctt 600
gtgctcttga cacaagatcg gatctacggg tttcgggtgt cgcgctcctt ccacaagata 660
tataaaccca agaaatcgaa atactttcaa gttacggtaa gcatatgata gtccatttta 720
aaacataatt ttaaaactgc aaactacca agaaattatt actttctacg tcacgtattt 780
tgtactaata tctttgtgtt tacagtcaaa ttaattctaa ttatctctct aacagccttg 840
tatcgtatat gcaaatatga aggaatcatg ggaaataggc cctcttcctg cccgaccttc 900
tgtccccctc accccacgtc gacattaatg aagcttggcg actagtaata ctgtaatagt 960
aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 1020
cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg cctatatgca tggccccagg 1080
aaatcggaaa tagttcaagt tacggtaagc atatgatagt ccattttaaa acattatTTT 1140
aaactgcaaa ctacccaaga aaattatact ttctacgtca cgtatTTTgt actaatatct 1200
ttgtgtttac agtcaaatta ttctaattat ctctcctaac agccttgat cgtatatgca 1260
aatatgaacg gaatcatggg aaataggccc tcttcctgcc cgaccttctg tccccccac 1320
cccacgtcga cgacaggatt ggtgacagag aacgtgacg tcatcaaccc gctccaagga 1380
atcgcgggcc cagtgtcact aggcgggaac acccagcgcg cgtgcgcctt ggcaggaaga 1440
tggtgtgtgag ggacagggga gtggcgccct gcaatatttg catgtcgcta tgtgttcttg 1500
gaaatcacca taaacgtgaa atgtcttttg atttgggaat cttataagtt ctgtatgaga 1560
ccactcggat ccggtgaggt agtaggttgt atggtttcaa gagaaccata caacctacta 1620
cctcatTTTT gagtcaaaaa aaaaaccgt agatccgaac ttgtgctctt gacacaagtt 1680
cggatctacg ggttcggtgt tcgcgtcctt tccacaagat atataaaccc aagaaatcga 1740
aatactttca agttacggtg agcatatgat agtccatttt aaaacataat tttaaaactg 1800
caaactaccc aagaaattat tactttctac gtcacgtatt ttgtactaat atctttgtgt 1860
ttacagtcaa attaatctta attatctctc taacagcctt gtatcgtata tgcaaatatg 1920
aaggaatcat gggaaatagg ccctcttcct gcccagcctt aagcttggcg actagtaata 1980

```

ctgtaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt 2040
 acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgccc acgacccccg ccccatgatg 2100
 ccctagtaaa tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa 2160
 tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt 2220
 atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc 2280
 ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat 2340
 gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgggtgatgc 2400
 ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc 2460
 tccacccccat tgacgtcaat gggagtgtgt tttgcacaa aatcaacggg actttccaaa 2520
 atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggagggt aggcgtgtac ggtgggagggt 2580
 ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccgc tagagatccg gtaccgagga 2640
 gatctgccgc cgcgatcgcc ggccgcccag atctcacgt taactagcta gcggaccgac 2700
 gcgtacgcgg ccgctcgaga tggtagcaaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggcgcc 2760
 catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg 2820
 cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagtcc atctgcacca ccggcaagct 2880
 gcccggtgcc tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggctgcagt gcttcagccg 2940
 ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccc aaggctacgt 3000
 ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa 3060
 gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcacgact tcaaggagga 3120
 cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat 3180
 ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga 3240
 cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt 3300
 gctgctgccc gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga 3360
 gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcgcat 3420
 ggacgagctg tacaagtaag tcgaggatta taaggatgac gacgataaat tcgtcgagca 3480
 ccaccaccac caccactaat aaggtttatc cgatccaccg gatctagata agatatccga 3540
 tccaccggat ctagataact gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt 3600
 gcttttaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt 3660
 gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat 3720
 ttcacaaata aagcattttt ttactgcat tctagtgtg gtttgtccaa actcatcaat 3780
 gtatcttaac gcggtaacca cgtgcggacc gagcggccgc aggaaccct agtgatggag 3840
 ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 3900
 cgacgcccgg gctttgcccg ggccggcctc gtgagcgagc gagcgcgag ctgcctgcag 3960
 gggcgctga tcgggtatct tctccttacg catctgtgag gtatttcaca ccgcatacgt 4020
 caaagcaacc atagtacgag ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 4080
 cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc 4140
 cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 4200
 tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat ttgggtgatg 4260
 gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 4320

```

cgttcttttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcgggct 4380
attctttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 4440
tttaacaaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt ttatgggtgca 4500
ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4560
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 4620
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacgctc atcacgaaa cgcgcgagac 4680
gaaagggcct cgtgatacgc ctatTTTTtT aggttaatgt catgataata atggtttctt 4740
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTtT 4800
aaatacatte aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4860
attgaaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttcctgtt cgcccttatt ccctTTTTtT 4920
cggcatTTTTtT ccttctgtt tttgtcacc cagaaacgt ggtgaaagta aaagatgctg 4980
aagatcagtt ggggtcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 5040
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat 5100
gtggcgcggt attatcccg attgacgcc ggcaagagca actcggctgc cgcatacact 5160
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 5220
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taacctagag tgataacact gcggccaact 5280
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg 5340
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaa cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 5400
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 5460
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 5520
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5580
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5640
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5700
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 5760
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatTTaA aaggatctag gtgaagatcc 5820
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgctcag 5880
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct 5940
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac 6000
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc 6060
tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 6120
ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 6180
tggaactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 6240
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 6300
tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 6360
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 6420
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 6480
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctTTTTtT acggttctg gcctTTTTtT 6540
ggcctTTTTtT tcacatgt
6558

```

<210> 86

<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 载体JBT-miR2中的let-7a-5p序列
<400> 86
gacggcgcta ggatcatcaa caactataca accaatgtac tacctcacia gtattctggt 60
cacagaatac aacaactata caaccaatgt actacctcac aagatgatcc tagcgccgctc 120
<210> 87
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 载体JBT-miR2中的let-7a-5p反向互补物
<400> 87
gacggcgcta ggatcatcctt gtgaggtagt acattggttg tatagttggt gtattctgtg 60
accagaatac ttgtgaggta gtacattggt tgtatagttg ttgatgatcc tagcgccgctc 120
<210> 88
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 载体JBT-miR2中的miR-99a-5p序列
<400> 88
gacggcgcta ggatcatcaa ccacaagatc ggaaatgtct acgggtacaa gtattctggt 60
cacagaatac aaccacaaga tcggaaatgt ctacgggtac aagatgatcc tagcgccgctc 120
<210> 89
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 载体JBT-miR2中的miR-99a-5p反向互补物
<400> 89
gacggcgcta ggatcatcctt gtacccgtag acatttccga tcttgtggtt gtattctgtg 60
accagaatac ttgtacccgt agacatttcc gatcttgtgg ttgatgatcc tagcgccgctc 120
<210> 90
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>	
<223> hsa-miR-99a-5p MIMAT00000097	
<400> 90	
aacccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 91	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-miR-99a-5p MIMAT00000097互补序列	
<400> 91	
cacaagatcg gatctacggg tt	22
<210> 92	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 99aFOR	
<400> 92	
aacactagtc acaagatcgg atctacgggt taagcttggt	40
<210> 93	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 99Arev	
<400> 93	
aacaagctta acccguagau ccgaucuugu gactagtgtt	40
<210> 94	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-miR-100-5p MIMAT00000098	
<400> 94	
aacccguaga uccgaacuug ug	22
<210> 95	
<211> 22	
<212> DNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-miR-100-5p MIMAT00000098互补序列	
<400> 95	
cacaagttcg gatctacggg tt	22
<210> 96	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 100正向引物	
<400> 96	
aacactagtc acaagttcgg atctacgggt taagcttggt	40
<210> 97	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 100反向引物	
<400> 97	
aacaagctta acccguagau ccgaacuugu gactagtgtt	40
<210> 98	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-let-7a-5p MIMAT00000062	
<400> 98	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 99	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-let-7a-5p MIMAT00000062互补序列	
<400> 99	
aactatacaa cctactacct ca	22
<210> 100	
<211> 40	

<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> LET7A正向引物	
<400> 100	
aacactagta actatacaac ctactacctc aaagcttggt	40
<210> 101	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> LET7A反向引物	
<400> 101	
aacaagcttu gagguaguag guuguauagu uactagtgtt	40
<210> 102	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-let-7c-5p MIMAT0000064	
<400> 102	
ugagguagua gguuguaugg uu	22
<210> 103	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> hsa-let-7c-5p MIMAT0000064互补序列	
<400> 103	
aaccatacaa cctactacct ca	22
<210> 104	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> LET7C正向引物	
<400> 104	
aacactagta accatacaac ctactacctc aaagcttggt	40
<210> 105	

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LET7C反向引物

<400> 105

aacaagcttu gagguaguag guuguauggu uactagtgtt

40

<210> 106

<211> 6436

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> pMIR-REPORT-萤光素酶_hsa-miR-99a

<400> 106

gacgaaagat tgggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat 60
gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag 120
tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccatt 180
cccgcctcta actccgcccc gttccgcccc ttctccgccc catggctgac taatTTTTTT 240
tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg 300
ctTTTTTtga ggcctaggct ttgcaaaaa gctagcttgc atgcctgcag gtcggccgcc 360
acgaccggtg ccgccaccat cccctgacct acgcccctga cccctcaca ggagacgacc 420
ttccatgacc gagtacaagc ccacggtgcg cctcgccacc cgcgacgacg tccccgggc 480
cgtacgcacc ctgcgcccg cgctcgccga ctaccccgcc acgcgccaca ccgtcgacct 540
ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct gcaagaactc ttcctcacgc gcgtcgggct 600
cgacatcggc aaggtgtggg tcgcggacga cggcgccgcg gtggcggtct ggaccacgcc 660
ggagagcgtc gaagcggggg cgggtgttcg cgagatcggc ccgcgcatgg ccgagttgag 720
cggttcccg cgtggccgcg agcaacagat ggaaggcctc ctggcgccgc accggcccaa 780
ggagcccgcg tggttcctgg ccaccgtcgg cgtctcgccc gaccaccagg gcaagggtct 840
gggcagcgcc gtcgtgctcc ccggagtggg ggcgcccgag cgcgccgggg tgcccgccct 900
cctggagacc tccgcgcccc gcaacctccc cttctacgag cggctcggct tcaccgtcac 960
cgccgacgtc gaggtgcccc aaggaccgcg cacctggtgc atgaccgca agcccgggtc 1020
ctgacgcccc cccacgacc cgacgcgcc gaccgaaagg agcgacgac cccatggctc 1080
cgaccgaagc caccggggg ggccccgccc accccgcacc cgccccgag gcccaccgac 1140
tctagaggat cataatcagc cataccacat ttgtagaggt ttacttgct ttaaaaaacc 1200
tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt 1260
ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaatttc acaataaag 1320
catttttttc actgcaatct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 1380
atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 1440
ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 1500

```

cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 1560
cccttttttg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 1620
aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 1680
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 1740
gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 1800
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 1860
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 1920
gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac 1980
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata 2040
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 2100
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 2160
gataaagttg caggaccact tctgcgtcgc gcccttcgg ctggctggtt tattgctgat 2220
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 2280
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 2340
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa 2400
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag 2460
gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac 2520
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 2580
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttt tttgccgat 2640
caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 2700
actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccattca agaactctgt agcaccgcct 2760
acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 2820
cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccgataagg cgcagcggtc gggctgaacg 2880
gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 2940
cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg 3000
gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgaggagc ttccaggggg aaacgcctgg 3060
tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 3120
tcgtcagggg ggcgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 3180
gccttttgct ggcttttgcc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat 3240
aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 3300
agcgagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg 3360
cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggttcc cgcactggaa agcgggcagt 3420
gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccacaggc tttacacttt 3480
atgcttccgg ctcgtatgtt gtgtggaatt gtgagcgat aacaatttca cacaggaaac 3540
agctatgaca tgattacgaa ttgcaacgat ttaggtgaca ctatagaaga gaaggaatta 3600
atacgactca ctataggag agagagagaa ttaccctcac taaagggagg agaagcatga 3660
attcaaggta ccagatctta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 3720
cccatatatg gaggttccgc ttacataact tacggtaaat ggcccgctg gctgaccgcc 3780
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 3840

```

gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca 3900
 tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggccgcg 3960
 ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 4020
 attagtcac gctattacca tggatgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 4080
 gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttggt 4140
 ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca 4200
 aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctgggt tagtgaaccg 4260
 tggatccacc atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct 4320
 agaggatgga accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc 4380
 tggaacaatt gcttttacag atgcacatat cgaggtgaac atcacgtacg cggaatactt 4440
 cgaaatgtcc gttcggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag 4500
 aatcgtcgta tgcagtgaat actctcttca attctttatg ccggtgttg ggcggttatt 4560
 tatcgaggtt gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag 4620
 tatgaacatt tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aagggttg caaaaatttt 4680
 gaacgtgcaa aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga 4740
 ttaccaggga tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa 4800
 tgaatacgat tttgtaccag agtccttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa 4860
 ttctcttgga tctactgggt tacctaaggg tgtggcctt ccgcatagaa ctgcctgcgt 4920
 cagattctcg catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcgttccg atactgcgat 4980
 ttttaagtgt gtccattcc atcacggtt tggaatgtt actacactcg gatatttgat 5040
 atgtggattt cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct 5100
 tcaggattac aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaccc ctattttcat tcttcgcaa 5160
 aagcactctg attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc 5220
 acctctttcg aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaacgc ttccatctc cagggatacg 5280
 acaaggatat gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga 5340
 taaaccgggc gcggtcggta aagttgttcc atttttgaa gcgaaggtt tggatctgga 5400
 taccgggaaa acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat 5460
 tatgtccggt tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg 5520
 gctacattct ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg 5580
 cttgaagtct ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat 5640
 attgttacaa caccacaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttccg acgatgacgc 5700
 cggtgaactt cccgccgccc ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga 5760
 gatcgtggat tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgt 5820
 gtttgtggac gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga 5880
 gatcctcata aaggccaaga agggcggaat gtccaaattg ctcgagtgat gaaagctgcg 5940
 cactagtcac aagatcggt ctacgggtta agcttaataa aggatctttt attttcattg 6000
 gatctgtgtg ttggtttttt gtatgcggcc gctagcttg cactggccgt cgttttaca 6060
 cgctgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgacg acatccccct 6120
 ttcgccagct ggcgtaatat cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc 6180

agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt 6240
 tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gtttaagccag 6300
 ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc 6360
 gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca 6420
 tcaccgaaac gcgcga 6436

<210> 107

<211> 6436

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> pMIR-REPORT-萤光素酶_hsa-miR-100

<400> 107

gacgaaagat tgggtgtgaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat 60
 gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag 120
 tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccatt 180
 cccgccccta actccgccc gttccgccc ttctccgccc catggctgac taatTTTTTT 240
 tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg 300
 ctttttttga ggccctaggct ttgcaaaaa gctagcttgc atgcctgcag gtcggccgcc 360
 acgaccggtg ccgccaccat cccctgacct acgcccctga cccctcaca ggagacgacc 420
 ttccatgacc gagtacaagc ccacgggtgc cctcgccacc cgcgacgacg tccccgggc 480
 cgtacgcacc ctgcgcccg cgctcgccga ctaccccgcc acgcgccaca ccgtcgacct 540
 ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct gcaagaactc ttctcacgc gcgtcgggct 600
 cgacatcggc aagggtgtggg tcgcggaaga cggcgccgcg gtggcggtct ggaccacgcc 660
 ggagagcgtc gaagcggggg cgggtgttcg cgagatcggc ccgcgcatgg ccgagttgag 720
 cgggttccccg ctggccgcgc agcaacagat ggaaggcctc ctggcgccgc accggcccaa 780
 ggagcccgcg tggttcctgg ccaccgtcgg cgtctcgccc gaccaccagg gcaagggtct 840
 gggcagcgcc gtcgtgctcc ccggagtggg ggcgcccgag cgcgcccggg tgcccgcctt 900
 cctggagacc tccgcgcccc gcaacctccc cttctacgag cggctcggct tcaccgtcac 960
 cgccgacgtc gaggtgcccc aaggaccgcg cacctggtgc atgaccgcga agcccgggtgc 1020
 ctgacgcccc cccacgacc cgcagcgccc gaccgaaagg agcgacgac cccatggctc 1080
 cgaccgaagc cccccgggc ggccccgcg acccgcacc cgccccgag gcccaccgac 1140
 tctagaggat cataatcagc cataccacat ttgtagaggt ttacttgct ttaaaaaacc 1200
 tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt 1260
 ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaatttc acaataaag 1320
 catTTTTTt actgcaatct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 1380
 atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 1440
 ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 1500
 cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 1560
 cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 1620

```

aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 1680
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 1740
gttctgctat gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 1800
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 1860
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc a taaccatgag tgataacact 1920
gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac 1980
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaa cggagctgaa tgaagccata 2040
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 2100
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 2160
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg ctggctggtt tattgctgat 2220
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 2280
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 2340
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa 2400
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag 2460
gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac 2520
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 2580
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttt tttgccgat 2640
caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 2700
actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 2760
acatacctcg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 2820
cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccgataagg cgcagcggtc gggctgaacg 2880
gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 2940
cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt ccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg 3000
gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 3060
tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 3120
tcgtcagggg ggcgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 3180
gccttttgct ggcttttgcc tcacatgttc tttcctgcgt tatccctga ttctgtggat 3240
aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 3300
agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg 3360
cgttgccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt 3420
gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccacaggc tttacacttt 3480
atgcttccgg ctctgtatgt gtgtggaatt gtgagcgat aacaatttca cacaggaaac 3540
agctatgaca tgattacgaa ttgcaacgat ttaggtgaca ctatagaaga gaaggaatta 3600
atacactca ctataggag agagagagaa ttaccctcac taaaggagg agaagcatga 3660
attcaaggta ccagatctta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 3720
cccatatatg gattccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgctg gctgaccgcc 3780
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 3840
gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgccact tggcagtaca 3900
tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggt aatggccgc 3960

```

ctggcattat gccagttaca tgaccttatg ggacttttct acttggcagt acatctacgt 4020
 attagtcacg gctattacca tggatgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 4080
 gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttggt 4140
 ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca 4200
 aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg 4260
 tggatccacc atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct 4320
 agaggatgga accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc 4380
 tggaacaatt gcttttacag atgcacatat cgaggtgaac atcacgtacg cggaatactt 4440
 cgaaatgtcc gttcgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag 4500
 aatcgtcgta tgcagtgaag actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt 4560
 tatcgaggtt gcagttgcgc ccggaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag 4620
 tatgaacatt tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aagggttgc aaaaaatttt 4680
 gaacgtgcaa aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga 4740
 ttaccaggga tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa 4800
 tgaatacgat tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa 4860
 ttctcttgga tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt 4920
 cagattctcg catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcgttccgg atactgcgat 4980
 ttttaagtgt gtccattcc atcacggtt tggaatgtt actacactcg gatatttgat 5040
 atgtggattt cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct 5100
 tcaggattac aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaccc ctattttcat tcttcgcaa 5160
 aagcactctg attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc 5220
 acctctttcg aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaacgc ttccatcttc cagggatacg 5280
 acaaggatat gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga 5340
 taaaccgggc gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtt tggatctgga 5400
 taccgggaaa acgctgggcg ttaatcagag aggcaatta tgtgtcagag gacctatgat 5460
 tatgtccggg tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg 5520
 gctacattct ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg 5580
 cttgaagtct ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat 5640
 attgttacaa caccacaaca tcttcgacgc ggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc 5700
 cggtgaactt cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaataaga 5760
 gatcgtggat tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg 5820
 gtttgtggac gaagtaccga aaggtcttac cggaatactc gacgcaagaa aaatcagaga 5880
 gatcctcata aaggccaaga agggcggaat gtccaaattg ctcgagtgat gaaagctgcg 5940
 cactagtcac aagttcggat ctacgggtta agcttaataa aggatctttt attttcattg 6000
 gatctgtgtg ttggtttttt gtatgcggcc gctagcttgg cactggccgt cgttttaca 6060
 cgctgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgacg acatccccct 6120
 ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc 6180
 agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt 6240
 tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag 6300

ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc 6360
 gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagagggtt ttcaccgtca 6420
 tcaccgaaac gcgcga 6436

<210> 108

<211> 6436

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> pMIR-REPORT-萤光素酶_hsa-let-7a-5p

<400> 108

gacgaaagat tgggtgtgaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat 60
 gcatctcaat tagtcagcaa ccaggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag 120
 tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccatt 180
 cccgccccta actccgcccc gttccgcccc ttctccgccc catggctgac taatTTTTTT 240
 tattttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg 300
 ctttttttga ggccctaggct ttgcaaaaaa gctagcttgc atgcctgcag gtcggccgcc 360
 acgaccggtg ccgccaccat cccctgacct acgcccctga cccctcaca ggagacgacc 420
 ttccatgacc gagtacaagc ccacggtgcg cctcgccacc cgcgacgacg tccccgggc 480
 cgtacgcacc ctgcgcccg cgctcgccga ctaccccgcc acgcgccaca ccgtcgacct 540
 ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct gcaagaactc ttctcacgc gcgtcgggct 600
 cgacatcggc aagggtgtgg tcgcggacga cggcgccgcg gtggcggtct ggaccacgcc 660
 ggagagcgtc gaagcggggg cgggtgttcg cgagatcggc ccgcgcatgg ccgagttgag 720
 cggttcccg cggtgccgcg agcaacagat ggaaggcctc ctggcgccgc accggcccaa 780
 ggagcccgcg tggttcctgg ccaccgtcgg cgtctcgccc gaccaccagg gcaagggtct 840
 gggcagcgcc gtcgtgctcc ccggagtggg ggcgcccgag cgcgccgggg tgcccgccctt 900
 cctggagacc tccgcgcccc gcaacctccc cttctacgag cggctcggct tcaccgtcac 960
 cgccgacgtc gaggtgcccc aaggaccgcg cacctggtgc atgaccgcga agcccgggtgc 1020
 ctgacgcccc cccacgacc cgcagcgccc gaccgaaagg agcgacgac cccatggctc 1080
 cgaccgaagc cccccgggc ggccccgcg acccgcacc cgccccgag gccaccgac 1140
 tctagaggat cataatcagc cataccacat ttgtagagg tttacttgct ttaaaaaacc 1200
 tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt 1260
 ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaatttc acaataaag 1320
 catTTTTTt actgcaatct cgtgatacgc ctatTTTTt aggttaatgt catgataata 1380
 atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 1440
 ttatTTTTt aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 1500
 cttcaataat attgaaaaa gaagagtatg agtattcaac atttcctgtt cgcccttatt 1560
 ccctTTTTt cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 1620
 aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacg gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 1680
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 1740

gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcgggtcgc 1800
 cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt 1860
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc aaccatgag tgataacact 1920
 gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac 1980
 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaa cggagctgaa tgaagccata 2040
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 2100
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 2160
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg ctggctggtt tattgctgat 2220
 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcatt cagcactggg gccagatggt 2280
 aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 2340
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 2400
 gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaattta aaggatctag 2460
 gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac 2520
 tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 2580
 gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttt tttgccgat 2640
 caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 2700
 actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 2760
 acatacctcg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 2820
 cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccgataagg cgcagcggtc gggctgaacg 2880
 gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 2940
 cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg 3000
 gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgaggagc ttccaggggg aaacgcctgg 3060
 tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 3120
 tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 3180
 gcctttttgct ggctttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatccctga ttctgtggat 3240
 aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 3300
 agcagctcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg 3360
 cgttgccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt 3420
 gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccacaggc tttacacttt 3480
 atgcttccgg ctctgatgtt gtgtggaatt gtgagcgat aacaatttca cacaggaaac 3540
 agctatgaca tgattacgaa ttgcaacgat ttaggtgaca ctatagaaga gaaggaatta 3600
 atacgactca ctataggag agagagagaa ttaccctcac taaaggagg agaagcatga 3660
 attcaaggta ccagatctta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 3720
 cccatatatg gatttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgctg gctgaccgcc 3780
 caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 3840
 gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca 3900
 tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacgta aatggccgc 3960
 ctggcattat gccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 4020
 attagtcac gctattacca tgggtgatgc gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 4080

gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttggt 4140
 ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca 4200
 aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctgggt tagtgaaccg 4260
 tggatccacc atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct 4320
 agaggatgga accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc 4380
 tggaacaatt gcttttacag atgcacatat cgaggtgaac atcacgtacg cggaatactt 4440
 cgaaatgtcc gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag 4500
 aatcgtcgta tgcagtgaag actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt 4560
 tatcggagtt gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag 4620
 tatgaacatt tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aagggttgc aaaaaatttt 4680
 gaacgtgcaa aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga 4740
 ttaccaggga tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa 4800
 tgaatacgat tttgtaccag agtccttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa 4860
 ttctcttgga tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt 4920
 cagattctcg catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcgttccgg atactgcgat 4980
 ttttaagtgt gtccattcc atcacggtt tggaatgtt actacactcg gatatttgat 5040
 atgtggattt cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct 5100
 tcaggattac aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa 5160
 aagcactctg attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc 5220
 acctctttcg aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaacgc ttccatcttc cagggatacg 5280
 acaaggatat gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga 5340
 taaaccgggc gcggtcggta aagttgttcc atttttgaa gcgaagggtg tggatctgga 5400
 taccgggaaa acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat 5460
 tatgtccggg tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg 5520
 gctacattct ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg 5580
 cttgaagtct ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat 5640
 attgttacaa caccacaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc 5700
 cggatgaact cccgccgccg ttgtgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga 5760
 gatcgtggat tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg 5820
 gtttgtggac gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga 5880
 gatcctcata aaggccaaga agggcggaat gtccaaattg ctcgagtgat gaaagctgcg 5940
 cactagtaac tatacaacct actacctcaa agcttaataa aggatctttt attttcattg 6000
 gatctgtgtg ttggtttttt gtatgcggcc gctagcttgg cactggccgt cgttttacaa 6060
 cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaate gccttgacg acatccccct 6120
 ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc 6180
 agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt 6240
 tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atccgcata gttaagccag 6300
 ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc 6360
 gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca 6420

tcaccgaaac gcgcga 6436

<210> 109

<211> 6436

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> pMIR-REPORT-萤光素酶_hsa-let-7c-5p

<400> 109

gacgaaagat tgggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat 60

gcatctcaat tagtcagcaa ccaggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag 120

tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccatt 180

cccgcgcccta actccgcccc gttccgcccc ttctccgccc catggctgac taattttttt 240

tattttatgca gaggccgagg ccgctcgggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg 300

ctttttttgga ggccctaggct tttgcaaaaa gctagcttgc atgcctgcag gtcggccgcc 360

acgaccggtg ccgccaccat cccctgaccc acgcccctga cccctcaca ggagacgacc 420

ttccatgacc gagtacaagc ccacggtgcg cctcgccacc cgcgacgacg tccccgggc 480

cgtacgcacc ctgcgcccg cgctcgccga ctaccccgcc acgcgccaca ccgtcgaccc 540

ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct gcaagaactc ttctcacgc gcgtcgggct 600

cgacatcggc aagggtgtggg tcgcggaaga cggcgccgcg gtggcggtct ggaccacgcc 660

ggagagcgtc gaagcggggg cgggtgttcg cgagatcggc ccgcgcatgg ccgagttgag 720

cggttcccg cggtgccgcg agcaacagat ggaaggcctc ctggcgccgc accggcccaa 780

ggagcccgcg tggttcctgg ccaccgtcgg cgtctcgccc gaccaccagg gcaagggtct 840

gggcagcgcc gtcgtgctcc ccggagtggg ggcgcccgag cgcgccgggg tgcccgcctt 900

cctggagacc tccgcgcccc gcaacctccc cttctacgag cggctcggct tcaccgtcac 960

cgccgacgtc gaggtgcccc aaggaccgcg cacctggtgc atgaccgcga agcccgtgc 1020

ctgacgcccc cccacgacc cgcagcgccc gaccgaaagg agcgacgac cccatggctc 1080

cgaccgaagc cccccgggc ggccccgccc acccgcacc cgccccgag gccaccgac 1140

tctagaggat cataatcagc cataccacat ttgtagaggt ttacttgct ttaaaaaacc 1200

tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt 1260

ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaatttc acaataaag 1320

catttttttc actgcaatct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 1380

atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 1440

ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 1500

cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttcctgtg cgcccttatt 1560

cccttttttg cggcattttg ctttcctgtt tttgctcacc cagaaacgt ggtgaaagta 1620

aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcaga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 1680

ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa 1740

gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 1800

cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt 1860

acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taacatgag tgataacact 1920
 gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac 1980
 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaaac cggagctgaa tgaagccata 2040
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 2100
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 2160
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt tatttgctgat 2220
 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 2280
 aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 2340
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 2400
 gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag 2460
 gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac 2520
 tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 2580
 gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttt tttgccgat 2640
 caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 2700
 actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 2760
 acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 2820
 cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccgataagg cgcagcggtc gggctgaacg 2880
 gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 2940
 cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg 3000
 gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgaggagc ttccagggg aaacgcctgg 3060
 tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 3120
 tcgtcagggg ggccgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 3180
 gccttttgct ggcttttgct tcacatgttc tttcctgcgt tatccccga ttctgtggat 3240
 aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 3300
 agcagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg 3360
 cgttgccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt 3420
 gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccacaggc tttacacttt 3480
 atgcttccgg ctctgtatgt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 3540
 agctatgaca tgattacgaa ttgcaacgat ttaggtgaca ctatagaaga gaaggaatta 3600
 atacgactca ctataggag agagagagaa ttaccctcac taaaggagg agaagcatga 3660
 attcaaggta ccagatctta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 3720
 cccatatatg gaggttccgc ttacataact tacggtaaat ggcccgctg gctgaccgcc 3780
 caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 3840
 gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacgtaa actgcccact tggcagtaca 3900
 tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacgta aatggccccg 3960
 ctggcattat gccagtaca tgaccttat ggactttcct acttggcagt acatctacgt 4020
 attagtcac gctattacca tggatgatgc gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 4080
 gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttgtt 4140
 ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc cattgacgca 4200

```

aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg 4260
tggatccacc atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc cgggcgccat tctatcctct 4320
agaggatgga accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc 4380
tggaacaatt gcttttacag atgcacatat cgaggtgaac atcacgtacg cggaatactt 4440
cgaaatgtcc gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag 4500
aatcgtcgta tgcagtgaac actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt 4560
tatcgaggtt gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag 4620
tatgaacatt tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aagggttgc aaaaaatttt 4680
gaacgtgcaa aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga 4740
ttaccaggga tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa 4800
tgaatacgat tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa 4860
ttcctctgga tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt 4920
cagattctcg catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcgttccgg atactgcgat 4980
tttaagtgtt gtcccatcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat 5040
atgtggattt cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct 5100
tcaggattac aaaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa 5160
aagcactctg attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc 5220
acctctttcg aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaacgc ttccatcttc cagggatacg 5280
acaaggatat gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga 5340
taaaccgggc gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtt tgatctgga 5400
taccgggaaa acgctgggcg ttaatcagag aggcaatta tgtgtcagag gacctatgat 5460
tatgtccggt tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg 5520
gctacattct ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg 5580
cttgaagtct ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat 5640
attgttacia caccacaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc 5700
cggatgaact cccgccgccg ttgtgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga 5760
gatcgatgat tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg 5820
gtttgtggac gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga 5880
gatcctcata aaggccaaga agggcggaat gtccaaattg ctcgagtgat gaaagctgcg 5940
cactagtaac catacaacct actacctcaa agcttaataa aggatctttt attttcattg 6000
gatctgtgtg ttggtttttt gtatgcggcc gctagcttgg cactggccgt cgttttacia 6060
cgctgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaate gccttcgacg acatccccct 6120
ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc 6180
agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcctc gtgcggtatt 6240
tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atccgcata gttaagccag 6300
ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc 6360
gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca 6420
tcaccgaaac gcgcga
6436

```

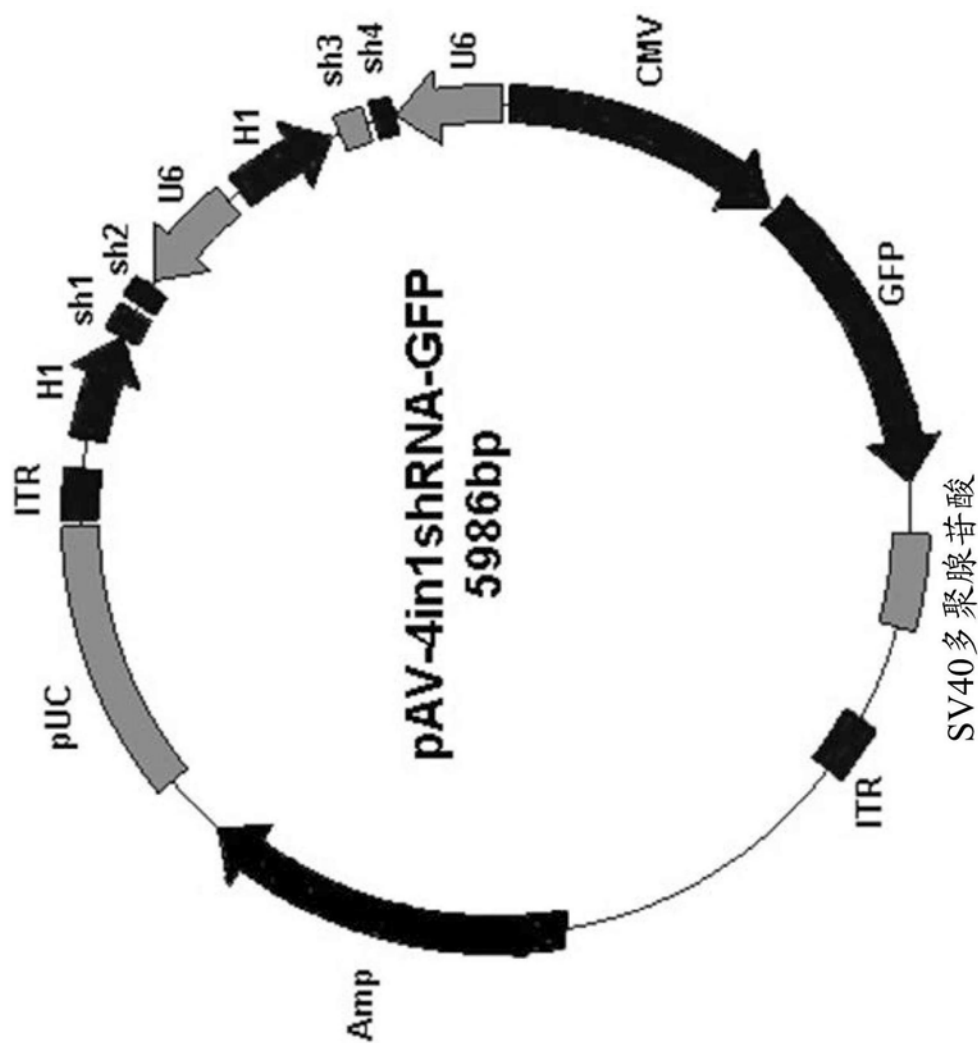


图1

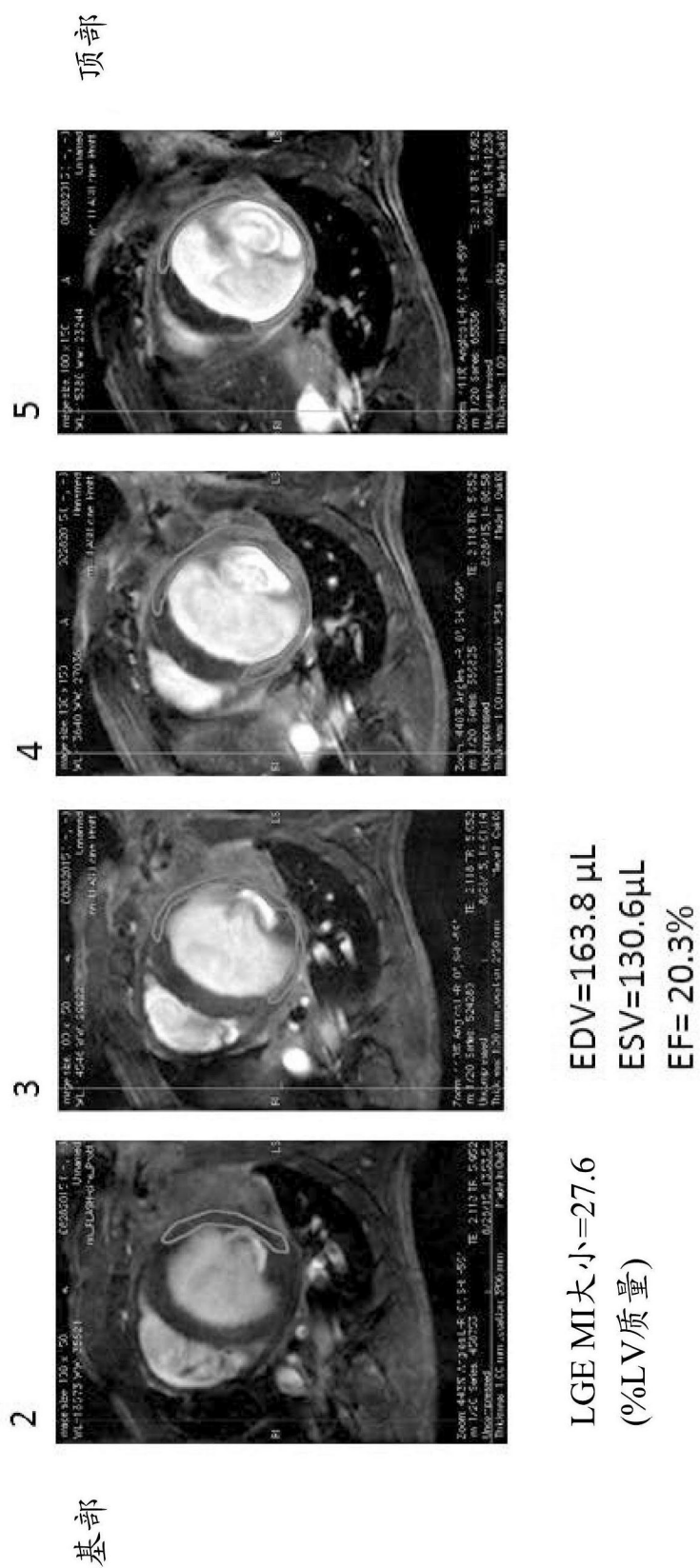


图2A

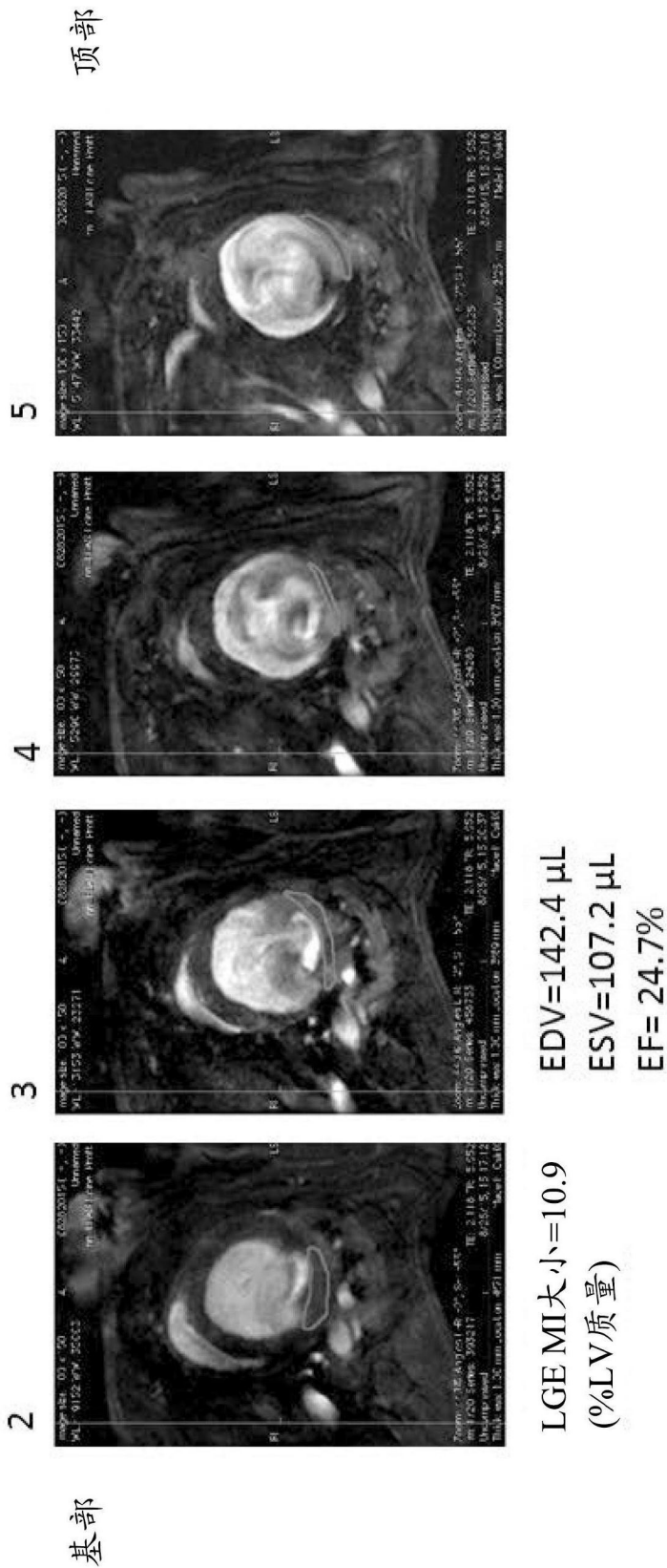


图2B

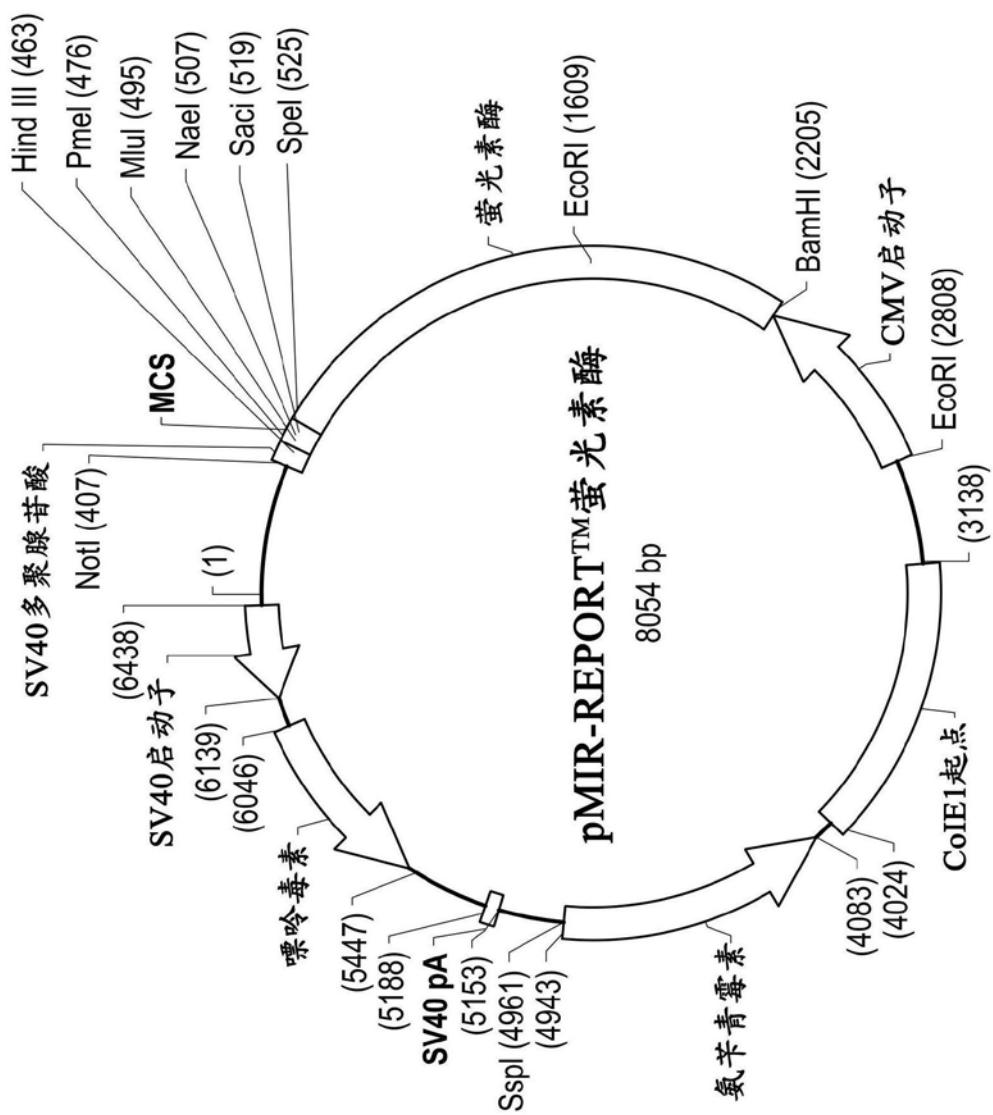


图3

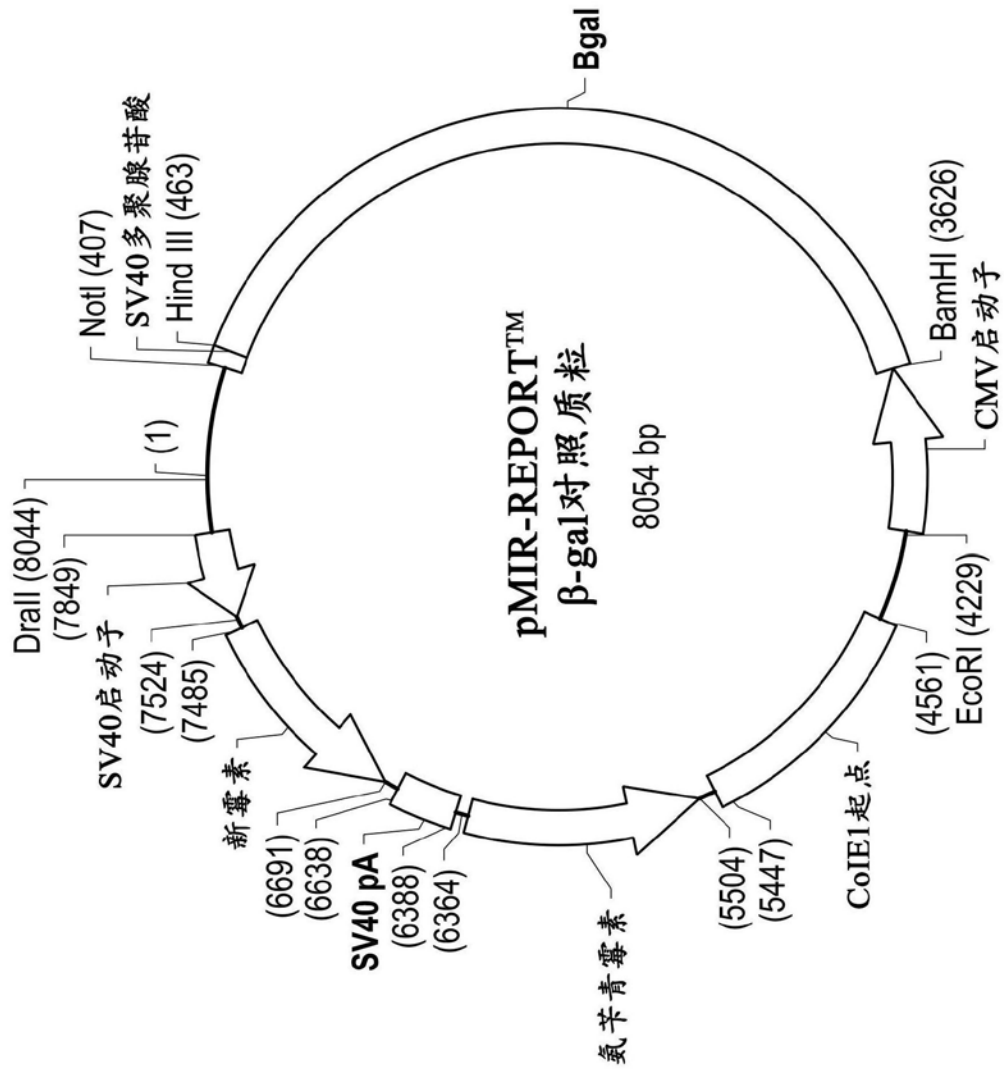


图4

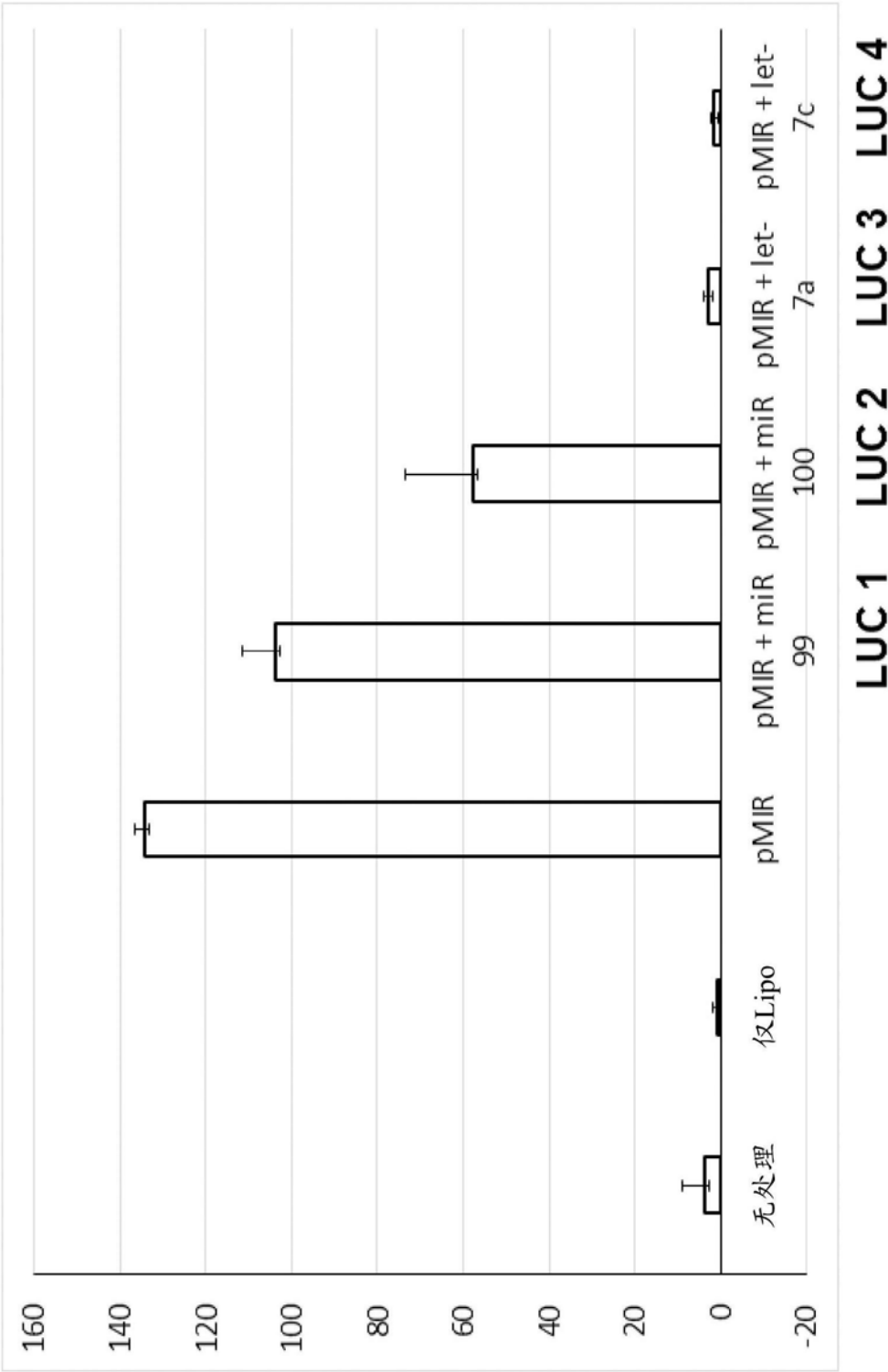


图5

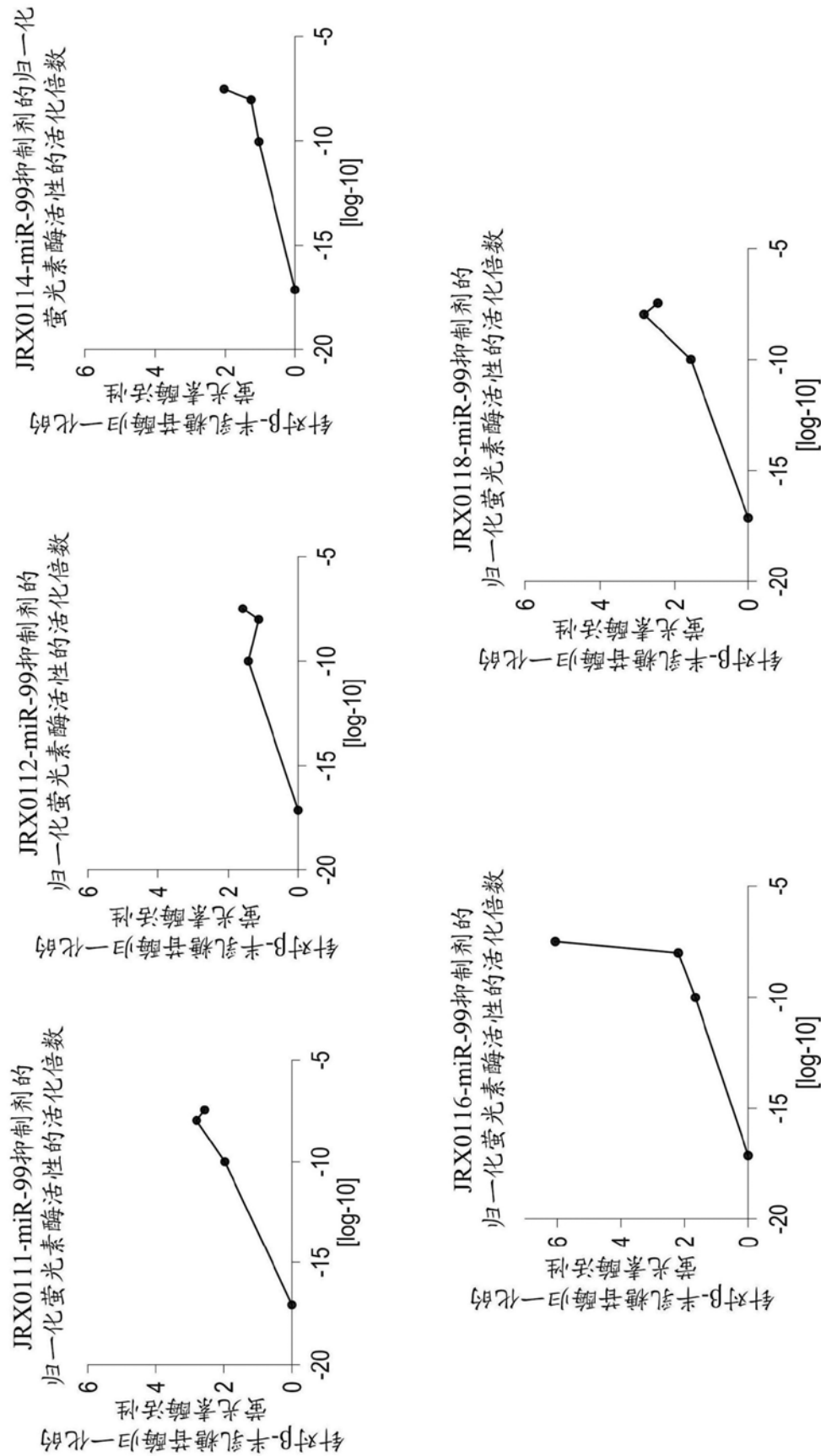


图6

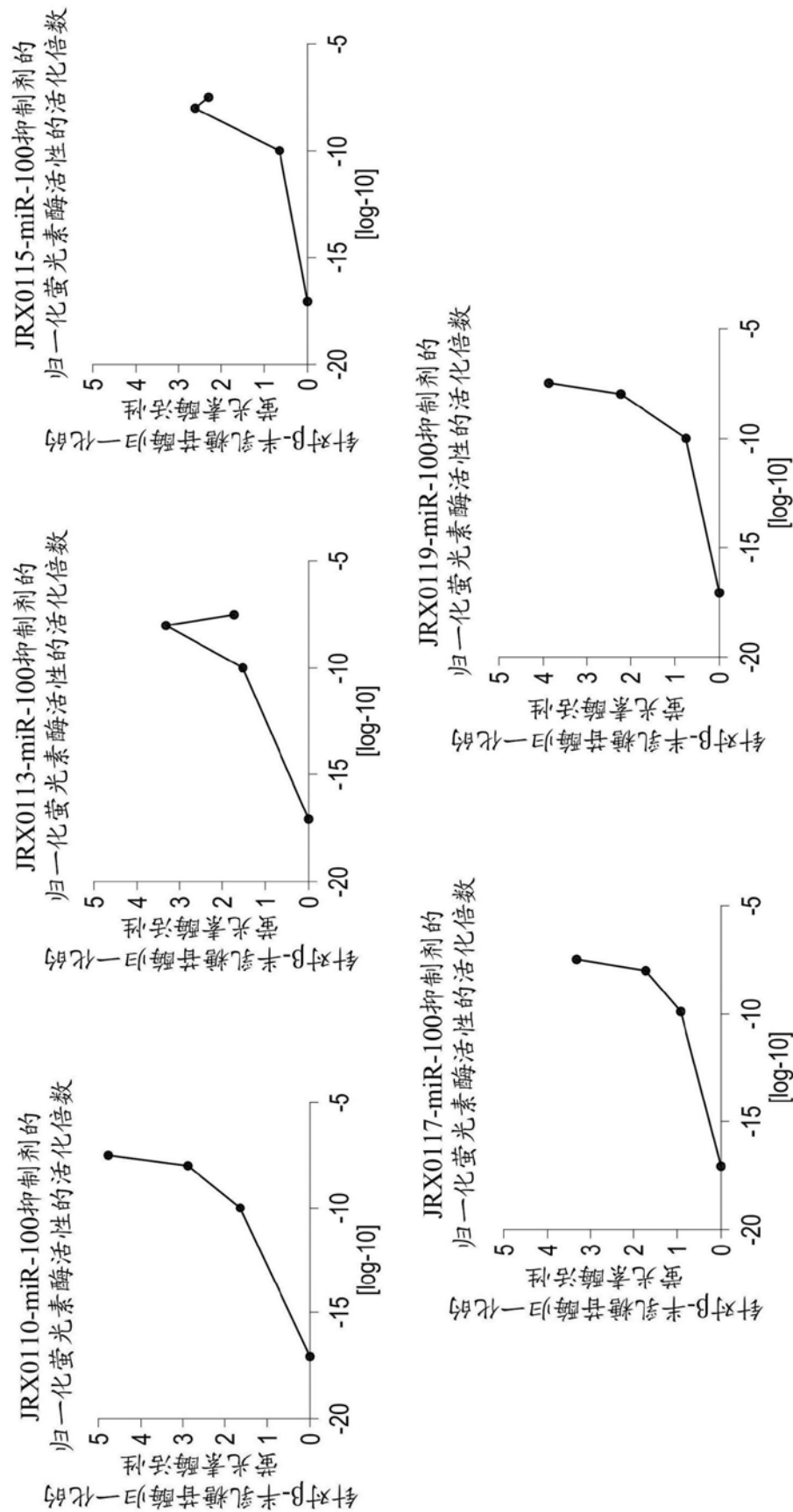


图7

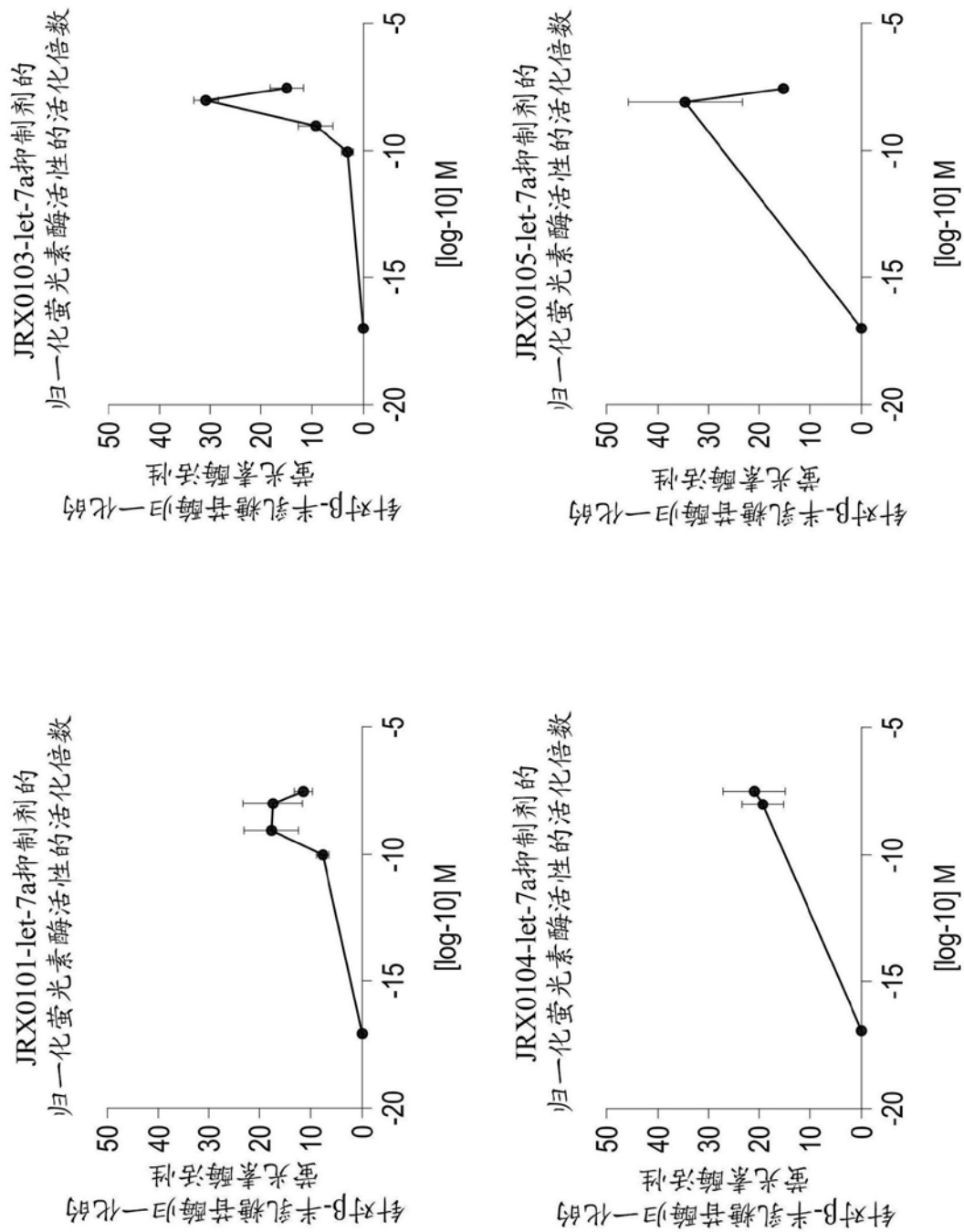


图8A

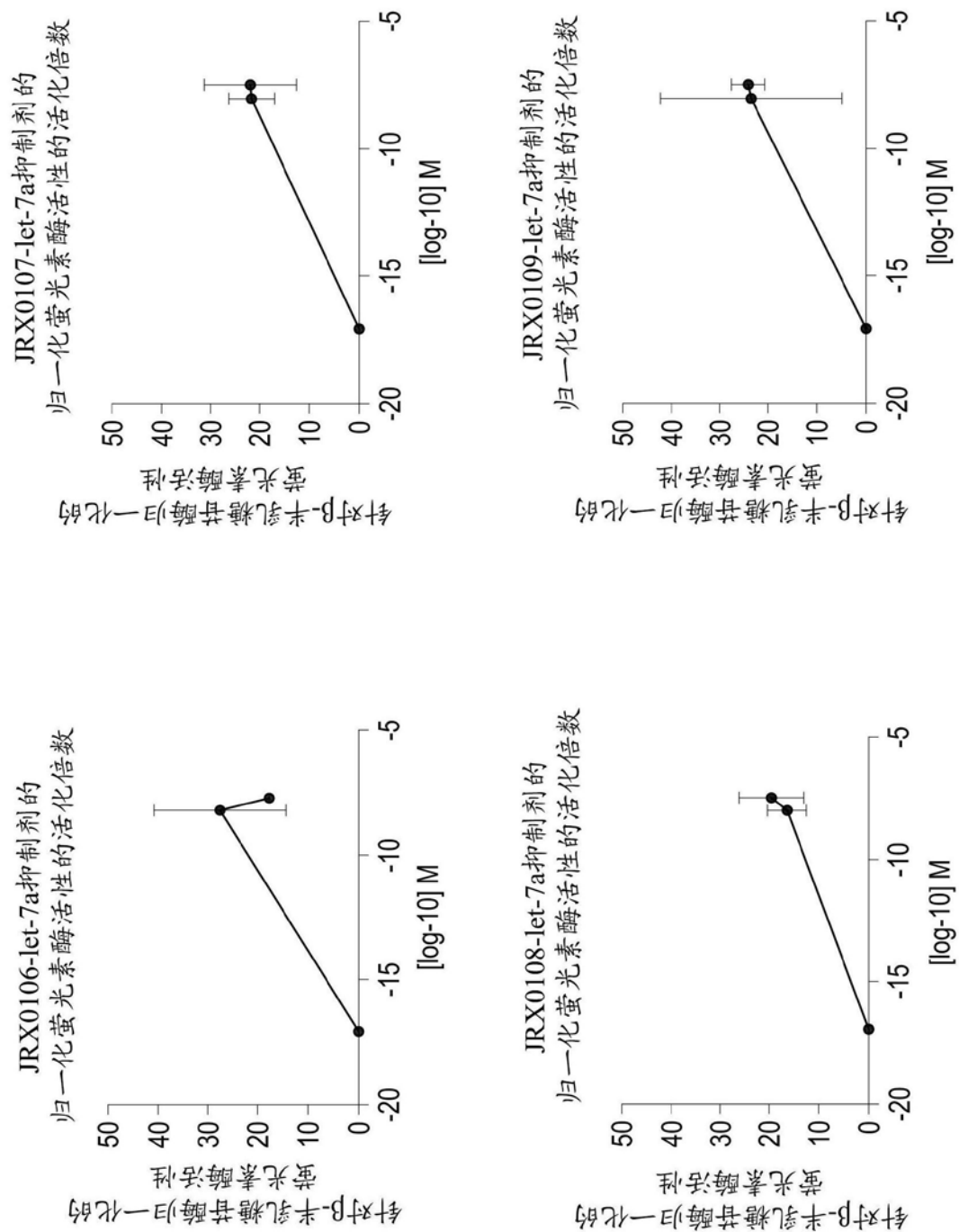


图8B

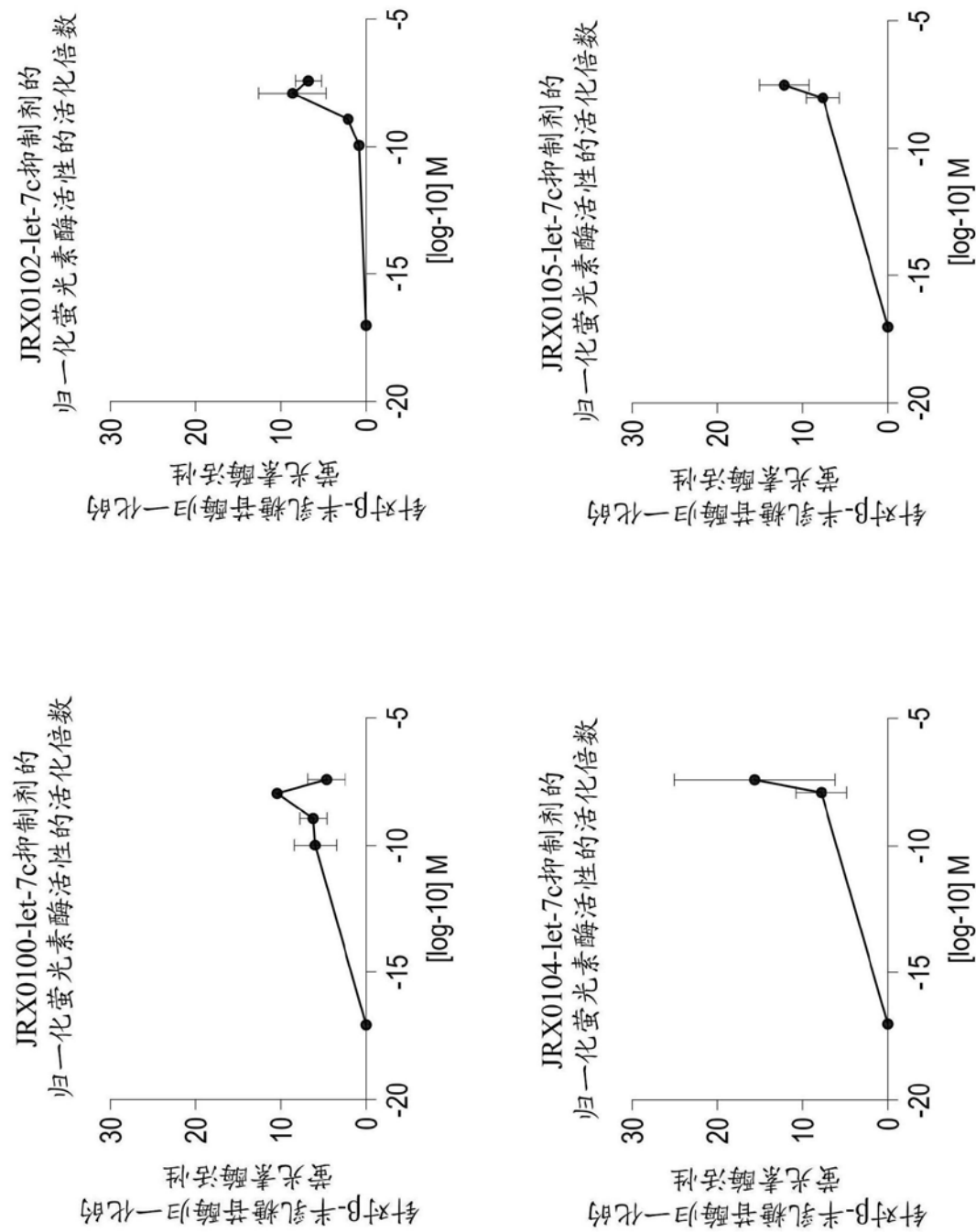


图9A

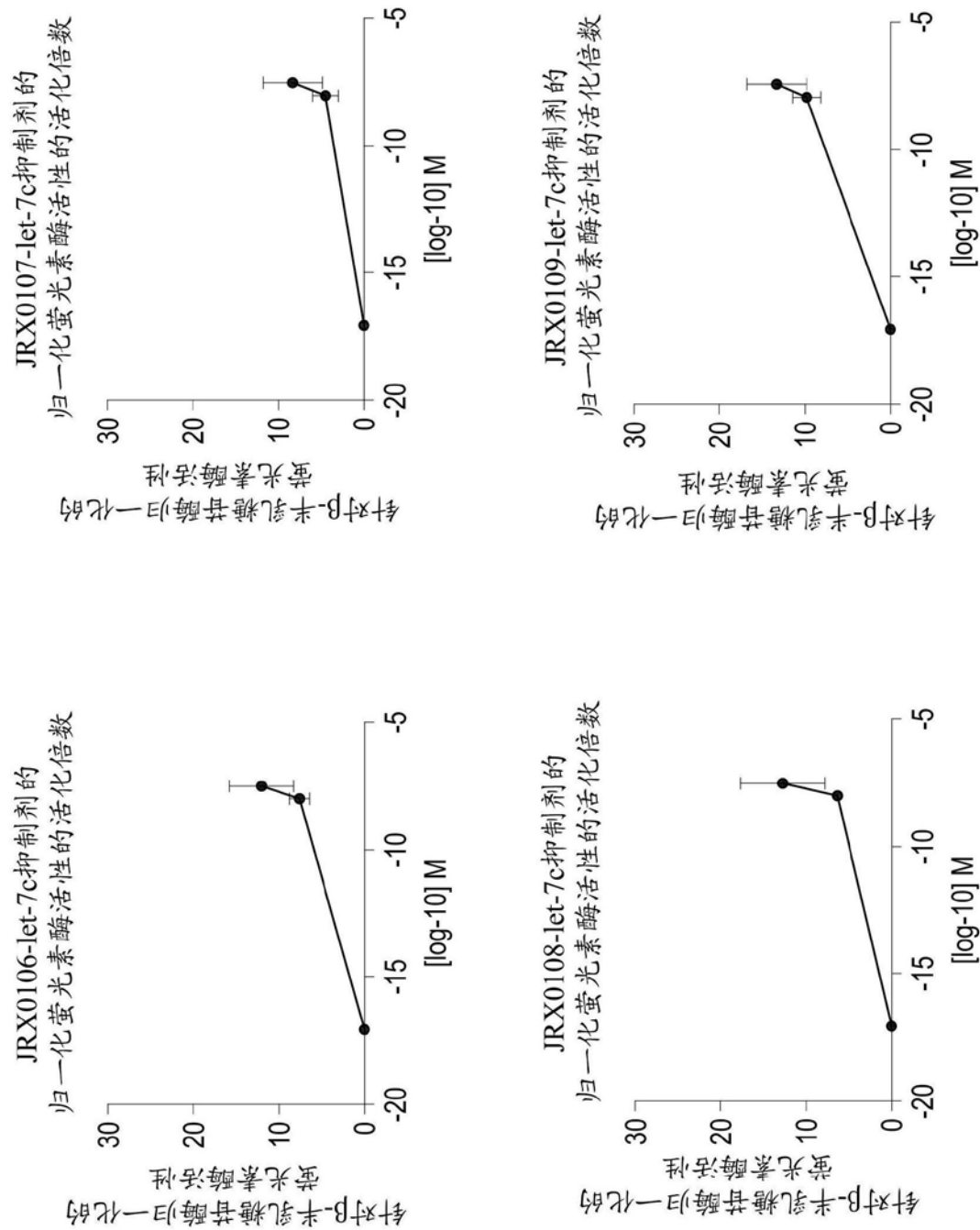


图9B

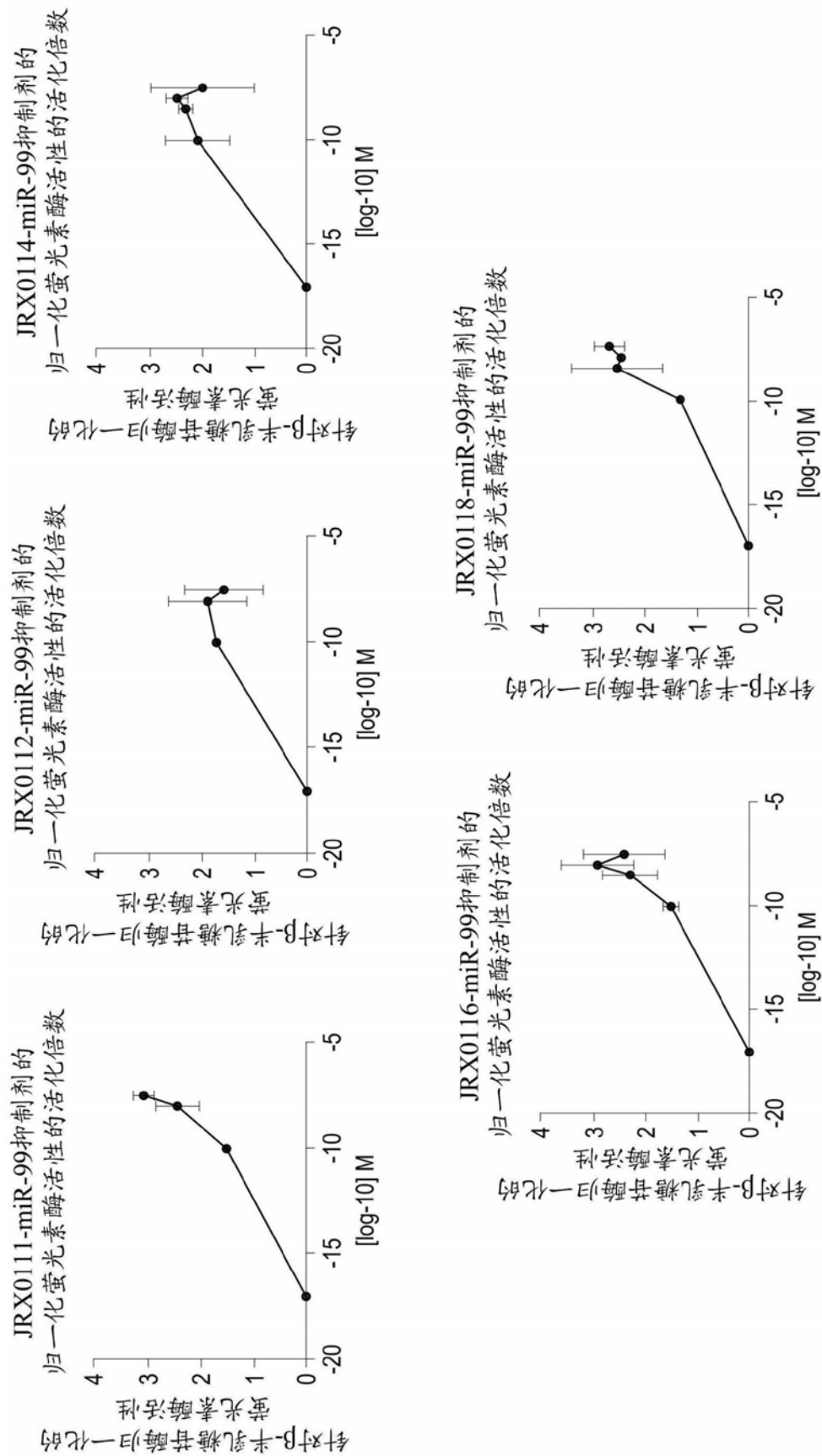


图10

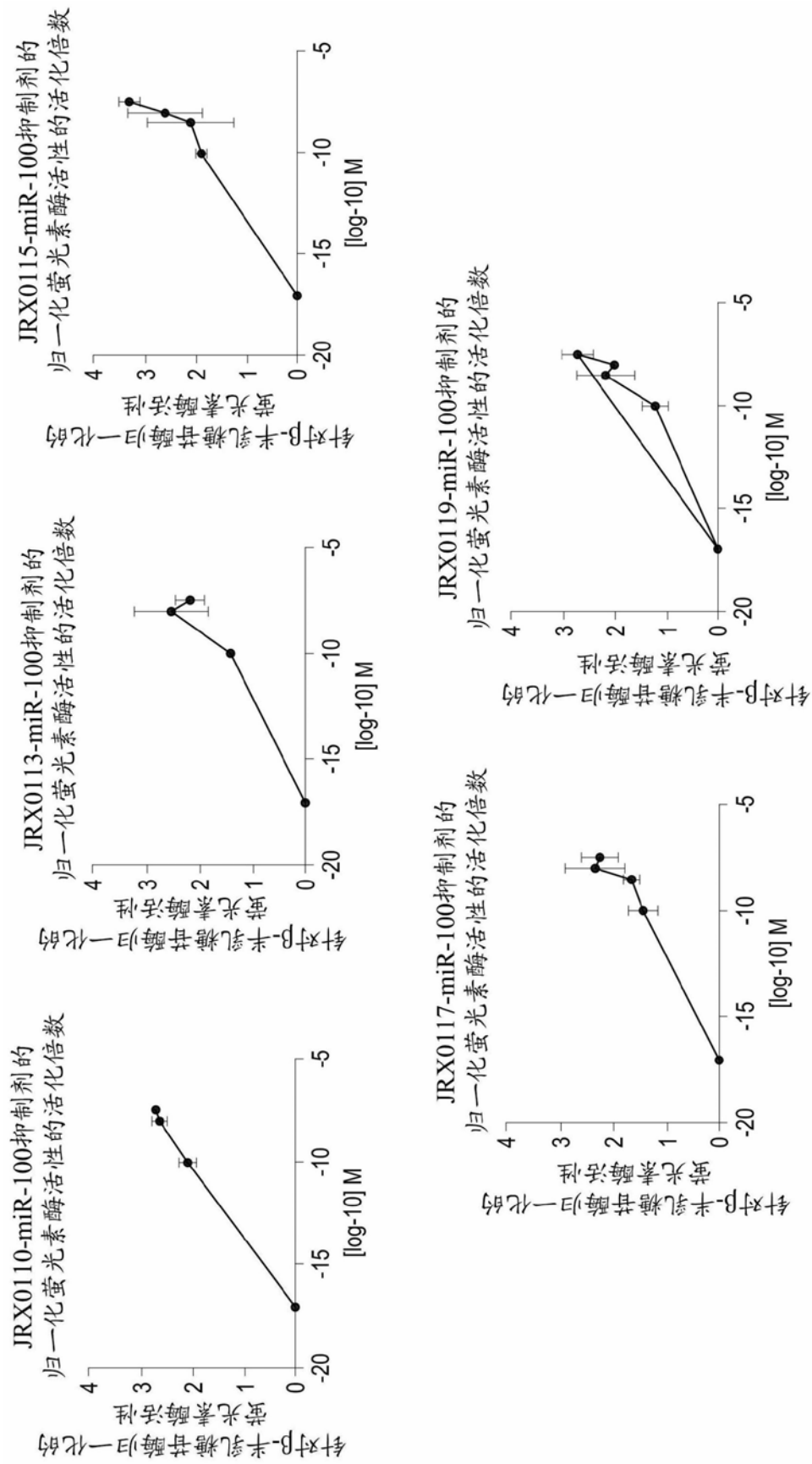


图11

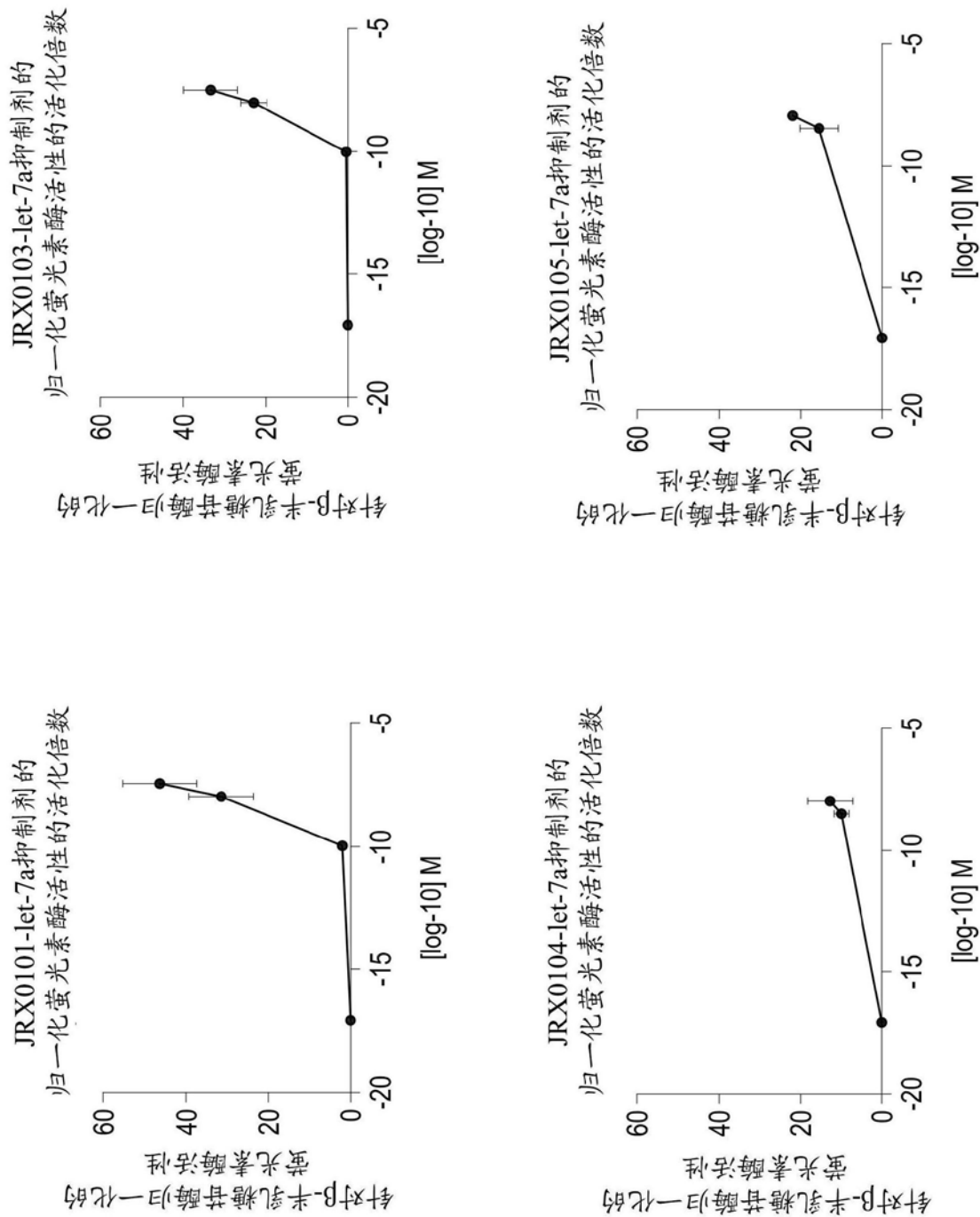


图12A

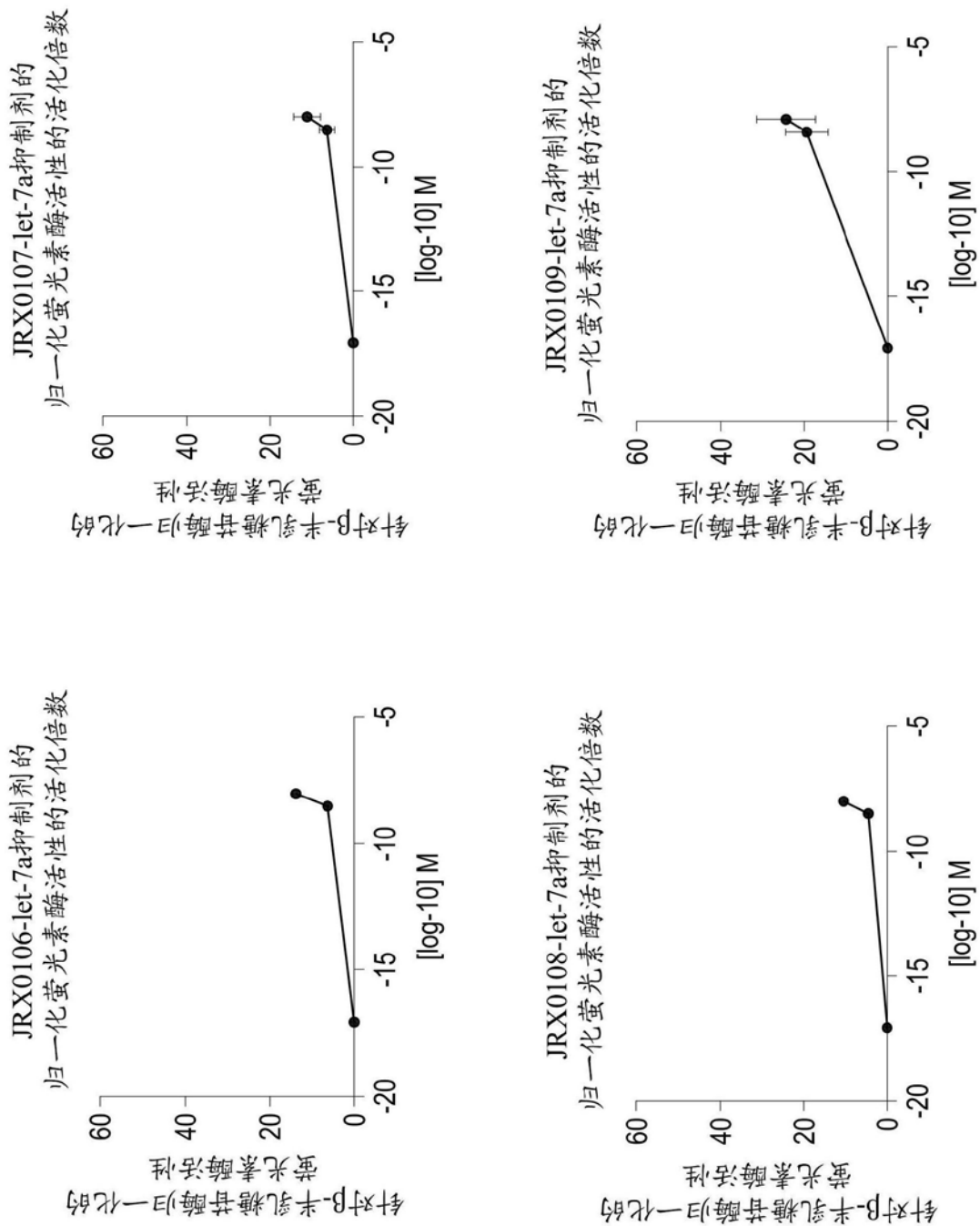


图12B

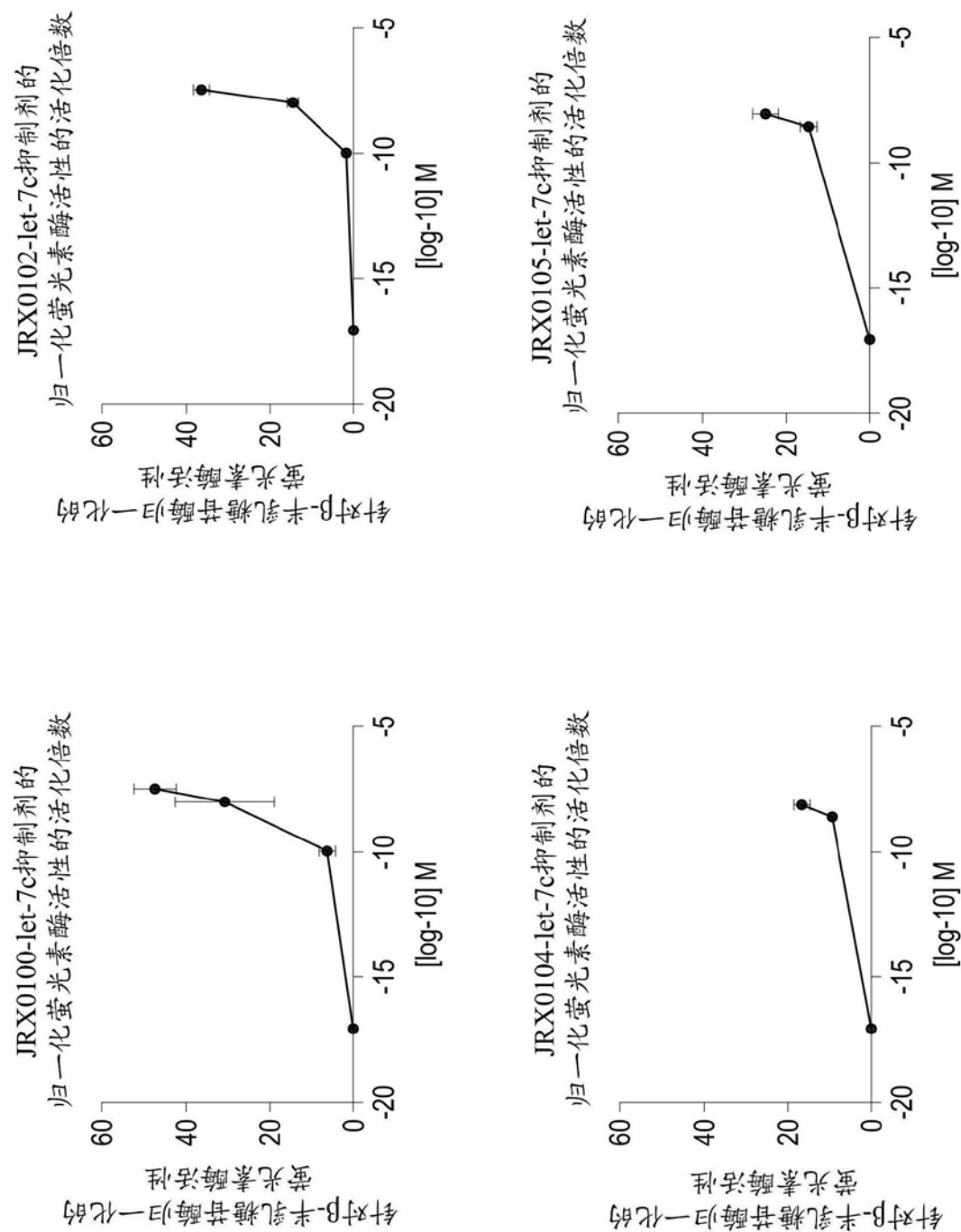


图13A

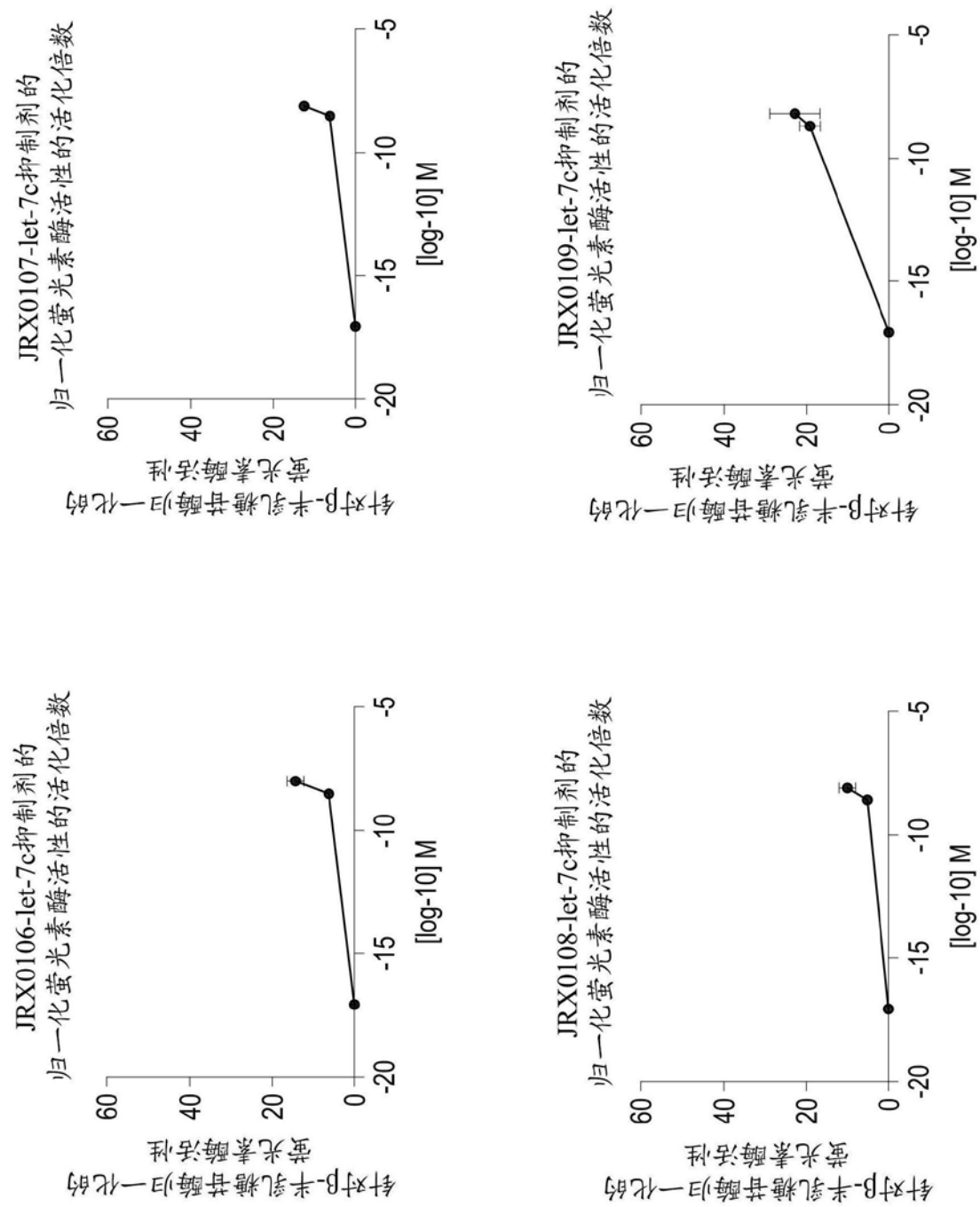


图13B