



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102791859 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 21

(21) 申请号 201080063933. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 12. 15

C12N 15/11 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/286, 622 2009. 12. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/060460 2010. 12. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02011/084460 EN 2011. 07. 14

(71) 申请人 得克萨斯系统大学董事会

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 E. N. 奥尔森 E. V. 鲁伊杰

D. 奎亚特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 27 页

序列表 6 页 附图 5 页

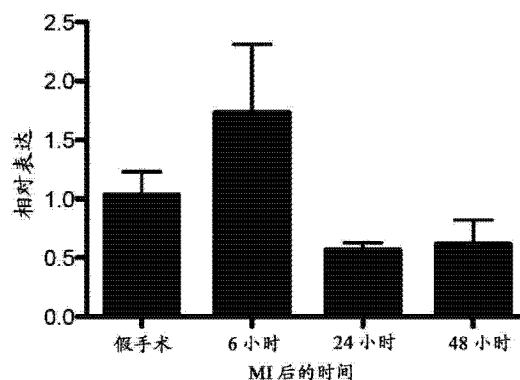
(54) 发明名称

在缺血和缺血再灌注损伤中的微小 RNA 调节

(57) 摘要

本发明涉及缺血和缺血再灌注损伤后的心脏重塑中涉及的 miRNA 的鉴定。这些 miRNA 的亚组在缺血事件后的短时间内受到调节, 指示这些 miRNA 在后续病理学事件的诱导中起重要作用。描述了对这些鉴定的 miRNA 的调整作为用于心肌缺血和缺血再灌注损伤的治疗或预防。

梗死区中的 miR-199a



1. 一种在有此需要的受试者中治疗或预防心肌缺血的方法,其包括调节在表 1 和 2 中列出的一种或多种 miRNA 在该受试者的心脏细胞中的表达或活性。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种 miRNA 选自 miR-15 家族成员、miR-21、miR-26a、let-7b、miR-199a、miR-214、miR-10a、miR-10b、miR-574、miR-320、miR-92a、miR-499、miR-101a、miR-101b、miR-125b、miR-126、miR-30 家族成员、miR-143、miR-145、miR-185、miR-34a、miR-1、miR-133、miR-210 和 miR-29a-c。

3. 权利要求 2 的方法,其中调节包括给所述受试者施用选自 miR-15 家族成员、miR-92a、miR-320、miR-21、miR-199a、miR-499 和 miR-30 家族成员的一种或多种 miRNA 的抑制剂。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述一种或多种 miRNA 的抑制剂是反义寡核苷酸或 Antagomir。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述反义寡核苷酸包含与所述一种或多种 miRNA 的成熟序列至少部分互补的序列。

6. 权利要求 4 的方法,其中所述反义寡核苷酸包含至少一种糖和 / 或主链修饰。

7. 权利要求 4 的方法,其中所述反义寡核苷酸的长度为约 8 至约 18 个核苷酸。

8. 权利要求 2 的方法,其中调节包括给所述受试者施用选自 miR-126、miR-143、miR-210 和 miR-29a-c 的一种或多种 miRNA 的激动剂。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述一种或多种 miRNA 的激动剂是包含所述一种或多种 miRNA 的成熟序列的多核苷酸。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述激动剂由表达构建体表达。

11. 权利要求 3 或 8 的方法,其中所述抑制剂或激动剂通过静脉内施用、皮下施用、或直接注射到心脏组织内而施用于所述受试者。

12. 权利要求 3 或 8 的方法,其中所述抑制剂或激动剂通过经口、经皮、持续释放、受控释放、延迟释放、栓剂、导管或舌下施用而施用于所述受试者。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述受试者具有冠状动脉疾病。

14. 权利要求 1 的方法,其中在调节一种或多种所述 miRNA 的表达或活性后在所述受试者中心肌细胞损失被减少或防止。

15. 权利要求 1 的方法,其进一步包括施用第二心脏治疗剂。

16. 权利要求 12 的方法,其中所述第二心脏治疗剂选自抗心绞痛药、 β 阻断剂、Ionotrope、利尿药、ACE 抑制剂、血管紧张素 2 型拮抗剂、内皮缩血管肽受体拮抗剂、HDAC 抑制剂和钙通道阻断剂。

17. 权利要求 1 的方法,其中所述受试者是人。

18. 一种在有此需要的受试者中预防或减少响应缺氧的心肌细胞损失的方法,其包括给所述受试者施用 miR-199a、miR-320 的抑制剂和 / 或 miR-210 的激动剂。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述 miR-199a 或 miR-320 的抑制剂是反义寡核苷酸或 Antagomir。

20. 权利要求 18 的方法,其中所述 miR-210 的激动剂是包含 miR-210 的成熟序列的多核苷酸。

21. 权利要求 18 的方法,其中所述激动剂是 HIF1 α 。

22. 权利要求 18 的方法,其中所述激动剂由表达构建体表达。

在缺血和缺血再灌注损伤中的微小 RNA 调节

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2009 年 12 月 15 日提交的美国临时申请号 61/286,622 的优先权利, 将其整体引入本文作为参考。

[0003] 政府支持的陈述

[0004] 本申请在由美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的授权号 HL53351-06 下由政府支持进行。政府在本发明中拥有一定权利。

发明领域

[0005] 本发明概括地涉及心脏学、病理学和分子生物学领域。特别地, 本发明包含响应缺血心脏组织的缺血和再灌注而受到调节的几种 miRNA。对这些鉴定的 miRNA 的表达的操作提供了用于治疗心肌缺血和其他形式的缺血损伤的新治疗方法。

[0006] 发明背景

[0007] 心脏病及其表现, 包括冠状动脉疾病、心肌梗死、充血性心力衰竭和心脏肥大, 明确呈现为美国当今的主要健康风险。诊断、治疗和赡养患有这些疾病的患者的费用高达 (is well into) 数十亿美元。心脏病特别严重的表现是心肌梗死。心肌梗死 (MI) 更通常称为心脏病发作, 是当对于心脏的一部分的血液供给中断时发生的医学状况, 最通常是由于易损斑块的破裂。血液供给中的中断最初导致缺血和氧不足引起的损害, 这可以进展为心脏组织死亡 (即梗死)。它遍及全世界对于男性和女性均为死亡主要原因。仅在美国, 冠心病是 5 例死亡中 1 例的原因, 并且大约 7,200,000 个男性和 6,000,000 个女性正忍受着某一形式的冠心病。在他们中, 每年 1,200,000 人患有新的或复发性冠心病发作, 并且其中约 40% 由于发作而死亡。这意味着大致每 65 秒, 1 个美国人死于冠心病事件。

[0008] 心肌梗死的先兆是心肌缺血。心肌缺血在氧输送不能满足心脏中的心肌代谢需要时发生。这种缺陷可以起因于氧的减少供应 (减少的冠状动脉血流) 或对于氧增加的心肌需求 (增加的壁压力或后负荷)。尽管缺氧是必须组分, 但它不是由缺血心脏经历的唯一环境应激。缺血产生损伤心血管功能的多种环境应激。因此, 多个信号传导途径在使细胞损伤降到最低且维持心输出量的尝试中在缺血损伤过程中在哺乳动物细胞中是激活的。在激活的转录调节物中有缺氧诱导因子 (HIF) 转录因子家族的成员。响应减少的氧浓度, HIF 因子调节影响众多细胞过程的多种基因, 所述细胞过程包括代谢 (增强的葡萄糖摄取)、经由血管生成的新血管形成、细胞存活和氧输送, 所有这些在心脏中是重要的。这些基因表达级联是快速的且影响对于心肌缺血的最初应答, 这影响心肌收缩力中所得到的减少。缺血后通常为组织的再灌注, 允许氧和代谢底物的重新接纳, 它们替换缺血代谢产物。再灌注过程诱导心肌中的生物化学、结构和功能变化, 并且可以倾斜细胞存活和细胞死亡之间的平衡。

[0009] 与 MI 后重塑相关的基因表达和信号传导途径中的变化已得到深入研究, 目的是鉴定可能允许受损心脏的功能恢复的治疗靶。近来, 微小 RNA 在心脏肥大和心力衰竭中的关键作用已得到描述, 指向心脏病调节的新模式 (van Rooij 等人 (2006) Proc Natl Acad Sci USA, 第 103 卷 (48):18255-60; vanRooij 和 Olson (2007) J Clin Invest., 第 117 卷

(9):2369-76;van Rooij等人(2008)Proc Natl Acad Sci USA,第105卷(35):13027-32)。微小RNA(miRNA)是长度约18-约25个核苷酸的小的非蛋白质编码RNA,其衍生自单个miRNA基因、蛋白质编码基因的内含子、或通常编码多个紧密关联的miRNA的多顺反子转录物。参见Carrington等人的综述(Science,第301卷(5631):336-338,2003)。当miRNA和靶mRNA的序列完全互补时,miRNA通过促进靶mRNA的降解来充当靶mRNA的阻遏物,或当miRNA和靶mRNA的序列含有错配时,miRNA通过抑制翻译来充当靶mRNA的阻遏物。

[0010] miRNA通过RNA聚合酶II(pol II)或RNA聚合酶III(pol III;参见Qi等人(2006)Cellular & Molecular Immunology,第3卷:411-419)转录,并且产生自称为初级miRNA转录物(pri-miRNA)的最初转录物,其一般长几千个碱基。pri-miRNA通过RNA酶Drosha在核中加工成约70-至约100-个核苷酸的发夹形前体(pre-miRNA)。在转运至细胞质后,发夹pre-miRNA通过Dicer进一步加工,以产生双链miRNA。成熟miRNA链随后掺入RNA诱导沉默复合体(RISC)内,在其中它通过碱基配对互补性与其靶mRNA结合。在其中miRNA与mRNA靶完全碱基配对的相对罕见的情况下,它促进mRNA降解。更通常地,miRNA与靶mRNA形成不完全异源双链体,影响mRNA稳定性或抑制mRNA翻译。

[0011] 基于在小鼠和人中的遗传研究,越来越明确的是miRNA确实活跃地涉及心脏重塑、生长、传导性(conductance)和收缩力(在van Rooij和Olson(2007)Journal of Clinical Investigation,第117卷(9):2369-2376中综述)。心脏缺血诱导可以影响心室的功能和对存活的预后的重塑,这依赖于肌细胞损失的程度和存活心肌组织的心室重塑程度。涉及响应缺血的最初细胞重塑过程的miRNA的鉴定和表征可以提供新治疗方法,以减少或消除缺血损伤的适应不良效应。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明部分基于在缺血事件或缺血继以组织再灌注后立即在心脏组织中受到调节的几种miRNA的发现。对这些鉴定的miRNA的调节呈现出用于治疗心肌缺血且预防心肌梗死和心力衰竭发展的新治疗方法。相应地,本发明提供了在有此需要的受试者中治疗或预防心肌缺血的方法,其包括调节一种或多种鉴定的miRNA在该受试者的心脏细胞中的表达或活性。在一个实施方案中,所述一种或多种miRNA选自miR-15家族成员、miR-21、miR-26a、let-7b、miR-199、miR-320、miR-214、miR-10a、miR-10b、miR-574、miR-92a、miR-499、miR-101a、miR-101b、miR-125b、miR-145、miR-126、miR-30家族成员、miR-143、miR-185、miR-34a、miR-1、miR-133、miR-210和miR-29a-c。在特定实施方案中,受试者具有冠状动脉疾病。

[0014] 在一个实施方案中,该方法包括给受试者施用一种或多种鉴定的miRNA的抑制剂。例如,所述抑制剂可以是选自miR-15家族成员、miR-92a、miR-320、miR-21、miR-199、miR-499和miR-30家族成员的miRNA的表达或活性的抑制剂。所述一种或多种miRNA的抑制剂可以包括Antagomir或反义寡核苷酸。

[0015] 在另一个实施方案中,该方法包括给受试者施用一种或多种鉴定的miRNA的激动剂。在某些实施方案中,所述激动剂增加选自miR-126、miR-143、miR-210和miR-29a-c的miRNA的表达或活性。在特定实施方案中,一种或多种miRNA的激动剂是包含一种或多种miRNA的成熟序列的多核苷酸。所述激动剂可以在体内由表达构建体表达。

[0016] 在某些实施方案中,治疗或预防心肌缺血的方法进一步包括施用第二心脏治疗

剂。第二心脏治疗剂可以是开处方为治疗心绞痛或冠状动脉疾病的试剂。在一个实施方案中,第二心脏治疗剂选自抗心绞痛药、 β -阻断剂、Ionotrope、利尿药、ACE-I、AII 拮抗剂、内皮缩血管肽受体拮抗剂、HDAC 抑制剂和钙通道阻断剂。

[0017] 本发明还包括预防或治疗有此需要的受试者中的缺血再灌注损伤的方法。在特定实施方案中,该方法包括施用在再灌注损伤后受到调节的一种或多种 miRNA 的调节剂。调节剂可以是 miRNA 功能或表达的抑制剂或激动剂。

[0018] 在另一个实施方案中,本发明包含预防或减少有此需要的受试者中响应缺氧的心肌细胞损失的方法,其包括给受试者施用 miR-199、miR-320 的抑制剂和 / 或 miR-210 的激动剂。在某些实施方案中,miR-210 的激动剂是转录因子 HIF1 α 。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1. 在缺血损伤后的心脏组织中的 miR-199a 表达。在心肌梗死诱导后 6、24 和 48 小时关于从小鼠的梗死区中分离的组织的 miR-199a 的实时 PCR 分析。

[0021] 图 2. HIF1 α 响应 miR-199 抑制在心肌细胞中是上调的。A. 在用针对 miR-199a 的 antimiR 或错配对照 (MM) 处理的心肌细胞中的 HIF1 α 表达的 Northern 印迹分析。B. 在 小鼠中在 antimiR-199a 或错配对照 (MM) 静脉内注射后在多种组织中关于 miR-199 的实时 PCR 分析。

[0022] 图 3. miR-320 在心肌缺血后的心脏组织中是下调的。在心肌缺血诱导后 6、24 和 48 小时关于从小鼠的梗死区中分离的组织的 miR-320 的实时 PCR 分析。

[0023] 图 4. miR-210 的表达在缺血和缺氧后的心脏细胞中被诱导。A. 在心肌缺血诱导后 6、24 和 48 小时关于从小鼠的梗死区中分离的组织的 miR-210 的实时 PCR 分析。B. 在体外暴露于缺氧条件后 6 和 12 小时关于大鼠新生儿心肌细胞的 miR-210 的实时 PCR 分析。

[0024] 图 5. 特定 miRNA 响应缺血再灌注被调节。在再灌注后的缺血组织中统计上显著受到调节的 miRNA 的热图 ($p < 0.01$)。

[0025] 发明详述

[0026] 本发明部分基于在缺血损伤后立即受到调节的 miRNA 亚组的鉴定。特别地,本发明人发现在缺血事件后的前 48 小时内,在缺血组织中显著上调的至少 30 种 miRNA 和在缺血组织中下调的至少 38 种 miRNA。miRNA 亚组显示出在缺血事件后立即的动态调节:某些 miRNA 的表达最初是下调的随后为上调,而其他的表达最初是上调的随后为下调。此外,本发明人发现在缺血事件后在再灌注的心脏组织中待调节的重叠但独特的 miRNA 亚组。发现在再灌注的心脏组织中至少 32 种 miRNA 是显著上调的,而至少 48 种 miRNA 是显著下调的。调节的 miRNA 中的重叠提示 miRNA 可以涉及在不同时间点时的不同心脏病过程,并且可以作用于影响疾病状态。因此,存在涉及心脏对缺血损伤的响应的一组 miRNA,并且对这些特定 miRNA 的活性或表达的操作可以导致对心脏重塑的控制,从而使得任何潜在所致的梗死在大小上得到限制,并且心肌收缩力得到维持。相应地,本发明提供了在 有此需要的受试者中治疗或预防心肌缺血的方法,其包括调节受试者的心脏细胞中在表 1 和 2 中列出的一种或多种 miRNA 的表达或活性。本发明还包括表 1 和 2 中列出的 miRNA 的相应人序列。在特定实施方案中,一种或多种 miRNA 选自 miR-15 家族成员 (例如 miR-15a、miR-15b、miR-16-1、miR-16-2、miR-195、miR-424 和 miR-497) (SEQ ID NOs :1-6)、miR-21 (SEQ ID NO:7)、miR-199a (SEQ ID NOs :8-9)、miR-320 (SEQ ID NO:10)、miR-214 (SEQ

ID NO:11)、miR-10a(SEQ ID NO:12)、miR-10b(SEQ ID NO:13)、miR-574(SEQ ID NOs :14-15)、miR-92a(SEQ ID NO:16)、miR-499(SEQ ID NOs :17-18)、miR-101a/miR-101b(SEQ ID NO:19)、miR-126(SEQ ID NO:20)、miR-30 家族成员 (例如 miR-30a、miR-30b、miR-30c、miR-30d 和 miR-30e)(SEQ ID NOs :21-25)、miR-143(SEQ ID NO:26)、miR-185(SEQ ID NO:27)、miR-34a(SEQ ID NO:28)、miR-1(SEQ ID NO:29)、miR-133a/miR-133b(SEQ ID NOs :30-31)、miR-210(SEQ ID NO:32)、miR-29a-c(SEQ ID NOs :33-35)、miR-26a(SEQ ID NO:37)、let-7b(SEQ ID NO:38)、miR-125b(SEQ ID NO:39) 和 miR-145(SEQ ID NO:40)。

[0027] 如本文使用的,术语“调节”指 miRNA 的生物学活性中的变化或改变。调节可以是 miRNA 的表达水平中的变化、miRNA 的结合特征中的变化(例如对于靶 mRNA 或 RISC 复合体的组分)、或与 miRNA 相关的生物学或功能性性质中的任何其他变化。调节可以是 miRNA 的表达或功能中的增加或减少。术语“调节剂”指能够改变或更改如上所述的 miRNA 的表达或生物学活性的任何分子或化合物。调节剂可以是 miRNA 功能或表达的抑制剂,或它可以是 miRNA 功能或表达的激动剂。

[0028] 如本文使用的,术语“心肌缺血”或“缺血”指在心脏内的状况,其起因于向心肌的血液供给不足。缺血可以涉及例如向心脏组织的有限血流量,其是由于通过正常供应心脏组织的一个或多个冠状动脉的堵塞或减少的流动。缺血损害包括心肌细胞的损失、心脏肥大、心肌病、心脏收缩力的减少和心律不齐。当对于局限性区域的血液供给被剥夺延长的时间段从而使得心脏细胞死亡时,导致梗死。“梗死”是组织中的凝固性坏死区域,其起因于向该区域的循环的阻塞。在受试者的心脏组织中本文公开的一种或多种 miRNA 的表达或活性的调节在减少或预防缺血损害方面是有效的,包括预防梗死的发展或减少梗死面积、维持心脏收缩力且使受试者中的心脏重塑降到最低,所述受试者已经历缺血事件或处于经历缺血事件的风险中。

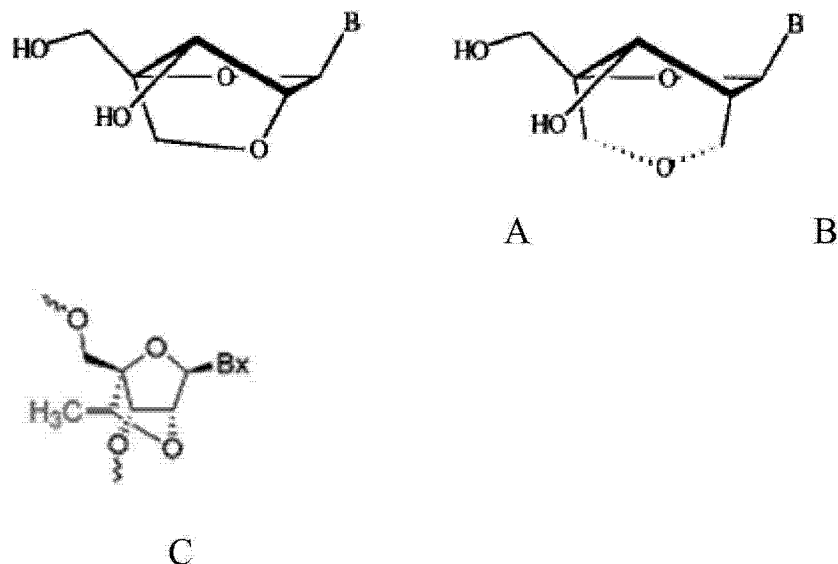
[0029] 在心脏中的缺血和所致的缺血损害通过缺血事件或损伤引起。“缺血事件”或“缺血损伤”是导致或可以导致对心脏组织的血液供给不足的任何情况。由本发明包含的缺血事件或损伤包括但不限于低血糖症、心动过速、动脉粥样硬化、低血压、血栓栓塞、血管的外部挤压、栓塞、镰状细胞病、通常伴随发炎脉管的管腔中的血栓的炎症性过程、出血、心力衰竭和心脏停搏、休克包括脓毒性休克和心源性休克、高血压、血管瘤和体温过低。

[0030] 在一个实施方案中,在有此需要的受试者中治疗或预防心肌缺血的方法包括给受试者施用在表 1 和 2 中列出的一种或多种 miRNA 的抑制剂。在另一个实施方案中,所述抑制剂是选自下组的一种或多种 miRNA 的表达或活性的抑制剂:miR-15 家族成员(例如 miR-15a、miR-15b、miR-16-1、miR-16-2、miR-195、miR-424 和 miR-497)(SEQ ID NOs :1-6)、miR-92a(SEQ ID NO:16)、miR-21(SEQ ID NO:7)、miR-199a(SEQ ID NOs :8-9)、miR-320(SEQ ID NO:10)、miR-499(SEQ ID NOs :17-18) 和 miR-30 家族成员(例如 miR-30a、miR-30b、miR-30c、miR-30d 和 miR-30e)(SEQ ID NOs :21-25)。

[0031] 在特定实施方案中,一种或多种 miRNA 的抑制剂是反义寡核苷酸。反义寡核苷酸可以包括核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或其组合。优选地,反义寡核苷酸具有至少一种化学修饰(例如糖或主链修饰)。例如,合适的反义寡核苷酸可以包含一种或多种“构象限制的”或二环糖核苷修饰(BSN),其对于在含有 BSN 的寡核苷酸及其互补微小 RNA 靶链之间形成的复合物赋予增强的热稳定性。例如,在一个实施方案中,反义寡核苷酸含有至少一个

“锁核酸”。锁核酸 (LNA) 含有 2'-O,4'-C- 亚甲基核糖核苷 (结构 A), 其中核糖糖部分呈“锁定”构象。在另一个实施方案中, 反义寡核苷酸含有至少一个 2',4'-C- 桥接的 2' 脱氧核糖核苷 (CDNA, 结构 B)。参见例如, 美国专利号 6, 403, 566 和 Wang 等人 (1999) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 第 9 卷: 1147-1150, 将这两篇都整体引入本文作为参考。在另外一个实施方案中, 反义寡核苷酸含有至少一个具有结构 C 中所示结构的修饰核苷。靶向一种或多种 miRNA 的反义寡核苷酸可以含有 BSN (LNA、CDNA 等) 或其他修饰核苷、和核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的组合。

[0032]



[0033] 可替代地, 反义寡核苷酸可以包含肽核酸 (PNA), 其含有基于肽的主链而不是糖-磷酸酯主链。还考虑了其他修饰的糖或对于反义寡核苷酸的磷酸二酯修饰。例如, 反义寡核苷酸可以含有的其他化学修饰包括但不限于糖修饰, 例如 2'-O-烷基 (例如 2'-O-甲基、2'-O-甲氧乙基)、2'-氟和 4' 硫代修饰, 和主链修饰, 例如一个或多个硫代硫酸酯、吗啉代或膦酰羧酸酯键合 (参见例如, 美国专利号 6, 693, 187 和 7, 067, 641, 其整体引入本文作为参考)。在一个实施方案中, 靶向一种或多种 miRNA 的反义寡核苷酸含有在每个碱基上的 2'-O-甲基糖修饰, 并且通过硫代硫酸酯键合连接。反义寡核苷酸特别是较短长度 (例如小于 15 个核苷酸) 的那些, 可以包含一种或多种亲和力增强修饰, 例如但不限于 LNAs、二环核苷、膦酰甲酸酯、2'-O-烷基修饰等。在某些实施方案中, 合适的反义寡核苷酸是 2'-O-甲氧乙基“缺口聚体 (gapmer)”, 其含有在 5' 和 3' 两个末端上的 2'-O-甲氧乙基修饰的核糖核苷酸, 伴随在中心的至少 10 个脱氧核糖核苷酸。这些“缺口聚体”能够触发 RNA 靶的 RNA 酶 H 依赖性降解机制。增强稳定性且改善效率的反义寡核苷酸的其他修饰, 例如整体引入本文作为参考的美国专利号 6, 838, 283 中描述的那些, 是本领域已知的, 并且适合于在本发明的方法中使用。例如, 为了促进体内递送和稳定性, 反义寡核苷酸可以在其 3' 末端上连接至类固醇例如胆固醇部分 (moiety)、维生素、脂肪酸、碳水化合物或糖苷、肽或其他小分子配体。

[0034] 对于抑制 miRNA 活性有用的优选反义寡核苷酸的长度为约 5 - 约 25 个核苷酸、长度为约 10 - 约 30 个核苷酸、或长度为约 20 - 约 25 个核苷酸。在特定实施方案中, 靶向本文描述的一种或多种 miRNA 的反义寡核苷酸的长度为约 8 - 约 18 个核苷酸, 并且在其他实

施方案中,长度为约 12 - 约 16 个核苷酸。可以使用与靶 miRNA 互补的任何 8 聚体或更长的聚体,即与 miRNA 的 5' 末端互补且进展跨越靶 miRNA 的完全互补序列的任何 anti-miR。反义寡核苷酸可以包含与来自一种或多种 miRNA 的成熟 miRNA 序列至少部分互补的序列。“部分互补的”指与靶 miRNA 序列至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 互补的序列。在某些实施方案中,反义寡核苷酸可以与成熟 miRNA 序列基本上互补,即与靶 miRNA 序列至少约 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 互补。在一个实施方案中,反义寡核苷酸包含与成熟 miRNA 序列 100% 互补的序列。

[0035] 在某些实施方案中,反义寡核苷酸是 Antagomir。“Antagomir”是单链、化学修饰的核糖核苷酸,其与至少一种成熟 miRNA 序列至少部分互补。Antagomir 可以包含一个或多个修饰核苷酸,例如 2'-O-甲基-糖修饰。在某些实施方案中,Antagomir 仅包含修饰核苷酸。Antagomir 还可以包含一个或多个硫代硫酸酯键合,导致部分或完全硫代磷酸酯主链。为了促进体内递送和稳定性,Antagomir 可以在其 3' 末端上连接至胆固醇或其他部分。适合于抑制一种或多种 miRNA 的 Antagomir 可以是长度约 12-约 70 个核苷酸、长度约 15 - 约 50 个核苷酸、长度约 18 - 约 35 个核苷酸、长度约 19 - 约 28 个核苷酸、或长度约 20 - 约 25 个核苷酸。Antagomirs 可以与成熟 miRNA 序列至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 互补。在某些实施方案中,Antagomir 可以与成熟 miRNA 序列基本上互补,即与靶多核苷酸序列至少约 95%、96%、97%、98% 或 99% 互补。在其他实施方案中,Antagomir 与成熟 miRNA 序列 100% 互补。

[0036] 在另一个实施方案中,在有此需要的受试者中治疗或预防心肌缺血的方法包括给受试者施用在表 1 和 2 中列出的一种或多种 miRNA 的激动剂。在特定实施方案中,激动剂是选自 miR-126 (SEQ ID NO:20)、miR-143 (SEQ ID NO:26)、miR-210 (SEQ ID NO:32) 和 miR-29a-c (SEQ ID NOs:33-35) 的一种或多种 miRNA 的激动剂。

[0037] 如本文使用的,“激动剂”是增强靶 miRNA 的表达或活性的分子或化合物。激动剂可以是编码 miRNA 序列的多核苷酸。例如,在一个实施方案中,一种或多种 miRNA 的激动剂是包含一种或多种 miRNA 的成熟序列的多核苷酸。在另一个实施方案中,一种或多种 miRNA 的激动剂可以是包含关于一种或多种 miRNA 的 pri-miRNA 或 pre-miRNA 序列的多核苷酸。包含成熟、pre-miRNA 或 pri-miRNA 序列的多核苷酸可以是单链或双链的。多核苷酸可以含有一种或多种化学修饰,例如锁核酸,肽核酸,糖修饰例如 2'-O-烷基(例如 2'-O-甲基、2'-O-甲氧乙基)、2'-氟和 4' 硫代修饰,和主链修饰例如一个或多个硫代硫酸酯、吗啉代或磷酸酯键合。在某些实施方案中,包含一种或多种 miRNA 序列的多核苷酸缀合至类固醇例如胆固醇、维生素、脂肪酸、碳水化合物或糖苷、肽或其他小分子配体。在特定实施方案中,一种或多种 miRNA 的激动剂是不同于 miRNA 自身的试剂,其作用于增加、补充或替换所述一种或多种 miRNA 的功能。

[0038] 本发明的 miRNA 的抑制剂和激动剂可以在体内由载体表达。“载体”是可以用于将目的核酸递送至细胞内部的物质组合物。众多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性分子化合物结合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制质粒或病毒。病毒载体的例子包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体等。表达构建体可以在活细胞中复制,或它可以合成制备。为了本申请的目的,术语“表达构建体”、“表达载体”和“载体”可互换使用,以表明以一般举例说明意义的本发明

的应用,并且不意图限制本发明。

[0039] 在一个实施方案中,用于表达一种或多种 miRNA 的激动剂的表达载体包含“可操作地连接的”启动子和编码一种或多种 miRNA 的序列的多核苷酸。如本文使用的短语“可操作地连接的”或“在转录控制下”意指启动子处于与多核苷酸有关的正确位置和方向,以控制通过 RNA 聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。编码一种或多种 miRNA 的多核苷酸可以编码一种或多种 miRNA 的初级 miRNA 序列、前体 -miRNA 序列、成熟 miRNA 序列或星(例如较小)序列。包含一种或多种 miRNA 的序列的多核苷酸可以是长度约 18 - 约 2000 个核苷酸、长度约 70 - 约 200 个核苷酸、长度约 20 - 约 50 个核苷酸、或长度约 18 - 约 25 个核苷酸。

[0040] 一种或多种 miRNA 的抑制剂(例如反义寡核苷酸)可以在体内由载体表达。例如,在一个实施方案中,用于表达一种或多种 miRNA 的抑制剂的表达载体包含可操作地连接的启动子与编码反义寡核苷酸的多核苷酸,其中所表达的反义寡核苷酸的序列与一种或多种 miRNA 的成熟序列至少部分互补。

[0041] 如本文使用的,“启动子”指由起始基因的特定转录所需的,细胞的合成机制或引入的合成机制识别的 DNA 序列。合适的启动子包括但不限于 RNAPol I、pol II、pol III,和病毒启动子(例如人巨细胞病毒(CMV)立即早期基因启动子、SV40 早期启动子和劳斯肉瘤病毒长末端重复序列)。在一个实施方案中,启动子是组织特异性启动子。特别感兴趣的是肌肉特异性启动子,且更具体而言,心脏特异性启动子。这些包括肌球蛋白轻链-2 启动子(Franz 等人(1994)Cardioscience,第 5(4):235-43;Kelly 等人(1995)J. Cell Biol.,第 129 卷(2):383-396)、 α 肌动蛋白启动子(Moss 等人(1996)Biol. Chem.,第 271 卷(49):31688-31694)、肌钙蛋白 1 启动子(Bhavsar 等人(1996)Genomics,第 35 卷(1):11-23); $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换剂启动子(Barnes 等人(1997)J. Biol. Chem.,第 272 卷(17):11510-11517)、肌营养不良蛋白启动子(Kimura 等人(1997)Dev. Growth Differ.,第 39 卷(3):257-265)、 α 7 整联蛋白启动子(Ziober 和 Kramer(1996)J. Bio. Chem.,第 271 卷(37):22915-22)、脑利钠肽启动子(LaPointe 等人(1996)Hypertension,第 27 卷(3 Pt 2):715-22)和 α B-晶状体蛋白/小热休克蛋白启动子(Gopal-Srivastava(1995)J. Mol. Cell. Biol.,第 15 卷(12):7081-7090)、 α 肌球蛋白重链启动子(Yamauchi-Takihara 等人(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA,第 86 卷(10):3504-3508)和 ANF 启动子(LaPointe 等人(1988)J. Biol. Chem.,第 263 卷(19):9075-9078)。

[0042] 在特定实施方案中,与编码 miRNA 家族抑制剂的多核苷酸可操作地连接的启动子可以是诱导型启动子。诱导型启动子是本领域已知的,并且包括但不限于四环素启动子、金属硫蛋白 IIA 启动子、热休克启动子、类固醇/甲状腺激素/视黄酸反应元件、腺病毒晚期启动子和诱导型小鼠乳房肿瘤病毒 LTR。

[0043] 在某些实施方案中,人巨细胞病毒(CMV)立即早期基因启动子、SV40 早期启动子、劳斯肉瘤病毒长末端重复序列、大鼠胰岛素启动子和 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子可以用于获得目的多核苷酸序列的高水平表达。还考虑了其他病毒或哺乳动物细胞或细菌噬菌体启动子的使用,所述启动子是本领域众所周知的以实现目的多核苷酸序列的表达,条件是表达水平对于给定目的是足够的。

[0044] 将表达构建体和核酸递送至细胞的方法是本领域已知的,并且可以包括例如磷酸

钙共沉淀、电穿孔、显微注射、DEAE- 右旋糖酐、脂转染、采用聚胺转染试剂的转染、细胞超声处理、使用高速微粒的基因轰击、和受体介导的转染。

[0045] 优选地,在表 1 和 2 中列出的一种或多种 miRNA 的抑制剂或激动剂的施用导致心肌缺血、心肌梗死、心力衰竭或心脏重塑的一种或多种症状的改善。一种或多种改善的症状可以是例如胸痛(例如心绞痛)减少、运动能力增加、心脏射血体积增加、左心室舒张末期压减少、肺毛细血管楔压减少、心输出量增加、心脏指数增加、肺动脉压降低、左心室收缩末期压和舒张期内径减少、左和右心室壁压力减少、壁张力减少、生活质量提高、和疾病相关的发病率或死亡率减少。在一个实施方案中,在患有心肌缺血的受试者的心脏细胞中对一种或多种 miRNA 的调节可以预防心肌梗死的发展。在另一个实施方案中,在患有心肌缺血的受试者的心脏细胞中对一种或多种 miRNA 的调节可以通过减少心脏细胞的损失(例如减少缺血区中的细胞凋亡)限制任何后续发生的梗死的面积。在另外一个实施方案中,心脏功能在对患有心肌缺血的受试者的心脏细胞中一种或多种 miRNA 的调节后在该受试者中得到稳定。

[0046] 在特定实施方案中,需要治疗或预防心肌缺血的受试者是处于心脏病发作的风险中的受试者。例如,在一个实施方案中,受试者具有冠状动脉疾病。在某些实施方案中,受试者可以显示出关于冠状动脉疾病的一种或多种风险因素,包括但不限于高血压、高胆固醇血症、吸烟、高血糖症、糖尿病、不稳定型心绞痛、过去的心脏病发作经历、和心脏病的家族史。

[0047] 本发明还包括在有此需要的受试者中治疗或预防缺血再灌注损伤的方法。如本文使用的,“缺血再灌注损伤”指在缺血期后由血流的恢复引起的组织损害。在缺血期后血流的恢复可以实际上比起因于缺血自身的那种更多损害。向缺血组织的循环的再引入诱导氧化性应激,导致通过损害性自由基的更多产生造成的炎症和氧化性损害。组织坏死可以由再灌注损伤极大加速。

[0048] 在一个实施方案中,该方法包括调节在受试者的心脏细胞中在表 2 中列出的一种或多种 miRNA 及其人对应物的表达或活性。在特定实施方案中,该方法包括给受试者施用在表 2 中列出的一种或多种 miRNA 的抑制剂。在一个实施方案中,抑制剂是 miR-15 家族成员(例如 miR-15a、miR-15b、miR-16-1、miR-16-2、miR-195、miR-424 和 miR-497)(SEQ ID NOs:1-6)和 miR-92a(SEQ ID NO:16)中的一种或多种的表达或活性的抑制剂。在其他实施方案中,该方法包括给受试者施用在表 2 中列出的一种或多种 miRNA 的激动剂。在一个实施方案中,激动剂是 miR-22(SEQ ID NO:36)、miR-126(SEQ ID NO:20)和 miR-29b(SEQ ID NO:34)中的一种或多种的激动剂。在另一个实施方案中,一种或多种 miRNA 的激动剂或抑制剂施用于缺血组织。在另外一个实施方案中,一种或多种 miRNA 的激动剂或抑制剂施用于接近缺血组织的非缺血组织。如本文描述的 miRNA 功能或表达的任何激动剂或抑制剂适合于在治疗或预防缺血再灌注损伤的方法中使用。

[0049] 本发明考虑了鉴定的 miRNA 的激动剂和抑制剂在受试者中的心肌缺血和缺血再灌注损伤的治疗和预防中的用途。治疗方案将取决于临床情况而改变,并寻求早期干预。然而,在缺血事件后长期维持至少一定的时间段看起来在大多数情况下会是合适的。还可能希望用 miRNA 的调节剂间歇地治疗,或改变给予哪些 miRNA,以便使保护效应达到最大。

[0050] 在特定实施方案中,设想使用与其他治疗模式组合的 miRNA 功能或表达的调节

剂。因此,除上文描述的 miRNA 治疗外,还可以给受试者提供一种或多种“标准”药理学心脏治疗。其他治疗的例子包括但不限于 β -阻断剂、抗高血压药、强心剂、抗血栓药、血管扩张药、激素拮抗剂、Iontrope、利尿药、内皮缩血管肽受体拮抗剂、钙通道阻断剂、磷酸二酯酶抑制剂、ACE 抑制剂、血管紧张素 2 型拮抗剂和细胞因子阻断剂 / 抑制剂、和 HDAC 抑制剂。

[0051] 在特定实施方案中,本文称为“抗高脂蛋白血症药”,降低一种或多种血脂和 / 或脂蛋白浓度的试剂的施用,可以与根据本发明的心血管治疗(例如 miRNA 调节剂)组合,特别是在动脉粥样硬化和脉管组织的增厚或堵塞的治疗中。在特定实施方案中,抗高脂蛋白血症剂可以包含芳氧基链烷酸 / 纤维酸衍生物、树脂 / 胆汁酸隔离剂(sequesterant)、HMG CoA 还原酶抑制剂、烟酸衍生物、甲状腺激素或甲状腺激素类似物、混杂试剂或其组合。芳氧基链烷酸 / 纤维酸衍生物的非限制性例子包括苜氯贝特(beclobrate)、苯扎贝特(enzafrate)、比尼贝特(binifibrate)、环丙贝特(ciprofibrate)、克利贝特(clinofibrate)、氯贝丁酯(clofibrate)(安妥明-S(atromide-S))、氯贝酸(clofibrac acid)、依托贝特(etofibrate)、非诺贝特(fenofibrate)、吉非贝齐(gemfibrozil)(lobid)、尼可贝特(nicofibrate)、吡贝特(pirifibrate)、氯烟贝特(ronifibrate)、双贝特(simfibrate)和益多酯(theofibrate)。树脂 / 胆汁酸隔离剂的非限制性例子包括考来烯胺(cholestyramine)(cholybar、消胆胺(questran))、考来替泊(colestipol)(降脂树脂 2 号(colestid))和降胆葡胺(polidexide)。HMG CoA 还原酶抑制剂的非限制性例子包括洛伐他汀(lovastatin)(美降脂(mevacor))、普伐他汀(pravastatin)(普拉固(pravochol))或辛伐他汀(simvastatin)(舒降之(zocor))。烟酸衍生物的非限制性例子包括烟酸酯、阿昔莫司(acepimox)、戊四烟酯(niceritrol)、尼可氯酯(nicoclonate)、尼可莫尔(nicomol)和氧烟酸(oxiniacacacid)。甲状腺激素及其类似物的非限制性例子包括 etoroxate、甲状丙酸和甲状腺素。

[0052] 在特定实施方案中,miRNA 调节剂可以与抗心律不齐药组合用于治疗心血管状况。抗心律不齐药的非限制性例子包括 I 类抗心律不齐药(钠通道阻断剂)、II 类抗心律不齐药(β -肾上腺素能阻断剂)、III 类抗心律不齐药(复极延长药物)、IV 类抗心律不齐药(钙通道阻断剂)和混杂抗心律不齐药。

[0053] 钠通道阻断剂包括但不限于 IA 类、IB 类和 IC 类抗心律不齐药。IA 类抗心律不齐药的非限制性例子包括双异丙吡胺(dispyramide)(丙吡胺(norpace))、普鲁卡因酰胺(procainamide)(普鲁卡因胺(pronestyl))和奎尼丁(quinidine)(硫酸奎尼丁(quinidex))。IB 类抗心律不齐药的非限制性例子包括利多卡因(lidocaine)(赛洛卡因(xylocaine))、妥卡尼(tocainide)(妥卡胺片(tonocard))和美西律(mexiletine)(脉舒律(mexitil))。IC 类抗心律不齐药的非限制性例子包括恩卡胺(encainide)(恩卡尼(enkaid))和氟卡尼(flecainide)(氟卡胺(tambocor))。

[0054] 示例性 β 阻断剂也称为 β -肾上腺素能阻断剂、 β -肾上腺素能拮抗剂或 II 类抗心律不齐药,包括醋丁洛尔(acebutolol)(醋丁洛尔片(sectral))、阿普洛尔(alprenolol)、氨磺洛尔(amosulalol)、阿罗洛尔(arotinolol)、阿替洛尔(atenolol)、苯呋洛尔(befunolol)、倍他洛尔(betaxolol)、贝凡洛尔(bevantolol)、比索洛尔(bisoprolol)、波吡洛尔(bopindolol)、布库洛尔(bucumolol)、布非洛尔(bufetolol)、丁呋洛尔(bufuralol)、布尼洛尔(bunitrolol)、布拉洛尔(bupranolol)、布替君盐酸

盐 (butidrine hydrochloride)、丁非洛尔 (butofilolol)、卡拉洛尔 (carazolol)、卡替洛尔 (carteolol)、卡维地洛 (carvedilol)、塞利洛尔 (celiprolol)、塞他洛尔 (cetamolol)、氯拉洛尔 (cloranolol)、地来洛尔 (dilevalol)、依泮洛尔 (epanolol)、艾司洛尔 (esmolol) (艾司洛尔 (brevibloc))、茛诺洛尔 (indanolol)、拉贝洛尔 (labetalol)、左布诺洛尔 (levobunolol)、甲吲洛尔 (mepindolol)、美替洛尔 (metipranolol)、美托洛尔 (metoprolol)、莫普洛尔 (moprolol)、纳多洛尔 (nadolol)、萘呋洛尔 (nadoxolol)、硝苯洛尔 (nifenalol)、尼普地洛 (nipradilol)、氧烯洛尔 (oxprenolol)、喷布洛尔 (penbutolol)、吲哚洛尔 (pindolol)、普拉洛尔 (practolol)、丙萘洛尔 (pronethalol)、心得安 (propanolol) (普萘洛尔 (inderal))、索他洛尔 (sotalol) (索他洛尔片 (betapace))、硫氧洛尔 (sulfinalol)、他林洛尔 (talinolol)、特他洛尔 (tertatolol)、噻吗洛尔 (timolol)、托利洛尔 (toliprolol) 和 xibinolol。在特定实施方案中, β 阻断剂包含芳氧基丙醇胺衍生物。芳氧基丙醇胺衍生物的非限制性例子包括醋丁洛尔、阿普洛尔、阿罗洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、贝凡洛尔、比索洛尔、波吲洛尔、布尼洛尔、丁非洛尔、卡拉洛尔、卡普洛尔、卡维地洛、塞利洛尔、塞他洛尔、依泮洛尔、茛诺洛尔、甲吲洛尔、美替洛尔、美托洛尔、莫普洛尔、纳多洛尔、尼普地洛、氧烯洛尔、喷布洛尔、吲哚洛尔、心得安、他林洛尔、特他洛尔、噻吗洛尔和托利洛尔。

[0055] III 类抗心律不齐药的例子包括延长复极的试剂, 例如胺碘酮 (可达龙 (cordarone)) 和索他洛尔 (β -pace)。IV 类抗心律不齐药也称为钙通道阻断剂的非限制性例子包括芳烷基胺 (例如苻普地尔 (bepridile)、地尔硫卓 (diltiazem)、芬地林 (fendiline)、戈洛帕米 (gallopamil)、普尼拉明 (prenylamine)、特罗地林 (terodiline)、维拉帕米 (verapamil)、二氢吡啶衍生物 (非洛地平 (felodipine)、伊拉地平 (isradipine)、尼卡地平 (nicardipine)、硝苯地平 (nifedipine)、尼莫地平 (nimodipine)、尼索地平 (nisoldipine)、尼群地平 (nitrendipine))、哌嗪衍生物 (piperazine derivative) (例如桂利嗪 (cinnarizine)、氟桂利嗪 (flunarizine)、利多氟嗪 (lidoflazine)) 或混杂钙通道阻断剂例如苻环烷、依地苯酮 (etafenone)、镁、咪拉地尔 (mibefradil) 或哌克昔林 (perhexiline)。在特定实施方案中, 钙通道阻断剂包含长效二氢吡啶 (硝苯地平型) 钙拮抗剂。

[0056] 还可以与本发明的 miRNA 调节剂组合的混杂抗心律不齐药的合适例子包括但不限于腺苷 (Adenocard)、地高辛 (digoxin) (拉诺辛 (lanoxin))、乙酰卡尼 (acecainide)、阿义马林 (ajmaline)、克冠吗啉 (amoproxan)、阿普林定 (aprinidine)、溴苻铵甲苯磺酸盐 (bretylum tosylate)、丁萘夫汀 (bunaftine)、布托苯定 (butobendine)、卡泊酸 (capobenic acid)、西苯唑啉 (cifenline)、双异丙吡胺 (disopyranide)、二氢奎尼丁 (hydroquinidine)、英地卡尼 (idecainide)、异丙托溴铵 (ipatropium bromide)、利多卡因 (lidocaine)、劳拉义明 (lorajmine)、劳卡尼 (lorcainide)、甲氧苻汀 (meobentine)、莫雷西嗪 (moricizine)、吡美诺 (pirmenol)、普拉马林 (prajmaline)、普罗帕酮 (propafenone)、比诺林 (pyrinoline)、奎尼丁聚半乳糖醛酸盐 (quinidine polygalacturonate)、硫酸奎尼丁 (quinidine sulfate) 和维喹地尔 (viquidil)。

[0057] 在本发明的另外一个实施方案中, miRNA 调节剂可以与抗高血压剂组合施用。抗高血压剂的非限制性例子包括交感神经阻滞药、 α/β 阻断剂、 α 阻断剂、抗血管紧张素 II

试剂、 β 阻断剂、钙通道阻断剂、血管扩张药和混杂抗高血压剂。

[0058] α 阻断剂也称为 α -肾上腺素能阻断剂或 α -肾上腺素能拮抗剂的非限制性例子包括氨磺洛尔 (amosulalol)、阿罗洛尔 (arotinolol)、达哌唑 (dapiprazole)、多沙唑嗪 (doxazosin)、甲磺酸双氢麦角碱 (ergoloid mesylate)、芬司匹利 (fenspiride)、吲哚拉明 (indoramin)、拉贝洛尔 (labetalol)、尼麦角林 (nicergoline)、哌唑嗪 (prazosin)、特拉唑嗪 (terazosin)、妥拉唑林 (tolazoline)、曲马唑嗪 (trimazosin) 和育亨宾 (yohimbine)。在特定实施方案中, α 阻断剂可以包含喹唑啉衍生物。喹唑啉衍生物的非限制性例子包括阿夫唑嗪 (alfuzosin)、布那唑嗪 (bunazosin)、多沙唑嗪 (doxazosin)、哌唑嗪 (prazosin)、特拉唑嗪 (terazosin) 和曲马唑嗪 (trimazosin)。在特定实施方案中, 抗高血压剂是 α 和 β 肾上腺素能拮抗剂。 α/β 阻断剂的非限制性例子包含拉贝洛尔 (labetalol) (盐酸拉贝洛尔 (normodyne)、拉贝洛尔 (trandate))。

[0059] 抗血管紧张素 II 试剂的非限制性例子包括血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素 II 受体拮抗剂。血管紧张素转化酶抑制剂 (ACE 抑制剂) 的非限制性例子包括阿拉普利 (alacepril)、依那普利 (enalapril) (依那普利片 (vasotec))、卡托普利 (captopril)、西拉普利 (cilazapril)、地拉普利 (delapril)、依那普利拉 (enalaprilat)、福辛普利 (fosinopril)、赖诺普利 (lisinopril)、moveltopril、培哚普利 (perindopril)、喹那普利 (quinapril) 和雷米普利 (ramipril)。血管紧张素 II 受体阻断剂也称为血管紧张素 II 受体拮抗剂、ANG 受体阻断剂、ANG-II 1 型受体阻断剂 (ARBS) 的非限制性例子包括血管坎地沙坦 (angiocandesartan)、依普罗沙坦 (eprosartan)、厄贝沙坦 (irbesartan)、氯沙坦 (losartan) 和缬沙坦 (valsartan)。

[0060] 在特定实施方案中, 心血管治疗剂可以包含血管扩张药 (例如脑血管扩张药、冠状血管扩张药或外周血管扩张药), 其可以与本发明的 miRNA 调节剂共施用。在特定优选实施方案中, 血管扩张药包含冠状血管扩张药。冠状血管扩张药的非限制性例子包括胺氧三苯 (amotriphene)、地巴唑 (bendazol)、琥珀苯呋地尔 (benfurodil hemisuccinate)、苯磺达隆 (benziodarone)、氯酚嗪 (chloracizine)、卡波罗孟 (chromonar)、氯苯呋醇 (clobenfurol)、氯硝甘油 (clonitrate)、地拉卓 (dilazep)、双嘧达莫 (dipyridamole)、氢普拉明 (droprenilamine)、乙氧黄酮 (efloxate)、硝酸戊四醇酯 (erythrityl tetranitrate)、依他苯酮 (etafenone)、芬地林 (fendiline)、夫洛地尔 (floretil)、更利芬 (gangliefene)、乙烷雌酚双 (β -二乙氨基乙基醚) (herestrol bis(β -diethylaminoethyl ether))、海索苯定 (hexobendine)、硝乙胺甲苯磺酸盐 (itramin tosylate)、凯林 (khellin)、利多氟嗪 (lidoflanine)、六硝酸甘露醇 (mannitol hexanitrate)、美地巴嗪 (medibazine)、硝酸甘油 (nicorglycerin)、季戊四醇四硝酸酯 (pentaerythritol tetranitrate)、戊硝醇 (pentrinitrol)、哌克昔林 (perhexiline)、匹美茶碱 (pimefylline)、曲匹地尔 (trapidil)、3-甲色酮 (tricromyl)、曲美他嗪 (trimetazidine)、磷酸三硝乙醇胺 (trolinitrate phosphate) 和维司那定 (visnadine)。

[0061] 在特定实施方案中, 血管扩张药可以包含慢性治疗血管扩张药或高血压急症血管扩张药。慢性治疗血管扩张药的非限制性例子包括肼苯哒嗪 (hydralazine) (肼屈嗪 (apresoline)) 和米诺地尔 (minoxidil) (米诺地尔片 (loniten))。高血压急症血管扩张药的非限制性例子包括硝普酸钠 (nitroprusside) (硝普钠 (nipride))、二氮嗪 (diazoxide)

(二氮嗪 IV(hyperstat IV))、肼苯哒嗪(hydralazine)(肼屈嗪(apresoline))、米诺地尔(minoxidil)(米诺地尔片(loniten))和维拉帕米(verapamil)。

[0062] 本发明的 miRNA 调节剂可以与肌力药(inotropic agent)组合。在某些实施方案中,肌力药是正性肌力药。正性肌力药也称为强心剂的非限制性例子包括 acefylline、乙酰毛地黄毒苷(acetyldigitoxin)、2-氨基-4-甲基吡啶、氨利酮(amrinone)、琥珀苯呋地尔(benfurondil hemisuccinate)、布拉地新(bucladesine)、脑苷酯(cerberosine)、樟吡他胺(camphotamide)、铃兰毒苷(convallatoxin)、磁麻苷(cymarín)、地诺帕明(denopamine)、去乙酰毛花苷(deslanoside)、洋地黄苷(digitalin)、洋地黄(digitalis)、毛地黄毒苷(digitoxin)、地高辛(digoxin)、多巴酚丁胺(dobutamine)、多巴胺(dopamine)、多培沙明(dopexamine)、依诺昔酮(enoximone)、格木碱(erythrophleine)、非那可明(fenalcomine)、吉他林(gitalin)、芰皂素(gitoxin)、胍基乙酸(glycocytamine)、辛胺醇(heptaminol)、白毛茛分碱(hydrastinine)、异波帕胺(ibopamine)、毛花苷(ianatoside)、metamivam、米力农(milrinone)、黄花夹竹桃次苷(nerifolin)、夹竹桃苷(oleandrin)、乌巴因(ouabain)、奥昔非君(oxyfedrine)、普瑞特罗(prenalterol)、海葱次苷(proscillaridin)、残蟾蜍配基(resibufogenin)、海葱苷(scillaren)、海葱苷宁(scillarenin)、毒毛旋花苷(strphanthin)、硫马唑(sulmazole)、可可碱(theobromine)和扎莫特罗(xamoterol)。

[0063] 在特定实施方案中,肌力药(intropic agent)是强心苷、 β -肾上腺素能激动剂或磷酸二酯酶抑制剂。强心苷的非限制性例子包括地高辛(拉诺辛)和毛地黄毒苷(洋地黄毒苷(crystodigin))。 β -肾上腺素能激动剂的非限制性例子包括沙丁胺醇(albuterol)、班布特罗(bambuterol)、比托特罗(bitolterol)、卡布特罗(carbuterol)、克仑特罗(clenbuterol)、氯丙那林(clorprenaline)、地诺帕明(denopamine)、双羟乙麻黄碱(dioxethedrine)、多巴酚丁胺(dobutamine)(独步催(dobutrex))、多巴胺(dopamine)(恩得品(intropin))、多培沙明(dopexamine)、麻黄碱(ephedrine)、乙非君(etafedrine)、乙基去甲肾上腺素(ethylnorepinephrine)、非诺特罗(fenoterol)、福莫特罗(formoterol)、海索那林(hexoprenaline)、异波帕胺(ibopamine)、异他林(isoetharine)、异丙肾上腺素(isoproterenol)、马布特罗(mabuterol)、奥西那林(metaproterenol)、甲氧那明(methoxyphenamine)、奥昔非君(oxyfedrine)、吡布特罗(pirbuterol)、丙卡特罗(procaterol)、普罗托醇(protokylol)、瑞普特罗(reproterol)、利米特罗(rimiterol)、利托君(ritodrine)、索特瑞醇(soterol)、特步他林(terbutaline)、曲托喹酚(tretoquinol)、妥洛特罗(tulobuterol)和扎莫特罗(xamoterol)。磷酸二酯酶抑制剂的非限制性例子包括氨利酮(amrinone)(氨力农(inocor))。

[0064] 抗心绞痛药可以包含有机硝酸酯(organonitrates)、钙通道阻断剂、 β 阻断剂及其组合。有机硝酸酯也称为硝基血管扩张药的非限制性例子包括硝酸甘油(nitro-bid、耐绞宁(nitrostat))、二硝酸异山梨酯(异山梨醇硝酸酯、硝酸异山梨酯)和亚硝酸异戊酯(aspirol、亚硝戊酯)。

[0065] 在特定实施方案中,本发明的 miRNA 调节剂与内皮缩血管肽共施用用于治疗心血管疾病。内皮缩血管肽(ET)是 21-氨基酸的肽,其具有看起来涉及心力衰竭发展的潜在

生理学和病理生理学效应。ET 的效应通过与两类细胞表面受体的相互作用介导。A 型受体 (ET-A) 与血管收缩和细胞生长相关,而 B 型受体 (ET-B) 与内皮细胞介导的血管舒张和其他神经激素例如醛固酮的释放相关。可以抑制 ET 的生产或其刺激有关细胞的能力的药理学试剂是本领域已知的。抑制 ET 的生产涉及使用阻断称为内皮缩血管肽转化酶的酶的试剂,所述酶涉及来自其前体的活性肽加工。抑制 ET 刺激细胞的能力涉及使用阻断 ET 与其受体的相互作用的试剂。内皮缩血管肽受体拮抗剂 (ERA) 的非限制性例子包括波生坦 (Bosentan)、恩拉生坦 (Enrasentan)、安立生坦 (Ambrisentan)、达卢生坦 (Darusentan)、替唑生坦 (Tezosentan)、阿曲生坦 (Atrasentan)、阿伏生坦 (Avosentan)、克拉生坦 (Clazosentan)、艾多南坦 (Edonentan)、司他生坦 (sitaxsentan)、TBC 3711、BQ 123 和 BQ 788。

[0066] 在特定实施方案中,可以与 miRNA 调节剂组合的第二治疗剂可以包含某一类型的手术,其包括例如预防、诊断或分期、治愈和姑息性手术。手术且特别是治愈性手术可以与其他治疗例如本发明的 miRNA 调节剂和一种或多种其他试剂结合使用。

[0067] 用于血管和心血管疾病和病症的此类手术治疗剂是本领域技术人员众所周知的,并且可以包含但不限于对生物实施手术、提供心血管机械假体、血管成形术、冠状动脉再灌注、导管消融术、对受试者提供植入型心律转复除颤器、机械循环支持或其组合。可以在本发明中使用的机械循环支持的非限制性例子包含主动脉内气囊反搏动术、左心室辅助装置或其组合。

[0068] 组合可以通过使心脏细胞与单一组合物或药理学制剂接触来实现,所述药理学制剂包括一种或多种 miRNA 调节剂和第二心脏治疗剂,或通过使细胞同时与两种不同组合物或制剂接触来实现,其中一种组合物包括一种或多种 miRNA 调节剂,并且另一种包括第二心脏治疗剂。可替代地,一种或多种 miRNA 调节剂的施用可以通过范围为数分钟到数周的间隔在一种或多种其他心脏试剂施用之前或之后。在其中其他心脏试剂和一种或多种 miRNA 调节剂分开应用于受试者的实施方案中,一般将确保在每次递送时间之间不超过一段显著长的时间 (a significant period of time did not expire),从而使得所述心脏试剂和一种或多种 miRNA 调节剂将仍能够对细胞施加有利的组合效应。在此类情况下,考虑一般将彼此在约 12-24 小时内施用两种组合物,并且更优选地,彼此在约 6-12 小时内,其中仅约 12 小时的延迟时间是最优选的。在某些情况下,然而,可能希望显著延长用于治疗的时间段,其中在各施用之间经过几天 (2、3、4、5、6 或 7) 至几周 (1、2、3、4、5、6、7 或 8)。

[0069] 还可设想将需要一种或多种 miRNA 的调节剂或其他心脏试剂的超过一次施用。在这点上,可以采用多种组合。作为举例说明,其中 miRNA 调节剂是“A”并且其他心脏试剂是“B”,基于 3 和 4 次总施用的下述排列是示例性的:

[0070] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

[0071] A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

[0072] A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

[0073] 同样考虑了其他组合。

[0074] 在另一个实施方案中,本发明提供了有此需要的受试者中预防或减少响应缺氧的心肌细胞损失的方法。“缺氧”指其中组织未接受足够的氧供应以满足组织的需氧量的状况。延长的缺氧可以导致细胞死亡。在一个实施方案中,该方法包括给受试者施

用 miR-199a (例如 SEQ ID NOs :8-9)、miR-320 (例如 SEQ ID NO:10) 的抑制剂、和 / 或 miR-210 (例如 SEQ ID NO:32) 的激动剂。miR-199a 或 miR-320 功能或表达的抑制剂可以是本文公开的任何抑制剂。例如,miR-199a 或 miR-320 的抑制剂可以是包含与成熟 miR-199a 或 miR-320 序列至少部分互补的序列的反义寡核苷酸或 Antagomir。

[0075] miR-210 功能或表达的激动剂可以是本文公开的任何激动剂。例如,在一个实施方案中,miR-210 的激动剂是包含 miR-210 的成熟序列的多核苷酸。在另一个实施方案中,miR-210 的激动剂是转录因子 HIF1 α 。在特定实施方案中,miR-210 的激动剂由表达构建体表达。

[0076] 药理学治疗剂和施用方法、剂量等是本领域技术人员众所周知的 (参见例如,在有关部分引入本文作为参考的“Physicians Desk Reference”,Klaassen’s “The Pharmacological Basis of Therapeutics”、“Remington’s Pharmaceutical Sciences”和 “The Merck Index,第 11 版”),并且可以根据本文公开内容与本发明组合。取决于待治疗受试者的状况,剂量中的某些变动将必然发生。在任何情况下,负责施用的个人将决定用于个别受试者的合适剂量,并且此类个别决定在本领域普通技术人员的技术内。

[0077] 当考虑临床应用时,包含在表 1 和 2 中鉴定的一种或多种 miRNA 的调节剂的药物组合物将以适合于预期应用的形式进行制备。一般地,这将使得制备组合物成为必需,所述组合物基本上不含热原以及对人或动物可能有害的其他杂质。胶体分散体系例如大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠和基于脂质的体系包括水包油乳状液、胶束、混合胶束和脂质体,可以用作递送媒介物用于 miRNA 功能的寡核苷酸抑制剂或 miRNA 激动剂 (例如表达特定 miRNA 的构建体或编码 miRNA 的多核苷酸)。适合于将本发明的核酸递送至组织例如心肌组织的商购可得脂肪乳状液包括 Intralipid®、Liposyn®、Liposyn® II、Liposyn® III、Nutrilipid 及其他相似脂质乳状液。用于用作体内递送媒介物的优选胶体体系是脂质体 (即人工膜囊)。此类体系的制备和使用是本领域众所周知的。示例性制剂还公开于 US 5,981,505 ;US 6,217,900 ;US 6,383,512 ;US 5,783,565 ;US 7,202,227 ;US 6,379,965 ;US 6,127,170 ;US 5,837,533 ;US 6,747,014 ;和 WO 03/093449 中,所述专利整体引入本文作为参考。

[0078] 一般会希望采用合适的盐和缓冲液,以致使核酸、激动剂、抑制剂和递送载体稳定且允许由靶细胞摄取。当重组细胞引入患者内时,还将采用缓冲液。本发明的水性组合物包含溶解或分散于药学可接受的载体或水介质中的有效量的试剂。短语“药学可接受的”或“药理学可接受的”指分子实体和组合物,当施用于动物或人时,其不产生不利的、变应性或其他不良反应。如本文使用的,“药学可接受的载体”包括可接受用于配制药剂例如适合于施用于人的药剂中使用的溶剂、缓冲液、溶液、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。此类介质和试剂用于药学活性物质的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与本发明的活性成分不相容,否则考虑其在治疗组合物中的使用。补充性活性成分也可以掺入组合物内,条件是它们不灭活组合物的载体或核酸。

[0079] 本发明的活性组合物可以包括常规药学制备物。根据本发明的这些组合物的施用可以经由任何常见途径,只要靶组织经由那个途径是可及的 (available)。这包括经口、经鼻或含服。可替代地,施用可以通过真皮内、皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射,或通过注射到心脏组织内。包含 miRNA 抑制剂或激动剂的药学组合物还可以通过导管系统或使

冠状动脉循环隔离用于将治疗剂递送至心脏的系统进行施用。用于将治疗剂递送至心脏和冠状脉管系统的多种导管系统是本领域已知的。适合于在本发明中使用的基于导管的递送方法或冠状动脉隔离方法的某些非限制性例子公开于美国专利号 6,416,510 ;美国专利号 6,716,196 ;美国专利号 6,953,466、WO 2005/082440、WO 2006/089340、美国专利公开号 2007/0203445、美国专利公开号 2006/0148742 和美国专利公开号 2007/0060907 中,所述专利全部整体引入本文作为参考。此类组合物通常会作为药学可接受的组合物施用,如上所述。

[0080] 活性化合物还可以肠胃外或腹膜内施用。作为举例说明,作为游离碱或药理学可接受的盐的活性化合物溶液可以在与表面活性剂例如羟丙基纤维素适当混合的水中制备。分散体还可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在贮存和使用的普通条件下,这些制备物一般含有防腐剂,以防止微生物的生长。

[0081] 适合于可注射使用或导管递送的药学形式包括例如无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。一般地,这些制备物是无菌的且以存在简单可注射性的程度流动。制备物在制造和贮存条件下应是稳定的,并且应针对微生物例如细菌和真菌的污染作用得到保护。合适的溶剂或分散介质可以含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、和植物油。合适流动性可以例如通过使用包衣例如卵磷脂、在分散体的情况下通过所需粒子大小的维持和通过使用表面活性剂得到维持。微生物作用的防止可以通过多种抗细菌和抗真菌剂来达到,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,将优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来达到。

[0082] 无菌可注射溶液可以通过下述进行制备:根据需要将活性化合物以合适量连同任何其他成分(例如如上文列举的)一起掺入溶剂内,随后为过滤灭菌。一般地,分散体通过将多种灭菌的活性成分掺入无菌媒介物内进行制备,所述无菌媒介物含有基本分散介质和所需其他成分,例如如上文列举的。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选制备方法包括真空干燥和冷冻干燥技术,其由先前经无菌过滤的相应溶液获得一种或多种活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。

[0083] 本发明的组合物一般可以以中性或盐形式进行配制。药学可接受的盐包括例如衍生自无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸的酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成)等。与蛋白质的游离羧基形成的盐还可以衍生自无机碱(例如氢氧化钠、钾、铵、钙或铁)或有机碱(例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0084] 在配制后,溶液优选以与剂量制剂相容的方式和以治疗有效的此类量施用。制剂可以以多种剂型容易地施用,例如可注射溶液、药物释放胶囊等。对于在水溶液中的肠胃外施用,例如,溶液一般适当地缓冲,并且例如用足够的盐水或葡萄糖首先使液体稀释剂等渗。此类水溶液可以例如用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。优选地,无菌水介质可以如本领域技术人员已知的特别是根据本公开内容采用。作为举例说明,单次剂量可以溶解于 1ml 等渗 NaCl 溶液内,并且加入 1000ml 皮下灌注术输液中或在提议的输注部位注射(参见例如,“Remington's Pharmaceutical Sciences”第 15 版,第 1035-1038 和 1570-1580 页)。取决于待治疗的受试者的状况,剂量必然发生某些变动。在任何情况下,负责施用的

个人将决定用于个别受试者的合适剂量。此外,对于人施用,制备物应符合如由FDA Office of Biologics 标准要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0085] 考虑本文讨论的任何实施方案可以就本发明的任何方法或组合物而言实现,并且反之亦然。此外,本发明的组合物可以用于实现本发明的方法。

[0086] 本发明通过下述附加实施例进一步举例说明,所述实施例不应解释为限制性的。根据本公开内容,本领域技术人员应当理解可以对公开的具体实施方案做出许多改变,并且仍获得相同或相似结果而不背离本发明的精神和范围。

实施例

[0087] 实施例 1. 在短期缺血过程中受到调节的 miRNA 的鉴定

[0088] 心脏缺血诱导可以影响心室的功能和关于存活的预后的重塑。为了测定 miRNA 是否涉及在缺血事件后的不同重塑过程,对在缺血损伤后 6、24 和 48 小时从梗死区中分离的组织执行 miRNA 微阵列分析。具体地,通过使左前降支动脉闭塞在小鼠中诱导了心肌缺血,并且在诱导后 6、24 和 48 小时在缺血区中组织的 miRNA 表达概况与来自假手术动物的心肌组织的表达概况相比较。在缺血损伤后短期中显著受到调节的 miRNA 在表 1 中列出。数据呈现为在假手术动物或在心肌缺血后 6、24 和 48 小时中 miR 表达的绝对值。在不同时间点时的表达概况对于每种特定 miRNA 变化相当大,指示对响应缺血的心脏重塑的 miRNA 贡献的非常动态和特异性的效应。

[0089] 表 1 - 响应缺血显著调节的 miRNA

[0090]

报道基因名称 编号	p-值	假手术的 平均值	MI后6小时 平均值	MI后24小时 平均值	MI后48小时 平均值
mmu-miR-1892	0.00E+00	173	1,421	42,346	6,642
mmu-miR-574-5p	0.00E+00	28	462	7,108	2,350
mmu-miR-1187	0.00E+00	19	259	6,489	2,773
mmu-miR-711	0.00E+00	6	9	5,501	456
mmu-miR-1196	0.00E+00	113	241	3,040	2,188
mmu-miR-705	5.55E-16	734	2,944	20,067	5,282
mmu-miR-1897-5p	5.55E-16	13	111	545	204
mmu-miR-21	6.66E-16	1,594	316	742	11,048
mmu-miR-29a	8.88E-16	3,478	1,370	108	390
mmu-miR-483	1.55E-15	36	492	4,028	1,454
mmu-miR-466i	1.78E-15	11	96	760	407
mmu-miR-574-3p	1.78E-15	20	86	532	313
mmu-miR-714	2.00E-15	26	211	957	118
mmu-miR-1895	2.44E-15	112	727	2,513	1,021
mmu-miR-1894-3p	2.89E-15	81	101	763	205

[0091]

报道基因名称 编号	p-值	假手术的 平均值	MI后6小时 平均值	MI后24小时 平均值	MI后48小时 平均值
mmu-miR-466f-3p	1.24E-14	31	391	1,409	687
mmu-miR-30e	1.32E-14	734	199	32	49
mmu-miR-30c	1.75E-14	3,802	2,887	374	640
mmu-miR-30b	7.23E-14	2,940	1,486	170	383
mmu-miR-762	8.72E-14	668	5,020	36,127	10,932
mmu-miR-467f	1.91E-13	25	275	2,079	972
mmu-miR-125b-5p	3.06E-13	3,036	2,482	507	1,866
mmu-miR-27b	5.30E-13	2,137	1,390	250	548
mmu-miR-671-5p	8.04E-13	49	472	486	85
mmu-let-7e	8.34E-13	1,359	542	113	201
mmu-miR-689	1.46E-12	224	2,984	1,510	811
mmu-let-7g	2.16E-12	3,344	2,578	470	839
mmu-miR-30a	2.33E-12	1,722	801	174	235
mmu-miR-126-3p	7.99E-12	15,856	17,569	6,483	19,543
mmu-miR-125a-5p	9.40E-12	740	360	56	339
mmu-miR-1224	1.80E-11	565	1,274	2,673	782
mmu-miR-290-5p	1.95E-11	22	31	438	113
mmu-miR-27a	2.63E-11	1,437	594	160	300
mmu-miR-690	3.25E-11	282	428	936	1,361
mmu-miR-22	8.60E-11	554	394	110	138
mmu-miR-133b	9.55E-11	2,406	2,883	428	1,001
mmu-miR-92a	1.57E-10	290	166	242	531
mmu-miR-199a-3p	1.70E-10	740	555	180	530
mmu-miR-451	5.79E-10	2,026	1,104	4,410	7,011
mmu-miR-26b	1.01E-09	2,435	1,944	412	818
mmu-miR-1	1.67E-09	47,997	56,431	17,333	42,200
mmu-miR-709	1.81E-09	10,451	14,051	25,010	23,279
mmu-let-7a	1.89E-09	9,285	8,734	2,867	4,867
mmu-miR-133a	3.33E-09	2,523	3,336	549	1,164

[0092]

报道基因名称 编号	p-值	假手术的 平均值	MI后6小时 平均值	MI后24小时 平均值	MI后48小时 平均值
mmu-miR-499	4.58E-09	1,309	420	6	7
mmu-let-7d	4.95E-09	6,334	6,018	2,034	3,027
mmu-miR-30d	5.62E-09	627	485	148	343
mmu-let-7f	5.74E-09	8,196	8,693	2,567	4,218
mmu-miR-195	6.08E-09	1,141	861	267	482
mmu-miR-15b	6.56E-09	381	226	284	797
mmu-miR-150	8.25E-09	426	434	54	225
mmu-miR-151-5p	1.09E-08	508	464	154	318
mmu-let-7b	1.77E-08	5,171	6,240	2,107	3,528
mmu-miR-25	3.60E-08	335	222	297	625
mmu-miR-26a	4.31E-08	11,427	12,159	5,297	11,307
mmu-miR-214	7.41E-08	335	356	786	1,027
mmu-let-7c	1.33E-07	8,677	9,349	3,156	5,642
mmu-miR-805	1.82E-07	2,455	2,287	1,472	754
mmu-miR-23b	2.68E-07	7,231	7,438	4,570	9,090
mmu-miR-23a	2.82E-07	6,448	6,714	4,965	10,303
mmu-let-7i	3.90E-07	2,991	3,601	1,535	3,090
mmu-miR-16	2.09E-06	2,552	2,033	1,126	1,893
mmu-miR-486	4.16E-06	643	454	280	662
mmu-miR-24	5.58E-06	2,347	2,891	1,646	2,164
mmu-miR-378	1.01E-05	1,526	1,683	1,432	934
mmu-miR-143	1.44E-05	1,502	1,311	698	768
mmu-miR-191	3.16E-05	582	505	295	531
mmu-miR-29c	1.79E-04	934	122	7	11

[0093] 有趣的是,显著调节的 miRNA 包括在我们先前的应激研究中也发现受到调节的几种 miRNA。例如,miR-21 和 miR-574 在 MI 后 3 和 14 天从梗死的边缘带中分离的组织中也是高度诱导的 (van Rooij 等人 (2008) Proc. Natl. Acad. Sci., 第 105 卷:13027-13032)。在缺血损伤后的短期中,miR-574 看起来在 24 小时时达到峰值,而 miR-21 的表达在缺血事件后的前 24 小时内减少,但在 48 小时强烈表达。此外,这些数据显示已报道为调节胶原沉积和纤维化 (van Rooij 等人 (2006) Proc. Natl. Acad. Sci., 第 103 卷:18255-18260; van Rooij

等人 (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 第 105 卷 :13027-13032) 的 miR-29 的表达,在缺血事件后的前 24 小时内显著减少。miR-30 家族的多个成员也显示了响应缺血在表达中的强烈减少。

[0094] miR-126, 内皮特异性 miRNA (Wang 等人, (2008) *Dev. Cell*, 第 15 卷 :261-271), 在 MI 后的前 24 小时内强烈下调,但看起来在 48 小时在表达中增加。这种表达模式可以通过报道的关于 miR-126 在新生血管生成中的作用加以解释 (Wang 等人, (2008) *Dev. Cell*, 第 15 卷 :261-271)。miR-92a, 先前牵涉血管生成的 miR (Bonauer 等人 (2009) *Science*, 第 324 卷 (5935):1710-1713), 显示出响应缺血事件与 miR-126 相似的表达概况,暗示 miR-92a 还可以影响新生血管生成。

[0095] 骨骼肌特异性 miRNA, miR-1、miR-133 和 miR-499, 在缺血后受到差异调节。例如, miR-1 和 miR-133 的表达在缺血事件后 24 小时后减少,但在 48 小时反弹。相比之下, miR-499 的表达在缺血后的前 48 小时被抑制。

[0096] 已牵涉对细胞存活和增殖的调节 (参见例如, WO 2009/062169) 的 miR-15 家族成员 (miR-15a/b、miR-16 和 miR-195) 的表达,显示在心肌缺血后的初始减少。对这些 miRNA 的抑制会有利于增强在响应 MI 的缺血区中的细胞存活,从而限制任何潜在所致的梗死的大小。另一种熟悉的应激应答性 miR, miR-214, 响应缺血被诱导且可以在肌细胞增殖和命运决定中起作用 (Watanabe T 等人, (2008) *Dev. Dyn.*, 第 237 卷 :3738-3748; Flynt AS 等人 (2007) *Nat. Genet.*, 第 39 卷 :259-63)。miR-143 为在平滑肌增殖中起作用的血管平滑肌细胞特异性 miRNA (参见未决的申请 PCT/US09/34887), 其在缺血事件后 24 和 48 小时时在缺血区中显著下调。miR-143 的减少增加平滑肌细胞的增殖,并且对于心脏是有害的。因此,增加 miR-143 的表达将作用于控制平滑肌细胞增殖且促进缺血组织的功能恢复。

[0097] 实施例 2. miR-199 调节缺血组织中的 HIF1 α 和 miR-210

[0098] miR-199a 在缺血组织中的表达在缺血后的前 24 小时内减少,但在缺血事件后 48 小时开始显示恢复。miR-199 的实时 PCR 分析证实 miR-199a 表达在缺血损伤后 24 小时的缺血组织中显著减少 (图 1)。有趣的是,我们先前将 miR-199 鉴定为在心肌梗死的边缘带中受到调节的 miRNA。响应 MI, miR-199 在 MI 后 3 和 14 天是上调的 (van Rooij 等人 (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 第 103 卷 :18255-18260; van Rooij 等人 (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 第 105 卷 :13027-13032)。为了进一步阐明 miR-199 在缺血后的作用,我们将转录因子低氧诱导因子 1 α (HIF1 α) 鉴定为 miR-199 的靶。为了证实 HIF1 α 是否是 miR-199 的功能靶,将心肌细胞用具有与 miR-199a 的序列的互补序列的寡核苷酸 (antimiR) 或具有错配序列 (MM) 的对照处理。如通过 Northern 印迹评估, HIF1 α 表达在用针对 miR-199a 的 antimiR 处理的心肌细胞中增加,而在用错配对照处理的心肌细胞中未观察到表达中的变化 (图 2A)。这些结果提示 miR-199a 的表达中的减少将引起 HIF1 α 水平的增加,这继而又会激活控制缺氧应答的基因表达。HIF1 α 表达中的此类增加在缺血损伤后将是有利的。

[0099] 为了证实针对 miR-199a 的 antimiR 可以在体内有效敲低 miR-199, 将小鼠用针对 miR-199a 的 antimiR 静脉内注射。心、肺、肝和肾组织的实时 PCR 分析显示与盐水注射的动物相比较, antimiR-199a 的注射在测量的所有组织中产生了 miR-199 的几乎完全敲低 (图 2B)。错配对照的注射产生了肝组织中 miR-199 的一定敲低,但在测量的其他组织中则没有。

[0100] miR-320 也已报道为在缺氧后是下调的。我们通过缺血组织中的实时 PCR 分析检查了 miR-320 的表达,以测定这种 miRNA 是否响应缺血在心脏组织中也受到调节。如图 3 中所示,miR-320 的表达早在心肌缺血诱导后 6 小时就显著减少。miR-320 靶向热休克蛋白 20 (HSP20),其已牵涉心肌功能的增强 (Fan 等人 (2007) *Circulation*, 第 116 卷:II-189)。因此,miR-320 表达中的减少会导致 HSP20 的上调和心肌功能的相应增强。miR-320 表达的进一步下调在缺血后会治疗性的。

[0101] 近来,miR-210 已牵涉对于缺氧的内皮细胞应答 (Fasanaro 等人 (2008) *J. Biol. Chem.*, 第 283 卷:15878-15883),并且认为是 HIF1 α 信号传导的下游。为了测定 miR-210 是否响应缺血在心脏组织中受到调节,我们通过心肌缺血的诱导后在缺血组织中的实时 PCR 分析检查了 miR-210 的表达。如图 4A 中所示,miR-210 表达在缺血事件后 24 小时受到强烈诱导。我们还观察到在体外暴露于缺氧条件的大鼠新生儿心肌细胞中 miR-210 的相似诱导 (图 4B)。miR-210 已报道为减少促细胞凋亡信号传导且因此充当抗细胞凋亡因子 (Kulshreshtha 等人 (2007) *Mol. Cell Biol.*, 第 27 卷:1859-1867)。因此,可能在缺血后 miR-210 的诱导通过预防细胞凋亡和心肌细胞的损失赋予对心脏细胞的保护。

[0102] 实施例 3. 在缺血再灌注损伤后受到调节的 miRNA 的鉴定

[0103] 为了进一步检查 miRNA 在缺血损伤后的心脏重塑中的作用,对在缺血再灌注后的心脏组织执行了 miRNA 微阵列。在心肌缺血过程中,对于梗死区域中的线粒体的血液供给不足以支持氧化磷酸化。缺血通常继以再灌注,允许氧和代谢底物的重新接纳,这替换缺血性代谢产物。再灌注过程诱导心肌中的生物化学、结构和功能变化,并且可以决定细胞存活和细胞死亡。对这个过程的调节可以减少缺血和 / 或再灌注的有害效应,且从而增强心肌梗死的临床后果。

[0104] 具体地,对雄性 C57B16 小鼠实施 45 分钟的心肌缺血。随后允许组织再灌注 24 小时。从缺血再灌注区域中收集组织且实施 miRNA 微阵列分析。发现几种 miRNA 在缺血组织的再灌注后是受到调节的 (表 2 和图 5)。

[0105] 表 2 - 响应缺血再灌注受到显著调节的 miRNA

[0106]

报道分子名称 编号	p-值	假手术的 平均值	缺血/ 再灌注 平均值	Log2 (缺血/假)
mmu-miR-1892	2.49E-08	292	1,267	2.12
mmu-miR-709	8.05E-08	15,600	28,596	0.87
mmu-miR-499	1.86E-07	3,035	918	-1.72
mmu-miR-126-3p	1.59E-06	39,722	27,548	-0.53
mmu-miR-762	1.79E-06	1,275	2,940	1.21
mmu-miR-30e	2.41E-06	1,175	485	-1.28
mmu-miR-29a	2.83E-06	8,786	4,676	-0.91
mmu-miR-690	4.38E-06	350	689	0.98
mmu-miR-26a	7.04E-06	32,537	22,791	-0.51
mmu-miR-29c	7.60E-06	2,073	597	-1.80

[0107]

报道分子名称 编号	p-值	假手术的 平均值	缺血/ 再灌注 平均值	Log2 (缺血/假)
mmu-miR-27a	2.62E-05	3,168	2,168	-0.55
mmu-miR-30d	5.00E-05	1,885	1,336	-0.50
mmu-miR-30a	5.64E-05	2,864	1,834	-0.64
mmu-miR-705	6.42E-05	689	2,265	1.72
mmu-miR-27b	1.48E-04	4,049	3,303	-0.29
mmu-miR-1224	1.64E-04	389	715	0.88
mmu-miR-92a	5.28E-04	672	832	0.31
mmu-miR-150	6.09E-04	1,123	809	-0.47
mmu-miR-133a	6.15E-04	10,020	7,546	-0.41
mmu-miR-689	1.00E-03	473	326	-0.54
mmu-miR-320	1.01E-03	296	439	0.57
mmu-miR-145	1.55E-03	1,579	2,223	0.49
mmu-miR-133b	1.65E-03	9,107	7,226	-0.33
mmu-miR-378	2.79E-03	1,126	1,344	0.25
mmu-miR-151-5p	5.16E-03	805	689	-0.22
mmu-miR-16	8.28E-03	4,093	5,039	0.30
mmu-miR-122	1.39E-08	296	17	-4.13
mmu-miR-328	5.65E-08	94	44	-1.12
mmu-miR-1187	1.69E-07	53	312	2.55
mmu-miR-1897-5p	2.48E-07	16	84	2.37
mmu-miR-574-5p	5.92E-07	58	370	2.68
mmu-miR-24-2*	1.96E-06	122	58	-1.06
mmu-miR-671-5p	2.38E-06	28	69	1.27
mmu-miR-466g	3.28E-06	8	49	2.64
mmu-miR-1895	4.99E-06	92	189	1.04
mmu-miR-10b	6.08E-06	120	43	-1.50
mmu-miR-29b	7.28E-06	82	19	-2.11
mmu-miR-22*	7.79E-06	95	43	-1.16

[0108]

报道分子名称 编号	p-值	假手术的 平均值	缺血/ 再灌注 平均值	Log2 (缺血/假)
mmu-miR-711	8.78E-06	18	195	3.48
mmu-miR-466f-3p	9.51E-06	30	160	2.41
mmu-miR-30e*	1.02E-05	263	77	-1.78
mmu-miR-680	1.02E-05	15	60	2.00
mmu-miR-466i	1.10E-05	18	100	2.49
mmu-miR-106b	1.21E-05	91	73	-0.32
mmu-miR-148a	1.90E-05	160	69	-1.22
mmu-miR-483	1.94E-05	43	307	2.84
mmu-miR-1196	2.32E-05	219	345	0.65
mmu-miR-140*	2.74E-05	46	68	0.56
mmu-miR-199a-5p	3.58E-05	35	23	-0.60
mmu-miR-15a	3.91E-05	225	127	-0.83
mmu-miR-720	6.86E-05	110	82	-0.42
mmu-miR-101b	6.90E-05	45	19	-1.22
mmu-miR-30a*	7.46E-05	226	106	-1.10
mmu-miR-145*	8.65E-05	56	14	-1.99
mmu-miR-152	9.80E-05	241	165	-0.55
mmu-miR-669f	1.42E-04	11	67	2.55
mmu-miR-10a	1.55E-04	52	21	-1.33
mmu-miR-101a	1.60E-04	83	21	-1.96
mmu-miR-185	1.61E-04	315	263	-0.26
mmu-miR-34a	1.62E-04	67	44	-0.61
mmu-miR-128	1.67E-04	278	192	-0.53
mmu-miR-1198	3.50E-04	43	30	-0.53
mmu-miR-467f	3.69E-04	41	203	2.29
mmu-miR-350	6.69E-04	35	11	-1.60
mmu-miR-192	6.87E-04	81	42	-0.95
mmu-miR-149	7.07E-04	56	36	-0.64

[0109]

报道分子名称 编号	p-值	假手术的 平均值	缺血/ 再灌注 平均值	Log2 (缺血/假)
mmu-miR-126-5p	7.33E-04	70	28	-1.33
mmu-miR-181a	1.13E-03	166	211	0.35
mmu-miR-322	1.16E-03	153	75	-1.02
mmu-miR-674	2.61E-03	68	79	0.21
mmu-miR-133a*	2.76E-03	69	51	-0.44
mmu-miR-100	3.39E-03	199	128	-0.64
mmu-miR-714	3.41E-03	36	53	0.56
mmu-miR-132	4.20E-03	142	114	-0.32
mmu-miR-467b*	4.96E-03	16	37	1.20
mmu-miR-329	6.39E-03	82	49	-0.76
mmu-miR-194	6.89E-03	65	46	-0.50
mmu-miR-92b	7.59E-03	233	282	0.27
mmu-miR-574-3p	8.44E-03	57	98	0.78
mmu-miR-322*	8.58E-03	30	35	0.23

[0110] 这些数据指示 miRNA 响应缺血后的再灌注受到调节且活跃涉及心脏重塑的过程。这些 miRNA 中的几种在缺血事件后也是受到剧烈调节的（实施例 1）。因此，存在涉及心脏对缺血和后续再灌注的应答的 miRNA 集合。操作这些特定 miRNA 的功能性以控制响应缺血的心脏重塑可以作用于限制梗死面积且维持心脏收缩力，从而提供治疗心肌梗死的新的有希望的治疗方法。

[0111] 本文讨论且引用的所有出版物、专利和专利申请整体引入本文作为参考。应当理解本发明并不限于所述的特定方法学、方案和材料，因为这些可以改变。还应当理解本文使用的术语学仅用于描述特定实施方案的目的，并且不预期限制仅受附加权利要求限制的本发明的范围。

[0112] 本领域技术人员将认识到，或能够使用不超过例行实验确定，本文描述的本发明的具体实施方案的许多等价物。此类等价物预期由下述权利要求包含。

[0113] 序列表

[0114]

人 miRNA	成熟 miRNA 序列	SEQ ID NO:
hsa-miR-15a	5'-UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG-3'	1
hsa-miR-15b	5'-UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA-3'	2
hsa-miR-16-1/ hsa-miR-16-2	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'	3
hsa-miR-195	5'-UAGCAGCACAGAAUAUUGGC-3'	4
hsa-miR-424	5'-CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA-3'	5
hsa-miR-497	5'-CAGCAGCACACUGUGGUUUGU-3'	6
hsa-miR-21	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'	7
hsa-miR-199a-5p	5'-CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC-3'	8
hsa-miR-199a-3p	5'-ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA-3'	9
hsa-miR-320	5'-AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA-3'	10
hsa-miR-214	5'-ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU-3'	11
hsa-miR-10a	5'-UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG-3'	12
hsa-miR-10b	5'-UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG-3'	13
hsa-miR-574-5p	5'-UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGU-3'	14
hsa-miR-574-3p	5'-CACGCUCAUGCACACACCCACA-3'	15
hsa-miR-92a	5'-UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU-3'	16
hsa-miR-499-5p	5'-UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU-3'	17
hsa-miR-499-3p	5'-AACAUACAGCAAGUCUGUGCU-3'	18
hsa-miR-101	5'-UACAGUACUGUGAUAAACUGAA-3'	19
hsa-miR-126	5'-UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG-3'	20
hsa-miR-30a	5'-UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG-3'	21
hsa-miR-30b	5'-UGUAAACAUCCUACACUCAGCU-3'	22
hsa-miR-30c	5'-UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC-3'	23
hsa-miR-30d	5'-UGUAAACAUCCCGACUGGAAG-3'	24
hsa-miR-30e	5'-UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG-3'	25

[0115]

人 miRNA	成熟 miRNA 序列	SEQ ID NO:
hsa-miR-143	5'-UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC-3'	26
hsa-miR-185	5'-UGGAGAGAAAGGCAGUUCCUGA-3'	27
hsa-miR-34a	5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3'	28
hsa-miR-1	5'- UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3'	29
hsa-miR-133a	5'- UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG-3'	30
hsa-miR-133b	5'- UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA-3'	31
hsa-miR-210	5'- CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA-3'	32
hsa-miR-29a	5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'	33
hsa-miR-29b	5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3'	34
hsa-miR-29c	5'-UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA-3'	35
hsa-miR-22	5'-AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU-3'	36
hsa-miR-26a	5'- UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'	37
hsa-let-7b	5'- UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU-3'	38
hsa-miR-125b	5'- UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA-3'	39
hsa-miR-145	5'-GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU-3'	40

[0001]

序列表

<110>	得克萨斯系统大学董事会 Olson, Eric N. van Rooij, Eva Quiat, Daniel	
<120>	在缺血和缺血再灌注损伤中的微小 RNA 调节	
<130>	MIRG 016/01W0	
<150>	US 61/286,622	
<151>	2009-12-15	
<160>	40	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人 (Homo sapiens)	
<400>	1 uagcagcaca uaaugguuug ug	22
<210>	2	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	2 uagcagcaca ucaugguuuu ca	22
<210>	3	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	3 uagcagcacg uaaaauuugg cg	22
<210>	4	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	4 uagcagcaca gaaauuuugg c	21
<210>	5	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	5 cagcagcaau ucauguuuug aa	22
<210>	6	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	6	

[0002]

cagcagcaca cugugguuug u	21
<210> 7	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 7	
uagcuuauca gacugauguu ga	22
<210> 8	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 8	
cccaguguuc agacuaccug uuc	23
<210> 9	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 9	
acaguagucu gcacauuggu ua	22
<210> 10	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 10	
aaaagcuggg uugagagggc ga	22
<210> 11	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 11	
acagcaggca cagacaggca gu	22
<210> 12	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 12	
uaccuguag aaccgaauuu gug	23
<210> 13	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 13	
uaccuguag aaccgaauuu gug	23
<210> 14	
<211> 23	
<212> RNA	

[0003]

<213>	人	
<400>	14	
	ugagugugug ugugugagug ugu	23
<210>	15	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	15	
	cacgcucaug cacacaccca ca	22
<210>	16	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	16	
	uauugcacuu gueccggccu gu	22
<210>	17	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	17	
	uuaagacuug cagugauguu u	21
<210>	18	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	18	
	aacaucacag caagucugug cu	22
<210>	19	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	19	
	uacaguacug ugauaacuga a	21
<210>	20	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	20	
	ucguaccgug aguaauaaug cg	22
<210>	21	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	21	
	uguaaacauc cucgacugga ag	22

[0004]

<210>	22	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	22	
uguaaacauc	cuacacucag	cū 22
<210>	23	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	23	
uguaaacauc	cuacacucuc	agc 23
<210>	24	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	24	
uguaaacauc	cccacugga	ag 22
<210>	25	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	25	
uguaaacauc	cuugacugga	ag 22
<210>	26	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	26	
ugagaugaag	cacuguageu	c 21
<210>	27	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	27	
uggagagaaa	ggcaguuccu	ga 22
<210>	28	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	28	
uggcaguguc	uuagcugguu	gu 22
<210>	29	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	29	

[0005]

uggaauguaa agaaguaugu au	22
<210> 30	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 30	
uuuggucccc uucaaccagc ug	22
<210> 31	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 31	
uuuggucccc uucaaccagc ua	22
<210> 32	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 32	
cugugcgugu gacagcggu ga	22
<210> 33	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 33	
uagcaccauc ugaaucggu ua	22
<210> 34	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 34	
uagcaccuu ugaaucagu guu	23
<210> 35	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 35	
uagcaccuu ugaaucggu ua	22
<210> 36	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 36	
aagcugccag uugaagaacu gu	22
<210> 37	
<211> 22	
<212> RNA	

[0006]

<213>	人	
<400>	37	
uucaaguaau	ccaggauagg	cu
		22
<210>	38	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	38	
ugagguagua	ggugugugg	uu
		22
<210>	39	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	39	
uccugagac	ccuacuugu	ga
		22
<210>	40	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	40	
guccaguuuu	ccaggaau	ccu
		23

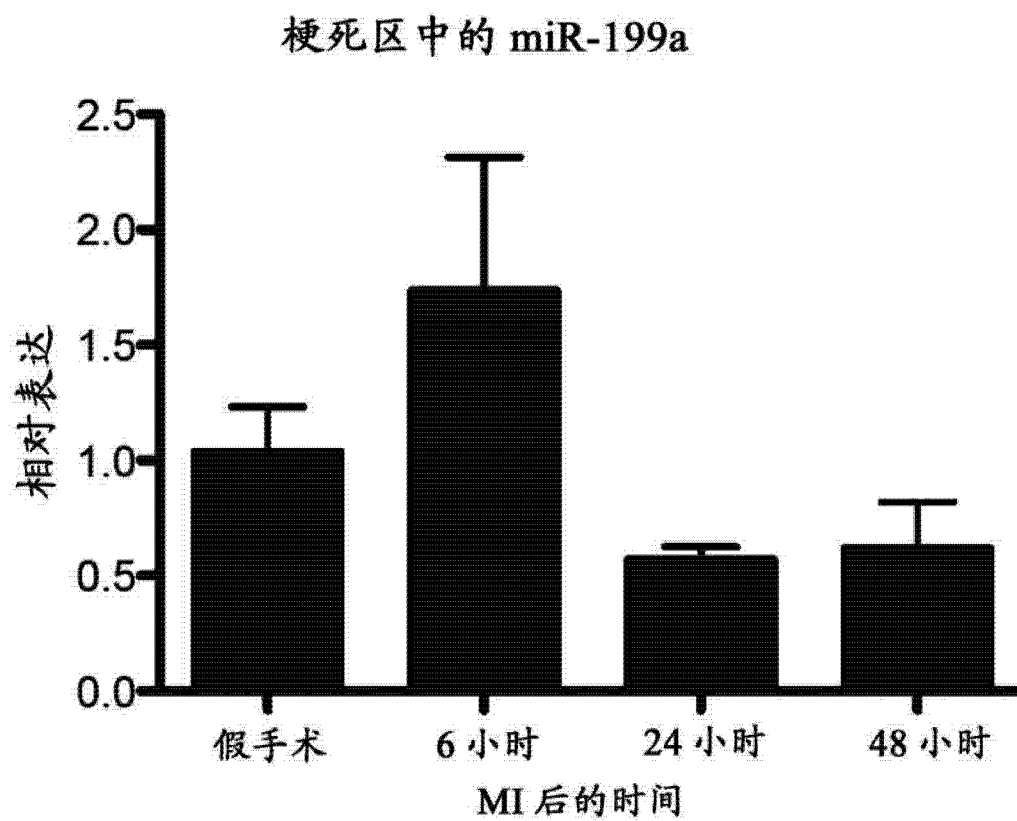


图 1

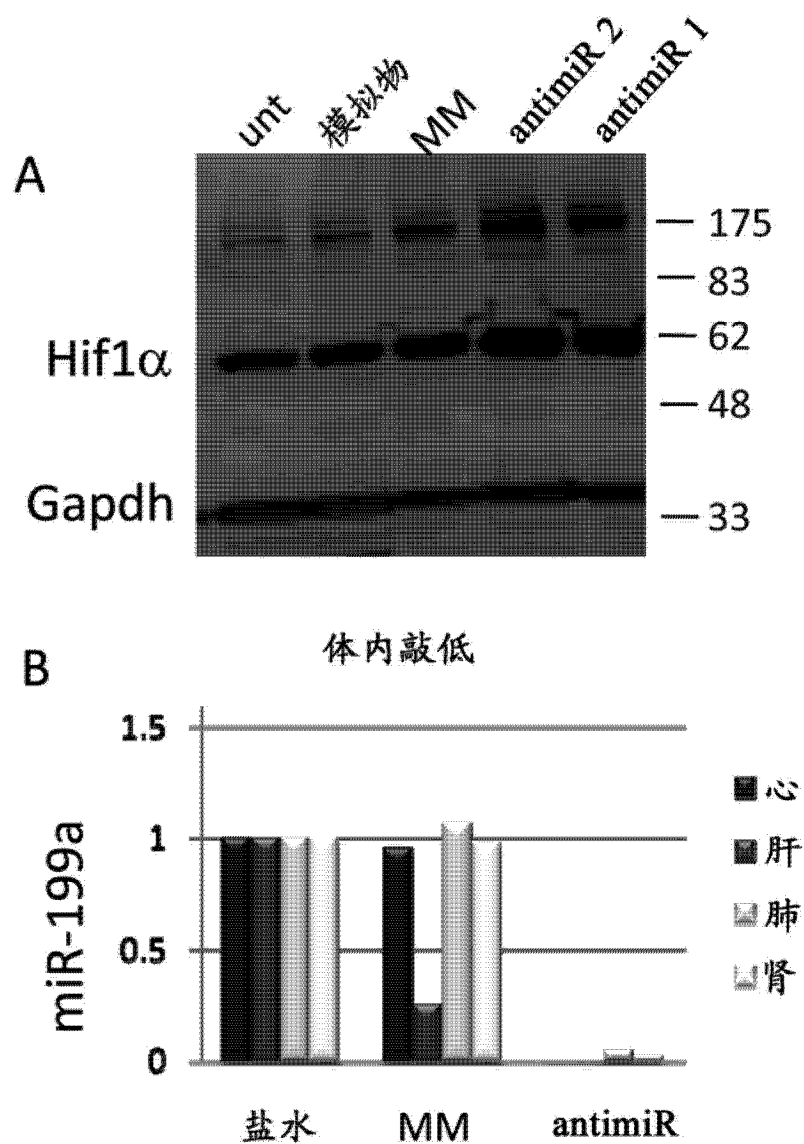


图 2

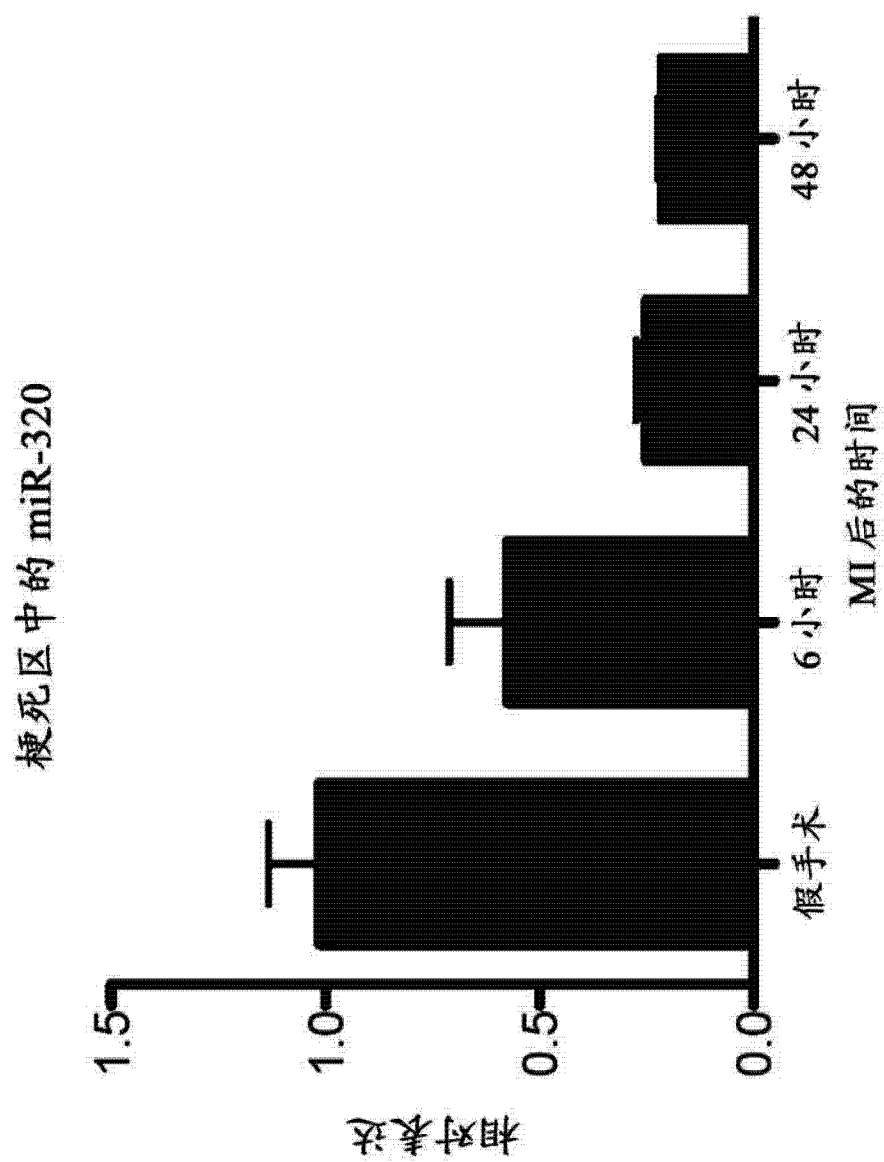


图 3

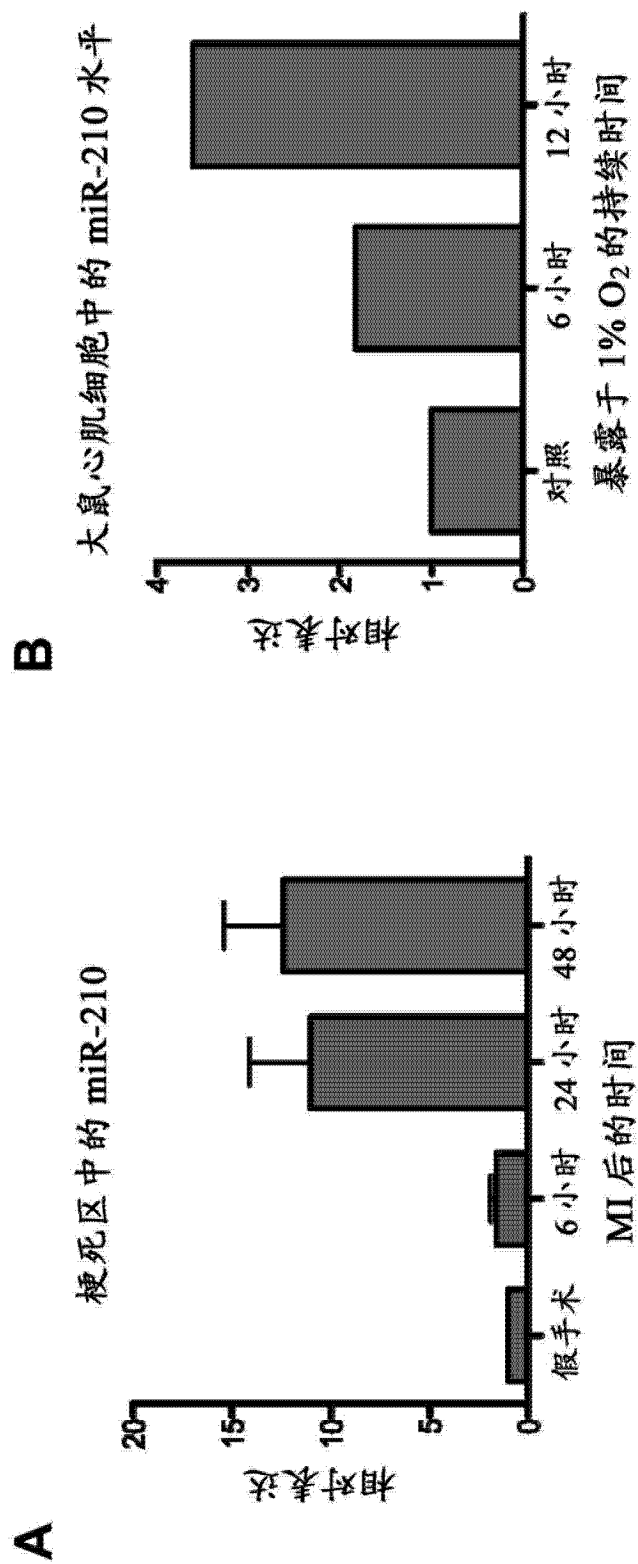


图 4

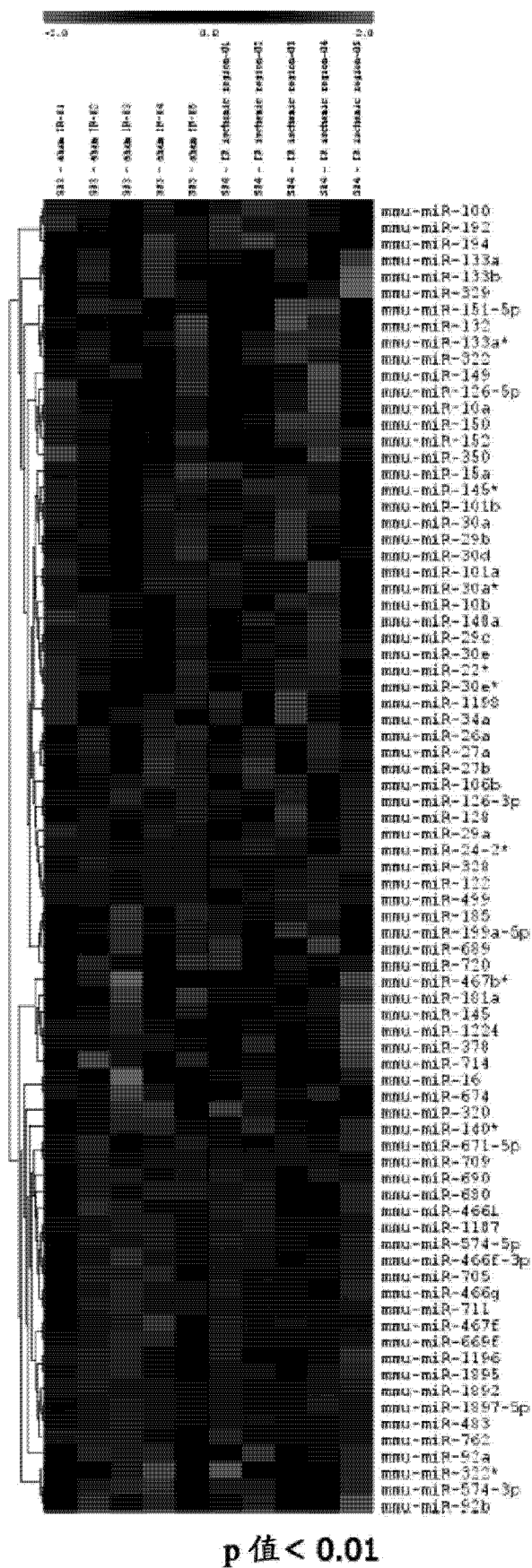


图 5