

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102939090 A

(43) 申请公布日 2013.02.20

(21) 申请号 201180017288.8 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2011.04.01 *A61K 31/7088*(2006.01)
(30) 优先权数据 *A61P 9/10*(2006.01)
10003675.5 2010.04.01 EP
(85) PCT申请进入国家阶段日
2012.09.29
(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2011/055122 2011.04.01
(87) PCT申请的公布数据
W02011/121120 EN 2011.10.06
(71) 申请人 法兰克福大学
地址 德国法兰克福
(72) 发明人 安德里亚斯·察赫尔
斯特凡妮·迪梅勒 雷耶尔·布恩
(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 7 页

(54) 发明名称

miRNA-29 表达拮抗剂及其在预防和治疗主动
脉瘤中的用途

(57) 摘要

本发明涉及微 RNA(miRNA-29) 的表达和 / 或
功能的拮抗剂,其用于预防和 / 或治疗主动脉瘤。
还公开了用于鉴定 miRNA-29 拮抗剂的方法、包含
所述 miRNA-29 拮抗剂的药物组合物以及用于在
需要这类治疗的个体中预防和/治疗年龄相关性主
动脉瘤形成的方法。

1. miRNA-29 表达和 / 或功能拮抗剂, 其用于预防和 / 或治疗哺乳动物的主动脉瘤形成。
2. 如权利要求 1 所述的拮抗剂, 其中所述主动脉瘤为腹主动脉瘤 (AAA)。
3. 如权利要求 1 所述的拮抗剂, 其中所述主动脉瘤形成还包括主动脉血管的弱化和 / 或主动脉破裂。
4. 如权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的拮抗剂, 其中所述主动脉瘤还包括主动脉组织中细胞外基质蛋白的基因的下调, 所述细胞外基质蛋白例如胶原、原纤维蛋白或弹性蛋白, 所述基因例如 COL1 A1、COL1 A2、COL1 A3、ELN 和 / 或 FBN1。
5. 如权利要求 1 至 4 中任一权利要求所述的拮抗剂, 其中所述 miRNA-29 选自 miRNA-29a、miRNA-29b 和 miRNA-29c, 特别为 miRNA-29b。
6. 如权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的拮抗剂, 其中所述拮抗剂选自反义 DNA- 和 / 或 RNA- 寡核苷酸、反义 2'-O- 甲基寡核糖核苷酸、包含磷硫酰键的反义寡核苷酸、包含锁核酸 LNA® 碱基的反义寡核苷酸、吗啉代反义寡核苷酸、PPAR- γ 激动剂、微 RNA 拮抗剂及其混合物。
7. 如权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的拮抗剂, 其中通过药物 - 洗脱支架或通过气球向所述主动脉组织给予所述拮抗剂。
8. 用于鉴定 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的拮抗剂的方法, 其包括:
 - (a) 使细胞与候选化合物接触;
 - (b) 评价 miRNA-29a 至 miRNA-29c 中至少一个的活性或表达; 以及
 - (c) 将步骤 (b) 中的所述活性或表达与不存在候选化合物下的 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的活性或表达进行比较,其中, 与步骤 (c) 相比, 在步骤 (b) 中测量的 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的活性或表达的下降表示所述候选化合物为 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的拮抗剂。
9. 如权利要求 8 所述的方法, 其中使所述细胞与所述候选化合物体外或体内接触。
10. 如权利要求 8 或 9 所述的方法, 其中所述候选化合物为蛋白、肽、多肽、多核苷酸、寡核苷酸或小分子。
11. 如权利要求 8 至 10 中任一权利要求所述的方法, 其中评价所述 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的表达包括 Northern 印迹法或 RT-PCR。
12. 如权利要求 8 至 11 中任一权利要求所述的方法, 其中评价 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的活性包括评价由 miRNA-29a 至 miRNA-29c 调节的基因的表达或活性, 例如, 胶原、原纤维蛋白或弹性蛋白的基因, 所述基因例如 COL1 A1、COL1 A2、COL1 A3、ELN 和 / 或 FBN1。
13. 药物组合物, 其包含 miRNA-29 的拮抗剂、特别是 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的拮抗剂。
14. 如权利要求 13 所述的药物组合物, 其中所述 miRNA-29 的拮抗剂选自反义 DNA- 和 / 或 RNA- 寡核苷酸、反义 2'-O- 甲基寡核糖核苷酸、包含磷硫酰键的反义寡核苷酸、包含锁核酸 LNA® 碱基的反义寡核苷酸、吗啉代反义寡核苷酸、PPAR- γ 激动剂、微 RNA 拮抗剂及其混合物, 并且特别为 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的微 RNA 拮抗剂。
15. 如权利要求 13 或 14 所述的药物组合物, 其中所述 miRNA-29a 至 miRNA-29c 的拮抗剂包括与 miRNA-29a、miRNA-29b、miRNA-29c 或其组合的成熟序列互补的序列。

miRNA-29 表达拮抗剂及其在预防和治疗主动脉瘤中的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及微 RNA (miRNA-29) 的表达和 / 或功能的拮抗剂,其用于预防和 / 或治疗主动脉瘤。还公开了用于鉴定 miRNA-29 拮抗剂的方法、包含所述 miRNA-29 拮抗剂的药物组合物以及用于在需要这类治疗的个体中预防和治疗年龄相关性主动脉瘤形成的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 目前,人类寿命的延长遇到年龄相关的心血管疾病的患病率增加的代价 (Lakatta EC. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. *Heart Fail Rev.* 2002;7:29-49)。具有高死亡率的一种具体疾病状态为主动脉瘤形成以及后续的主动脉血管破裂。主动脉瘤 (AA) 是典型的年龄相关疾病,其影响约 9% 的老年人并导致大量的死亡 (Singh K, Bona KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence of and Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysms in a Population-based Study: The Tromso Study. *Am J Epidemiol.* 2001;154:236-244)。

[0004] AA 的发生率仍在增加,意味着诸如通过针对血压的目前主要的预防性医疗保健策略在降低 AA 方面不是显著有效的。外科手术目前是先进的治疗;然而,这种外科手术介入与显著的发病率和死亡率相关,例如,由于大的术前和术后死亡率,仅 10-25% 的患者幸免于破裂。在机械学水平上,人类病理学部分的分析表明 AA 的形成和破裂特征在于血管壁的变薄。细胞外基质的形成降低或破坏被认为是导致血管壁变薄的关键病理生理学过程 (Guo DC, Papke CL, He R, Milewicz DM. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:339-352)。

[0005] 微 RNA (miRNA) 目前已经显现为多个 (病理) 生理学过程的关键调节剂。miRNA 是短的非编码 RNA,其通过诱导靶 mRNA 的降解或通过阻断蛋白翻译而调节蛋白的转录后表达。miRNA 被表达为折叠成茎环结构的前体转录本。随后,前体 miRNA 通过 Drosha 和 Dicer 核酸酶而被消化,从而产生成熟 miRNA 双链体,其然后被引入 miRNA 相关的 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC)。然而,成熟 miRNA 仅一条链被保留在复合物中,并且将提供与靶 mRNA 的结合。沉默的基因转录本内的靶序列区域主要发现位于各自 mRNA 的未翻译区域;miRNA 优选在它们的靶 mRNA 的 3' 未翻译区域中结合,并且促进翻译抑制或 mRNA 降解。

[0006] 然而,各种研究表明特异性 miRNA 控制血管生长和心功能 (Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases; inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2008;79:581-588), miRNA 在 AA 形成和动脉粥样硬化斑块破裂中的参与以及年龄对血管 miRNA 表达的影响是未知的。

[0007] 围绕 miRNA29 的微 RNA 家族已知为心组织中纤维化的关键调节剂。WO 2009/018493 表明 miRNA-29 家族的成员,即 miRNA-29a、b 和 c 在对应激反应的心脏组织中下调,并且在耐受应激和纤维化的小鼠的心脏组织中上调。然而,在 WO 2009/018493 中未公开主动脉瘤形成。

[0008] 同样,WO 2008/042231 公开了 miRNA 表达在心脏疾病中的治疗启示。发现在心肌

细胞中的改变的 miRNA 表达引起对心力衰竭中各种基因转录的广泛影响。例如, miR-1 调节钙蛋白表达水平。预期的 miR-1 靶标包括多个能引起心力衰竭发病机理的靶标, 其中, Calm1 和 Calm2 为心脏中的主要调钙蛋白异构体。该申请建议使用在受累心脏组织中特异性表达的 miRNA 作为治疗靶标。

[0009] WO 2009/018493 公开了 miR-29a 至 c 拮抗剂作为促纤维化作用剂的用途, 其使脉管系统中的软斑块转化为纤维化组织以防止心肌梗死。

[0010] 多个其他的微 RNA 为心脏疾病起始中的关键调节剂。Silvestri 等人评论了 MiR-29 参与心肌梗死后的纤维化反应, 而 miR-21 可以在血管成形后再狭窄中发挥重要作用。MiR-208 参与心力衰竭中收缩蛋白向胚胎基因表达模式的改变。MiR-1 影响在心肌梗死之后对心律失常的易感性 (Silvestri P 等人, MicroRNAs and ischemic heart disease: towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic targets. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2009 Jun; 4(2): 109-18)。

[0011] miRNA-29 在心肌梗死中的表达是研究吡格列酮 (PPAR- γ 激动剂) 针对心肌缺血再灌注损伤的保护性作用的起始点。在向大鼠给予吡格列酮之后, miRNA-29a 和 miRNA-29c 显著较少地表达。有趣地, miRNA-29a 和 miRNA-29c 的微 RNA 拮抗剂 (antagomir) 显著降低经过 IR 损伤的心脏中的心肌梗塞尺寸和细胞凋亡。这可能是由于心脏中抗凋亡因子 (Mc1-2) 的表达增加 (Ye Y, 等人, Down-regulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR- γ agonist protects against myocardial ischemia-reperfusion injury, Cardiovasc Res. 2010 Feb 17)。此外, Golledge 等人 (在 Golledge J, 等人 Peroxisome proliferator-activated receptor ligands reduce aortic dilatation in a mouse model of aortic aneurysm. Atherosclerosis. 2010 May; 210(1): 51-6. Epub 2009 Oct 29. 中) 公开了骨桥蛋白与人类腹主动脉瘤 (AAA) 相关, 并且在体外研究中, 暗示了通过过氧化物酶体增殖物-激活的受体 (PPAR) 连接来下调该细胞因子。同样, Jones 等人 (在 Jones A, 等人 Rosiglitazone reduces the development and rupture of experimental aortic aneurysms. Circulation. 2009 Jun 23; 119(24): 3125-32. Epub 2009 Jun 8. 中) 公开了罗格列酮, 即过氧化物酶体增殖物-激活的受体- γ 激动剂, 降低动脉瘤扩张或破裂。使用罗格列酮的预处理或后治疗降低小鼠模型中的主动脉扩张和破裂。使用罗格列酮预治疗的动物中的损伤降低伴随着炎症介质的表达降低。描述需要阐明准确机制的其它研究。然而, 在这些公开中, 配体或罗格列酮或吡格列酮的作用完全与本发明涉及的机制无关。

[0012] 尽管没有药物治疗被认证并可用于治疗主动脉瘤形成、风险因子修饰以及预防性治疗, 但在最近的 15 年里, 使用他汀类药物和 ACE 抑制剂已经降低由于动脉粥样硬化而导致的死亡率。然而, 更重要地, 由于寿命期望的增加和总人群的年龄增加, 所以预期年龄相关的疾病, 例如动脉瘤形成将进一步随时间而增加。因此, 迫切需要有效的治疗。治疗性干扰异常的血管重构的目前尝试集中于改良与血管壁结构的改变相关的炎性反应。然而, 没有一种治疗选择修饰血管壁的组织弱化。阻断胶原-降解蛋白酶的特异性介入或炎性细胞募集的抗体导向抑制结果是不成功的。

[0013] 发明概述

[0014] 根据上述现有技术以及目前用于主动脉瘤的预防性或治疗性策略的限制,本发明的目的在于提供用于预防和 / 或治疗在老年人中常诊断出的主动脉瘤的新型诊断和治疗策略。

[0015] 在第一方面,通过用于预防和 / 或治疗哺乳动物、优选人类的主动脉瘤形成的 miRNA-29 表达和 / 或功能拮抗剂来解决上述问题。通过使用生物信息学方法,发明人惊讶地发现与年轻小鼠相比, mir-29 家族 (mir-29a、b 和 c) 为本发明环境中所研究的 20 个调节的 miRNA 中功能性影响年老小鼠的主动脉中的 mRNA 水平的唯一一个。

[0016] 主动脉瘤形成由胶原、原纤维蛋白的分解,血管平滑肌细胞的凋亡,以及炎性细胞的募集诱发。

[0017] 本发明所述的拮抗剂特别可用于预防与动脉血管弱化有关的疾病和事件,例如急性心肌梗死、不稳定性心绞痛、周围动脉闭塞性疾病、缺血性发作、主动脉瘤形成和主动脉破裂。优选地,本发明的拮抗剂用于预防和 / 或治疗疾病状态,包括 i) 由于动脉粥样硬化而产生的主动脉中的动脉瘤形成; ii) 由于遗传因素而产生的主动脉中的动脉瘤形成,例如在马凡氏综合征中; iii) 在患有二叶式主动脉瓣形成的患者中的主动脉瘤形成; 以及 iv) 年龄依赖性主动脉瘤形成。因此,在一个实施方案中,所述主动脉瘤形成能在年老哺乳动物中发生,由此为年龄相关性的。在另一实施方案中,所述主动脉瘤形成能由于遗传状态而发生和 / 或为疾病相关性的。两种实施方案还能同时发生。

[0018] 在本发明语境中的术语“主动脉破裂”涉及其中主动脉(身体中最大的动脉)由于扩张而撕裂或破裂的疾病状态,特别是由于主动脉瘤的缘故或由于动脉粥样硬化斑块的形成。

[0019] 在本发明语境中的术语“预防”应理解为旨在避免负面事件发生的医疗介入,所述负面事件很可能导致患有疾病的患者的疾病状态的恶化或者健康和 / 或生病个体的损伤或死亡。

[0020] 在一个实施方案中, miRNA-29 表达和 / 或功能拮抗剂用于主动脉瘤 (AA), 所述主动脉瘤特征在于由于血管壁变薄而产生的主动脉的局部扩张。

[0021] 因此,在另一实施方案中,本发明的拮抗剂用于预防和 / 或治疗年龄相关性主动脉瘤,其中所述主动脉瘤(优选年龄相关性的)还涉及主动脉组织中的细胞外基质蛋白的基因下调,所述细胞外基质蛋白例如胶原、原纤维蛋白或弹性蛋白,所述基因例如 COL1 A1、COL1 A2、COL1 A3、ELN 和 / 或 FBN1。

[0022] 在本发明的又一实施方案中, miRNA-29 的表达和 / 或功能的拮抗剂选自 miRNA-29a、miRNA-29b 和 miRNA-29c 的表达和 / 或功能的拮抗剂,特别是 miRNA-29b 的表达和 / 或功能的拮抗剂。

[0023] 本发明的拮抗剂在另一实施方案中为选自以下的拮抗剂:反义 DNA- 和 / 或 RNA- 寡核苷酸、反义 2'-O- 甲基寡核糖核苷酸、包含磷硫酰键的反义寡核苷酸、包含锁核酸 LNA® 碱基的反义寡核苷酸、吗啉代反义寡核苷酸、PPAR- γ 激动剂、微 RNA 拮抗剂及其混合物。

[0024] 因为 miRNA 通过沃森-克里克碱基配对而靶向它们的 mRNA, 因此优选地, miRNA-29 的拮抗剂为反义寡核苷酸, 其与 miRNA 互补并且与内源 mRNA 靶标竞争性地与 miRNA 碱基配对。对于本发明的目的,反义寡核苷酸的序列与 miRNA-29(a 至 c) 的补体和 / 或其种子

序列为 50% 相同, 优选为与 miRNA-29(a 至 c) 补体和 / 或其种子序列 60%、70%、80%、90% 或 95% 相同, 并且最优为 100% 相同。此外, 特别优选地, 反义寡核苷酸被化学地修饰以改善反义寡核苷酸和 miRNA 之间的双链体的热稳定性。优选的化学修饰包括例如, 双环高亲和性 RNA 类似物, 其中糖 - 磷酸主链中的呋喃糖环通过引入 2' -O, 4' -C- 亚甲基桥 (LNA® -antimiR) 而化学地锁在 RNA 模拟 N- 型构象中。其它的优选化学修饰的寡核苷酸包括吗啉代 (morpholinos) 寡核苷酸、2' -O- 甲基寡核苷酸、2' -O- 甲氧基乙基寡核苷酸, 以及胆固醇结合的 2' -O- 甲基修饰的寡核苷酸 (微 RNA 拮抗剂)。

[0025] 在本发明语境中的拮抗剂还包括能通过抑制微 RNA 表达或通过抑制微 RNA 的沉默功能而抑制 miRNA-29 的任何物质。因此, 干扰微 RNA 途径的任何化合物能够为本发明的拮抗剂, 例如通过抑制蛋白 Pasha、Drosha、Dicer 或 Argonaut 家族蛋白的功能。此外, 抑制前体微 RNA 或 miRNA-29 的任何化合物, 例如聚合酶 II 或 III 的抑制剂, 为 miRNA-29 表达的候选拮抗剂。成熟 miRNA 还用作设计 miRNA-29 功能抑制剂的靶标。具有与微 RNA 精确的或错配的互补性的核酸可以用于抑制或竞争内源 miRNA-29 与其靶 mRNA 的结合。如何设计这类 miRNA 抑制剂在本领域中公知。

[0026] 在另一实施方案中, 通过药物 - 洗脱支架或通过气球向动脉组织给予本发明的拮抗剂。优选地, 药物洗脱支架或气球由生物可吸收材料制成。应理解, 任何适于将药物局部递送入血管内部的装置可用于本发明的环境中。

[0027] 通过用于鉴定 miRNA-29a 至 c 拮抗剂的方法, 在另一方面解决本发明的目的, 所述方法包括:

[0028] (a) 使细胞与候选化合物接触;

[0029] (b) 评价 miRNA-29a 至 c 活性或表达; 以及

[0030] (c) 将步骤 (b) 中的活性或表达与不存在候选化合物下的 miRNA-29a 至 c 的活性或表达进行比较,

[0031] 其中, 与步骤 (c) 相比, 在步骤 (b) 中测量的 miRNA-29a 至 c 活性或表达的下降表示候选化合物为 miRNA-29a 至 c 的拮抗剂。

[0032] 合适的细胞能选自血管壁细胞、主动脉起始细胞或源自哺乳动物血管的其他细胞, 例如, 优选为内皮细胞 (EC) 和 / 或平滑肌细胞 (SMC), 其在其他优选的实施方案中重组地或固有地表达或优选地过表达基质基因, 例如, 胶原、原纤维蛋白或弹性蛋白的基因, 例如 COL1 A1、COL1 A2、COL1 A3、ELN 和 / 或 FBN1。

[0033] 在其他实施方案中, 本发明的方法包括使细胞与候选化合物在体外和 / 或体内接触。

[0034] 又一实施方案则涉及本发明的方法, 其中所述候选化合物为蛋白、肽、多肽、多核苷酸、寡核苷酸或小分子。

[0035] 在其他实施方案中, 评价 miRNA-29a 至 c 的表达包括 Northern 印迹法或 RT-PCR。然而, 用于鉴定和量化微 RNA 的许多技术在本领域中已知。除了 Northern 印迹法或 RT-PCR, 评价微 RNA 表达能通过微 RNA 表达阵列、荧光核酸探针 (例如与膜或珠结合的)、以及基于抗体的测定系统而进行。在间接方法中, 还通过体外或体内报告基因测定来进一步测量微 RNA 的活性。例如, 本领域技术人员能在没有掌握本发明技能的情况下设计基于 miRNA-29 家族的种子序列的报告基因测定, 其允许简单筛选候选 miRNA-29 拮抗剂。在这类方法中,

miRNA 的靶序列能被引入所选报告基因的 3' 或 5' 未翻译区域。该 miR- 敏性构造则转化为合适的细胞表达系统,其随后开始与候选化合物接触。在与对照样本中报告基因的活性比较下,与化合物接触的样本中报告基因的活性产生与测试化合物的抑制作用相关的信息。

[0036] 在另一实施方案中,本发明的用于鉴定 miRNA29a 至 c 拮抗剂的方法包括评价由 miRNA-29a 至 c 调节的基因的表达或活性,例如,胶原、原纤维蛋白或弹性蛋白的基因,例如, COL1 A1、COL1 A2、COL1 A3、ELN 和 / 或 FBN1。

[0037] 在本发明另一方面中,通过包含 miRNA-29、特别是 miRNA-29a 至 c 的拮抗剂的药物组合物解决上述问题。在优选的实施方案中,本发明的药物组合物包括选自以下的 miRNA-29 拮抗剂:反义 DNA- 和 / 或 RNA- 寡核苷酸、反义 2'-O- 甲基寡核糖核苷酸、包含磷硫酰键的反义寡核苷酸、包含锁核酸 LNA® 碱基的反义寡核苷酸、吗啉代反义寡核苷酸、PPAR- γ 激动剂、微 RNA 拮抗剂及其混合物,特别是 miRNA-29a 至 c 的微 RNA 拮抗剂。在特别优选的实施方案中,miRNA-29a 至 c 拮抗剂包括与 miRNA-29a、miRNA-29b、miRNA-29c 或其组合的成熟序列互补的序列。

[0038] 尽管可能地,对于治疗用途,miRNA-29a 至 c 表达和 / 或功能的拮抗剂可以以化学原料的形式而给予,但优选以药物组合物的形式提供活性成分。因此,在其他方面,本发明提供了药物组合物,其包含与药物可接受的载体和 / 或赋形剂相联合的 miRNA-29a 至 c 表达和 / 或功能拮抗剂或其药物可接受的衍生物。载体和 / 或赋形剂必须与制剂的其他成分相容且对其接受者无害的含义上为“可接受的”。

[0039] 在其他方面,通过预防和 / 或治疗有需要的个体中的主动脉瘤形成的方法来解决本发明的目的,所述方法包括下列步骤:

[0040] (a) 确定患有主动脉瘤的个体;以及

[0041] (b) 向所述个体给予 miRNA-29 表达或功能拮抗剂。

[0042] 在本发明的语境中需要预防和 / 或治疗主动脉瘤形成的个体优选为哺乳动物,更优选为人类,其被诊断患有主动脉中的动脉瘤。此外,还包括具有发展主动脉瘤的增加了的风险的个体,优选哺乳动物,更优选为人类。

[0043] 在一个实施方案中,本文上述所公开的方法是优选的,其中 miRNA-29 拮抗剂选自反义 DNA- 和 / 或 RNA- 寡核苷酸、反义 2'-O- 甲基寡核糖核苷酸、包含磷硫酰键的反义寡核苷酸、包含锁核酸 LNA® 碱基的反义寡核苷酸、吗啉代反义寡核苷酸、PPAR- γ 激动剂、微 RNA 拮抗剂及其混合物,并且特别选自 miRNA-29a 至 c 的微 RNA 拮抗剂。在特别优选的实施方案中,miRNA-29a 至 c 的拮抗剂包括与 miRNA-29a、miRNA-29b、miRNA-29c 或其组合的成熟序列互补的序列。

[0044] 在接下来的实施方案中,预防和 / 或治疗有需要的个体中的主动脉瘤的方法是优选的,其中通过肠胃外给药或直接注射进主动脉组织来给予 miRNA-29 拮抗剂。拮抗剂的这类给药优选包括口服给药、经皮给药、缓释给药、控释给药、延时释放给药、栓剂给药、导管给药、药物-洗脱支架给药、气球给药或舌下给药。

[0045] 在其他实施方案中,本发明的预防和 / 或治疗主动脉瘤形成的方法包括向所述个体给予第二治疗。优选地,所述第二治疗选自引入支架或气球。更优选地,所述第二治疗与 miRNA-29 拮抗剂同时给予,或其中所述第二治疗在 miRNA-29 之前或之后给予。

[0046] 优选本发明的预防和 / 或治疗年龄相关性主动脉瘤形成的方法的其他实施方案,

其中在给予 miRNA-29 拮抗剂之后,在所述个体中改善了血管壁变薄和 / 或细胞外基质蛋白形成降低或破坏的一个或多个症状。

[0047] 下列附图和实施例仅用于阐述本发明,而不应解释为将本发明的范围限制在实施例所述的本发明具体实施方案中。对于本发明的目的,所引用的所有参考以其整体形式通过引用并入本文。

[0048] 本发明的实施例涉及附图,其中:

[0049] 图 1 表示 miRNA 和 mRNA 表达的生物信息学分析,以鉴定靶向 mRNA 表达的 miRNA。(A) 使用 6 核苷酸长度的字段的 Sylamer 图片。具有最高峰的“字段”反应了 miRNA-29 种子序列。(B) miRNA 分数的柱状图。分数如下

[0050]

Mir	分数	p- 值
mmu-miR-29c	26.84	2.2e-12
mmu-miR-29b	26.11	4.5e-12
mmu-miR-29a	23.95	3.9e-11
mmu-miR-186	13.42	1.4e-06
mmu-miR-758	10.75	2.1e-05
mmu-miR-183	10.1	4.0e-05
mmu-miR-182	9.84	5.3e-05
mmu-miR-140	9.55	7.0e-05
mmu-miR-190	9.45	7.8e-05
mmu-miR-98	8.13	0.00029

[0051] 图 2 示出主动脉中年龄调节的 miRNA 的确认。在 n=4 个年轻小鼠 (6 周龄) 和 n=4 个年老小鼠 (18 月龄) 中,通过 TaqMan RT-PCR 来测定 miRNA。(**) 表示年轻小鼠和年老小鼠之间的显著差异。

[0052] 图 3 示出相对于年轻主动脉,在年老主动脉中 miRNA-29 靶基因的表达成倍增加或成倍降低。

[0053] 图 4 示出对 sno202 标准化的 AngII- 灌注的小鼠的主动脉中的 miRNA-29 家族成员的表达。(a) miRNA-29b, (b) miRNA-29a, (c) miRNA-29c。n=6/ 组。(**) 表示对照和血管紧张素治疗的样本之间的显著差异。

[0054] 图 5 示出在 AngII 治疗的 SMC 中的相对 MiR-29 (成倍变化) 表达。(A) miRNA-29b, (b) miRNA-29a。

[0055] 图 6 示出与对照主动脉相比,在患有正常三尖式主动脉瓣的患者和患有异常二叶

式主动脉瓣的患者的人类动脉瘤组织切片中 miRNA-29a、miRNA-29b 和 miRNA-29c 的成倍变化的相对表达。(**) 表示表达的显著差异。

[0056] 实施例 1: 在主动脉中 miRNA 的年龄相关性调节

[0057] 为了确定年龄对 miRNA 表达的影响, 发明人生成了比较年老雄性小鼠 (18 月龄) 与年轻雄性小鼠 (6 周龄) 的 miRNA 和 mRNA 微阵列表达谱。通过该方法确定了在主动脉中由年龄调节 [成倍增加 / 减少 >1.5 且 $p < 0.01$] 的 20 个 miRNA (表 1)。

[0058] 为了证实这些 miRNA 中哪种还在老化中发挥生物作用, 应用两种不同的无偏性生物信息学工具, 其使用 mRNA 表达数据以鉴定 miRNA 的推定调节。这些工具, 即 Sylamer (van Dongen S 等人, Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. Nat Meth. 2008;5:1023-1025) 和 MirExTra (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/hexamers>), 均确定 mir-29 家族 (mir-29a, b 和 c) 为 20 个调节的 miRNA 中功能性影响 mRNA 水平的唯一一个 (图 1)。通过实时 PCR 来确认由年龄上调的 mir-29 家族 (miRNA-29a 和 miRNA-29b) (图 2)。在心脏中, 已表明 miRNA-29 家族 (其包括 miRNA-29a、miRNA-29b 和 miRNA-29c) 通过靶向诸如胶原、原纤维蛋白和弹性蛋白的细胞外基质蛋白来控制急性心肌梗死之后的组织纤维化 (van Rooij E 等人, Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miRNA-29 in cardiac fibrosis. PNAS. 2008;105:13027-13032)。实际上, 这些已知的 mir-29 靶标均在主动脉中由年龄下调 (图 3)。

[0059] 表 1: 上调和下调的 miRNA

[0060] 上调的 miRNA

[0061]

基因名称	倍数	FDR-p
mmu-miR-129-3p	5.45	0.00002
mmu-miR-129-5p	5.37	0.00004
mmu-miR-146a	2.02	0.00671
mmu-miR-142-3p	1.63	0.00599
mmu-miR-29b	1.61	0.00381
mmu-miR-223	1.58	0.00649

[0062] 下调的 miRNA

[0063]

基因名称	倍数	FDR-p
mmu-miR-299*	-2.21	0.00032
mmu-miR-181c	-2.14	0.00028

mmu-miR-127	-2.10	0.00013
mmu-miR-154	-1.95	0.00145
mmu-miR-337-5p	-1.86	0.00163
mmu-miR-379	-1.76	0.00150
mmu-miR-136	-1.71	0.00244
mmu-miR-329	-1.70	0.00017
mmu-miR-31	-1.67	0.00246
mmu-miR-322	-1.67	0.00675
mmu-miR-377	-1.63	0.00359
mmu-miR-434-3p	-1.61	0.00325
mmu-miR-411	-1.54	0.00052
mmu-miR-181d	-1.51	0.00237

[0064] 实施例 2 :血管紧张素 II 体内和体外诱导 miRNA-29 表达

[0065] ApoE^{-/-}小鼠中的血管紧张素 (Ang) II 灌注用作小鼠中 AA 形成的建模。因此,AngII 连续应用于小鼠,持续 4 周。在 AngII 治疗的小鼠的主动脉中,miRNA-29b 显著上调 (图 4a)。然而,miRNA-29 家族的其他成员,即 miRNA-29a 未被调节 (图 4b)。通过体外研究来确认这些体内数据,表明平滑肌细胞的 AngII 治疗刺激 miRNA-29b 表达但未影响 miRNA-29a (图 5)。这些数据表明作为小鼠中 AA 形成的原型诱导物的 AngII 诱导 miRNA-29b 表达。

[0066] 实施例 3 :miRNA-29b 在人类的动脉瘤病理学切片中特异性增加

[0067] 为了检验在人类中这些实验结果的相关性,测量患有二叶式主动脉瓣疾病的患者的病理学切片中 miRNA-29 家族成员的表达。在该实验环境中,与 n=30 的对照主动脉相比,n=77 的患者切片中 miR-29b 显著增加,而非 miRNA-29a 和 miRNA-29c (图 6)。然而,为了不受理论限制,假设在年老个体 / 患者中,还修饰了 miRNA-29a 和 miRNA-29c 的调节,如在各个小鼠模型中所发现的。

[0068] 本研究的数据表明年龄与主动脉中的 miRNA-29 家族的表达增加有关。与 miRNA-29 家族成员的表达增加相一致,由 miRNA-29 靶向的细胞外基质蛋白的水平显著降低。因为年龄包括发展 AA 的主要风险因子,所以发明人随后测定 AngII-灌注的小鼠的主动脉中 miRNA-29 的调节。AngII 是增加小鼠中 AA 发生率的因子中的一个。与老化类似,AngII 灌注增加了 miRNA-29b 的表达。然而,与老化相反,通过 AngII 灌注未调节 miRNA-29 家族的其他成员。同样地,SMC 的体外 AngII 治疗还优先增加 miRNA-29b 表达。为了确定在人类中的推定相关性,发明人还测量了人类病理学切片中 miRNA-29 家族成员的表达。与

使用 AngII 作为刺激物的实验结果相一致,与人类主动脉的对照切片相比,选择性且显著上调了 miRNA-29b。同时,这些数据表明通过年龄和通过在实验模型以及人类中刺激 AA 的因子来增加 miRNA-29b。因为 miRNA-29b 靶向细胞外基质蛋白,人们可以推定 miRNA-29b 的表达增加可能促进细胞外基质的破坏和血管壁的变薄。

[0069] 还表明 MiR-29 通过靶向 Mcl-1 (抗凋亡 Bcl-2 家族成员) (Mott JL 等人, mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007;26:6133-6140) 以及通过增加 p53 水平 (Park SY 等人, miRNA-29 miRNAs activate p53 by targeting p85[alpha] and CDC42. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16:23-29) 而诱导癌细胞的细胞凋亡。平滑肌细胞凋亡被认为促进斑块破裂,并且也可能参与 AA (Clarke MCH 等人, Chronic Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Accelerates Atherosclerosis and Promotes Calcification and Medial Degeneration, *Circ Res*. 2008;102:1529-1538)。尽管仍表明 miRNA-29 的这些促凋亡作用还发生在平滑肌细胞中,但由 miRNA-29 诱导的平滑肌细胞凋亡可以进一步导致斑块不稳定性。因此, miRNA-29b 可以为预防动脉粥样硬化斑块变薄和不稳定的非常吸引人的靶标。

[0070] 因为外科手术是目前可用于 AA 的唯一治疗,所以新型药理学介入将提供在 AA 治疗中的主要步骤。还称为微 RNA 拮抗剂或抗 miR (antimiR) 的 miRNA 抑制剂已经成功地用于降低小鼠模型和非人类灵长类动物中的 miRNA 表达 (Bonauer A 等人, MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of ischemic Tissues in Mice. *Science*. 2009;324:1710-1713; Lanford RE 等人, Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Science*. 2010;327:198-201)。通过药物-洗脱支架或通过气球的微 RNA 拮抗剂局部递送可以用于提供在靶组织中 miRNA 的有效局部抑制,并限制对其他器官的假定副作用。

A)

使用长度6的字段的Sylamer图片

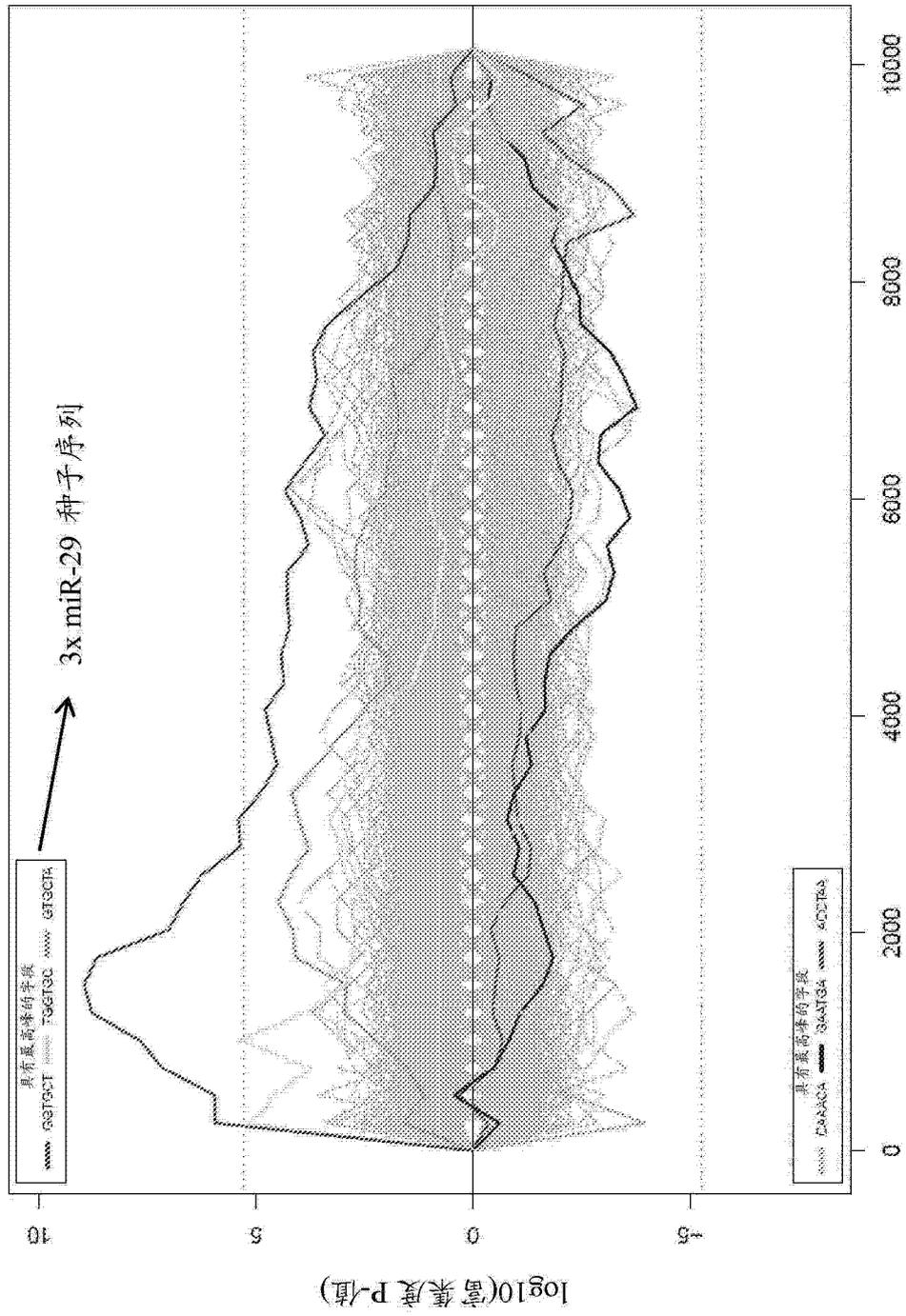


图 1

B)

miRNA分数减lnp的柱状图

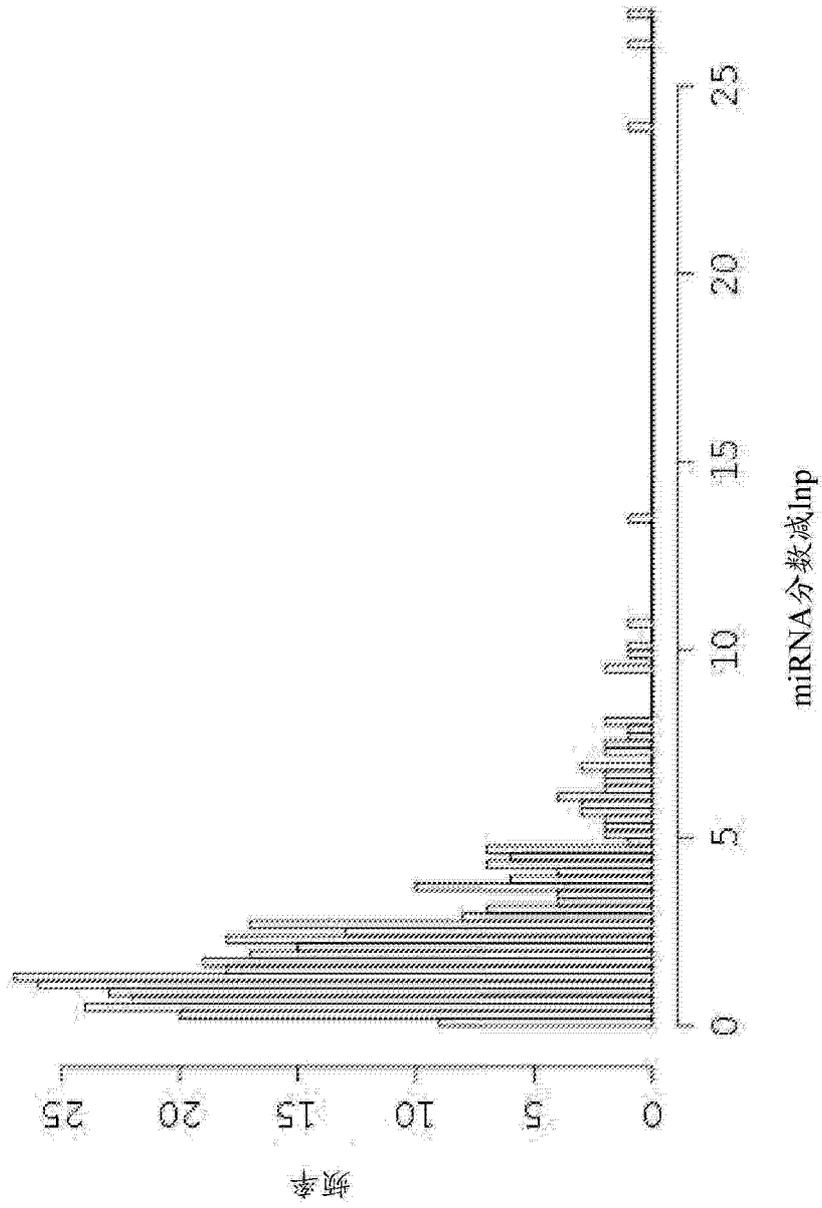


图1(续)

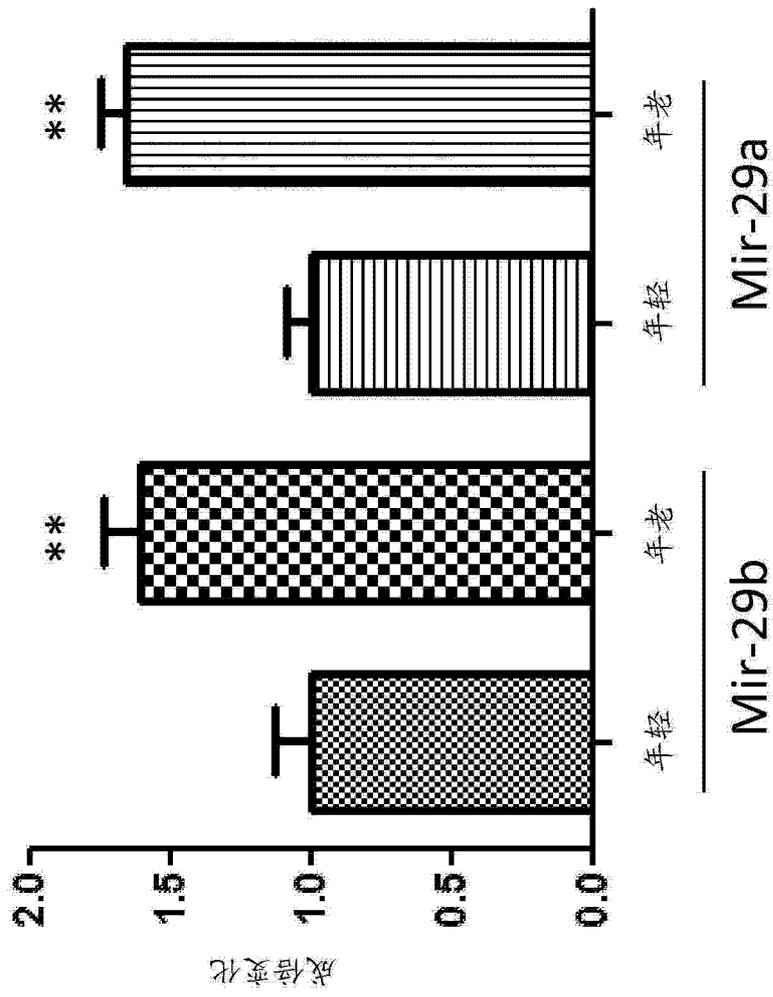


图 2

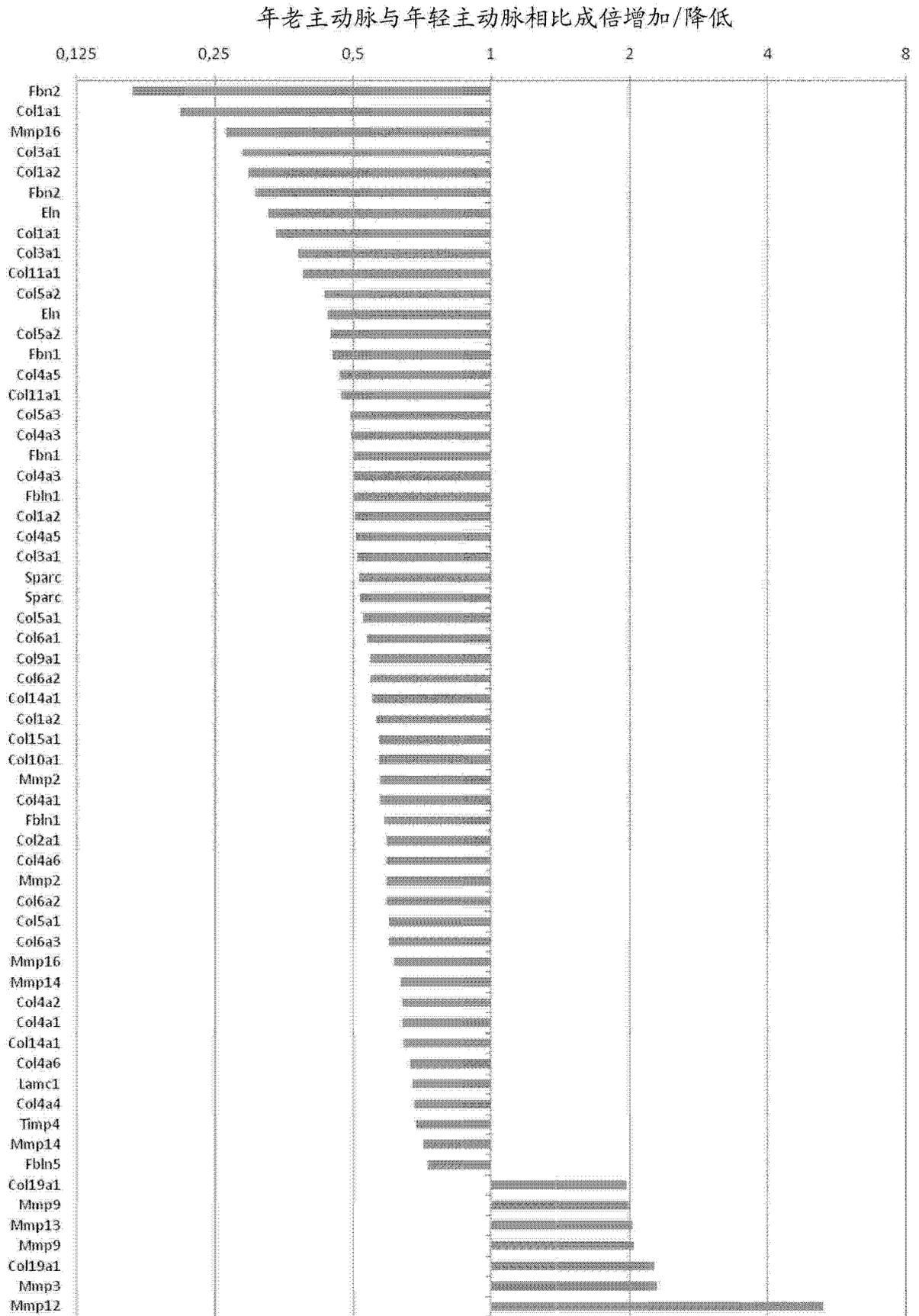


图 3

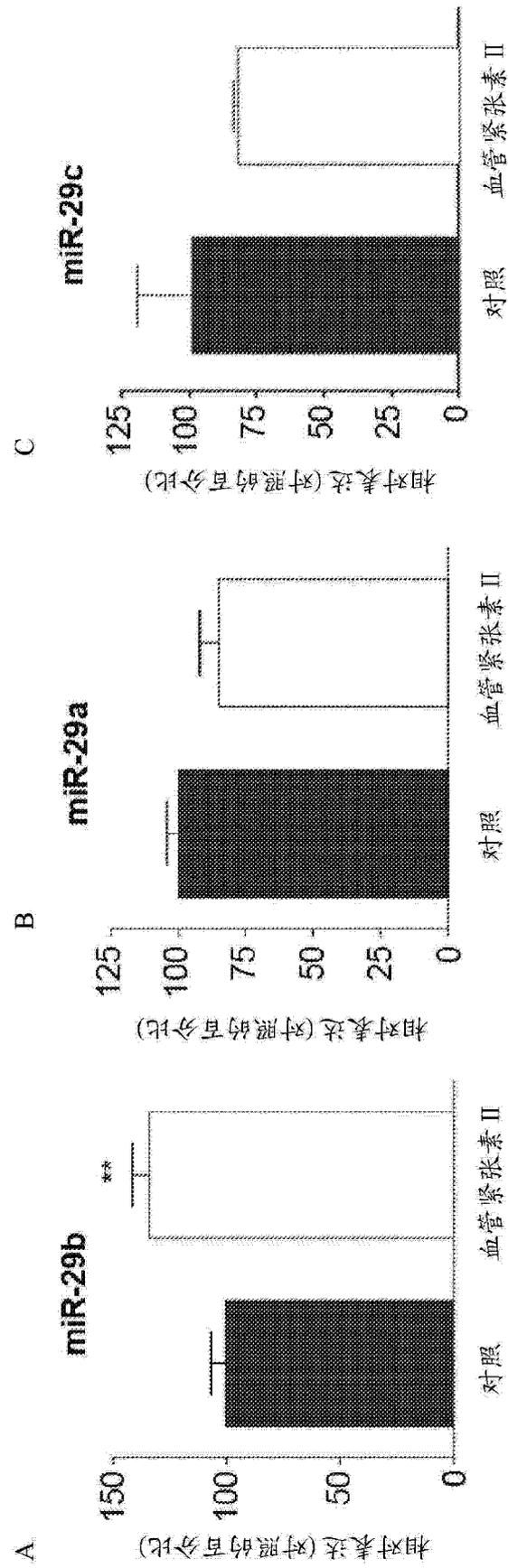
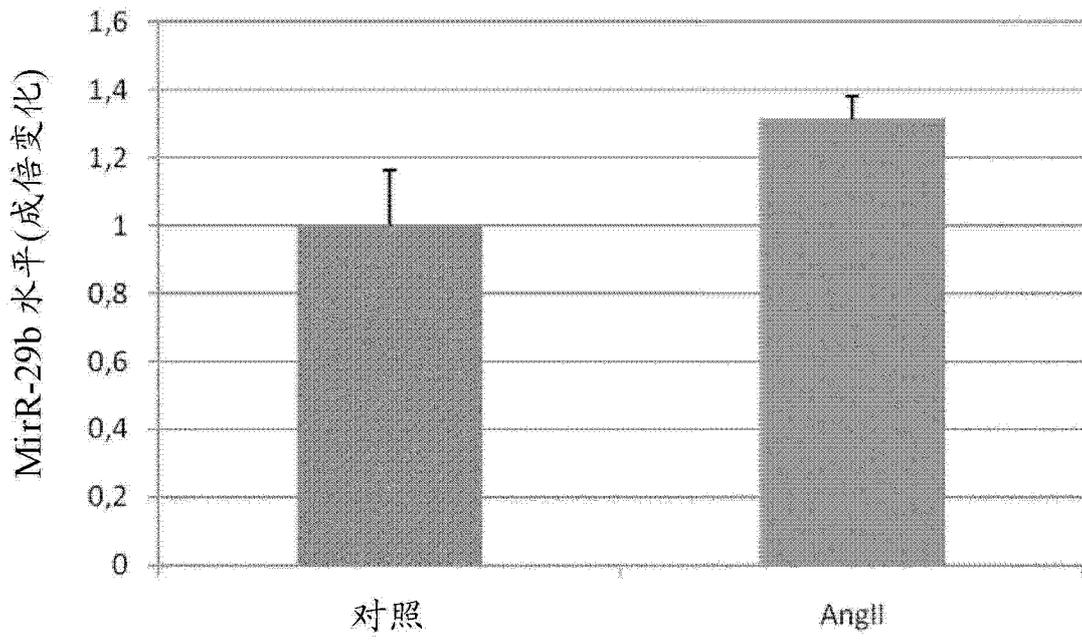


图 4

A



B

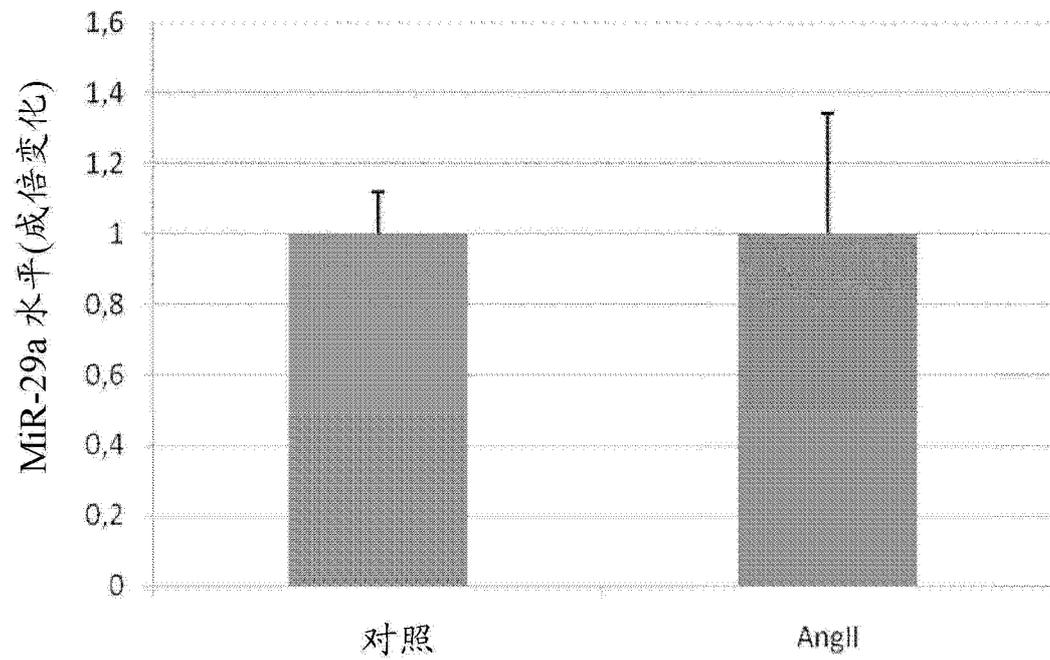


图 5

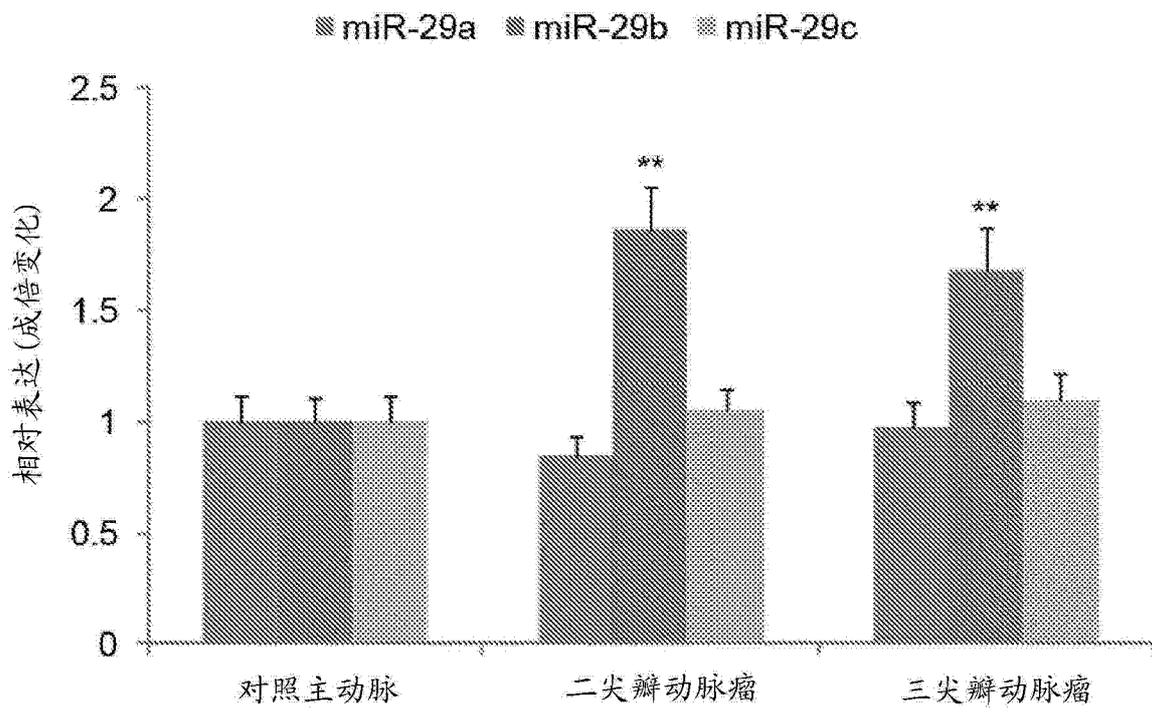


图 6