



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104995300 B

(45)授权公告日 2018.07.17

(21)申请号 201380061417.2

(22)申请日 2013.10.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104995300 A

(43)申请公布日 2015.10.21

(30)优先权数据

2012904297 2012.10.02 AU

2012904365 2012.10.05 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.05.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2013/001129 2013.10.02

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/053014 EN 2014.04.10

(73)专利权人 百年癌症药物与细胞生物学研究所

地址 澳大利亚新南威尔士州坎珀当

专利权人 米瑞克斯治疗公司 悉尼大学

(72)发明人 詹尼弗·甘布尔 马修·瓦达斯
索尔莱夫·默勒

(74)专利代理机构 上海唯源专利代理有限公司
31229

代理人 曾耀先

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 7/10(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

W0 2010/139026 A1,2010.12.09,

CN 101641440 A,2010.02.03,

CN 101821390 A,2008.06.13,

US 2011/0065778 A1,2011.03.17,

熊青 等.血清microRNAs在胃肠道疾病中的
意义.《世界华人消化杂志》.2012,第20卷(第22
期),

Susanne U. Mertens-Talcott 等.The
Oncogenic microRNA-27a Targets Genes That
Regulate Specificity Protein
Transcription Factors and the G2-M
Checkpoint in MDA-MB-231 Breast Cancer
Cells.《Cancer Res》.2007,第67卷(第2期),

审查员 王佳妹

权利要求书2页 说明书23页
序列表9页 附图7页

(54)发明名称

RNA活性和血管通透性的调节

(57)摘要

本发明提供抑制miR-27a结合于VE-钙粘蛋白mRNA的寡核苷酸,其尤其呈布洛克形式。本发明还提供包含所述寡核苷酸的组合物以及使用所述寡核苷酸调节VE-钙粘蛋白的活性、抑制或降低血管通透性、治疗或预防血管通透性相关疾病或病状、抑制肿瘤生长、治疗缺血性损伤、增强从缺血性损伤恢复、治疗手术创伤和/或促进手术后恢复以及促进或诱导血管生成的方法。

1. 一种寡核苷酸,其包含与SEQ ID NO:2的至少12个连续碱基互补的连续序列,其中所述寡核苷酸包含一个或多个修饰型核碱基,所述寡核苷酸的长度为12-25个碱基,所述寡核苷酸与SEQ ID NO:2之间的碱基配对包括SEQ ID NO:2的位置22-27,所述寡核苷酸能够抑制miR-27a或包含含有序列UCACAG的种子区的miRNA结合于包含SEQ ID NO:2的RNA分子,且所述寡核苷酸在与SEQ ID NO:2的位置22-27结合时不引起RNase H或RNAi机制。

2. 如权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述miR-27a miRNA是包含SEQ ID NO:11中所示的核苷酸序列的hsa-miR-27a。

3. 如权利要求1所述的寡核苷酸,其包含与SEQ ID NO:2的至少或13个碱基、至少或14个碱基、至少或15个碱基、至少或16个碱基、至少或17个碱基、至少或18个碱基、至少或19个碱基、至少或20个碱基、至少或22个碱基、或至少或25个碱基的序列互补的连续序列。

4. 如权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸与SEQ ID NO:2之间的碱基配对包括SEQ ID NO:2的位置8-28、8-27、9-27、10-27、11-27、12-27、13-27、14-27、15-27、16-27、17-27、18-27、19-27、20-27、21-27、9-28、10-28、11-28、12-28、13-28、14-28、15-28、16-28、17-28、18-28、19-28、20-28或21-28。

5. 如权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

6. 如权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述一个或多个修饰型核碱基是LNA核碱基、UNA核碱基或2'-O-甲基核碱基。

7. 如权利要求1所述的寡核苷酸,其包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。

8. 一种组合物,其包含如权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸。

9. 如权利要求8所述的组合物,其中所述组合物包含一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

10. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于调节细胞中VE-钙粘蛋白的活性的药物中的用途。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中调节VE-钙粘蛋白的活性以抑制或降低血管通透性,治疗或预防血管通透性相关疾病或病状,抑制肿瘤生长,治疗缺血性损伤,增强从缺血性损伤恢复,治疗手术创伤和/或促进手术后恢复,或促进或诱导血管生成。

12. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于抑制或降低血管壁血管的血管通透性的药物中的用途。

13. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于抑制或降低需要治疗的受试者的血管通透性的药物中的用途。

14. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于治疗或预防血管通透性相关疾病或病状的药物中的用途。

15. 如权利要求14所述的用途,其中所述血管通透性相关疾病或病状选自水肿、心血管疾病、心肌梗塞、周围性血管疾病、局部缺血、中风、癌症、动脉粥样硬化、银屑病、糖尿病、诸如类风湿性关节炎等自体免疫疾病、血小板减少、高空病、气压损伤、医源性病症、细菌感染、病毒感染以及与血管渗漏相关的眼部病状,诸如非增生性和增生性视网膜病变、黄斑水肿、青光眼以及黄斑变性。

16. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于治疗或预防水肿的药物中的用途。

17. 如权利要求15或16所述的用途,其中所述水肿选自心脏水肿、肺水肿、肾水肿、黄斑水肿、脑水肿、营养不良性水肿、淋巴水肿或由手术程序引起的水肿。

18. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于抑制肿瘤生长的药物中的用途。

19. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于治疗缺血性损伤和/或增强从缺血性损伤恢复的药物中的用途。

20. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于促进或诱导细胞或组织中的血管生成的药物中的用途。

21. 如权利要求20所述的用途,其中所述对血管生成的促进或诱导是用于创伤愈合、组织修复、组织再生或组织工程改造。

22. 如权利要求21所述的用途,其中所述创伤是手术创伤并且所述血管生成是手术后血管生成。

23. 权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸在制备用于治疗手术创伤和用于促进手术后恢复的药物中的用途。

24. 如权利要求22或23所述的用途,其中所述手术创伤由牙科手术、心脏手术、器官移植手术、膝关节和髋关节置换手术以及截肢引起。

RNA活性和血管通透性的调节

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及可用于影响靶RNA、尤其是CDH5或VE-钙粘蛋白mRNA的活性的寡核苷酸。更明确地说,本发明的寡核苷酸抑制miR-27a与VE-钙粘蛋白mRNA的结合。本发明还涉及所述寡核苷酸用于抑制血管通透性或血管渗漏并且治疗与此相关的疾病和病状的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 反义寡核苷酸

[0004] 反义寡核苷酸的第一代意在影响靶mRNA的活性。对所述寡核苷酸有兴趣的一个原因是敏锐并且可预测的潜在特异性,其可因特定碱基配对而实现。设计对诸如mRNA等给定核酸具高度特异性的寡核苷酸在理论上是非常简单的。然而,简单碱基配对不足以实现对给定靶mRNA的调节。换句话说,与给定靶mRNA互补的寡核苷酸未必影响靶mRNA的活性。如果寡核苷酸靶向mRNA的开放阅读框,那么举例来说可以是翻译设备在翻译期间简单地置换寡核苷酸。因此,研发了将改进寡核苷酸的调节活性的手段,所述寡核苷酸包括可活化靶mRNA的RNase H裂解的寡核苷酸。然而,所述寡核苷酸的一个缺点是它们可介导除预定靶mRNA以外的RNA裂解,从而产生脱靶效应。尽管如此,通过RNase H裂解起作用的若干寡核苷酸仍在临床试验中用于治疗各种疾病。

[0005] 更新近的研究已显示包括哺乳动物细胞的真核细胞包含使用RNA作为特异性决定子的复杂基因调节系统(RNAi机制)。这个系统可由小干扰性RNA(siRNA)触发,所述小干扰性RNA可引入所关注的细胞以调节靶mRNA的活性。

[0006] 当前,对使用siRNA作为新颖治疗剂来触发RNAi机制用于靶RNA、特别是靶mRNA的特定调节作出了大量努力。然而,siRNA证实比最初所想更小的特异性并且产生显著脱靶效应。现相信这些脱靶归因于siRNA,更精确地说归因于siRNA的引导链,其充当微RNA。

[0007] 微RNA

[0008] 微RNA(miRNA)是一类内源性RNA分子,其像siRNA那样经由RNAi机制起作用。miRNA是单链、非编码小RNA,其至少部分地通过其所谓的种子序列或种子区使靶基因的3' UTR与miRNA的5' -端碱基配对从而使miRNA结合于靶基因的3' UTR的能力来调节mRNA降解与翻译。

[0009] 当前,已发现超过500个人miRNA并且相信所有人类基因中超过三分之一是由miRNA调节。因此,miRNA本身可用于调节靶RNA的活性,从而开启了发展miRNA作为治疗剂的可能。然而,miRNA通常在超过一个靶RNA处起作用;它们是混杂的。因此,向细胞中引入miRNA或调节细胞中的miRNA水平将影响超过一个靶mRNA的活性并且因此可产生出乎意外并且不需要的效应。

[0010] miRNA可使用称为安提妙(antimir)和安塔够妙(antagomir)的互补寡核苷酸来抑制。然而,因为每个miRNA本身是混杂的,所以任何给定安提妙或安塔够妙均将类似地影响超过一个靶mRNA的活性。

[0011] miRNA和血管生成

[0012] 严密控制血管通透性是血管的内皮细胞内层的主要功能之一。内皮的这一屏障功

能的丢失构成许多全身性和器官特异性疾病过程的基础,所述疾病过程包括肿瘤血管的渗漏、各种呼吸窘迫综合征、化学治疗的并发症以及急性类过敏反应。对通透性的控制通常分成两种类型:一种是刺激物,像凝血因子、组胺、血管内皮细胞生长因子(VEGF),其诱导渗漏。另一种是像血管生成素-1的一类分子,其对保持现状施加增强性影响。最终,这两种影响集中于调节接合结构的细胞-细胞接合分子,诸如VE钙粘蛋白和PECAM。

[0013] 鉴于这些刺激物诱导相对明显的表型,令人惊讶的是在修复或生理性血管生成的情况下渗漏是如此具自限制性。发明人推断可能存在尚未被发现的机制,其将发挥作用以促使例如在血管生成的过程中快速恢复至血管常态,或其在生理性血管生成期间发挥作用以限制新形成血管的渗漏。这将与肿瘤新生血管形成鲜明对比,所述肿瘤新生血管以过度渗漏为特征,其中可能回避了这些控制机制。

[0014] 在脉管系统中,已将miRNA与发育调节以及诸如肿瘤生长和心血管疾病等疾病相联系。举例来说,内皮细胞限制性miRNA即miR-126在血管发育和肿瘤血管生成期间高度表达,而相比之下在肿瘤血管中miR-101下调,通过组蛋白-甲基转移酶起作用以促进血管生成。在内皮细胞中miR-296是VEGF响应性的并且此miRNA的阻断抑制肿瘤相关性血管生成。miR-132在肿瘤新生血管中被诱导,靶向作用于整合蛋白下游以增加细胞增殖和血管生长的p120RasGAP。miR-92a靶向整合蛋白信号传导并且其抑制改善了缺血性损伤之后的血流恢复。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明涉及用于调节靶RNA活性的寡核苷酸。本发明的寡核苷酸能够或不能在结合于靶位点时募集RNase H和/或RNAi机制。

[0017] 本文公开了包含与SEQ ID NO:1中所示的序列互补并且能够与其结合的序列的寡核苷酸。典型地,寡核苷酸包含与VE-钙粘蛋白(CDH5)mRNA分子的3'未翻译区(3'UTR)的包含SEQ ID NO:1中所示的序列的连续序列互补并且能够与其结合的序列。

[0018] 在本发明的第一方面中提供包含与包含SEQ ID NO:2或含1、2或3个取代的SEQ ID NO:2的RNA序列的至少8个连续碱基互补的连续序列的寡核苷酸,其中寡核苷酸抑制miR-27a、其变体或包含含序列UCACAG的种子区的miRNA结合于所述RNA。

[0019] 典型地,miR-27a miRNA是包含SEQ ID NO:11中所示的核苷酸序列的hsa-miR-27a。

[0020] 在一个实施方案中,寡核苷酸包含与SEQ ID NO:2或包含1、2或3个取代的SEQ ID NO:2的至少或约7个碱基、至少或约8个碱基、至少或约9个碱基、至少或约10个碱基、至少或约11个碱基、至少或约12个碱基、至少或约13个碱基、至少或约14个碱基、至少或约15个碱基、至少或约16个碱基、至少或约17个碱基、至少或约18个碱基、至少或约19个碱基、至少或约20个碱基、至少或约22个碱基、至少或约25个碱基、至少或约30个碱基或至少或约35个碱基的序列互补的连续序列。

[0021] 典型地,寡核苷酸结合于SEQ ID NO:2的位置22-27。

[0022] 在一个特定实施方案中,寡核苷酸与SEQ ID NO:2之间的碱基配对包括SEQ ID NO:2的位置8-28、8-27、9-27、10-27、11-27、12-27、13-27、14-27、15-27、16-27、17-27、18-27、19-27、20-27、21-27、9-28、10-28、11-28、12-28、13-28、14-28、15-28、16-28、17-28、18-28、19-28、20-28或21-28。

[0023] 在另一个特定实施方案中,寡核苷酸包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。

[0024] 在另一个特定实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个修饰型核碱基。在示例性实施方案中,修饰型核碱基可选自LNA核碱基、UNA核碱基以及2' O-甲基核碱基。

[0025] 在另一个特定实施方案中,寡核苷酸包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示的序列。

[0026] 在第二方面中,本发明提供一种包含如权利要求1至8中任一项所述的寡核苷酸的组合物。

[0027] 在一个实施方案中,组合物是包含一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。

[0028] 在第三方面中,本发明提供用于调节细胞中的VE-钙粘蛋白的活性的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的第一方面的寡核苷酸接触,从而调节VE-钙粘蛋白的活性。

[0029] 在特定实施方案中,调节VE-钙粘蛋白的活性抑制或降低血管通透性,治疗或预防血管通透性相关疾病或病状,抑制肿瘤生长,治疗缺血性损伤,增强从缺血性损伤恢复,治疗手术创伤和/或促进手术后恢复,或促进或诱导血管生成。

[0030] 在第四方面中,本发明提供一种用于抑制或降低脉管壁血管的血管通透性的方法,所述方法包括使血管与有效量的第一方面的寡核苷酸或第二方面组合物接触。

[0031] 在第五方面中,本发明提供一种用于抑制或降低需要所述治疗的受试者的血管通透性的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的第一方面的寡核苷酸或第二方面的组合物。

[0032] 在第六方面中,本发明提供一种用于治疗或预防受试者的血管通透性相关疾病或病状的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的第一方面的寡核苷酸或第二方面的组合物。

[0033] 血管通透性相关疾病或病状可选自水肿、心血管疾病、心肌梗塞、周围性血管疾病、局部缺血、中风、癌症、动脉粥样硬化、银屑病、糖尿病、诸如类风湿性关节炎等自体免疫疾病、血小板减少、高空病、气压损伤、医源性病症、细菌感染、病毒感染以及与血管渗漏相关的眼部病状,诸如非增生性和增生性视网膜病变(包括糖尿病性视网膜病变)、黄斑水肿(包括糖尿病性黄斑水肿)、青光眼以及黄斑变性(包括年龄相关性黄斑变性)。

[0034] 在特定实施方案中,水肿可以是例如心脏水肿、肺水肿、肾水肿、黄斑水肿、脑水肿、营养不良性水肿或淋巴水肿。水肿可由手术程序引起,特别是较大的手术程序,诸如心脏手术、器官移植手术、膝关节和髋关节置换手术、牙科手术或截肢手术(例如与糖尿病并发症相关)。

[0035] 在第七方面中,本发明提供一种用于治疗或预防受试者的水肿的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的第一方面的寡核苷酸或第二方面的组合物。

[0036] 在第八方面中,本发明提供一种用于抑制受试者的肿瘤生长的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的第一方面的寡核苷酸或第二方面的组合物。

[0037] 在第九方面中,本发明提供一种用于治疗和/或增强从缺血性损伤恢复的方法,所述方法包括向需要所述治疗的受试者施用有效量的第一方面的寡核苷酸或第二方面的组合物。

[0038] 在第十方面中,本发明提供一种用于促进或诱导受试者的细胞或组织中的血管生成的方法,所述方法包括向受试者或向由其衍生的细胞或组织施用有效量的第一方面的寡核苷酸或第二方面的组合物。

[0039] 促进或诱导血管生成可例如用于创伤愈合(包括手术创伤)、组织修复、组织再生或组织工程改造。血管生成可以是例如手术后血管生成。

[0040] 在第十一方面中,本发明提供一种用于治疗手术创伤和用于促进手术后恢复的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的第一方面的寡核苷酸或第二方面的组合物。

[0041] 根据第十和第十一方面,手术创伤可以是由手术引起或在手术过程中诱导的任何创伤,包括例如与牙科手术、心脏手术、器官移植手术、膝关节和髋关节置换手术以及截肢(例如与糖尿病并发症相关)相关的创伤和手术。

[0042] 还提供第一方面的寡核苷酸用于抑制或降低血管通透性,治疗或预防血管通透性相关疾病或病状,抑制肿瘤生长,治疗和/或增强从缺血性损伤的恢复,或促进或诱导血管生成。

[0043] 还提供第一方面的寡核苷酸用于制造药剂的用途,所述药剂用于抑制或降低血管通透性,治疗或预防血管通透性相关疾病或病状,治疗或预防水肿,抑制肿瘤生长,治疗和/或增强从缺血性损伤恢复,促进或诱导血管生成和/或治疗手术创伤以及促进手术后恢复。

[0044] 还提供第一方面的寡核苷酸作为研究工具的用途,所述研究工具用于研究例如VE-钙粘蛋白活性、血管通透性和血管生成以及其可能的治疗和疗法。

[0045] 附图简述

[0046] 本文仅通过非限制性实例参考以下图式描述了本发明的实施方案。

[0047] 图1.靶向VE-钙粘蛋白的miR-27a。

[0048] (A) 48h后VE-钙粘蛋白在对照或miR-27a模拟物转染的细胞中的表达。 β -肌动蛋白用作上样对照。(B) 五个独立HUVEC系的平均值 $\pm$ SEM的归一化表达。*,参照对照 $p < 0.05$ 。(C) 如通过流式细胞术所评估的表面VE-钙粘蛋白的水平。实线,对照模拟物;虚线,miR-27a模拟物。显示一次实验的结果(类似于进行了三次)。(D) 用miR-27a转染后24h的VE-钙粘蛋白mRNA表达的水平。针对 β -肌动蛋白归一化的结果是五个独立HUVEC系的同样四次qRT-PCR反应的平均值 $\pm$ SEM。*参照对照 $p < 0.05$ 。(E) 用对照或抗miR-27a转染的细胞转染后24h的HUVEC的VE-钙粘蛋白表达。(F) 示出三个独立HUVEC系的平均值 $\pm$ SEM。***,参照对照 $p < 0.001$ 。(G) 如通过流式细胞术评估的表面VE-钙粘蛋白的水平。实线,对照LNA;虚线,LNA-27。显示一次实验的结果(类似于进行了两次)。(H) HEK293T细胞以及对照或miR-27a模拟物中的含有含推定的miR-27a结合位点(Wt,黑色柱)或突变miR-27a结合位点(Mut,白色柱)的VE-钙粘蛋白的3'UTR的荧光素酶构建体。结果表示四个独立实验的同样三次转染的平均值 $\pm$ SEM。* $p = 0.01$,Wt+miR-27a相较于Mut+miR-27a。*** $p = .00001$,Wt+对照相较于Wt+miR-27a。

[0049] 图2.miR-27a改变VE-钙粘蛋白定位和内皮细胞通透性。

[0050] (A), (B) 在转染之后48h将HUVEC针对VE-钙粘蛋白进行染色。(A) 对照模拟物(i) 或(ii) miR-27a模拟物(B) (i) 对照LNA, (ii) miR-27LNA。比例尺:100 μ m。(C) 48小时之后在对照或miR-27a模拟物转染的细胞中测量的通透性。所显示的结果是归一化的五个独立HUVEC系

的平均值 $\pm$ SEM。*,参照对照 $p<0.05$ 。(D)在对照LNA(黑色)或miR-27 LNA转染的细胞(白色)中,未经凝血因子刺激(NIL)或凝血因子刺激之后(T)所测量的通透性。结果是来自代表所进行的3次实验的平均值的一次实验 $\pm$ SEM,* $p<0.05$ 。(E)用皮内注射到小鼠背部中的4 μ g对照(黑色)或抗miR-27a(白色柱)进行迈尔斯分析。24小时后,将VEGF或PBS(NIL)作为对照给予到相同位点。* $p<0.01$ ** $p<0.001$, $n=9$ 小鼠/组。

[0051] 图3.miRNA-27a的过表达降低体内毛细管形成而miR-27a抑制体内通透性降低。

[0052] (A)用对照(i和iii)或miR-27a模拟物(ii和iv)转染HUVEC并且涂铺至基质胶上。收回的管子:白色箭头。非常细的管子:黑色箭头。(i)和(ii)比例尺:200 μ m。(iii)、(iv)比例尺:400 μ m。(v)每个视野形成的毛细管的数目,以相对于对照的百分比表示。*参照对照 $p<0.05$ 。四个独立HUVEC系的平均值 $\pm$ SEM。(B)将小鼠皮下植入含有FGF-2和仅媒介物(i,v)、对照(ii,vi)或miRNA-27a模拟物(iii,vii)的基质胶塞。代表性组织切片和苏木精和伊红染色的截面(i-iii),比例尺:20 μ m。定量的含有红细胞的血管的数目(iv)。代表性CD31免疫化学,(v-vii)。比例尺:50 μ m。定量的CD31阳性细胞的数目(viii)。数据以平均值 $\pm$ SEM表示。差异的统计分析是通过用于多重比较的邦弗伦尼氏校正(Bonferroni's correction)情况下的单因素ANOVA进行比较。对于对照(C) $n=3$ 个小鼠,而对于miRNA-27a和媒介物(V) $n=6$ 个小鼠。(C)miR-27a模拟物的效应因VE-钙粘蛋白的过表达而逆转。用对照模拟物(i)、miR-27a模拟物(ii)、VE-钙粘蛋白质粒+对照模拟物(iii)或VE-钙粘蛋白表达质粒+miR-27a模拟物(iv)转染细胞。24小时后,将细胞涂铺至基质胶上并且观察超过24小时。(D)在使EC单层形成创伤之后miR-27a(开放圆圈)和VE-钙粘蛋白mRNA(闭合圆圈)随时间推移的表达。数据是针对汇合细胞中的水平进行归一化。表达水平是通过qRT-PCR测量,并且miR-27a的结果针对U48归一化而VE-钙粘蛋白针对 β -肌动蛋白归一化。结果是来自2-4个独立的HUVEC系。

[0053] 图4.人类疾病中miR-27a的调节。

[0054] 将来自三个肝硬化患者的人类肝组织针对CD31染色。(A)纤维间隔(黑色圆圈)和如用黑色箭头指示的小静脉(ii)中的新的再生血管(新血管)是通过LCM确定并且捕获。(i)比例尺:15 μ m。(ii)比例尺:30 μ m。(B)RNA与三个患者(a、b、c)的小静脉或新血管(Neo)中的内皮细胞分离。miR-27a的表达水平是通过qRT-PCR定量并且针对miR-520d*归一化。数据表示同样四次qRT-PCR反应的平均值 $\pm$ SEM。* $p<0.05$,小静脉相较于新血管。

[0055] 图5.布洛克妙(Blockmir)调节VE-钙粘蛋白依赖性功能。

[0056] (A)如通过西方墨点法测定的布洛克妙CD5-2或CD5-3转染的细胞中的VE-钙粘蛋白水平是针对对照布洛克妙转染细胞中的水平进行定量并且归一化。对于 $n=4$ 个独立内皮细胞系来说,结果显示百分比比对照增加。(B)转染后48小时,将HUVEC针对VE-钙粘蛋白染色。对照(i)或(ii)布洛克妙CD5-2。(C)穿过未刺激或凝血因子刺激的对照或布洛克妙CD5-2转染的细胞单层的通透性。结果针对对照的通透性进行归一化,3-5次实验的平均值 $\pm$ SEM。(D)用静脉注射的对照(黑色)或布洛克妙CD5-2(白色柱)进行迈尔斯分析。24小时后,皮内给予VEGF或PBS, $n=4$ 个小鼠/组。* $p<0.005$ 。

[0057] 图6.布洛克妙调节局部缺血之后的水肿和血管生成。

[0058] (A)在手术之后测量后肢血流量并且以缺血肢体血流量占非缺血后肢血流量的百分比表示。*, $P<0.05$;**, $P<0.01$ 。 $n=6-10$ 个小鼠/组。(B)第0天-第3天之间的LDBF的扩展视

图在右手侧图形中给出。(C) 对用对照布洛克妙(黑色柱)和CD5-2(白色柱)处理的小鼠在后肢缺血之后24小时的水肿的评估。取内收肌下半部用于定量,*, $p<0.05$;**, $p<0.01$, $n=8$ 个/组。(D) 毛细管密度的评估。将切片针对CD31染色。显示给予对照布洛克妙(i)、CD5-2(ii)的一个小鼠的代表性区域,并且定量毛细管数目并且以缺血肢体中的毛细管/肌细胞的比率形式给出(iii), $n=4-5$ 个动物。* $p<0.02$ 。

[0059] 图7.布洛克妙的特异性。

[0060] (A) 来自用LNA27、CD5-2或对照(Ctrl)转染的HUVEC的VE-钙粘蛋白和Sema6A的西方墨点分析。细胞溶解产物是来自转染之后48h的HUVEC, α -微管蛋白用作上样对照。数据代表三个独立实验。(B) 如(A)中所描述进行分析的VE-钙粘蛋白、Sema6A表达的定量评价。对照(白色柱),LNA27(黑色柱),而CD5-2(条纹柱)。* $P<0.05$ ($n=3-5$),NS,相对于对照组没有显著差异。平均值 $\pm$ s.e.m. (C) 用miR-27a模拟物和仅载体、对照布洛克妙、CD5-2或针对PPAR γ (SEQ ID NO:10)中的miR27结合位点的布洛克妙共转染的HeLa细胞中的PsiCHECK2VE-钙粘蛋白3'UTR(WT)的荧光素酶(海肾(Renilla))活性。海肾荧光素酶活性是针对由相同质粒表达的荧光虫荧光素酶进行内部归一化。荧光素酶活性是相对于不用布洛克妙和miR-27a模拟物转染(载体[-])的3'UTR-报告子显示,并且以每个实验三个重复样品的三个独立实验的百分比平均值 $\pm$ SD的形式呈现;ANOVA $p<0.0001$,(*) $p<0.05$ 。

[0061] 图8.布洛克妙抑制肿瘤生长。

[0062] 在注射肿瘤诱导B16F10细胞至小鼠中之后6-9天静脉注射布洛克妙CD5-2(方形)或错误对照(圆圈)之后C57BL/6雌性小鼠的肿瘤体积(mm^3), $n=3$ 个小鼠/组。

[0063] 本说明书含有使用程序PatentIn版本3.4制得的氨基酸和核苷酸序列信息,其在本文中呈现在序列表中。核苷酸和氨基酸序列是通过序列标识编号(SEQ ID NO:)来提到。SEQ ID NO:数字上对应于序列标识<400>1(SEQ ID NO:1)、<400>2(SEQ ID NO:2)等。具体地说,VE-钙粘蛋白(CDH5)的3'UTR中的miR-27a靶'抗种子'区显示于SEQ ID NO:1中。人类VE-钙粘蛋白的3'UTR的含有miR-27a'抗种子'区的区域显示于SEQ ID NO:2中。SEQ ID NO:3和4显示示例性寡核苷酸的序列。SEQ ID NO:5至10显示如本文中所例示(也参见表1)用于本研究中的寡核苷酸的序列。人类miR-27a(hsa_miR-27a)的成熟序列显示于SEQ ID NO:11中。

[0064] 发明详述

[0065] 冠词“一”在本文中用于指冠词的一个或多于一个(即指至少一个)语法对象。举例来说,“一种元素”意指一种元素或多于一种元素。

[0066] 在本说明书的上下文中,术语“约”被理解为指本领域技术人员将视为等效于在实现相同功能或结果的背景下所列举的值的数字范围。

[0067] 在本说明书和接下来的权利要求书通篇中,除非上下文另外要求,否则词语“包含(comprise)”和诸如“包含了(comprises)”和“包含着(comprising)”等变化形式应理解为暗示包括所陈述的整体或步骤或整体或步骤的群组,但不排除任何其它整体或步骤或整体或步骤的群组。

[0068] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸碱基的单链序列、天然核苷酸的已知类似物或其混合物。“寡核苷酸”包含基于核酸的分子,包括DNA、RNA、PNA、LNA、UNA或其任何组合。主要包含核糖核苷酸碱基的天然或非天然寡核苷酸可称为RNA

寡核苷酸。寡核苷酸典型地是短(例如长度小于50个核苷酸)序列,其可通过任何适合的方法制备,包括例如直接化学合成或克隆以及限制适当的序列。

[0069] “反义寡核苷酸”是与特定DNA或RNA序列互补的寡核苷酸。典型地,在本发明的上下文中,反义寡核苷酸是与特定mRNA或miRNA互补的RNA寡核苷酸。反义寡核苷酸结合于其互补miRNA,并且使其互补miRNA沉默或部分或完全地抑制其活性。并非反义寡核苷酸中所有碱基均与‘靶标’或miRNA序列互补;寡核苷酸仅需要含有足以使寡核苷酸能够识别靶的互补碱基。寡核苷酸还可以包括其它碱基。反义寡核苷酸序列可以是未修饰的核糖核苷酸序列或可通过如本文所描述的多种手段进行化学修饰或缀合。

[0070] 如本文所用的术语“多核苷酸”是指脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物或天然核苷酸的已知类似物或其混合物。“多核苷酸”包含基于核酸的分子,包括DNA、RNA、PNA、LNA、UNA或其任何组合。除非另外指出,否则所述术语包括提到指定序列以及与其互补的序列。多核苷酸可通过本领域技术人员已知的多种手段进行化学修饰。因此,“多核苷酸”包含基于核酸的分子,包括DNA、RNA、PNA、LNA、UNA或其任何组合。

[0071] 如本文关于寡核苷酸和多核苷酸所用,术语“核苷酸”是指寡核苷酸或多核苷酸内的单一核碱基或单体单元。术语“核苷酸”和“单体”在本文中可互换使用。核碱基可以是DNA、RNA、INA、LNA、UNA或寡核苷酸或多核苷酸其任何两种或更多种的组合的一部分。在一些实施方案中,核碱基可以是通用碱基。如下文所描述,修饰型核碱基也由本发明涵盖。

[0072] 如本文所用,术语“互补”是指两个单链核苷酸序列典型地根据沃森-克里克碱基配对规则(Watson-Crick base pairing rules),即在G与C之间和A与T或U之间进行碱基配对的能力。在一些实施方案中,G也与U配对并且反之亦然,以形成所谓的摇摆碱基对。在另一个实施方案中,碱基肌苷(I)可包括在本发明的寡核苷酸内。I与A、C以及U碱基配对。在另一个实施方案中,可使用通用碱基。通用碱基可典型地与G、C、A、U以及T碱基配对。通用碱基往往不与另一条链上相对的碱基形成氢键。在另一个实施方案中,互补序列是指排他地具有沃森-克里克碱基对的连续序列。对于将互补的两个核苷酸分子来说,它们无需在碱基配对区域显示100%互补性,而是必须足以互补以使碱基配对能够发生。因此,可忍受序列之间一定程度的不匹配并且所述序列可仍是互补的。如本文所用,术语“能够与……碱基配对”可与“与……互补”互换使用。

[0073] 如本文所用的术语“取代”是指在寡核苷酸或多核苷酸内的特定位置的核碱基已被另一种核碱基取代。取代可以是例如因为在靶RNA中存在单核苷酸多态性。术语取代还涵盖核碱基的缺失和核碱基的增加。

[0074] 如本文所用的术语“布洛克妙”是指结合于RNA靶从而阻断一种或多种miRNA物质结合于所述靶标并且影响所述靶标的活性的能力的空间位阻寡核苷酸。布洛克妙被构建使得不能募集RNAi机制或RNase H。布洛克妙描述在例如公开内容以引用的方式并入本文中的WO 2008/061537和WO 2012/069059中。

[0075] 在本说明书的上下文中,术语“活性”在其有关于多核苷酸(例如DNA、mRNA或miRNA)、蛋白质或多肽时意指由多核苷酸、蛋白质或多肽发挥的任何一种或多种细胞功能、作用、效应或影响。举例来说,在mRNA的背景下,活性将典型地指mRNA的表达,即翻译至蛋白质或肽中。因此,通过如本文所描述的寡核苷酸调节靶mRNA的活性可包括降解mRNA和/或翻译调节。调节mRNA活性还可以包括影响mRNA的胞内转运。

[0076] 如本文所用的术语“抑制着”和其诸如“抑制”和“抑制了”等变化形式未必暗示完全抑制指定事件、活性或功能。相反地，抑制可以是达到一定程度，和/或持续一定时间，足以产生所要效果。抑制可以是预防、延迟、降低或以其它方式阻碍事件、活性或功能。所述抑制可以是在量值方面和/或在本质上是暂时的。在特定背景中，术语“抑制”和“预防”以及其变化形式可互换使用。

[0077] 如本文所用的术语“促进着”和“诱导着”以及其诸如“促进”和“诱导”等变化形式未必暗示完全促进或诱导指定事件、活性或功能。相反地，促进或诱导可以是达到一定程度，和/或持续一定时间，足以产生所要效果。通过本发明的寡核苷酸促进或诱导血管生成可以是直接或间接的并且可以是在量值方面和/或在本质上是暂时的。

[0078] 如本文所用的术语“RNAi机制”是指为siRNA和miRNA的活性或RNAi通道所必需的细胞组分。RNAi机制的主要成分是RNA诱导的沉默复合体(RISC复合体)。

[0079] 如本文所用，术语“有效量”在其含义内包括无毒但足以提供所要效果的量或剂量的药剂或化合物。所需要的确切量或剂量从受试者到受试者将不同，这取决于诸如以下因素：正在治疗的物种、受试者的年龄和概况、正在治疗的病状的严重性、正在施用的特定药剂以及施用模式等。因此，不可能指定确切“有效量”。然而，对于任何给定的情况，适当的“有效量”可由本领域一般技术人员仅使用常规实验来确定。

[0080] 如本文所用，术语“治疗着”、“治疗”、“预防着”以及“预防”是指任何和所有用途，其治疗病状或症状，预防病状或疾病的形成或以其它方式无论如何预防、阻碍、延迟或逆转病状或疾病或其它不需要的症状的进展。因此术语“治疗”和“预防”等应在其最宽背景下进行考虑。举例来说，治疗未必暗示治疗患者直到完全恢复。在显示多个症状或以多个症状为特征情况下，治疗或预防未必需要补救、预防、阻碍、延迟或逆转所有所述症状，而是可预防、阻碍、延迟或逆转所述症状中的一种或多种。在一些病症的背景下，本发明的方法涉及就降低或改善与病症或病症的进展的不可逆结果相关的高度不必要的事件的发生率但本身不可预防事件或结果的最初发生而言“治疗”病症。因此，治疗包括改善特定病症的症状或预防或以其它方式降低罹患特定病症的危险。

[0081] 如本文所用的术语“血管通透性相关疾病或病状”是指由血管通透性(典型地过度的血管通透性或渗透性过高)引起、引起血管通透性、以血管通透性为特征或以其它方式与血管通透性相关的任何疾病或病状。因此，疾病或病状与血管通透性之间的关联可以是直接或间接的并且可以是时间和/或空间上分开的。在本说明书的上下文中，术语血管通透性或过度的血管通透性和血管渗漏可互换使用。

[0082] 如本文所用的术语“受试者”是指哺乳动物并且包括人类、灵长类动物、牲畜(例如羊、猪、牛、马、驴)、实验室测试用动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠)、伴侣动物(例如犬、猫)以及捕获的野生动物(例如狐狸、袋鼠、鹿)。优选地，哺乳动物是人类或实验室测试用动物。甚至更优选地，哺乳动物是人类。

[0083] 本文公开和例示的寡核苷酸能够结合于序列CUGUGA，从而阻断miRNA(诸如miRNA miR-27a)结合于所述序列的能力并且从而抑制miRNA影响包含所述序列的多核苷酸的活性或表达。典型地，所述序列存在于VE-钙粘蛋白mRNA的3'UTR中。

[0084] 因此，本发明的一个方面提供一种寡核苷酸，其包含与包含SEQ ID NO:2或包含1、2或3个取代的SEQ ID NO:2的RNA序列的至少8个连续碱基互补的连续序列，其中寡核苷酸

抑制miR-27a、其变体或包含含序列UCACAG的种子区的miRNA结合于所述RNA。

[0085] 还提供用于使用如本文所公开的寡核苷酸调节细胞中的VE-钙粘蛋白的活性的组合物和方法。

[0086] 此外,本文所公开的寡核苷酸还发现了治疗性应用。如本文所例示,miR-27a调节内皮细胞接合以控制血管完整性。miR-27a的抑制或其与VE钙粘蛋白的特异性相互作用在不存在血管生成的情况下抑制血管渗漏。因为血管渗漏是许多血管性、炎症性以及瘤性疾病的主要病理生理学机制,所以本文所描述和例示的研究为血管通透性治疗提供新的可能。

[0087] 因此还提供使用如本文所公开的寡核苷酸用于抑制或降低脉管壁血管的血管通透性的组合物和方法、用于治疗或预防血管通透性相关疾病或病状的组合物和方法、用于治疗 and/或增强从缺血性损伤恢复的组合物和方法、用于治疗手术创伤和促进手术后恢复的组合物和方法、用于促进或诱导血管生成的组合物和方法、用于治疗水肿的组合物和方法以及用于抑制肿瘤生长的组合物和方法。

[0088] 本公开的寡核苷酸还在医疗和生物学研究活动中应用为研究工具,包括作为试剂盒的组分,从而促进对例如VE-钙粘蛋白活性、血管通透性和血管生成以及其可能的治疗和疗法的研究。

[0089] 典型地,包含种子序列UCACAG的miRNA是miR-27a。成熟人类miR-27a(hsa-miR-27a)的核苷酸序列提供于SEQ ID NO:11中。miR-27a miRNA的其它序列信息可见于<http://microma.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>。本文还涵盖此miRNA的变体。变体包括基本上类似于miR-27a的序列的核苷酸序列。举例来说,变体miRNA可包含显示与SEQ ID NO:10至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。

[0090] 寡核苷酸

[0091] 本发明的寡核苷酸典型地包含与选自由SEQ ID NO:2中所示的序列或包含1、2或3个取代的SEQ ID NO:2的序列的至少约9个连续碱基、至少约10个连续碱基、至少约11个连续碱基、至少约12个连续碱基、至少约13个连续碱基、至少约14个连续碱基、至少约15个连续碱基、至少约16个连续碱基、至少约17个连续碱基、至少约18个连续碱基、至少约19个连续碱基、至少约20个连续碱基、至少约22个连续碱基、至少约25个连续碱基、至少约30个连续碱基以及至少约35个连续碱基组成的组的序列互补的连续序列。

[0092] 在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸可包含与选自由SEQ ID NO:2中所示的序列或包含1、2或3个取代的SEQ ID NO:2的序列的不超过8个连续碱基、不超过9个连续碱基、不超过10个连续碱基、不超过11个连续碱基、不超过12个连续碱基、不超过13个连续碱基、不超过14个连续碱基、不超过15个连续碱基、不超过16个连续碱基、不超过17个连续碱基、不超过18个连续碱基、不超过19个连续碱基、不超过20个连续碱基、不超过22个连续碱基、不超过25个连续碱基、不超过30个连续碱基以及不超过35个连续碱基组成的组的序列互补的连续序列。

[0093] 在另一个实施方案中,本发明的寡核苷酸可包含与选自由SEQ ID NO:2中所示的序列或包含1、2或3个取代的SEQ ID NO:2的序列的8个连续碱基、9个连续碱基、10个连续碱基、11个连续碱基、12个连续碱基、13个连续碱基、14个连续碱基、15个连续碱基、16个连续

碱基、17个连续碱基、18个连续碱基、19个连续碱基、20个连续碱基、21个连续碱基、22个连续碱基、23个连续碱基、24个连续碱基、25个连续碱基、30个连续碱基以及35个连续碱基组成的组的序列互补的连续序列。

[0094] 典型地,寡核苷酸结合于SEQ ID NO:2的位置22-27,此区域代表miR-27a的种子序列的补体,其为miR-27a结合于VE-钙粘蛋白mRNA的3'UTR的靶位点(‘抗种子’区)。寡核苷酸与SEQ ID NO:2之间的碱基配对可包括SEQ ID NO:2的位置8-28、8-27、9-27、10-27、11-27、12-27、13-27、14-27、15-27、16-27、17-27、18-27、19-27、20-27、21-27、9-28、10-28、11-28、12-28、13-28、14-28、15-28、16-28、17-28、18-28、19-28、20-28或21-28。

[0095] 在一个实施方案中,寡核苷酸与序列SEQ ID NO:2之间的碱基配对在SEQ ID NO:2的位置27处结束。在其它实施方案中,碱基配对可在SEQ ID NO:2的位置28、29、30、31、32或33处结束。在另一个实施方案中,寡核苷酸与序列SEQ ID NO:2之间的碱基配对从SEQ ID NO:2的位置22开始。在其它实施方案中,碱基配对可在SEQ ID NO:2的位置21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6或5处开始。

[0096] 本领域技术人员将了解本发明的寡核苷酸可具有任何适合的长度,这取决于寡核苷酸的精确功能或用途。典型地,寡核苷酸的长度在8与25个碱基之间。甚至更典型地,寡核苷酸的长度在10与20个碱基之间。

[0097] 为强结合于其靶RNA,寡核苷酸的长度可增加。在一些情况下,可能可使用更短的寡核苷酸改善向细胞中递送。另外,在其它情况下,寡核苷酸分别对靶RNA的抗种子序列的位置分别可调整。举例来说,可调整与SEQ ID NO:2的靶RNA的位置22-27互补的碱基位置使得其位于在例如寡核苷酸的5'端、在寡核苷酸的3'端或在寡核苷酸的中部或朝向寡核苷酸中部。典型地,与位置22-27互补的碱基位置位于寡核苷酸中,使得其在位置1、位置2、位置3、位置4、位置5或位置6处或在位置2、位置3、位置4、位置5或位置6上游的位置处或在位置1、位置2、位置3、位置4、位置5或位置6下游的位置处开始,其中所述位置是从寡核苷酸的5'端开始数起。

[0098] 在一些实施方案中,靶RNA序列,例如序列SEQ ID NO:2可包含1、2或3个取代。或者,序列可不包含取代。在取代存在的情况下,这些位置可定位于寡核苷酸与靶RNA之间互补的区域。取代可以是单核苷酸多态性(SNP),其可增强或降低给定靶RNA的miRNA调节。SNP可形成新的miRNA靶位点,从而引起给定靶RNA的异常miRNA调节。RNA编辑也可以产生取代。

[0099] 本发明的寡核苷酸可能活化RNase H。RNase H裂解RNA-DNA双链体的RNA部分,并且RNase H活化的结构要求是熟练受众熟知的。类似地,本发明的寡核苷酸可能募集细胞RNAi机制并且将RNAi机制导向靶RNA。这可引起靶RNA裂解或靶RNA的翻译抑制。

[0100] 然而,在本发明的特定实施方案中,寡核苷酸可既不募集RNAi机制又不募集RNase H。因此典型地,本发明的寡核苷酸能够阻断RNAi机制在特定靶RNA处的活性。寡核苷酸可通过隔离靶RNA的靶序列(miRNA结合位点)使得RNAi机制不会识别靶序列来这样做。具有此活性的本发明的寡核苷酸也可以称为布洛克妙,因为其阻断给定miRNA在靶RNA中的特定miRNA结合位点处的调节活性。为实现通过本发明的寡核苷酸预防RNase H的募集或活化的能力,寡核苷酸典型地不包含5个或更多个连续DNA核碱基。

[0101] 本文所描述并且根据本文所公开的方面和实施方案使用的本发明寡核苷酸可包含多个序列和结构修饰,这取决于如以下将进一步描述的寡核苷酸的用途和功能。本领域

技术人员将了解本文所描述的序列和结构修饰仅为示例性,并且参考其修饰本发明范围不应受限制,而是也可以使用本领域技术人员已知的其它修饰提供保持所需功能或活性的寡核苷酸。

[0102] 仅举例来说,寡核苷酸序列可通过在序列中的残基之间添加一个或多个硫代磷酸酯(例如单硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯)键联或使主链中包括一个或吗啉环来修饰。残基之间的替代性非磷酸酯键联包括磷酸酯、羟基胺、羟基胍基、酰胺和氨基甲酸酯键联、甲基磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酰胺脂或硼衍生物。寡核苷酸中所存在的核苷酸残基可以是天然存在的核苷酸或可以是修饰型核苷酸。适合的修饰型核苷酸包括2'-O-甲基核苷酸、2'-O-氟核苷酸、2'-O-甲氧基乙基核苷酸、诸如5-硝基吡啶等通用核碱基、LNA、UNA、PNA以及INA核碱基、2'-脱氧-2'-氟-阿拉伯糖基核酸(FANA)以及阿拉伯糖基核酸(ANA)。核糖核苷中的天然存在的核糖部分可例如由己糖、多环杂烷基环或环己烯基代替。或者,或此外,寡核苷酸序列可在一个或两个末端缀合至一种或多种适合的化学部分。举例来说,寡核苷酸可经由适合的键联、诸如在3'端的羟基脯氨酸键联缀合至胆固醇。

[0103] 所关注的特定修饰包括增加寡核苷酸对互补序列的亲合力、即增加与互补序列碱基配对的寡核苷酸的熔解温度,或增加寡核苷酸的生物稳定性的修饰。所述修饰包括2'-O-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基。也典型地使用LNA、UNA、PNA以及INA单体。对于更短的寡核苷酸,典型地存在更高百分比的增加亲和力的修饰。如果寡核苷酸的长度小于12或10个核碱基,那么其可完全由增加亲和力的单元(例如LNA单体、UNA单体或2'-O-甲基RNA核碱基)构成。

[0104] 在特定实施方案中,寡核苷酸中在碱基或糖处被修饰的单体相对于在碱基或糖处未被修饰的单体的分数可以是小于99%,小于95%,小于90%,小于85%,小于75%,小于70%,小于65%,小于60%,小于50%,小于45%,小于40%,小于35%,小于30%,小于25%,小于20%,小于15%,小于10%,小于5%,小于1%,超过99%,超过95%,超过90%,超过85%,超过75%,超过70%,超过65%,超过60%,超过50%,超过45%,超过40%,超过35%,超过30%,超过25%,超过20%,超过15%,超过10%,以及超过5%或超过1%。

[0105] 脂质和/或肽也可以缀合至寡核苷酸。所述缀合可提高生物利用率并且防止寡核苷酸活化RNase H和/或募集RNAi机制。更大的更庞大部分的缀合典型地在寡核苷酸的中心部分,例如在最中心的5个单体中的任一者处进行。或者,在与SEQ ID NO:1-5中的任一者的位置22-27中的一者互补的碱基中的一者处。在另一个实施方案中,所述部分可在寡核苷酸的5'端或3'端缀合。一种示例性疏水性部分是胆固醇部分,其可缀合至寡核苷酸,从而防止寡核苷酸募集RNAi机制并且改善寡核苷酸的生物利用率。举例来说,胆固醇部分可缀合于与序列SEQ ID NO:2的位置22-27互补的核碱基的一者或多者、寡核苷酸的3'端处或寡核苷酸的5'端处。

[0106] 不同修饰可安置在寡核苷酸内的不同位置,以防止寡核苷酸活化RNase H和/或能够募集RNAi机制。

[0107] 在一个特定实施方案中硫代磷酸酯核苷酸间键合可连接寡核苷酸中的单体以改善寡核苷酸的生物稳定性。寡核苷酸的所有键联均可作为硫代磷酸酯键联。在另一个实施方案中,硫代磷酸酯键联的分数可以是小于95%,小于90%,小于85%,小于80%,小于75%,小于70%,小于65%,小于60%,小于50%,超过95%,超过90%,超过85%,超过80%,超过

75%，超过70%，超过65%，超过60%以及超过50%。

[0108] 在一个实施方案中，寡核苷酸可不包含任何RNA核碱基。这可帮助防止寡核苷酸能够募集RNAi机制，从而增加寡核苷酸的生物稳定性。举例来说，寡核苷酸可由LNA和DNA核碱基组成并且这些组成部分可如上文所概述由硫代磷酸酯键联连接。在替代实施方案中，寡核苷酸不包含任何DNA核碱基。在替代实施方案中，寡核苷酸不包含任何吗啉基和/或LNA核碱基。

[0109] 在一个实施方案中，寡核苷酸可包含DNA核碱基与RNA核碱基的混合，以防止寡核苷酸活化RNase H并且防止寡核苷酸募集RNAi机制。举例来说，DNA和RNA核碱基可沿寡核苷酸的长度交替存在，或者一个或多个DNA核碱基可彼此相邻定位并且一个或多个RNA核碱基可彼此相邻定位。

[0110] 在另一个特定实施方案中，寡核苷酸包含LNA单体与2'-O-甲基RNA核碱基的混合物。如上述情况，LNA和2'-O-甲基RNA核碱基可沿寡核苷酸的长度交替存在，或者一个或多个LNA核碱基可彼此相邻定位并且一个或多个2'-O-甲基RNA核碱基可彼此相邻定位。

[0111] 在一些实施方案中，存在于寡核苷酸中的增加寡核苷酸对互补序列的亲力的核碱基的数目是至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21或至少22核碱基。在一些实施方案中，存在于寡核苷酸中的增加寡核苷酸对互补序列的亲力的核碱基的数目是1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个以及22个核碱基。

[0112] 在特定实施方案中，增加寡核苷酸对互补序列的亲力的核碱基可位于寡核苷酸的侧翼，即位于寡核苷酸的5'端和3'端的任一者或两者处或在其附近，或可位于寡核苷酸的中心处或在其附近。增加寡核苷酸对互补序列的亲力的核碱基还可以在寡核苷酸的长度上均匀分布。

[0113] 在特定示例性实施方案中，寡核苷酸已经如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6以及SEQ ID NO:7中的一者中所示的序列。

[0114] VE-钙粘蛋白活性和治疗适应证

[0115] 凭借本发明寡核苷酸抑制miR-27a、其变体或包含含序列UCACAG的种子区的miRNA结合至靶RNA的能力，本发明的一个方面提供一种用于调节细胞中VE-钙粘蛋白的活性的方法，所述方法包括使细胞与有效量的本发明寡核苷酸接触，从而调节VE-钙粘蛋白的活性。

[0116] 使细胞与寡核苷酸接触的步骤可体外、离体或体内进行。细胞可存在于获自受试者的生物样品中。

[0117] 本发明的另一个方面提供一种用于抑制或降低需要所述治疗的受试者的血管通透性的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本发明寡核苷酸。

[0118] 本发明的另一个方面提供一种用于治疗或预防受试者的血管通透性相关疾病或病状的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本发明寡核苷酸。

[0119] 本发明的另一个方面提供一种用于治疗缺血性损伤和/或增强从缺血性损伤恢复的方法，所述方法包括向需要所述治疗的受试者施用有效量的本发明寡核苷酸。

[0120] 本发明的实施方案涉及的血管通透性相关疾病或病状包括但不限于水肿、心血

管疾病、心肌梗塞、周围性血管疾病、局部缺血、中风、癌症、动脉粥样硬化、银屑病、糖尿病、诸如类风湿性关节炎等自体免疫疾病、血小板减少、高空病、气压损伤、医源性病症、细菌感染、病毒感染以及与血管渗漏相关的眼部病状,诸如非增生性和增生性视网膜病变(包括糖尿病性视网膜病变)、黄斑水肿(包括糖尿病性黄斑水肿)、青光眼以及黄斑变性(包括年龄相关性黄斑变性)。水肿可以是全身性水肿或局部或器官特异性水肿。水肿可以是例如心脏水肿、肺水肿、肾水肿、黄斑水肿、脑水肿、营养不良性水肿或淋巴水肿。水肿可由手术程序引起,特别是较大的手术程序,诸如心脏手术、器官移植手术、膝关节和髋关节置换手术、牙科手术或截肢手术(例如与糖尿病并发症相关)。

[0121] 本发明的另一个方面提供一种用于抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括向需要所述治疗的受试者施用有效量的本发明寡核苷酸。

[0122] 本文所公开的本发明实施方案还提供使用本发明寡核苷酸促进或诱导细胞和组织中的血管生成,所述促进或诱导可体内或离体进行。举一非限制性实例,促进血管生成可为所需的情况包括在创伤愈合(慢性、急性以及手术创伤的创伤愈合)中、在一些妇科病症和不孕症的治疗中、在冠状动脉疾病和眼部病状的治疗中、在中风的预防中、在组织修复或再生以及组织工程改造(例如在三维骨架构建中)中。便于根据本发明实施方案治疗的创伤的非限制性实例包括手术创伤、溃疡(诸如静脉性溃疡和糖尿病性溃疡)、烧伤以及其它形式的组织损伤。本发明的特定实施方案涉及治疗手术创伤和促进手术后恢复。便于治疗的手术创伤可以由手术引起或在手术的过程中诱导的任何创伤,包括例如与牙科手术、心脏手术、器官移植手术、膝关节和髋关节置换手术以及截肢(例如与糖尿病并发症相关)相关的创伤。

[0123] 药物组合物

[0124] 本发明的寡核苷酸可根据本文所公开的实施方案以药物组合物形式施用,所述组合物可包含一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。所述组合物可以任何方便的或适合的途径施用,诸如通过肠胃外(例如皮下、动脉内、静脉内、肌肉内)途径、口服(包括舌下)、经鼻或局部途径。在需要适当浓度的寡核苷酸直接递送至所要治疗的身体内的位点的情况下,施用可以可区域性的而非全身性的。区域性施用提供以下能力:将非常高局部浓度的寡核苷酸递送至所需位点,并且因此适合用于实现所需治疗或预防作用,同时避免身体的其它器官暴露于所述化合物,并且从而潜在地降低副作用。

[0125] 应了解,本发明的组合物针对任何特定个体的特异性剂量水平将取决于多个因素,包括例如所使用的特定寡核苷酸的活性;所要治疗的个体的年龄、体重、一般健康和膳食;施用时间、排泄速率以及与任何其它治疗或疗法的组合。单次或多次施用可以治疗医师所选的剂量水平和模式进行。广泛范围的剂量可以是可适用的。考虑一个患者,每天每千克体重可施用例如约0.1mg至约1mg的药剂。可调整给药方案以提供最佳预防反应。例如,可每天、每周、每月或其它适合的时间间隔施用若干分开的剂量,或剂量可如通过情况的急迫性所指示按比例降低。

[0126] 药学上可接受的载体或稀释剂的实例是去矿物质水或蒸馏水;盐水溶液;基于植物的油,诸如花生油(peanut oil)、红花油、橄榄油、棉籽油、玉米油、芝麻油、落花生油(arachis oil)或椰子油;硅酮油,包括聚硅氧烷,诸如甲基聚硅氧烷、苯基聚硅氧烷以及甲基苯基聚硅氧烷;挥发性硅酮;矿物油,诸如液体石蜡、软石蜡或角鲨烷;纤维素衍生物,诸

如甲基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠或羟丙基甲基纤维素；低碳烷醇，例如乙醇或异丙醇；低碳芳烷醇(aralkanol)；低级聚亚烷基二醇或低级亚烷基二醇，例如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇、丙二醇、1,3-丁二醇或甘油；脂肪酸酯，诸如棕榈酸异丙酯、肉豆蔻酸异丙酯或油酸乙酯；聚乙烯吡咯烷酮；琼脂；角叉菜胶；黄蓍胶或阿拉伯胶，以及凡士林。典型地，载体将形成以组合物的重量计10%至99.9%。

[0127] 适合用于可注射用途的药物形式包括无菌水溶液(在水溶性情况下)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。配制品在制造和储存条件下必须是稳定的，并且必须针对诸如细菌和真菌等微生物的污染作用是保守的。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇以及液体聚乙二醇等)、其适合的混合物以及植物油的溶剂或分散介质。适当的流动性可例如通过使用诸如卵磷脂等涂料、在分散体情况下通过维持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持。对微生物的作用的预防可通过例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等各种抗细菌和抗真菌剂来引起。在许多情况下，将优选的是包括等张剂，例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可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)来引起。

[0128] 无菌可注射溶液是通过按需要以所需量将活性化合物与以上所列举的各种其它成分一起并入适当的溶剂中随后过滤灭菌来制备。一般来说，分散体是通过将各种灭菌活性成分并入含有基本分散介质和来自上文所列举的成分的所需其它成分的无菌媒介物中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，其产生活性成分加上来自先前无菌过滤的溶液的任何其它所需成分的粉末。

[0129] 当活性剂受适当保护时，其可例如与惰性稀释剂或与可吸收的可食用载体一起经口施用，或其可密封在硬壳或软壳明胶胶囊中，或其可压制成片剂，或其可与膳食的食物直接合并。对于经口治疗性施用，活性化合物可与赋形剂合并并且以可摄取片剂、口含片、药片、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、薄片等形式使用。所述组合物和制剂应含有至少1重量%的活性化合物。组合物和制剂的百分比当然可变化并且可适宜地介于约5至约80%重量单位之间。所述治疗适用组合物中活性化合物的量使得将获得适合的剂量。根据本发明的优选组合物或制剂经制备使得经口剂量单位形式含有约0.1 μ g与2000mg之间的活性物。

[0130] 片剂、药片、丸剂、胶囊等还可以含有如下所列举的组分：粘合剂，诸如树胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂，诸如磷酸氢钙；崩解剂，诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉、褐藻酸等；润滑剂，诸如硬脂酸镁；并且可添加甜味剂，诸如蔗糖、乳糖或糖精；或调味剂，诸如薄荷油、冬青油或樱桃调味剂。当剂量单位形式是胶囊时，其除以上类型的材料之外还可含有液体载体。各种其它材料可作为包衣存在或以其它方式修饰剂量单位的物理形式。举例来说，片剂、丸剂或胶囊可包覆虫胶、糖或两者。糖浆或酏剂可含有蔗糖作为甜味剂、对羟基苯甲酸丙甲酯和对羟基苯甲酸丙酯作为防腐剂、染料和诸如樱桃或桔子调味剂等调味剂。当然，制备任何剂量单位形式时所用的任何材料均应是药学纯的并且以所使用的量是基本上无毒的。此外，寡核苷酸可并入缓释制剂和配制品中。

[0131] 本发明涵盖组合治疗，其中如本文所描述的寡核苷酸是与可促进所需治疗或预防结果的其它适合的药剂共施用。举例来说，在癌症或肿瘤背景下，可设法维持正在进行中的抗癌或抗肿瘤治疗，诸如化学治疗或放射治疗，同时使用根据本发明的实施方案的寡核苷酸来抑制或降低肿瘤血管生成和/或肿瘤转移。“共施用”意指以相同配制品或两种不同配

制品形式经由相同或不同途径同时施用或通过相同或不同途径依序施用。“依序”施用意指药剂施用之间的秒、分钟、小时或天的时间差。施用可按任何顺序进行。

[0132] 本发明的实施方案还提供用于根据本发明的用途的试剂盒。举例来说,本发明的试剂盒可含有一种或多种本文所公开的布洛克妙,并且含有任选错义寡核苷酸用作对照。所述试剂盒可用于例如医疗或生物研究活动,包括研究VE-钙粘蛋白活性、血管通透性或血管生成。根据本发明的试剂盒还可以包括使用布洛克妙所需的其它组分,诸如缓冲剂和/或稀释剂。试剂盒典型地包括用于容纳各种组分的容器和用于将试剂盒组件用于本发明的方法中的说明书。

[0133] 本说明书中参考任何现有出版物(或自其衍生的信息)或已知的任何内容并非并且不应视为承认或许可或任何形式暗示该现有出版物(或自其衍生的信息)或已知内容形成本说明书所涉及的努力领域中的普遍常识的一部分。

[0134] 现将参考以下具体实施例描述本发明,所述具体实施例不应视为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0135] 以下实施例说明本发明并且在本说明书通篇中不应视为以任何方式限制本说明书的公开内容的一般性质。

[0136] 一般方法

[0137] 细胞培养物

[0138] 如先前所描述分离和培养HUVCE (Litwin等,1997) 并且在第二代与第四代之间使用。将HEK293T和HeLa细胞维持在补充有10%FBS的DMEM (Gibco) 中。

[0139] 寡核苷酸

[0140] 由Dharmacon合成人类miR-27a的微RNA (Miridian) 模拟物。由Exiqon设计和合成miR-27a的LNA抑制剂 (LNA-27a)。由MirrX设计和合成所有布洛克妙。由Invitrogen设计和合成Stealth RNAi™靶向siRNA的人类VE-钙粘蛋白mRNA。以下实施例中所描述的实验中所用的寡核苷酸的序列提供于表1和出现在本说明书末尾处序列表中。

[0141] 表1.寡核苷酸序列

寡核苷酸	序列(5'-3') ¹	SEQ ID NO
CD5-1	<u>TUCACAGUTGCUUCA</u>	5
CD5-2	<u>TUCACAGUTGCTTCA</u>	6
CD5-3	<u>TUCACAGUTGCTTCA</u>	7
LNA-27a 安提妙	<u>CUTAGCCACUGTGAA</u>	8
错义对照	<u>TCCAGAGATGGTUGA</u>	9
154-pparg	<u>TUCACAGUAAATTTC</u>	10

[0143] 1单下划线表示LNA单体;双下划线表示2'0-甲基RNA单体;粗体表示UNA单体

[0144] 质粒

[0145] PsiCHECK VE-钙粘蛋白3'UTR (WT) 是通过将衍生自人类VE-钙粘蛋白基因的整个3'UTR克隆至质粒PsiCHECK-2 (Promega) 中海肾荧光素酶报告基因紧接着的下游来制备。此

质粒含有荧光虫荧光素酶表达盒,其充当荧光素酶活性的内部归一化。PsiCHECK mut-VE-钙粘蛋白3' UTR (Mut) 是通过使质粒PsiCHECK VE-钙粘蛋白3' UTR中VE-钙粘蛋白3' UTR中的miR-27a结合位点突变来制备。

[0146] 报告子质粒pMiR-靶、pMir.PPARG 3' UTR以及pMir.SPRY2 3' UTR是由Origene制备。pMir.PPARG 3' UTR含有衍生自被克隆在荧光虫荧光素酶报告子的紧接着的下游的人类过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 基因的3' UTR,而pMir.SPRY2 3' UTR被类似地构建以运送人类Sprouty同系物2 (果蝇) 3' UTR。pMiR-靶充当空载体对照。对于转染实验,pMiR-靶、pMir.PPARG 3' UTR以及pMir.SPRY2 3' UTR的荧光虫荧光素酶活性针对充当转染对照的质粒pGL4.73 (Promega) 的海肾荧光素酶表达进行归一化。

[0147] 瞬时转染和荧光素酶分析

[0148] HUVEC细胞转染是在T25长颈瓶中使用HiPerFect转染试剂 (Qiagen) 根据制造商说明书进行。将细胞以每个长颈瓶 4×10^5 个细胞进行接种并且孵育24小时,然后在最终浓度为15nM的微RNA模拟物或在最终浓度为30nM的LNA布洛克妙或VE-钙粘蛋白siRNA情况下进行转染。转染后24h分析细胞的荧光素酶活性。对于VE-钙粘蛋白复水实验,使用Amaxa® HUVECNucleofector® 试剂盒 (Lonza) 根据制造商的说明书将1 μ g适当的质粒在最终浓度为15nM的miRNA模拟物情况下共转染。

[0149] HEK293T和海拉细胞转染是在96孔板中使用脂质体2000根据制造商说明书一式三份地进行。将细胞以每孔 6×10^3 个细胞涂铺并且孵育24小时,然后共转染,每孔涉及荧光素酶报告子构建体 (70ng)、布洛克妙或LNA (3.75nM) 以及miR 27a-模拟物 (3.75nM-30nM)。作为内部对照,将含有海肾荧光素酶报告子基因的质粒pGL4.73 (0.5ng) 共转染并且24小时后使用PolarStar Omega (BMG Labtech) 定量荧光素酶活性。

[0150] miRNA微阵列

[0151] 如先前所描述来进行阵列 (Thomson等,2004)。使用来自两个单独的HUVEC细胞株实验的RNA进行竞争杂交,并且在每一时间点将这些生物重复实验的数据汇集起来。使用由GenePixPro 4.0 (Molecular Devices) 驱动的GenePix 4000B扫描仪扫描阵列。使用可自由获得的统计编程和图形环境R (<http://cran.r-project.org>) 进行分析。使用将基因关于差异表达的量值和一致性的组合分等级的经验贝叶斯方法 (empirical Bayes approach) 来鉴别差异表达的MiRNA (Smyth,2004)。

[0152] miRNA微阵列数据的分析

[0153] 使用Limma (微阵列数据的线性模型) 程序包内的归一化工具来读入并且归一化由阵列产生的SPOT输出文件。一般来说,双色阵列的微阵列归一化涉及将每个阵列内的比率对数值 (M值) 归一化 (阵列内归一化),其可因印刷尖端组可变性而产生;以及归一化阵列之间的通道强度 (A值)。在此处所用的阵列中,归因于每个印刷尖端组的点数小,使用整体的局部加权回归法 (global loess method) (使用函数 'NormalizeWithinArrays') 进行阵列内归一化。使用函数 ('NormalizeWithinArrays') 的默认五分位数法用于阵列间归一化。

[0154] 也使用用于线性模型化的工具和关于差异表达的量值与一致性的组合将基因分等级的经验贝叶斯统计计算在Limma中进行差异表达分析。Limma中的 'topTable' 函数用于在给定时间点提供每个miRNA的概括统计量,包括:平均倍数变化 (M)、调整的t统计量、p值、针对多个测试校正的p值以及B统计量 (下文更详细解释)。

[0155] 平均倍数变化对数 (M):表示在每个时间点对比下 (例如3h相较于0h) 重复实验间的每个微RNA的平均log2倍数变化。

[0156] 调整的t统计量:调整的t统计量具有与一般t统计量相同的解释,除了标准误差已使用简单的贝叶斯模型在基因间进行调整,即缩小成共同值。

[0157] P值:表示在给定时间点所述基因的倍数变化的显著性。这可针对多个测试进行调整,从而提供调整的p统计量。使用本杰米尼-霍赫伯格校正 (Benjamini-Hochberg correction) 来进行调整。

[0158] B统计量:表示表达的几率与不表达的几率的优势对数 (底数exp)。

[0159] RNA提取和qRT-PCR

[0160] 通过Trizol提取 (Invitrogen) 根据制造商的说明书从HUVEC分离总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒 (Applied Biosystems) 从1μg总DNAse处理的RNA随机引发互补DNA。对于miRNA表达的分析,使用TaqMan®微RNA分析使用TaqMan®微RNA逆转录试剂盒 (Applied Biosystems) 根据制造商的说明书 (Applied Biosystems) 进行cDNA合成。

[0161] 基质胶管形成分析

[0162] 如先前所描述进行基质胶分析 (Gamble等,1993)。简单来说,根据制造商的说明书,将基质胶 (Becton Dickinson) 解冻并且将100μl基质胶添加至平底96孔板中,这允许在37℃下聚合1小时。然后,将HUVEC以每孔 3.6×10^4 个细胞涂铺于HUVEC培养基中。在24h内以固定时间间隔拍照。

[0163] 通透性分析

[0164] 如先前所描述进行通透性分析 (Gamble等,2000)。简单来说,转染后24h将HUVEC以每个transwell (Corning) 1×10^5 个细胞涂铺于HUVEC培养基中持续24h并且然后在2%FCS HUVEC培养基中再持续24h。将FITC缀合的右旋糖酐 (2μg) 添加至所有孔的上部腔室中。使用LS 50B荧光光谱仪 (Perkin Elmer) 在485nm的激发波长和530nm的发射波长下测定transwell的下部腔室中的FITC-右旋糖酐的量。以从上部腔室穿过进入下部腔室的FITC-右旋糖酐的量的形式给出通透性。将过表达miR-27a的HUVEC涂铺至transwell上。24h后进行转染程序并且以与用对照模拟物转染的细胞相同的方式进行处理。

[0165] 免疫印迹

[0166] 将HUVEC溶解在冰冷溶解缓冲液 (1M Tris.HCl,pH 7.5,具有1%NP-40、5M NaCl、200mM EGTA、500mM NaF、100mM Na₄P₂O₇以及蛋白酶抑制剂混合物)。使用布拉德福试剂 (Bradford Reagent) (BioRad) 分析蛋白质浓度。将相等量的蛋白质加载至丙烯酰胺凝胶上,通过SDS-PAGE分离,转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉/PBS-T阻断并且依次用VE-钙粘蛋白第一抗体 (C-19,Santa Cruz) 和适当的第二抗体探测。洗涤之后,通过化学发光 (Amersham Pharmacia Biotech) 检测反应性光谱带。将膜洗涤并且使用单克隆抗β肌动蛋白抗体 (Sigma) 作为上样对照再探测。

[0167] VE-钙粘蛋白定位

[0168] 如所描述 (Li等,2009) 使用涂铺在LabTek载玻片中的细胞 (体外技术) 进行定位研究持续48h。在装有用于荧光素的激发过滤器的Nikon Eclipse Ti-U倒置显微镜 (Nikon) 上使用40X物镜观察VE-钙粘蛋白的定位,并且采集至Digital Sight冷却型彩色数码相机 (Nikon)。使用NIS-AR先进研究软件 (Nikon) 调节图像的亮度和对比度。

[0169] 胶原分析

[0170] 如先前所描述进行胶原毛细管形成分析 (Gamble等,1993)。通过添加20ng/ml佛波醇豆蔻酸酯乙酸酯 (PMA) 和针对促进形成复杂多细胞管的 $\alpha_2\beta_1$ -整合蛋白 (AC11) 的抗体来刺激毛细管形成。

[0171] 基质胶塞分析

[0172] 如先前所描述进行基质胶塞分析 (Zhang等,2006)。对六至八周龄雌性C57BL/6小鼠皮下 (右翼) 注射500 μ l含有FGF-2 (0.5 μ g, (Sigma,MI)、90 μ g对照或miR-27a模拟物或没有模拟物 (媒介物) 和FuGENE6 (2.5 μ l) 的基质胶。14天后,将塞切除并且固定于10%多聚甲醛中。将5 μ m横截面用苏木精-曙红染色。通过光学显微术在100X放大倍数下定量塞中含有红细胞的血管并且表示为三个随机视野的平均值。在室温下,在BX51显微镜上使用DPC Controller 3.1.1.267软件将图A的图像使用UPlanFl 20X/0.50物镜而图B用UPlanFl 40X/0.77物镜采集到DP70照相机 (所有均来自Olympus) 中。在数据采集之后,使用ImageJ (NIH) 进行亮度和对比度调节。使用两个独立批次的miRNA模拟物在分开的两天进行实验。

[0173] 激光捕获

[0174] 使用Arcturus PixCell IIE仪器实现内皮细胞从小静脉和新的新生血管的切除。激光直径设定为7.5 μ m并且激光脉冲设定在0.2秒。将内皮细胞转移至CapSure Macro LCM盖子上。两个内皮细胞群体的每个患者收集约五至十个LCM盖子。在室温下,在Arcturus PixCell IIE显微镜 (Molecular Devices) 上使用UPlanFl 4x/0.13、UPlanFl10x/0.30、LCPlanFl 20x/0.40物镜采集图像并且采集至Hitachi 1/2英寸单片CCD彩色相机 (Hitachi) 中。使用LCM 2.0版软件调节图像的亮度和对比度。

[0175] 体内通透性的迈尔斯分析

[0176] 基本上如先前所描述以体内通透性模型形式进行迈尔斯分析 (Li等,2008)。对8周龄C57BL/6J-Tyr^{c-2J}/J小鼠进行皮内注射至背部,同时注射4 μ g对照LNA或miR-27a LNA。第二天,静脉注射100 μ l 5%伊文思蓝 (Evans blue) 染料,然后15分钟后将PBS或10 μ g VEGF皮内注射至与LNA相同的部位中并且30min后将小鼠处死。测量作蓝色染料灌注远离注射部位的程度的通透性。关于定量,获得受影响区域的活检,在56℃下在甲酰胺中洗脱染料过夜,并且在620nm下读取吸光率。使用总共9个小鼠。在不同的两天进行实验。

[0177] 单侧后肢局部缺血小鼠模型

[0178] 将整个左股动脉和静脉结扎并且从野生型C57BL/6小鼠 (Egami等,2006) 手术切除。以每千克体重30mg的剂量经由尾部静脉全身注射布洛克妙。使用高解析度激光多普勒成像器 (Moor Instruments UK) 测量后肢血流量。在不同时间点 (左侧与右侧后肢 (手术前、第0、1、2、3、7以及10天) 激光多普勒血流 (LDBF) 测量。在激光扫描期间,将小鼠用甲氧基氟烷麻醉并且放在加热垫 (37℃) 上以使因体温引起的变化减到最小。扫描后肢最少三次重复扫描。计算缺血性 (左) 后肢血流量超过假 (右) 后肢血流量的百分比并且求平均值。

[0179] 使用后肢缺血模型进行通透性分析

[0180] 进行手术并且用布洛克妙处理后24小时,将每个组中的八个动物静脉注射0.5%伊文思蓝 (200 μ l)。允许染料循环30分钟,然后将小鼠处死。将内收肌群肌肉切除并且称重。将组织中的伊文思蓝用甲酰胺在55℃下萃取24小时,并且使用LabSystem Multiskan和MultiSofit板读数器测量其在620nm下的荧光。血管通透性以染料渗漏水平 (吸收度) /肌肉

重量(克)表示。

[0181] 毛细管密度的测定

[0182] 将小鼠用甲氧基氟烷麻醉并且通过心脏穿刺从心脏收集约1mL血液。接着,通过颈椎脱位使小鼠安乐死。获得缺血肢体和非缺血肢体的股内侧内收肌并且加工成8 μ m厚的冷冻切片。将切片固定在冰冷丙酮中10分钟并且用包括大鼠抗小鼠层粘连蛋白(1:1000, Abcam)、缀合至藻红蛋白的抗CD31(1:200, Abcam)以及缀合至FITC的抗平滑肌肌动蛋白(1:500, Abcam)的抗体混合物染色。将切片洗涤并且用缀合至Alexa Fluor染料350的第二抗大鼠抗体(1:2000, Invitrogen Molecular Probes)染色。使用Olympus IX71显微镜和Olympus DP71照相机在200x放大倍数(Olympus LUCPLFLN 20x物镜, NA0.45)下从每个动物取得10个不同的随机显微镜视野。由DP Controller(3.1.1.267版)和DP Manager(3.1.1.208)组成的采集软件均来自Olympus。使用ImageJ 1.46a版软件分析图像。毛细管密度以毛细管数目/肌细胞数目表示。

[0183] 统计量

[0184] 除非另外说明,否则进行T-测验。

[0185] 道德规范

[0186] 从澳大利亚悉尼的阿尔弗莱德王子医院(Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australia)获得人类伦理批准,并且从悉尼大学(University of Sydney)或新南威尔士大学(NSW大学)的动物伦理委员会(Animal Ethics Committee)获得动物伦理批准。

[0187] 实施例1-识别在体外血管生成期间被调节的miRNA

[0188] 使用miRNA微阵列来鉴别在毛细管形成期间调节的微RNA。结果证实,基于正的B值和M值,在所述过程期间33个上调和69个下调的miRNA。使用包括TargetScan、PicTar以及miRanda的基于网络的靶标预测算法研究了最适度调节的miRNA的潜在靶标以及哪些参与了通透性调节。特别关注的是miR-27a,其被预测靶向VE-钙粘蛋白,即内皮细胞特异性钙依赖性细胞粘附分子,其负责实体组织中的细胞-细胞相互作用和粘附以及VEGF介导的信号传导。VE-钙粘蛋白的3' UTR含有miR-27a的单一预期8-mer位点,其中在成熟miRNA和位置2-8处精确匹配,随后是'A'(种子区+位置8)。miR-27a以及此miRNA群集的另外2个成员miR-23a和miR-24的miRNA微阵列表达型态是使用另外三个独立的HUVEC系的汇集物通过qRT-PCR来确认(数据未显示)。

[0189] 实施例2-miR-27a改变VE-钙粘蛋白表达和VE-钙粘蛋白依赖性函数

[0190] 为确定miR-27a是否调节VE-钙粘蛋白表达,在miR-27a模拟物转染的细胞中测量了VE-钙粘蛋白的蛋白水平。VE-钙粘蛋白表达存在显著降低(25% $\pm$ 4%, n=5)(图1A和1B),如通过流式细胞术(图1C)和mRNA(图1D)所分析的细胞表面表达存在类似量值的降低(31% $\pm$ 7%, n=5)。反之使用含有锁核酸(LNA)的抗miR-27a安提妙(LNA-27a; SEQ ID NO: 8)的miR-27的基因敲低引起VE-钙粘蛋白表达的上调(22% $\pm$ 4%)(图1E和1F)和细胞表面表达(图1G)。

[0191] 当含有VE-钙粘蛋白的整个3' UTR的荧光素酶报告子质粒共转染至HEK293T细胞中时,HEK293T细胞中miR-27a的异位表达抑制荧光素酶活性(33% $\pm$ 3%, n=4)。miRNA位点的突变能够逆转荧光素酶活性的抑制(图1H),从而证实miR-27a与VE-钙粘蛋白的3' UTR中的miR-27a结合位点之间的直接相互作用。

[0192] miR-27a过表达(miR-27a模拟物)的效应是在已知关键地涉及VE-钙粘蛋白的环境中测试。miR-27a-模拟物对细胞活力没有影响并且诱导内皮细胞增殖小而显著的增加。在内皮细胞单层中,用对照模拟物转染的细胞显示装饰有VE-钙粘蛋白的特征性紧密并列接合(图2Ai)。相比之下,miR-27a-模拟物细胞在接合处之间具有空隙,存在更宽的用于VE-钙粘蛋白的染色的模型并且细胞更平(图2Aii)。用抗miR-27a LNA转染的细胞也显示VE-钙粘蛋白分布的变化。在松散堆积的单层中,对照细胞显示更多细胞间空隙和更宽染色模型(图2Bi)。相比之下,抗miR-27a细胞显示更紧密并列接合和更少细胞间空隙(图2Bii)。与中断的接合一致,miR-27a-模拟物细胞显示小而显著的通透性增加(图2C),而抗miR-27a LNA转染的细胞在用强劲的通透性诱导剂凝血因子刺激之后抑制了内皮细胞通透性(图2D)。抗miR-27LNA在体内也是有效的。图2E证实抗miR-27a LNA显著降低小鼠中VEGF的血管通透性并且与此一致,LNA也抑制组织中的内源性miR-27a水平(数据未显示)。最后,miR-27a模拟物的过表达抑制了体外毛细管形成(图3A)以及使用基质胶塞分析的体内血管生成(图3B)。

[0193] 为证实VE-钙粘蛋白是毛细管形成的主要调节剂,使用siRNA将VE-钙粘蛋白基因敲低,从而产生接近20-30%基因敲低,类似于在miR-27a模拟物情况下所见(数据未显示)。细胞保持是活的,但是当涂铺至基质胶上时,毛细管是细的并且倾向于破碎并且不再形成如对照中所产生(数据未显示)的稳定网络、非常类似于在miR-27a的过表达情况下所见的表型。然后使用VE-钙粘蛋白表达质粒进行miR-27a过表达效应的营救实验。使用此表达质粒实现了VE-钙粘蛋白表达的量的约5倍的增加。VE-钙粘蛋白过表达能够部分逆转miR-27a-模拟物在基质胶上形成毛细管的能力方面的效应(图3C),当使用刮伤分析诱导EC的迁移时,miR-27a快速下调而VE-钙粘蛋白的mRNA水平上调。创伤之后24小时,miR-27a水平是高的并且与此一致,VE-钙粘蛋白mRNA的水平已降低(图3D)并且蛋白质降低(数据未显示)。总而言之,这些结果表明VE-钙粘蛋白是内皮细胞中miR-27a的主要靶标并且其调节使得观测到扰乱的毛细管形成。

[0194] 实施例3-在疾病中在新血管中miR-27a下调

[0195] 上文所描述的数据将表明经历有限血管生成反应的血管中的内皮细胞应与成熟非新生血管中的内皮细胞相比具有降低水平的miR-27a。为测试这个假设,本发明人研究了具有已知发生血管生成但不与肿瘤生长相关的疾病的患者的血管中的miR-27a的表达。石蜡包埋的肝脏切片是获自具有肝硬化的三个患者。已知包围再生性结节的纤维化区域是由血管生成形成新的血管(新血管)的环境并且在正常肝脏中这个区域不具有所述新血管(Medina等,2004)。通过激光捕获显微解剖(LCM)收集来自小静脉和新血管的内皮细胞(图4A)并且从样品中分离RNA。使用泰格曼低密度阵列(Taqman Low Density Arrays,TLDA)分析的miRNA型态显示在三个患者各自的小静脉中检测到与新血管中类似数目的miRNA,不过在患者之间检测到的miRNA的数目存在变化。在各组与各患者之间检测到的miRNA的平均Ct值均类似。在原始阵列筛检中,发现miR-520d*是高度稳定的并且因此用作qRT-PCR的归一化对照。为解决LCM样品的细胞纯度,归因于所捕获材料的量的限制不可能研究对内皮细胞或肝细胞具特异性的mRNA的水平。然而,注意到在任何样品中均未检测到miR-122,即一种高度丰富并且肝脏特异性的miRNA,其占总肝脏miRNA群体的70%并且在其它组织中是不可检测的(Lagos-Quintana等,2002),这表明所捕获的细胞未被肝细胞显著污染。

[0196] 然后通过qRT-PCR分析RNA样品的miR-27a表达并且将结果针对miR-520d*表达进

行归一化(图4B)。对于所有三个患者,与来自小静脉的细胞相比,来自新血管群体的细胞中的miR-27a水平显著降低。因此,虽然患者数目小,但数据支持了miR-27a下调与受调节的血管生成有关的想法。

[0197] 实施例4-针对VE-钙粘蛋白的布洛克妙调节VE-钙粘蛋白表达

[0198] 至少部分归因于中靶标结合中所用的高度保守种子序列,miRNA能够靶向多个基因。因此,使用直接结合至miRNA的拮抗剂调节miRNA活性使得多个靶基因去调节,并且不指示哪个(哪些)靶标对于(miRNA的)给定功能来说是关键的。为更好地理解miR-27a的哪些靶标对miR-27a调节通透性和血管生成来说是关键的,使用了布洛克妙。布洛克妙是空间反义寡核苷酸阻断剂,其结合于靶RNA中的特定miRNA结合位点,从而阻止miRNA结合于靶位点。本研究中所用的布洛克妙被设计为与VE-钙粘蛋白mRNA中的miR-27a结合位点互补的15-mer LNA/2'-O-甲基寡核苷酸,指定为CD5-1(SEQ ID NO:5)、CD5-2(SEQ ID NO:6)以及CD5-3(SEQ ID NO:7)。

[0199] 使用被设计成结合于VE-钙粘蛋白的3' UTR中的miR-27a结合位点的2种不同布洛克妙CD5-2(SEQ ID NO:6)和CD5-3(SEQ ID NO:7),本发明人证实内皮细胞中VE-钙粘蛋白的水平显著增加(图5A)。对布洛克妙CD5-2进行下一步工作,因为它一贯地类似于在抗miR-27a LNA情况下所见调节VE-钙粘蛋白水平。布洛克妙CD5-2也将VE-钙粘蛋白定位调节至内皮细胞单层中的接合处(图5B),抑制针对凝血因子的通透性(图5C)并且如在迈尔斯分析中所测量抑制VEGF诱导的血管渗漏(图5D)。

[0200] 实施例5-针对VE-钙粘蛋白的布洛克妙和缺血性损伤

[0201] 本发明人还研究了CD5-2布洛克妙对小鼠中的后肢缺血后恢复的影响。在损伤之后头2天内miR-27a快速下调,并且在其后恢复正常或略微更高水平。布洛克妙CD5-2是在第0天在刚刚诱导缺血之后以单次全身性注射形式给予。如在第7天所测量,布洛克妙引起血流的显著改善(图6A)。此外,在24小时内明显从缺血恢复(图6B)。布洛克妙CD5-2在头24小时内使得缺血性肌肉中的水肿减轻(图6C)。另外,如通过CD31染色所评估,CD5-2刺激血管生成(图6D)。与布洛克妙靶向miR-27-VE-钙粘蛋白一致,在缺血肌肉内VE-钙粘蛋白在CD31阳性血管上的表达增加(数据未显示)。在非缺血肌肉中,CD5-2对毛细管作用没有影响(数据未显示)。因为缺血恢复受水肿限制与血管生成程度的影响,所以这些结果表明布洛克妙影响这两个方面。总之,布洛克妙CD5-2即使当在缺血性损伤时以单次大剂量静脉注射形式递送时也增强缺血后恢复。与恢复相关的是水肿的抑制和血管生成反应的增加。

[0202] 虽然上文所描述的布洛克妙被设计成靶向VE-钙粘蛋白中的miR-27a结合位点,但这一位点在其它预期靶标中是高度同源的。因此,本发明人研究了VE-钙粘蛋白定向布洛克妙针对两种其它miR-27a经验证靶标SEMA6A和PPAR γ 的特异性(Lin等,2009;Zhou等,2011)。虽然抗miR-27a LNA诱导VE-钙粘蛋白和SEMA6A蛋白质表达的增加,与这些一致的是靶mRNA,但是仅CD5-2诱导VE-钙粘蛋白的显著增加(图7A和7B)。类似地,LNA还显著调节PPAR γ 蛋白表达,而CD5-2不调节(数据未显示)。本发明人还使用荧光素酶报告子分析来研究使用含有VE-钙粘蛋白的整个(1548bp区)3' UTR的质粒对VE-钙粘蛋白的调节。在HeLa细胞中,miR-27a过表达引起VE-钙粘蛋白荧光素酶活性的预期抑制。布洛克妙CD5-2逆转miR-27a介导的抑制,而被设计针对PPAR γ 中的miR-27a结合位点的布洛克妙不逆转(图7C)。LNA逆转由miR-27a过表达引起的抑制。VE-钙粘蛋白中miR-27位点的突变消除了由CD5-2造成

的抑制。这些使用蛋白质表达与翻译报告子分析的实验证实了布洛克妙的设计中的选择性的程度,其中布洛克妙CD5-2显示针对VE-钙粘蛋白而不针对SEMA6A和PPAR γ 的活性。此外,表明虽然布洛克妙结合于VE-钙粘蛋白的3' UTR中的miR-27a结合位点,其不激活miRNA降解机制,估计可能因为缺乏对必需的辅助蛋白的募集。

[0203] 实施例6-针对VE-钙粘蛋白的布洛克妙抑制肿瘤生长

[0204] 鉴于以上所描述的布洛克妙对VE-钙粘蛋白的影响,本发明人研究了施用这些布洛克妙对体内肿瘤生长的影响。将含于200 μ l PBS中的同基因的B16F10细胞(4×10^5)皮下注射至C57BL/6雌性小鼠(8周龄)的背部右侧区域中。当肿瘤可见时(注射B16F10细胞之后第6天),将布洛克妙CD5-2或错义对照静脉注射至小鼠(每组三个小鼠)中。每天用卡尺使用下式测量肿瘤体积: $V = \frac{1}{6} \pi \times (d^2 \times D)$ 其中d是肿瘤短轴而D是肿瘤长轴。如图8中所示,在施用布洛克妙CD5-2的小鼠中,肿瘤体积与那些施用错义对照布洛克妙的小鼠中相比以基本上更慢的速率增大。

[0205] 参考文献

[0206] Achan, V., H.K.Ho, C.Heeschen, M.Stuehlinger, J.J.Jang, M.Kimoto, P.Vallance, and J.P.Cooke.2005.ADMA regulates angiogenesis:genetic and metabolic evidence.Vasc Med 10:7-14.

[0207] Gamble, J.R., J.Drew, L.Trezeise, A.Underwood, M.Parsons, L.Kasminkas, J.Rudge, G.Yancopoulos, and M.A.Vadas.2000.Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions.Circ Res 87:603-607.

[0208] Gamble, J.R., L.J.Matthias, G.Meyer, P.Kaur, G.Russ, R.Faull, M.C.Berndt, and M.A.Vadas.1993.Regulation of in vitro capillary tube formation by anti-integrin antibodies.JCell Biol 121:931-943.

[0209] Lagos-Quintana, M., R.Rauhut, A.Yalcin, J.Meyer, W.Lendeckel, and T.Tuschl.2002.Identification of tissue-specific microRNAs from mouse.Curr Biol 12:735-739.

[0210] Li, X., M.Stankovic, C.S.Bonder, C.N.Hahn, M.Parsons, S.M.Pitson, P.Xia, R.L.Proia, M.A.Vadas, and J.R.Gamble.2008.Basal and angiopoietin-1-mediated endothelial permeability is regulated by sphingosine kinase-1.Blood 111:3489-3497.

[0211] Li, X., M.Stankovic, B.P.Lee, M.Aurrand-Lions, C.N.Hahn, Y.Lu, B.A.Imhof, M.A.Vadas, and J.R.Gamble.2009.JAM-C induces endothelial cell permeability through its association and regulation of β_3 integrins.Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:1200-1206.

[0212] Litwin, M., K.Clark, L.Noack, J.Furze, M.Berndt, S.Albelda, M.Vadas, and J.Gamble.1997.Novel cytokine-independent induction of endothelial adhesion molecules regulated by platelet/endothelial cell adhesion molecule(CD31)., J Cell Biol 139:219-228.

[0213] Medina, J., A.G.Arroyo, F.Sanchez-Madrid, and R.Moreno-

Otero.2004.Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease.Hepatology 39: 1185-1195.

[0214] Thomson,J.M.,J.Parker,C.M.Perou,and S.M.Hammond.2004.A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression.Nat Methods 1: 47-53.

[0215] Zhang,G.,R.G.Fahmy,N.diGirolamo,and L.M.Khachigian.2006.JUN siRNA regulatesmatrix metalloproteinase-2expression,microvascular endothelial growth and retinal neovascularisation.J Cell Sci 119:3219-3226.

[0216] Zhou,Q.,R.Gallagher,R.Ufret-Vineenty,X.Li,E.N.Olson,and S.Wang.2011.Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24clusters.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:8287-8292.

三三三

[0001]

<110> 百年癌症药物与细胞生物学研究所; 米瑞克斯治疗公司; 悉尼大学

× 20 × 200 毫米 玻璃板 1 块

4130 35208242

450 22

4302 校對 25. 4

4730 3

44444 6

72224 8223

74 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 106

44004 4

ਦੇਸ਼-ਪ੍ਰੇਮ

52

4420 2

9244 43

222 333

222 5/15

● ● ● ● ●

[illegible]

45

22305 2

92421 43

7-23-76 ~~CONF~~

724444 1-2

✱ 223 ✱

2024 年度 总结

45004 45

உயர்நீதிமன்றம்

423

4-2104 4

44 45 46 47 48 49

534 535

233 12

12304

● 223 ● 金 銀 珠 翠

4400 4

cucaagutg ccca

55

210 **3**

43222 22

[0002]

<212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (1)..(1)
 <223> LNA

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 2' O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (3)..(3)
 <223> LNA

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (4)..(4)
 <223> 2' O-甲基腺嘌呤核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> LNA

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (6)..(6)
 <223> 2' O-甲基腺嘌呤核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (7)..(7)
 <223> LNA

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (8)..(8)
 <223> 2' O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (9)..(9)
 <223> LNA

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (10)..(10)
 <223> 2' O-甲基鸟嘌呤核苷

<220>

[0003]

<221> 修饰的_碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-甲基胞嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (12)..(12)
 <223> LNA

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (14)..(15)
 <223> LNA

<400> 5
 tucacagutg cuuca

15

<210> 6
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (1)..(1)
 <223> LNA

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-甲基胞嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-甲基腺嘌呤核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-甲基胞嘧啶核苷

<220>

[0004]

<221> 修饰的_碱基
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-甲基腺嘌呤核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-甲基鸟嘌呤核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (9)..(15)
 <223> LNA

<400> 6
 tucacagutg ctcca

15

<210> 7
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (1)..(1)
 <223> LNA

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-甲基胞嘧啶核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-甲基腺嘌呤核苷

<220>
 <221> 修饰的_碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> UNA

<220>

[0005]

```

<221> 修饰的_碱基
<222> (6)..(6)
<223> 2'-O-甲基鸟嘌呤核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-甲基鸟嘌呤核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (9)..(15)
<223> LNA

<400> 7
tucacagutg cttea

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 甲基尿嘧啶核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (1)..(1)
<223> LNA

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (2)..(2)
<223> 2'-O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (3)..(3)
<223> LNA

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-甲基腺嘌呤核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (5)..(5)
<223> 2'-O-甲基鸟嘌呤核苷

<220>

```

15

[0006]

```

<221> 修饰的_碱基
<222> (6)..(6)
<223> LNA

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-甲基胞嘧啶核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (8)..(8)
<223> 2'-O-甲基腺嘌呤核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (9)..(9)
<223> LNA

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (10)..(10)
<223> 2'-O-甲基尿嘧啶核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (11)..(11)
<223> 2'-O-甲基鸟嘌呤核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (12)..(12)
<223> LNA

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (13)..(13)
<223> 2'-O-甲基鸟嘌呤核苷

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (14)..(15)
<223> LNA

<400> 8
cutagccacu gtgaa

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<220>

```

15

[0007]

<221>	修饰的_碱基
<222>	(1)..(1)
<223>	LNA
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(2)..(2)
<223>	2'-O-甲基胞嘧啶核苷
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(3)..(3)
<223>	LNA
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(4)..(4)
<223>	2'-O-甲基腺嘌呤核苷
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(5)..(5)
<223>	LNA
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(6)..(6)
<223>	2'-O-甲基腺嘌呤核苷
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(7)..(7)
<223>	LNA
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(8)..(8)
<223>	2'-O-甲基腺嘌呤核苷
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(9)..(9)
<223>	LNA
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(10)..(11)
<223>	2'-O-甲基鸟嘌呤核苷
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(12)..(12)
<223>	LNA
<220>	
<221>	修饰的_碱基
<222>	(13)..(13)
<223>	2'-O-甲基尿嘧啶核苷

[0008]

<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{14}..{15}	
<223>	LNA	
<400>	9	
	tccagagatg gtuga	15
<210>	10	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{1}..{1}	
<223>	LNA	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{2}..{2}	
<223>	2'-O-甲基尿嘧啶核苷	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{3}..{3}	
<223>	2'-O-甲基胞嘧啶核苷	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{4}..{4}	
<223>	2'-O-甲基腺嘌呤核苷	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{5}..{5}	
<223>	2'-O-甲基胞嘧啶核苷	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{6}..{6}	
<223>	2'-O-甲基腺嘌呤核苷	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{7}..{7}	
<223>	2'-O-甲基鸟嘌呤核苷	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	{8}..{8}	
<223>	2'-O-甲基尿嘧啶核苷	

[0009]

```
<220>
<221> 修饰的-碱基
<222> (9)..(15)
<223> tna

<400> 10
tucacaguaa atttc                                     15

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 智人

<400> 11
uucacagugg cuaaguccg c                               21
```

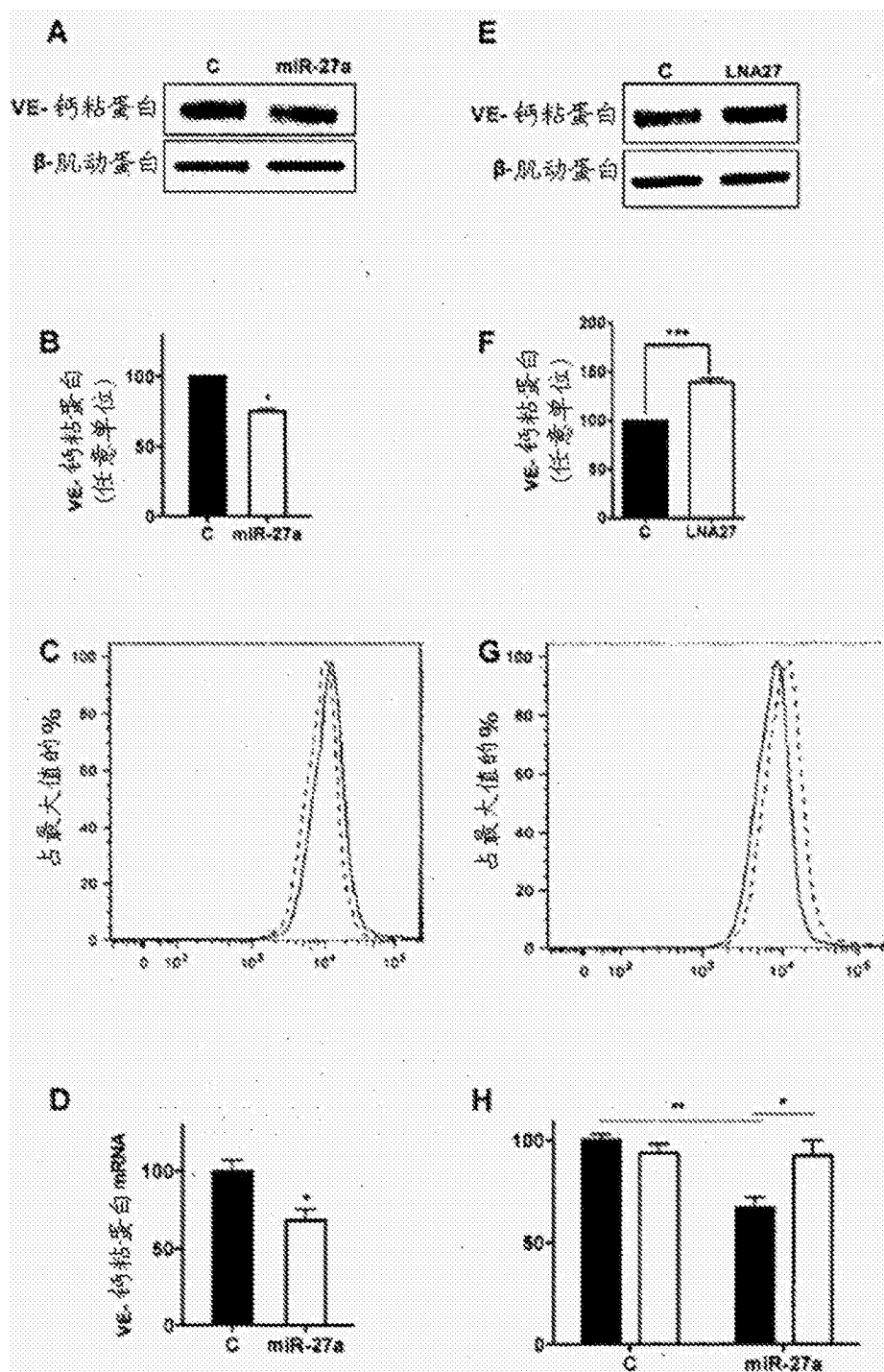


图1

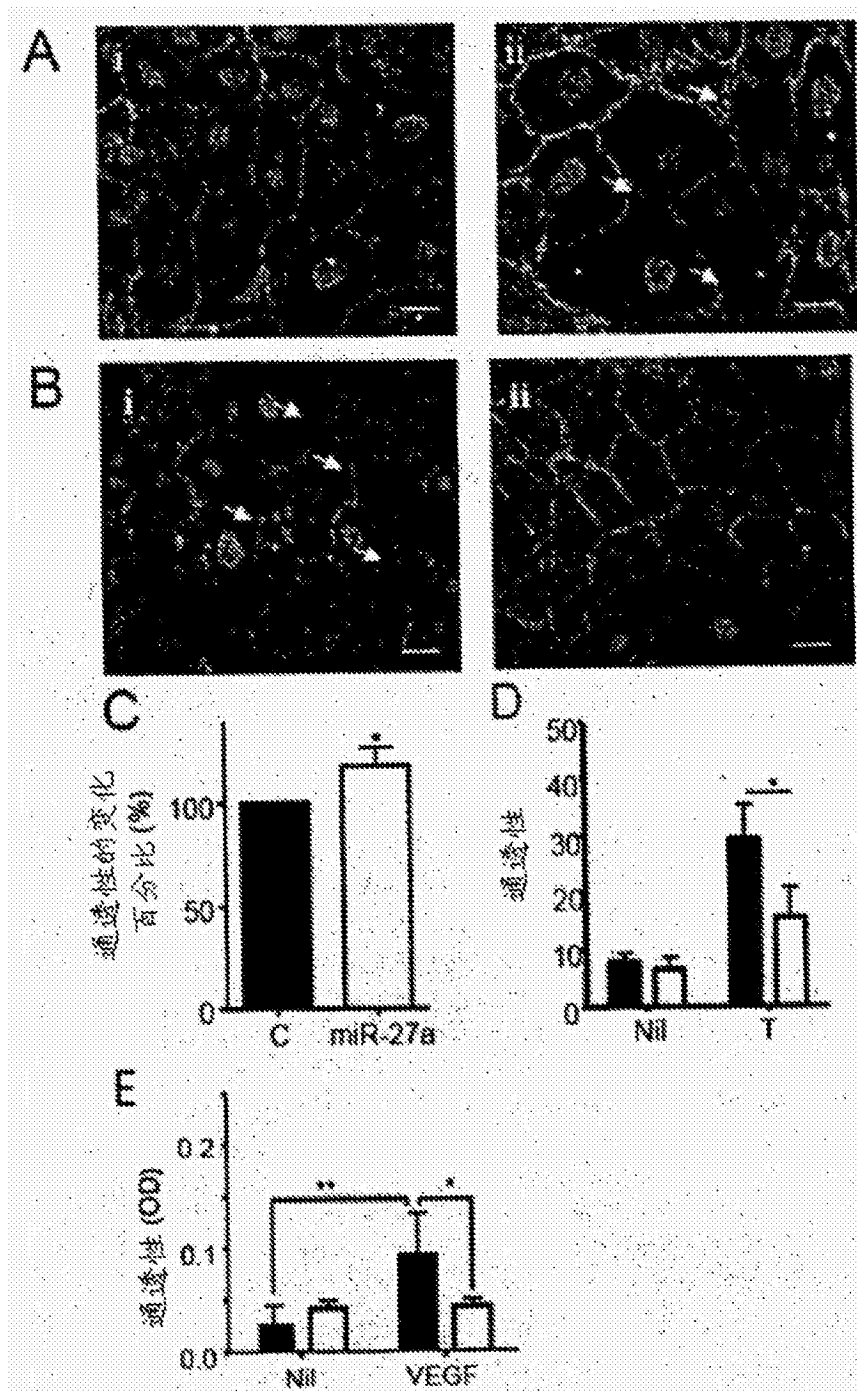


图2

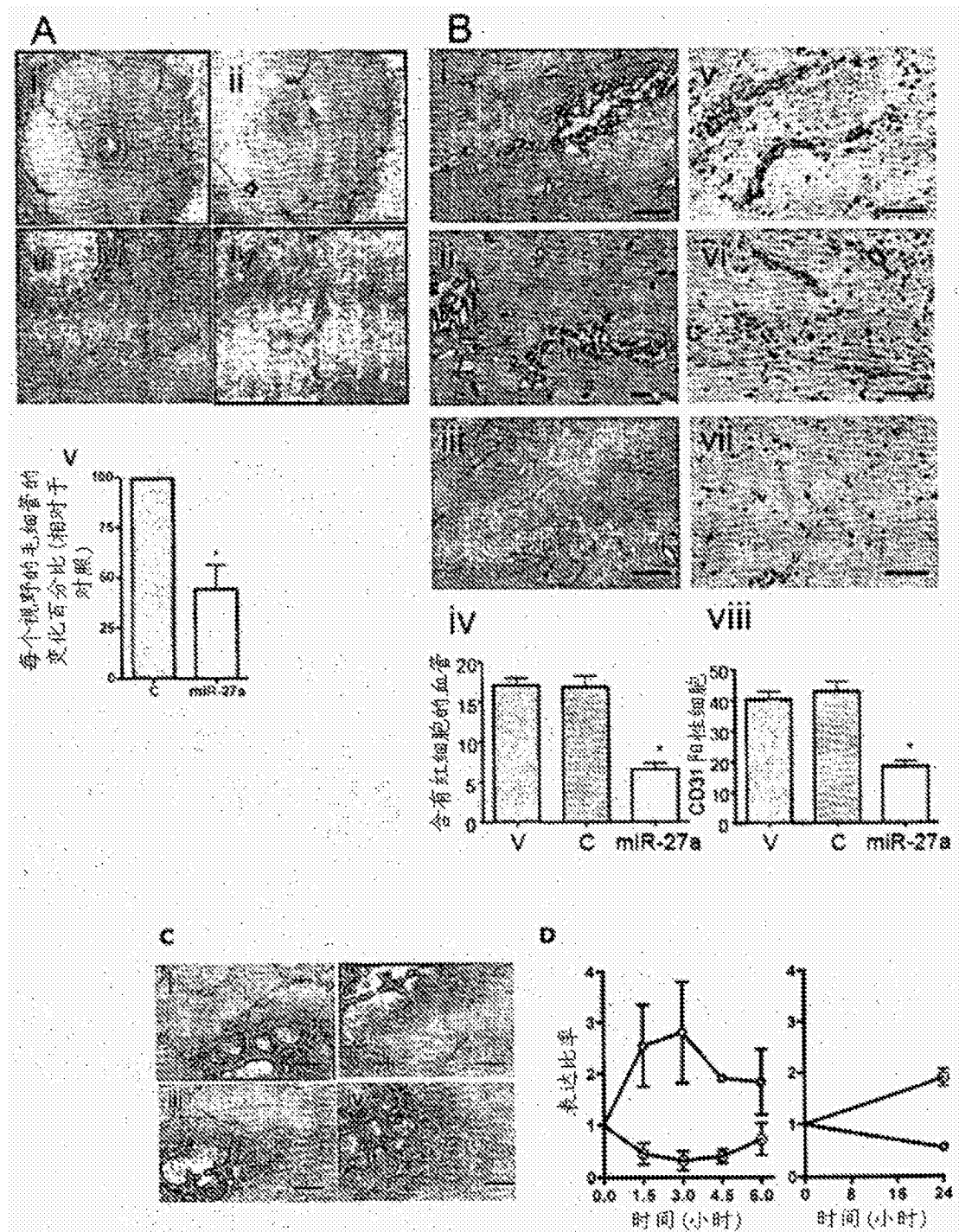


图3

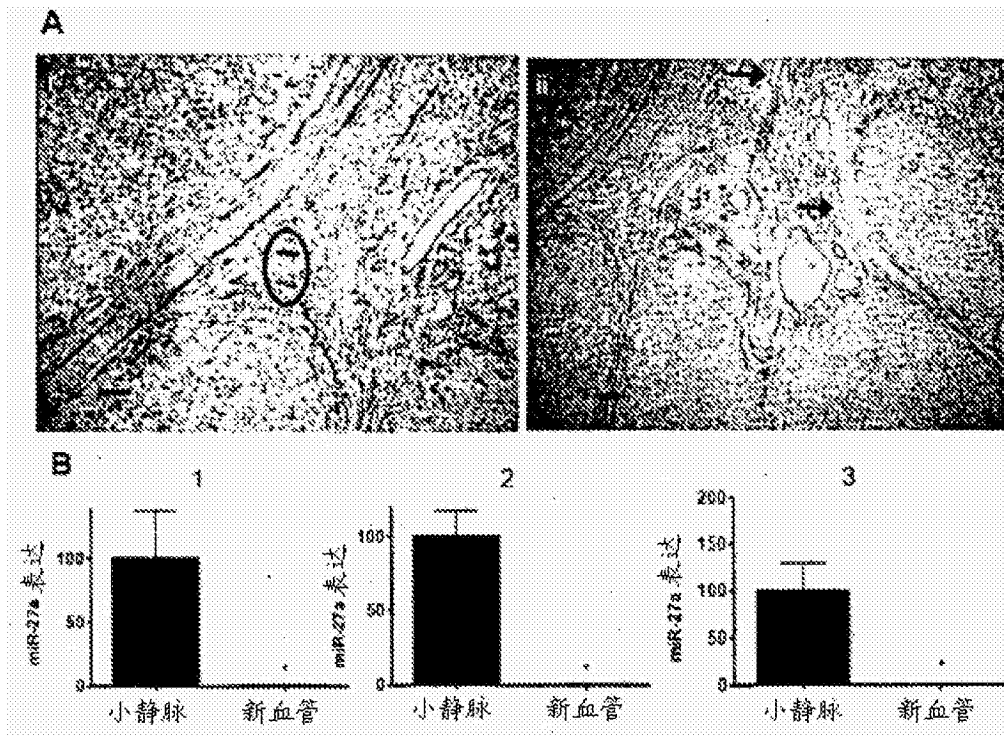


图4

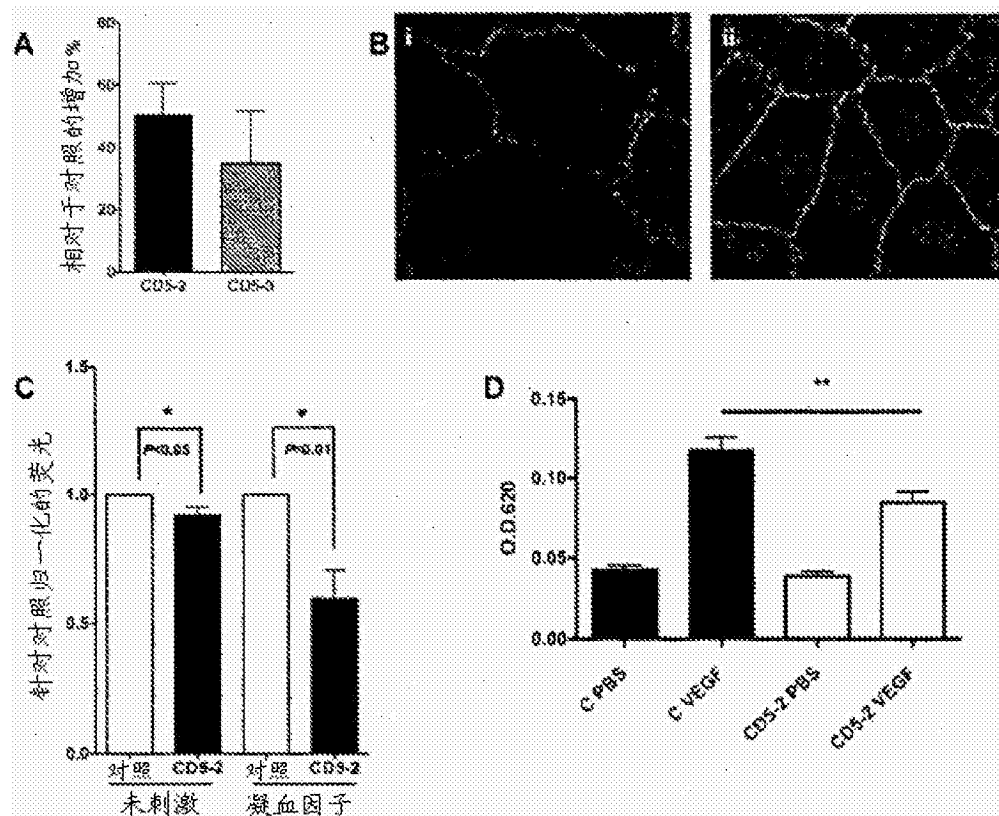


图5

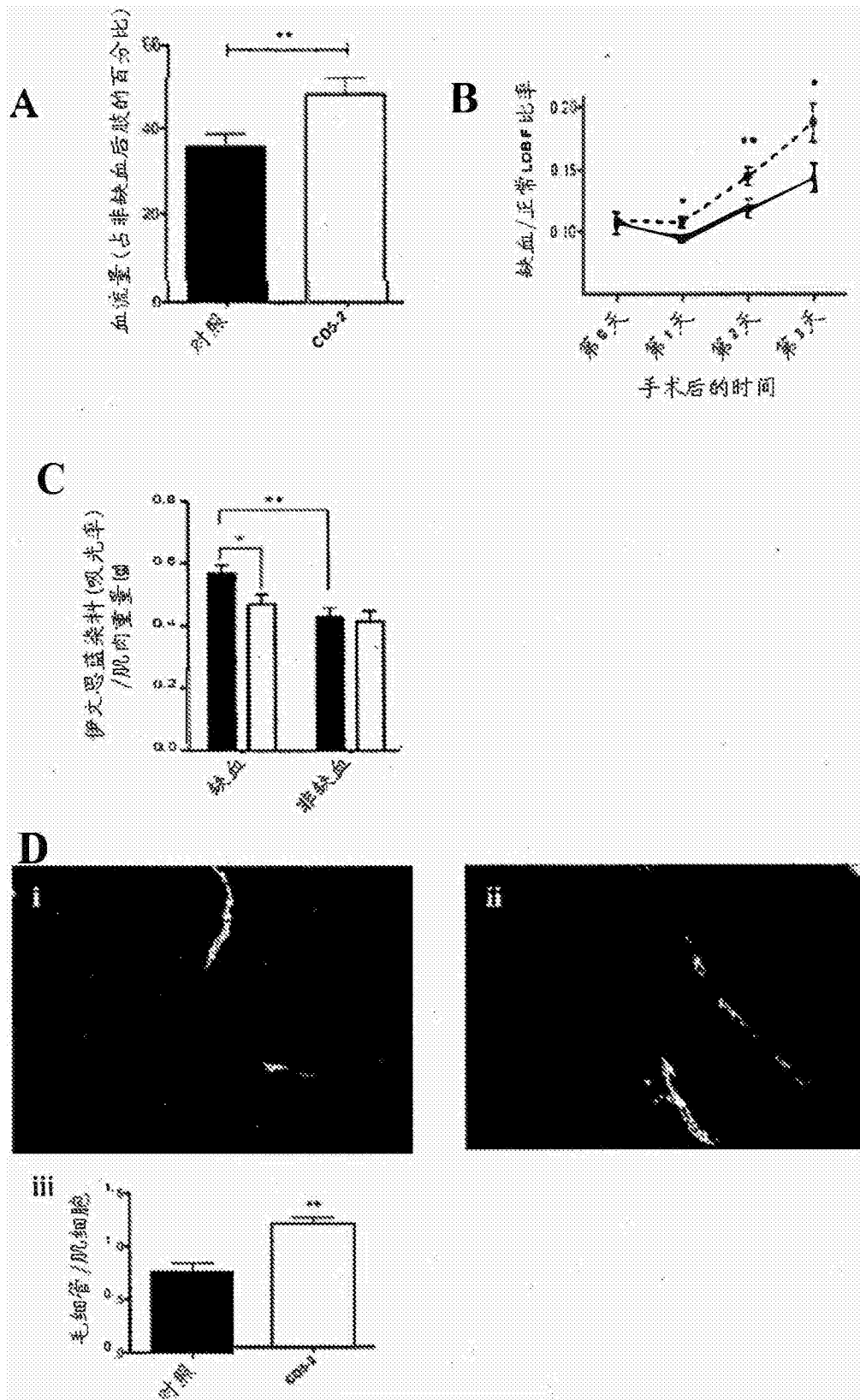


图6

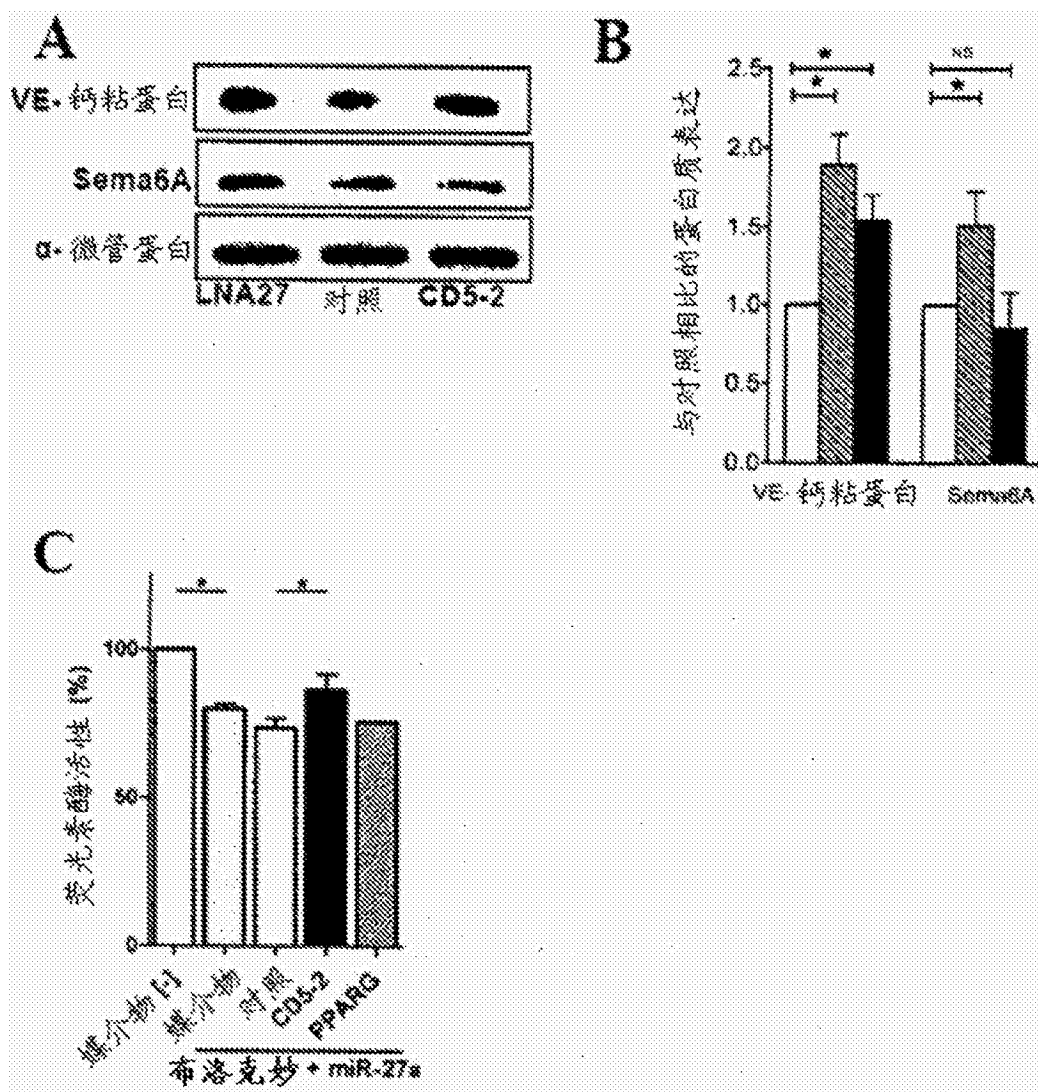


图7

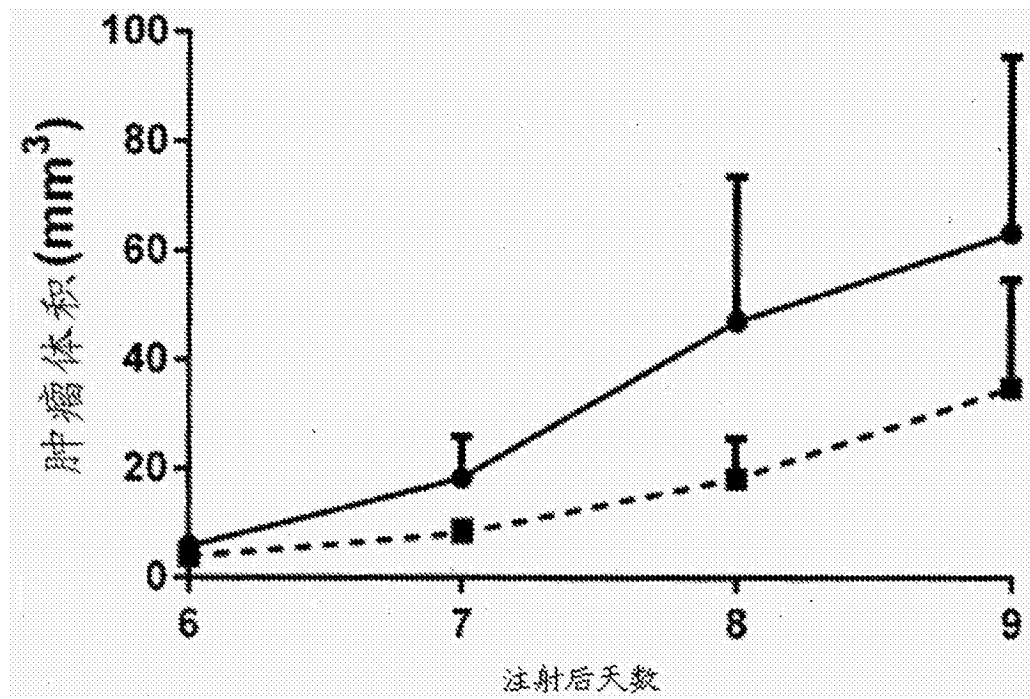


图8