202500167

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202500167 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：113121494 (22)申請日： 中華民國 113 (2024) 年 06 月 11 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/713 (2006.01)* *C12N15/113 (2010.01)*

C12N15/85 (2006.01) *A61P27/02 (2006.01)*

(30)優先權：2023/06/21 中國大陸 2023107418934

(71)申請人：天津醫科大學眼科醫院 (中國大陸) (CN)
中國大陸

(72)發明人：李筱榮 (CN) ；張曉敏 (CN) ；張慧 (CN) ；于欣悅 (CN)

(74)代理人：朱世仁

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：84 共 94 頁

(54)名稱

miR-15a-5p 在治療眼底疾病中的應用

(57)摘要

本發明屬於生物醫藥技術領域，具體涉及 miR-15a-5p 或修飾的 miR-15a-5p 在治療眼底疾病中的應用。所述 miR-15a-5p 或修飾的 miR-15a-5p 具有生物活性，可在體外被細胞吸收，或者在體內被視網膜細胞吸收，並迅速發揮生物學作用。通過局部給藥的方式，所述 miR-15a-5p 或修飾的 miR-15a-5p 可以抑制病理性新生血管、促進無灌注區恢復、減少視網膜炎症因數表達、減輕視網膜纖維化並促進神經損傷修復。在生物醫藥領域中具有非常好的應用和研究價值。

指定代表圖：

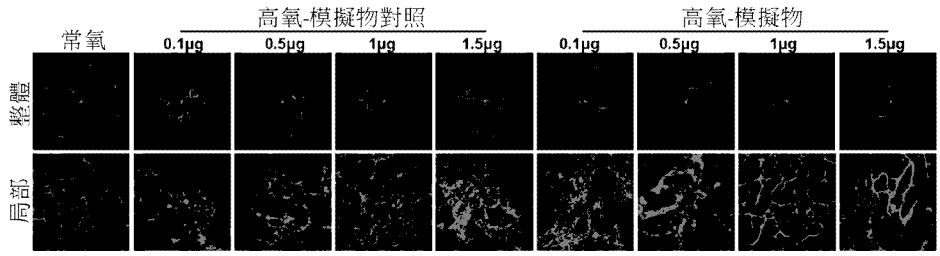


圖 15

【發明摘要】

【中文發明名稱】　miR-15a-5p在治療眼底疾病中的應用

【中文】

本發明屬於生物醫藥技術領域，具體涉及miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p在治療眼底疾病中的應用。所述miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p具有生物活性，可在體外被細胞吸收，或者在體內被視網膜細胞吸收，並迅速發揮生物學作用。通過局部給藥的方式，所述miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p可以抑制病理性新生血管、促進無灌注區恢復、減少視網膜炎症因數表達、減輕視網膜纖維化並促進神經損傷修復。在生物醫藥領域中具有非常好的應用和研究價值。

【指定代表圖】　圖15

【發明說明書】

【中文發明名稱】　miR-15a-5p在治療眼底疾病中的應用

【技術領域】

【0001】本發明涉及生物醫藥技術領域，具體涉及miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p在治療眼底疾病中的應用。

【先前技術】

【0002】眼底是眼球最重要的生理結構，包括脈絡膜、視網膜和玻璃體等。其中視網膜遍佈了血管及神經，是承擔視覺功能的主要結構，具有重要的生理作用。血糖升高或者缺氧等致病因素會導致視網膜損傷，造成視力的下降。例如早產兒視網膜病變（ROP）是常見於早產兒的致盲性眼底疾病，其病理機制為新生兒吸氧導致的視網膜血管退化以及持續大量的新生血管生成。在新生兒視網膜發育過程中血管的異常同時導致神經的變性及退化，極大的影響了嬰幼兒的視網膜發育。目前的治療方法為玻璃體腔注射抗血管內皮生長因數（VEGF）的單抗類藥物，但是其靶點單一，無法改善視網膜的神經變性以及降低視網膜炎症水準；而且由於VEGF是重要的神經營養因數，使用抗VEGF治療反而可導致視網膜神經細胞進一步損害和視網膜功能下降。而在勞動年齡發病率較高的糖尿病視網膜病變（DR）也是以新生血管和神經變性為主要特徵的微血管疾病。其致病因素為持續升高的血糖，但後續病理機制較為複雜。現有的治療方法為在非增殖期採取鐳射光凝破壞視網膜周邊部以減少血管滲漏以及降低視網膜耗氧量，但是鐳射療法具有一定的破壞性，並不能完全阻止新生血管

的發生。而在增殖期一般採取玻璃體腔注射抗VEGF單抗類藥物抑制新生血管或者進行玻璃體切割手術。如前所述，抗VEGF治療無法改善視網膜神經損傷和功能。

【0003】 MicroRNA（miRNA）是一類由內源基因編碼的長度約為22個核苷酸的非編碼單鏈RNA分子，它們在動植物中參與轉錄後基因表達調控。主要特點為人體天然存在，多靶向調控，生物學功能豐富。其中，miR-15a-5p與多種疾病的發生和發展密切相關。

【0004】 專利文獻：CN112575088B公開了一種血漿外泌體miRNA生物標記物在製備子宮內膜癌篩查診斷的試劑盒中的應用，所述生物標記物為miR-15a-5p，miR-106b-5p和miR-107的組合。

【0005】 專利文獻:CN109414459B公開了包含miR-15a-5p等等的外泌體可以促進傷口癒合。

【0006】 專利文獻：CN113943800A公開了檢測外泌體miR-15a-5p的試劑在製備甲狀腺癌碘抵抗篩查試劑盒中的用途。

【0007】 專利文獻：CN110205377A公開了基於miRNA分子標記物進行提前評估川崎病風險的方法，miRNA分子標記物為miR-30c-5p、miR-26a-5p、miR-27a-3p、miR-15a-5p、miR-186-5p、let-7g-5p、miR-941、miR-92a-3p、miR-22-3p、miR-151a-3p、miR-140-3p、miR-199a-3p、miR-4433b-5p。

【0008】 目前現有技術對單一生物成分的miR-15a-5p在眼底疾病中的應用及機理研究較少。

【發明內容】

【0009】為彌補現有技術的不足，本申請展示了miR-15a-5p在治療眼底疾病的有效性，miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p具有生物活性，可在體外被細胞吸收，或者在體內被視網膜細胞吸收，並迅速發揮生物學作用。通過局部給藥的方式，所述miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p可以抑制病理性新生血管、促進無灌注區恢復、減少視網膜炎症因數表達、減輕視網膜纖維化並促進神經損傷修復。在生物醫藥領域中具有非常好的應用和研究價值。

【0010】具體方案如下：

【0011】本發明的第一方面，提供了一種miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p在製備治療和/或預防眼底疾病的產品中的應用。

【0012】所述的眼底疾病選自玻璃體病變、視網膜病變、視神經病變或脈絡膜病變中的一種或兩種以上。

【0013】優選的，所述的眼底疾病選自早產兒視網膜疾病、視網膜新生血管疾病、脈絡膜新生血管疾病或糖尿病視網膜病變中的一種或兩種以上。

【0014】所述的miR-15a-5p包含SEQ ID NO：1或與SEQ ID NO：1的核苷酸序列具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96、97%、98%、99%、99.5%或99.9%以上同源性或包含一個或多個核苷酸的取代、缺失或插入的核苷酸序列。

【0015】其中，SEQ ID NO：1為UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG。

【0016】所述的miR-15a-5p或其模擬物包含正義鏈和反義鏈。正義鏈為SEQ ID NO：1，反義鏈為CACAAACCAUUAUGUGCUGCUA（SEQ ID NO：6）。

【0017】所述的產品包含miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p和/或miR-15a-5p模擬物，或者，包含miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p和/或miR-15a-5p模擬物的載體（所述的載體可以為包裹或轉錄或表達miR-15a-5p的任何載體）。

【0018】所述的載體為病毒載體或非病毒載體。

【0019】優選的，所述病毒載體包括慢病毒載體、逆轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體、痘病毒載體或皰疹病毒載體中的一種或兩種以上。

【0020】優選的，所述的非病毒載體包括脂質體、脂質納米顆粒、聚合物、多肽、抗體、適配體或N-乙醯半乳糖胺中的一種或兩種以上。

【0021】所述的修飾的miR-15a-5p包括在鹼基上進行的修飾。

【0022】所述鹼基的修飾位於反義鏈。優選包括3'端進行膽固醇修飾、5'端兩個硫代骨架修飾、3'端四個硫代骨架修飾或全鏈甲氧基修飾中的一種或兩種以上。

【0023】所述的產品包含正義鏈和反義鏈。

【0024】優選的，所述的正義鏈和/或反義鏈上包含懸掛鹼基。

【0025】所述的懸掛鹼基位於正義鏈和/或反義鏈的3'末端。

【0026】所述的懸掛鹼基為去氧核苷。優選的，所述的懸掛鹼基為dTdT、dTdC或dUdU。例如，所述的miR-15a-5p或其模擬物包含的正義鏈可以為UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGdTdT（SEQ ID NO：7），反義鏈可以為CACAAACCAUUAUGUGCUGCUAdTdT（SEQ ID NO：8）。

【0027】miR-15a-5p或其模擬物包含的正義鏈和/或反義鏈經過全鏈甲氧基修飾、3'端膽固醇修飾、5'端硫代骨架修飾或3'端硫代骨架修飾中的一種或兩種以上。

【0028】在本發明的一個具體實施方式中，miR-15a-5p或其模擬物的反義鏈經過全鏈甲氧基修飾、3'端膽固醇修飾、5'端2個硫代骨架修飾和3'端4個硫代骨架修飾。

【0029】在本發明的一個具體實施方式中，所述的正義鏈為SEQ ID NO：1，所述的反義鏈為經5'端2個硫代骨架修飾，3'端4個硫代骨架修飾，3'端膽固醇修飾以及全鏈甲氧基修飾的SEQ ID NO：6。

【0030】所述的治療和/或預防眼底疾病選自抑制視網膜血管內皮細胞（HRMECs）活力、抑制HRMECs增殖（尤其是減弱VEGF誘導的HRMECs的增殖）、抑制Smad2的磷酸化、抑制總Smad2的表達、抑制纖維化、抑制VEGF的表達、抑制視網膜的炎症、抗新生血管或促進無灌注區的恢復、改善視網膜變薄、恢復視功能或促進神經損傷修復中的一種或兩種以上。

【0031】優選的，所述的抗新生血管包括抑制視網膜新生血管形成和/或脈絡膜新生血管形成。

【0032】所述的治療和/或預防眼底疾病包括向需要的受試者施用miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物和/或施用包含miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物的載體。

【0033】所述的施用部位可以為受試者的眼內空間或腔。例如前房中的房水、懸吊韌帶、睫狀體、睫狀體內和肌肉、晶狀體或虹膜、玻璃體、視網膜、脈絡膜或視神經等中的一種或兩種以上。

【0034】本發明的第二方面，提供了一種miR-15a-5p或其模擬物在製備TGF-β1/Smad2通路抑制劑中的應用。

【0035】所述的TGF-β1/Smad2通路抑制劑包括miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物，或者，包含miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物的載體。

【0036】本發明的協力廠商面，提供了一種包含轉錄為miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物的核酸的載體。

【0037】所述的miR-15a-5p包括SEQ ID NO：1。

【0038】能夠轉錄為miR-15a-5p的核酸包含TAGCAGCACATAATGGTTTGTG（SEQ ID NO：9）。

【0039】所述的修飾的miR-15a-5p包括在鹼基上進行的修飾。

【0040】所述鹼基的修飾位於反義鏈，包括3'端進行膽固醇修飾、5'端兩個硫代骨架修飾、3'端四個硫代骨架修飾或全鏈甲氧基修飾中的一種或兩種以上。

【0041】所述的miR-15a-5p或其模擬物包含正義鏈和反義鏈。

【0042】所述的正義鏈和/或反義鏈上包含懸掛鹼基。

【0043】所述的懸掛鹼基位於正義鏈和/或反義鏈的3'末端。

【0044】所述的懸掛鹼基為去氧核苷。

【0045】所述的懸掛鹼基為dTdT、dTdC或dUdU。

【0046】所述的載體為病毒載體或非病毒載體。

【0047】所述病毒載體包括慢病毒載體、逆轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體、痘病毒載體或皰疹病毒載體中的一種或兩種以上。

【0048】所述的非病毒載體包括脂質體、脂質納米顆粒、聚合物、多肽、抗體、適配體或N-乙醯半乳糖胺中的一種或兩種以上。

【0049】本發明的第四方面，提供了一種包含轉錄為miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物的核酸的載體在製備治療和/或預防眼底疾病的產品中的應用。

【0050】所述的miR-15a-5p包括SEQ ID NO：1。

【0051】能夠轉錄為miR-15a-5p的核酸包含TAGCAGCACATAATGGTTTGTG（SEQ ID NO：9）。

【0052】所述的修飾的miR-15a-5p包括在鹼基上進行的修飾。

【0053】所述鹼基的修飾位於反義鏈，包括3'端進行膽固醇修飾、5'端兩個硫代骨架修飾、3'端四個硫代骨架修飾或全鏈甲氧基修飾中的一種或兩種以上。

【0054】所述的miR-15a-5p或其模擬物包含正義鏈和反義鏈。

【0055】所述的正義鏈和/或反義鏈上包含懸掛鹼基。

【0056】所述的懸掛鹼基位於正義鏈和/或反義鏈的3'末端。

【0057】所述的懸掛鹼基為去氧核苷。

【0058】所述的懸掛鹼基為dTdT、dTdC或dUdU。

【0059】所述的載體為病毒載體或非病毒載體。

【0060】所述病毒載體包括慢病毒載體、逆轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體、痘病毒載體或皰疹病毒載體中的一種或兩種以上。

【0061】所述的非病毒載體包括脂質體、脂質納米顆粒、聚合物、多肽、抗體、適配體或N-乙醯半乳糖胺中的一種或兩種以上。

【0062】所述的眼底疾病選自玻璃體病變、視網膜病變、視神經病變或脈絡膜病變中的一種或兩種以上。

【0063】優選的，所述的眼底疾病選自早產兒視網膜疾病、視網膜新生血管疾病、脈絡膜新生血管疾病或糖尿病視網膜病變中的一種或兩種以上。

【0064】所述的治療和/或預防眼底疾病選自抑制HRMEC活力、抑制HRMEC增殖、抑制Smad2的磷酸化、抑制總Smad2的表達、抑制纖維化、抑制VEGF的表達、抑制視網膜的炎症、抗新生血管或促進無灌注區的恢復、改善視網膜變薄、恢復視功能或促進神經損傷修復中的一種或兩種以上。

【0065】優選的，所述的抗新生血管包括抑制視網膜新生血管形成和/或脈絡膜新生血管形成。

【0066】所述的治療和/或預防眼底疾病包括向需要的受試者施用包含轉錄為miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物的核酸的載體。

【0067】所述的施用部位可以為受試者的眼內空間或腔。例如前房中的房水、懸吊韌帶、睫狀體、睫狀體內和肌肉、晶狀體或虹膜、玻璃體、視網膜、脈絡膜或視神經等中的一種或兩種以上。

【0068】本發明的第五方面，提供了一種修飾的miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物。

【0069】所述的修飾的miR-15a-5p包括在鹼基上進行的修飾。

【0070】所述鹼基的修飾位於反義鏈。優選包括3'端進行膽固醇修飾、5'端兩個硫代骨架修飾、3'端四個硫代骨架修飾或全鏈甲氧基修飾中的一種或兩種以上。

【0071】所述的miR-15a-5p或其模擬物包含的正義鏈和/或反義鏈經過全鏈甲氧基修飾、3'端膽固醇修飾、5'端硫代骨架修飾或3'端硫代骨架修飾中的一種或兩種以上。

【0072】在本發明的一個具體實施方式中，miR-15a-5p或其模擬物的反義鏈經過全鏈甲氧基修飾、3'端膽固醇修飾、5'端2個硫代骨架修飾和3'端4個硫代骨架修飾。

【0073】在本發明的一個具體實施方式中，所述的正義鏈為SEQ ID NO：1，所述的反義鏈為經5'端2個硫代骨架修飾，3'端4個硫代骨架修飾，3'端膽固醇修飾以及全鏈甲氧基修飾的SEQ ID NO：6。

【0074】本發明的第六方面，提供了一種藥物或藥物組合物，所述的藥物或藥物組合物包括miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p和/或miR-15a-5p模擬物和/或上述協力廠商面所述的包含轉錄為miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物的核酸的載體，以及藥學上可接受的輔料。

【0075】所述的藥物或藥物組合物可以治療眼底疾病。

【0076】所述的藥物組合物還可以包含其他治療或預防眼底疾病的核酸、多肽、蛋白、化合物等或者降低副作用的核酸、多肽、蛋白、化合物等。

【0077】所述的藥物或藥物組合物可以採用任何合適的給藥途徑，例如胃腸道給藥（例如口服）或非胃腸道給藥（例如，靜脈內、肌內、皮下、皮內、器官內、鼻內、眼內、滴注、腦內、鞘內、透皮、直腸內等）途徑。

【0078】所述的藥物或藥物組合物可以為任何合適的劑型，例如經胃腸道給藥劑型或非經胃腸道給藥劑型，優選包括但不限於片劑、丸劑、粉劑、顆粒劑、膠囊劑、錠劑、糖漿劑、液體、乳劑、微乳劑、混懸劑、注射劑、噴霧劑、氣霧劑、粉霧劑、洗劑、軟膏劑、硬膏劑、糊劑、貼劑、滴眼劑、滴鼻劑、舌下片劑、栓劑、氣霧劑、發泡錠、滴丸劑、凝膠劑等等。

【0079】所述藥物或藥物組合物的各種劑型可以按照藥學領域的常規生產方法製備。

【0080】所述的藥物或藥物組合物可以含有重量比為0.01-99.5%（具體如，0.01%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%）的所述miR-15a-5p、修飾的miR-15a-5p、包含miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p的載體。

【0081】所述的藥物或藥物組合物可以為人用藥或獸用藥。

【0082】本發明的第七方面，提供了一種治療或預防眼底疾病的方法，所述的方法包括向有需要的受試者施用有效量的miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p和/或miR-15a-5p模擬物和/或包含miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物的載體和/或藥物組合物。

【0083】所述的治療和/或預防眼底疾病選自抑制HRMECs活力、抑制HRMECs增殖（尤其是減弱VEGF誘導的HRMECs的增殖）、抑制Smad2的磷酸化、抑制總Smad2的表達、抑制纖維化、抑制VEGF的表達、抑制視網膜的炎症、

抗新生血管或促進無灌注區的恢復、改善視網膜變薄、恢復視功能或促進神經損傷修復中的一種或兩種以上。

【0084】優選的，所述的抗新生血管包括抑制視網膜新生血管形成和/或脈絡膜新生血管形成。

【0085】優選的，所述的方法包括每隻眼施用0.5-5μg（例如0.5、1、2、3、4、5μg）的miR-15a-5p、修飾的miR-15a-5p、miR-15a-5p模擬物、包含miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p或miR-15a-5p模擬物的載體或上述的藥物或藥物組合物。

【0086】優選的，所述的方法包括施用至受試者的眼內空間或腔。例如前房中的房水、懸吊韌帶、睫狀體、睫狀體內和肌肉、晶狀體或虹膜、玻璃體、視網膜、脈絡膜或視神經等中的一種或兩種以上。

【0087】Agomir-15a-5p在體內實驗的驗證均與臨床上經典的Anti-VEGF藥物雷珠單抗雷珠單抗做對比。結果表明其抑制視網膜及脈絡膜新生血管的作用與雷珠單抗相當，優於雷珠單抗在於以下三點，一是抑制新生血管的同時促進視網膜血運恢復，減少視網膜無灌注區面積；二是具有視神經保護作用；三是具有抑制視網膜炎症因數及炎症介質的作用。

【0088】本發明所述的“藥學上可接受的”是指既不顯著刺激生物體也不抑制所施用的產品的活性物質的生物學活性及特性。

【0089】本發明所述的“藥學上可接受的輔料”，包括但不限於載體、賦形劑、稀釋劑、潤濕劑、填充劑、黏合劑、潤滑劑、崩解劑、抗氧化劑、緩衝劑、助懸劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑、矯味劑或防腐劑等中的一種或兩種以上。

【0090】本發明所述的“治療”表示在疾病已開始發展後減緩、中斷、阻止、控制、停止、減輕、或逆轉一種體徵、症狀、失調、病症、或疾病的進展或嚴重性，但不一定涉及所有疾病相關體徵、症狀、病症、或失調的完全消除。

【0091】本發明所述“有效量”是指在以單個或多個劑量給予至個體或器官之後提供所希望的治療或預防的本發明的miR-15a-5p、miR-15a-5p模擬物、修飾的miR-15a-5p、藥物或藥物組合物的量或劑量。

【0092】本發明所述的“預防”表示為了阻止或延遲疾病或病症或症狀在機體內的發生而實施的方式。

【0093】本發明所述的“受試者”可以為人或非人哺乳動物，所述的非人哺乳動物可以為野生動物、動物園動物、經濟動物、寵物、實驗動物等等。優選的，所述的非人哺乳動物包括但不限於豬、牛、羊、馬、驢、狐、貉、貂、駱駝、狗、貓、兔、鼠（例如大鼠、小鼠、豚鼠、倉鼠、沙鼠、龍貓、松鼠）或猴等等。

【圖式簡單說明】

【0094】以下，結合附圖來詳細說明本發明的實施例，其中：

圖1：向視網膜血管內皮細胞分別轉染miR-15a-5p的模擬物對照/模擬物/抑制劑對照/抑制劑後，檢測視網膜血管內皮細胞中miR-15a-5p的表達量。模擬物可以增加細胞內miR-15a-5p的表達量，抑制劑可以減少細胞內miR-15a-5p的表達量。

圖2：不同濃度的VEGF刺激視網膜血管內皮細胞對細胞增殖的影響。10ng/ml的VEGF即可引起細胞異常增殖。

圖3：不同濃度的VEGF刺激視網膜血管內皮細胞對miR-15a-5p相對表達量的影響。10ng/ml的VEGF不會影響細胞內miR-15a-5p的表達量。

圖4：CCK-8試劑盒檢測miR-15a-5p對細胞增殖活力的影響。miR-15a-5p模擬物減弱VEGF誘導的視網膜血管內皮細胞病理性增殖。

圖5：細胞劃痕實驗檢測miR-15a-5p對細胞增殖能力的影響。

圖6：細胞劃痕定量統計分析，miR-15a-5p模擬物減少VEGF誘導的視網膜內皮細胞病理性增殖。

圖7：Transwell實驗檢測miR-15a-5p對細胞遷移能力的影響。

圖8：對Transwell實驗細胞遷移數量的定量統計分析，miR-15a-5p模擬物減少VEGF誘導的視網膜血管內皮細胞病理性遷移。

圖9：管腔形成實驗檢測miR-15a-5p對細胞體外成管能力的影響。

圖10：對管腔形成實驗細胞形成的血管管腔總長度的定量統計分析，miR-15a-5p模擬物減少VEGF誘導的視網膜血管內皮細胞血管管腔生成。

圖11：對管腔形成實驗細胞形成的血管管腔節點數的定量統計分析，miR-15a-5p模擬物減少VEGF誘導的視網膜血管內皮細胞血管管腔生成。

圖12：小鼠視網膜吸收修飾（Agomir）及未修飾（mimic）的miR-15a-5p模擬物的差異。*為模擬物（mimic）組與對照組比$P<0.05$，@為修飾的模擬物（Agomir）與對照組比$P<0.05$，#為模擬物（mimic）組與修飾的模擬物（Agomir）比$P<0.05$。

圖13：氧誘導的小鼠視網膜新生血管模型流程圖。P代表小鼠出生後的天數。

圖14：氧誘導的視網膜新生血管小鼠發育過程中視網膜miR-15a-5p的表達水準。常氧為未處理鼠，高氧為新生血管造模組。

圖15：不同劑量miR-15a-5p模擬物治療氧誘導的視網膜新生血管的作用。常氧為未處理鼠，高氧為新生血管造模組，模擬物為Agomir。

圖16：不同劑量miR-15a-5p模擬物治療氧誘導的視網膜新生血管的作用統計圖。常氧為未處理鼠，高氧為新生血管造模組，模擬物為Agomir，模擬物對照為亂序的Agomir。

圖17：1μg的miR-15a-5p模擬物治療氧誘導的視網膜新生血管的作用示意圖。常氧為未處理鼠，高氧為新生血管造模組，模擬物為Agomir，模擬物對照為亂序的Agomir，VEGF單抗為雷珠單抗。

圖18：1μg的miR-15a-5p模擬物治療氧誘導的視網膜新生血管的新生血管面積統計圖。常氧為未處理鼠，高氧為新生血管造模組，模擬物為Agomir，模擬物對照為亂序的Agomir，VEGF單抗為雷珠單抗。

圖19：1μg的miR-15a-5p模擬物治療氧誘導的視網膜新生血管的無灌注區面積統計圖。常氧為未處理鼠，高氧為新生血管造模組，模擬物為Agomir，模擬物對照為亂序的Agomir，VEGF單抗為雷珠單抗。

圖20：包含miR-15a-5p的腺相關病毒的結構示意圖。

圖21：包含miR-15a-5p的腺相關病毒感染視網膜的示意圖。

圖22：PCR結果顯示腺相關病毒感染視網膜後，視網膜miR-15a-5p過表達倍數。其中OIR-AAV-NC為注射對照病毒組，OIR-AAV-15a為注射包含miR-15a-5p的腺相關病毒。

圖23：包含miR-15a-5p的腺相關病毒對視網膜新生血管和無灌注區的治療效果示意圖。其中OIR-AAV-NC為注射對照病毒組，OIR-AAV-15a為注射包含miR-15a-5p的腺相關病毒。

圖24：包含miR-15a-5p的腺相關病毒對無灌注區的治療效果統計結果。

圖25：包含miR-15a-5p的腺相關病毒對氧誘導的視網膜新生血管的治療效果統計結果。

圖26：鐳射誘導的脈絡膜新生血管模型流程圖。

圖27：眼底螢光造影（FFA）觀察miR-15a-5p抑制脈絡膜新生血管作用。

圖28：對滲漏的螢光進行定量分析結果。

圖29：脈絡膜鋪片行IB4染色以定量新生血管簇的面積察miR-15a-5p抑制脈絡膜新生血管作用。IB4陽性示新生血管團簇。

圖30：對新生血管團簇進行定量分析結果。

圖31：包含miR-15a-5p的腺相關病毒感染視網膜脈絡膜的螢光示意圖。

圖32：PCR結果腺相關病毒感染視網膜脈絡膜後，視網膜和脈絡膜miR-15a-5p過表達倍數。其中CNV-AAV-NC為脈絡膜新生血管並且注射對照病毒組，CNV-AAV-15a為脈絡膜新生血管並且注射包含miR-15a-5p的腺相關病毒組。

圖33：脈絡膜鋪片行IB4染色以定量新生血管簇的面積觀察包含miR-15a-5p的腺相關病毒抑制脈絡膜新生血管的示意圖。

圖34：脈絡膜鋪片行IB4染色以定量新生血管簇的面積觀察包含miR-15a-5p的腺相關病毒抑制脈絡膜新生血管的統計結果圖。

圖35：在小鼠出生後第42天使用光學相干層析成像（OCT）量化視網膜各層厚度的示意圖，IPL代表內叢狀層，INL代表內核層，OPL代表外叢狀層，ONL代表外核層。常氧代表未處理小鼠，高氧代表氧誘導的視網膜新生血管模型鼠。

圖36：在小鼠出生後第42天使用光學相干層析成像（OCT）量化視網膜各層厚度的地形圖。常氧代表未處理小鼠，高氧代表氧誘導的視網膜新生血管模型鼠。

圖37：在小鼠出生後第42天使用光學相干層析成像（OCT）量化視網膜各層厚度的統計結果，確定miR-15a-5p對視網膜結構的保護作用。常氧代表未處理小鼠，高氧代表氧誘導的視網膜新生血管模型鼠。

圖38：在小鼠出生後25天及42天使用視網膜電生理檢查（ERG）分析視網膜功能的示意圖。常氧代表未處理小鼠，高氧代表氧誘導的視網膜新生血管模型鼠。

圖39：在小鼠出生後25天及42天使用視網膜電生理檢查（ERG）分析視網膜功能的統計結果圖，確認miR-15a-5p對視網膜功能的保護作用。常氧代表未處理小鼠，高氧代表氧誘導的視網膜新生血管模型鼠。

圖40：視網膜H&E染色示視網膜層間結構及細胞形態。星號表示外叢狀層。GCL代表神經節細胞層，IPL代表內叢狀層，INL代表內核層，OPL代表外叢狀層，ONL代表外核層，RPE代表色素上皮層。常氧代表未處理小鼠，高氧代表氧誘導的視網膜新生血管模型鼠。

圖41：視網膜脈絡膜H&E染色示視網膜脈絡膜層間結構及細胞形態。GCL代表神經節細胞層，IPL代表內叢狀層，INL代表內核層，OPL代表外叢狀層，ONL代表外核層，RPE代表色素上皮層。

圖42：使用視網膜電生理檢查（ERG）分析視網膜功能的示意圖。

圖43：使用視網膜電生理檢查（ERG）分析視網膜功能的統計結果圖。

圖44：酶聯免疫吸附實驗（ELISA）檢測不同時間點氧誘導的視網膜病變小鼠視網膜中TNFα的含量。

圖45：Western Blot示氧誘導視網膜病變各組小鼠視網膜細胞間黏附分子1(ICAM-1)表達量示意圖。

圖46：Western Blot示氧誘導視網膜病變各組小鼠視網膜細胞間黏附分子1(ICAM-1)表達量統計結果。

圖47：PCR結果示鐳射誘導的各組小鼠視網膜炎症因數水準。A圖為TNFα，B圖為ICAM-1，C圖為IL-1β。

圖48：miR-15a-5p靶向VEGF的鹼基互補配對圖。

圖49：PCR結果顯示miR-15a-5p可以減少TGF-β1引起的RPE細胞中VEGF的mRNA水準。

圖50：Western Blot示miR-15a-5p可以減少TGF-β1引起的RPE細胞中VEGF的蛋白水準升高示意圖。

圖51：Western Blot示miR-15a-5p可以減少TGF-β1引起的RPE細胞中VEGF的蛋白水準升高統計結果。

圖52：Elisa示miR-15a-5p可以減少TGF-β1引起的RPE細胞上清中VEGF的蛋白水準升高。

圖53：雙螢光素酶報告實驗顯示miR-15a-5p可以在體外與VEGF的mRNA靶向結合。其中pmirGLO載體為空載質粒，VEGF野生型為VEGF鹼基序列，突變型為結合區鹼基不同的VEGF鹼基序列。

圖54：玻璃體腔注射Agomir-15a-5p模擬物可以逆轉高氧誘導的小鼠視網膜VEGF表達水準增加。

圖55：玻璃體腔注射Agomir-15a-5p模擬物可以逆轉高氧誘導的小鼠視網膜VEGF表達水準增加。

圖56：玻璃體腔注射Agomir-15a-5p模擬物可以逆轉鐳射誘導的小鼠視網膜VEGF表達水準增加。

圖57：miR-15a-5p模擬物相較VEGF單抗可以更長時間抑制視網膜ERK磷酸化信號啟動。其中，A圖為示意圖，在出生後第12天進行玻璃體腔注射後，在P13、P14、P15、P17、P20、P25取材視網膜。B圖為P12時，高氧組小鼠視網膜ERK的磷酸化信號增強。C圖為P13時，VEGF單抗組視網膜ERK的磷酸化信號降低。D圖為P14時，miR-15a-5p模擬物組和VEGF單抗組視網膜ERK的磷酸化信號降低。E圖為P15時，miR-15a-5p類比物組視網膜ERK的磷酸化信號降低。F圖為P17時，miR-15a-5p類比物組視網膜ERK的磷酸

化信號降低。G圖為P20時，各視網膜ERK的磷酸化信號無明顯差異。H圖為P25時，各視網膜ERK的磷酸化信號無明顯差異。I圖、J圖、K圖、L圖、M圖、N圖、O圖分別為P12、P13、P14、P15、P17、P20、P25的統計結果。P圖為各組小鼠視網膜在不同時間點視網膜磷酸化ERK信號相對表達量。

圖58：miR-15a-5p與Smad2構成鹼基互補配對示意圖。

圖59：PCR結果顯示miR-15a-5p可以降低視網膜血管內皮細胞中Smad2的mRNA水準。

圖60：Western Blot結果顯示miR-15a-5p可以降低視網膜血管內皮細胞中Smad2的蛋白水準示意圖。

圖61：Western Blot結果顯示miR-15a-5p可以降低視網膜血管內皮細胞中Smad2的蛋白水準統計結果。

圖62：雙螢光素酶報告實驗顯示miR-15a-5p可以在體外與Smad2的mRNA靶向結合。其中pmirGLO載體為空載質粒，Smad2野生型為Smad2鹼基序列，突變型為結合區鹼基不同的Smad2鹼基序列。

圖63：轉染miR-15a-5p模擬物後，經TGF-β1刺激的視網膜血管內皮細胞纖維化標誌物α-SMA和CD31的免疫螢光染色結果圖。

圖64：轉染miR-15a-5p模擬物後，經TGF-β1刺激的視網膜血管內皮細胞波形蛋白的免疫螢光染色結果圖。

圖65：轉染miR-15a-5p模擬物後，經TGF-β1刺激的視網膜血管內皮細胞纖維化標誌物波形蛋白、α-SMA以及CD31的變化Western Blot示意圖。

圖66：轉染miR-15a-5p模擬物後，經TGF-β1刺激的視網膜血管內皮細胞纖維化標誌物波形蛋白、α-SMA以及CD31的變化Western Blot統計結果圖。

圖67：轉染miR-15a-5p模擬物後，經TGF-β1刺激的視網膜血管內皮細胞磷酸化-Smad2，總Smad2變化Western Blot示意圖。

圖68：轉染miR-15a-5p模擬物後，經TGF-β1刺激的視網膜血管內皮細胞磷酸化-Smad2，總Smad2變化Western Blot統計結果圖。

圖69：Western Blot結果示不同濃度的TGF-β2刺激Müller細胞後纖維化相關蛋白表達水準示意圖。

圖70：Western Blot結果示不同濃度的TGF-β2刺激Müller細胞後纖維化相關蛋白表達水準統計結果。

圖71：Western Blot結果示轉染miR-15a-5p模擬物及模擬物對照後，TGF-β2刺激Müller細胞後纖維化相關蛋白表達水準示意圖。

圖72：Western Blot結果示轉染miR-15a-5p模擬物及模擬物對照後，TGF-β2刺激Müller細胞後纖維化相關蛋白表達水準統計結果。

圖73：Western Blot結果示轉染miR-15a-5p模擬物及模擬物對照後，TGF-β2刺激Müller細胞後Smad2總蛋白及磷酸化水準示意圖。其中P-Smad2為磷酸化Smad2，T-Smad2為總Smad2。

圖74：Western Blot結果示轉染miR-15a-5p模擬物及模擬物對照後，TGF-β2刺激Müller細胞後Smad2總蛋白及磷酸化水準統計結果。其中P-Smad2為磷酸化Smad2，T-Smad2為總Smad2。

圖75：高氧誘導小鼠各組視網膜冰凍切片示α-SMA和視網膜血管的表達定位。

圖76：高氧誘導小鼠各組視網膜冰凍切片示纖維連接蛋白和視網膜血管的表達定位。

圖77：高氧誘導小鼠各組視網膜冰凍切片示α-SMA和視網膜活化的Müller細胞表達定位。其中GFAP示活化的Müller細胞。

圖78：Western Blot檢測示視網膜纖維化蛋白的表達。A圖示高氧誘導小鼠各組視網膜纖維連接蛋白表達情況。B圖為纖維蛋白表達水準統計結果。C

圖示高氧誘導小鼠各組視網膜TGFβ受體2蛋白和α-SMA蛋白表達情況。D圖為TGFβ受體2蛋白和α-SMA蛋白表達水準統計結果。E圖為高氧誘導小鼠各組視網膜磷酸化Smad2和總Smad2表達情況。F圖為視網膜磷酸化Smad2和總Smad2表達水準統計結果。

圖79：眼內給藥miR-15a-5p通過拯救星形膠質細胞為內皮頂端細胞的生長提供範本。其中A圖為各組視網膜血管分佈與星形膠質細胞形態。第一行顯示常氧組小鼠視網膜沒有無灌注區，高氧組小鼠使用模擬物治療組無灌注區最小。第一行顯示類比物對照以及VEGF單抗治療組小鼠視網膜無灌注區星形膠質細胞排列紊亂，而模擬物治療組的星形膠質細胞排列整齊。B圖為局部血管放大圖，類比物組血管頂端細胞發出細絲，而對照組和VEGF單抗組細絲較少（見箭頭）。C圖為血管和星形膠質細胞的雙染放大圖，常氧組星形膠質細胞與血管存在明顯攀附，模擬物對照組缺乏攀附，模擬物組血管頂端細胞與星形膠質細胞存在攀附（見箭頭），有利於血管生長，而VEGF單抗組也缺乏血管頂端細胞絲狀纏繞。

圖80：眼內給藥miR-15a-5p對氧誘導小鼠發育的安全性評估。其中，A圖示自給藥當天P12（出生後第12天）至小鼠基本成年P42（出生後42天），小鼠的體重變化。B圖示各組血漿顏色。C圖示小鼠血清肌酐水準。D圖示小鼠小鼠血清尿素水準。E圖示小鼠血漿甘油三酯水準。F圖示小鼠血漿總膽固醇水準。G圖和H圖示小鼠的出生後17天（P12），25天（P25），42天（P42）的肝臟及腎臟結構H&E染色。

圖81：眼內給藥miR-15a-5p對正常小鼠發育及視網膜的安全性評估。其中，A圖示自給藥當天P12（出生後第12天）至小鼠基本成年P42（出生後42天），小鼠的體重變化。B圖示小鼠血清肌酐水準。C圖示小鼠血清尿素水準。D圖示小鼠血漿甘油三酯水準。E圖示小鼠血漿總膽固醇水準。F圖示注藥後

不同時間點肝腎的螢光切片。G圖和H圖示小鼠的出生後17天（P12），25天（P25），42天（P42）的肝臟及腎臟結構H&E染色。I圖、J圖、K圖為OCT結果示玻璃體腔注射miR-15a-5p模擬物、模擬物對照以及VEGF單抗對視網膜厚度的影響。L圖、M圖為視網膜冰凍切片，示玻璃體腔注射miR-15a-5p模擬物、模擬物對照以及VEGF單抗後視網膜小膠質細胞的啟動情況。

圖82：在糖尿病鼠（瘦素受體缺乏模型鼠）中觀察了玻璃體腔注射miR-15a-5p模擬物對糖尿病鼠視網膜光感受器損傷和視網膜雙極細胞損傷的治療作用。其中a波代表光感受器細胞對光刺激的反應，b波代表雙極細胞對光刺激的反應。

圖83：在糖尿病鼠（瘦素受體缺乏模型鼠）中觀察了玻璃體腔注射miR-15a-5p模擬物對糖尿病鼠視網膜光感受器損傷的治療作用統計結果。其中a波代表光感受器細胞對光刺激的反應。

圖84：在糖尿病鼠（瘦素受體缺乏模型鼠）中觀察了玻璃體腔注射miR-15a-5p模擬物對糖尿病鼠視網膜雙極細胞損傷的治療作用統計結果。其中b波代表雙極細胞對光刺激的反應。

【實施方式】

【0095】下面將結合本發明實施例中的附圖，對本發明實施例中的技術方案進行清楚、完整地描述，顯然，所描述的實施例僅是本發明的部分實施例，而不是全部。基於本發明中的實施例，本領域普通技術人員在沒有做出創造性勞動前提下所獲得的所有其他實施例，都屬於本發明保護的範圍。

【0096】實施例中涉及的實驗方法如下：

【0097】1、miR-15a-5p對人視網膜血管內皮細胞的影響

【0098】1.1細胞培養

【0099】人視網膜血管內皮細胞（Human retinal microvascular endothelial cells，HRMEC）從angiopromie公司購買，將其在內皮細胞基本培養基（ECM）中與體積分數5%胎牛血清，體積分數1%青黴素-鏈黴素和內皮細胞生長補充劑（ECGS）一起培養。將細胞在37℃和體積分數5%的二氧化碳中孵育。每2天更換一次培養基。取第三至第六代細胞進行實驗。

【0100】1.2 CCK-8試劑盒檢測細胞增殖

【0101】使用Cell Counting Kit（CCK-8）CCK-8/WST-8試劑盒：消化細胞並製成單細胞懸浮液，以2000個/孔的密度於96孔板中接種，每組設置5個複孔，細胞貼壁後進行換液，加入目的培養基並在24小時檢測細胞活性。檢測前，每孔加入10μl CCK-8試劑，37℃避光孵育2h；然後將孵育後的培養基移到酶標板中，450nm處用BIO-RAD酶標儀測定的吸光度。

【0102】1.3細胞轉染

【0103】在96孔板中按2000個/孔的密度接種HRMECs，細胞培養箱中培養過夜。在2個EP管中分別加入5μl Opti-MEM培養基，再向第一管中加入0.15μl的Lipofectamine 3000試劑，第二管中加入0.15μl的模擬物對照/模擬物/抑制劑對照/抑制劑，將兩管液體混合，室溫孵育5min，之後將10μl的混合液加入一個孔中。配液時一般需要算出所有孔加液的總量，混合後逐個孔添加，而不要每個孔單獨配液避免誤差。其它的模擬物對照、抑制劑對照和抑制劑也用同樣的方法轉染入細胞，但抑制劑對照和抑制劑需要加入比類比物多一倍的量。

【0104】1.4細胞總RNA的提取

【0105】在細胞中加入500μl的Trizol，吹打後室溫靜置5min，加入100μl buffer A，劇烈震盪15s後室溫靜置3min，分層後4℃、15000g離心5min，吸取上層水相200μl於另一個1.5ml EP管中，加入1.5倍體積的無水乙醇，上下

顛倒，加至試劑盒(EZB公司，貨號EZB-RN5)提供的RNA吸附柱中，4000g離心1min，取出後倒掉收集管內的液體，將500μl的wash buffer 1液體加入離心柱然後12000g離心1min，離心直到所有液體都經過離心柱。之後向離心柱中加入500μl的wash buffer 2清洗緩衝液，12000g離心1min，取出後倒掉收集管內的液體，12000g離心1min，取出後倒掉收集管內的液體，將吸附柱換到新的1.5ml EP管中，開蓋晾2min，加入20μl DEPC水，12000g離心1min，將離心液再加入吸附柱中，室溫5 min，12000g離心1min，收集管中液體即總RNA，用Nano Drop測濃度。

【0106】 1.5逆轉錄

【0107】 按照下述的比例在200μl的EP管中加入試劑，其中RNA的體積根據RNA濃度不同而有所不同，RNA總量500ng，之後加gDNA remover 1μl混勻室溫存放5分鐘。按表1加入試劑。放入PCR儀中設置程式：37℃加熱15min，之後42℃加熱10min，之後95℃加熱3min，結束後將得到的cDNA迅速放置於冰上。

【0108】 表1

4× miRNA RT Buffer	5μl
miRNA RT Enzyme Mix	2μl
RNA	適量
DEPC 水	適量
總體積	20μl

【0109】 1.6qRT-PCR

【0110】 按照表 2 比例配製每孔中的反應液體，SYBR Green Master 與 cDNA 混合，上下游引物和水混合，cDNA 不足的部分用 RNeasy free water 補足，混勻後加入 384 孔板中。注意避光。加樣完成後貼上封板膜，4℃ 2000rpm 離心 3 分鐘，然後上機。程式設置為：第一步 95℃ 15 min，第二步 94℃ 15 s——55℃ 30 s——70℃ 30 s 並迴圈 40 次，第三步 95℃ 15 s——55℃ 15 s——95℃ 15 s。

sEVs 使用 U6 作為內參，血漿和玻璃體使用 cel-miR-39 作為外參。miRNA 的表達水準用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 來表示。各 miRNA 的引物序列見表 3。

[0111] 表 2

SYBR Green Master	4μl
上游引物	1μl
下游引物	1μl
cDNA	2μl
DEPC 水	2μl

[0112] 表 3

	正向引物	反向引物
U6	5’-CTCGCTTCGGCAGCACA-3’（SEQ ID NO：2）	5’-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3’（SEQ ID NO：3）
cel-miR-39	5’-ACACTCCAGCTGGGTCACCGGGTGTAAATCA-3’（SEQ ID NO：4）	5’-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCAAGCTGA-3’（SEQ ID NO：5）

[0113] 1.7 細胞劃痕實驗

[0114] 將 HRMECs 消化後接種於 6 孔板上，細胞融合度達到 75%-80%時分別轉染模擬物對照、模擬物、抑制劑對照和抑制劑，6h 後吸去含轉染試劑的培養基並用 1ml 槍頭在每孔細胞中央以相同的力度劃一道線，之後用 PBS 緩衝液清洗 2 次洗去脫落的細胞，鏡下拍照並保存，記錄拍照的地方以保證之後拍照都是同一個地方，24h 後再次拍照保存。同時用 image J 軟體分析計算劃痕的面積。

[0115] 1.8 Transwell 細胞遷移實驗

[0116] Transwell 細胞遷移實驗用於檢測 miR-15a-5p轉染後對細胞遷移能力的影響。預處理後，用胰蛋白酶消化 HRMECs，並將 8000 個細胞接種入小孔

上室，培養 24 小時後，用 PBS 洗滌三次。然後用 PFA 固定細胞並使用 0.01%結晶紫緩衝液染色細胞。在顯微鏡下隨機選擇 5 個視野，並計數發生遷移的細胞數量。

【0117】 1.9 內皮細胞管腔形成實驗

【0118】 將 Matrigel 基質膠（Corning 公司，貨號 354234）在 4℃下融化 12 小時，在 48 孔細胞板的表層鋪適量的基質膠，為管腔形成提供支援。然後在 37℃下在固化 40 分鐘。預處理後，將 HRMECs 接種到塗有 Matrigel 的 48 孔板中。3 小時後，使用反相顯微鏡採集每個孔的五個區域。使用 image-J 軟體計算血管管腔的總長度和管腔節點個數。

【0119】 1.10 免疫螢光細胞染色

【0120】 預處理後，將 HRMECs 固定在 4%多聚甲醛中 15 分鐘，並在 PBS 中用 0.1Triton-X100（PBST）浸泡 15 分鐘。在室溫下用 5%牛血清白蛋白（BSA）封閉後，將細胞與一級抗體波形蛋白（1:300，Abcam，ab45939）、a-SMA（1:500，Abcam，ab124964）、CD31（1:150，Abcam，ab24590）在 4℃下孵育過夜。用 PBST 洗滌三次後。然後在室溫下將細胞與 Alexa fluorR 488 綴合的山羊抗兔 IgG H&L（1：1000 Abcam）孵育波形蛋白，與'Alexa fluorB-647 綴合的羊抗小鼠 IgG H&L（1：1000，Abcam。用 4，6-二氨基-2-苯基吲哚（1:500，Solarbio）標記細胞核。在共聚焦鐳射掃描顯微鏡（LSM800，蔡司德國）下觀察並拍攝細胞。

【0121】 2.miR-15a-5p 靶基因的篩選和驗證

【0122】 2.1.靶基因預測

【0123】 在三個資料庫 TargetScan, PITA, microRNAorg 中分別預測篩選出的差異 miRNA 的靶基因。

【0124】2.2 雙螢光素酶報告基因實驗

【0125】使用螢光素酶報告基因測定來驗證 Smad2 是否為 miR-15a-5p 的靶基因。雙螢光素酶報告質粒：構建了 pmIRGLO-Smad2 野生型和 pmIRGLO-Smad2 突變體，空載質粒作為對照質粒。將報告質粒與 miR-15a-5p 模擬物或亂序對照共轉染到 HEK-293 細胞中。轉染 48 小時後，根據雙螢光素酶報告物測定系統（Gene Pharma 公司，貨號 G06001）的步驟裂解細胞並收集上清液。TECAN Infinite 200（德國）用於檢測螢火蟲螢光素酶報告基因和雷尼拉螢光素酶報告基因的活性。螢火蟲螢光素酶的比率，以 Renilla 螢光素酶為相對螢光素酶活性。每個實驗重複 3 次。

【0126】3. 動物實驗操作

【0127】3.1 小鼠 OIR 模型的建立

【0128】C57BL/6J 小鼠用於建立氧誘導的新生血管性視網膜病變模型。新生小鼠和哺乳期雌性小鼠在乳鼠出生後第 7 天（P7）至第 12 天（P12）暴露於 75%氧氣中。第 12 天從氧艙中取出，放置於常氧中。由於缺氧會導致新生血管生成，在出生後第 17 天（P17），達到視網膜新生血管的高峰。其間伴隨視網膜炎症、神經損傷及纖維化改變。

【0129】3.2 小鼠玻璃體腔注藥

【0130】在第 12 天使用 34 號針頭（Hamilton，Reno，NV，United States）將濃度為 1μg 的經修飾的 miR-15a-5p 模擬物（Agomir）注射到小鼠玻璃體腔中。將相同數量的小鼠注射亂序的 Agomir 作為陰性對照組。或者，將 1μl 腺相關病毒注射到小鼠玻璃體腔中，滴度為 1×10^{12}。注射後使用抗生素凝膠覆蓋眼表防止角膜水腫。

【0131】3.3 小鼠視網膜對修飾及未修飾的 miR-15a-5p 的吸收差異

【0132】雄性 6 周齡的 C57BL/6J 小鼠用於該實驗，麻醉後使用 34 號針頭（Hamilton，Reno，NV，United States）將濃度為 1μg（Genepharma 公司）的未經修飾的 miR-15a-5p 模擬物（mimics）或者經修飾的 miR-15a-5p

模擬物（Agomir）注射到小鼠玻璃體腔中，將相同數量的小鼠注射 PBS 作為陰性對照組。在注射後 8 小時，24 小時，48 小時，5 天和 7 天取視網膜進行 miR-15a-5p 水準的檢測。

【0133】3.4 視網膜鋪片

【0134】在 P17 處死 OIR 小鼠，取出其眼球。剝離視網膜，用 4%多聚甲醛固定，並切成 4 個放射狀瓣。使用山羊血清封閉 2 小時，使用 IB4（Thermo，貨號 I21411）或者 GFAP 進行視網膜血管染色。清洗 5 小時後，使用羊抗兔 IgG（Abcam 150077）作為二抗進行染色，清洗 5 小時後使用抗螢光衰減封片劑進行封片。使用共焦鐳射掃描顯微鏡（LSM800，德國蔡司）拍攝視網膜血管圖像。使用 Photoshop 進行新生血管和無灌注區的量化分析。

【0135】3.5 組織免疫螢光染色。

【0136】將眼球解剖並在包埋膠中快速冷凍。將視網膜切片（8μm），並在室溫下在 4%多聚甲醛中固定 20 分鐘。然後在 4℃下分別與抗膠質纖維酸性蛋白（GFAP）抗體（Abcam，貨號 ab7260）α-SMA（Abcam，貨號 ab1224964），Fibronectin（Abcam，貨號 ab45688），IB4（Thermo，貨號 I21411）孵育過夜。用 PBS 洗滌三次後，將視網膜切片與 Alexa Fluor 488 綴合的 IgG（Abcam，貨號 ab150077）孵育 2 小時，用 PBS 洗滌三次後，用 4，6-二氨基-2-苯基吲哚（1:500，Solarbio）標記細胞核。用 PBS 洗滌三次後滴加抗螢光衰減封片劑，用蓋玻片密封。然後用共焦鐳射掃描顯微鏡（LSM800，德國蔡司）對它們進行拍照。

【0137】3.6TUNEL 分析

【0138】根據製造商的說明，使用 TUNEL 系統（Roche，貨號 11684795910）對視網膜冷凍切片進行 TUNEL 測定。

【0139】3.7 蛋白質印跡分析

【0140】經 BCA 定量後，取等量的蛋白樣品，加入 PBS 定容到 20μl，加入 5 μl 蛋白上樣緩衝液（5×），95℃加熱，5 分鐘。蛋白電泳條件為 100V，90min。電轉條件為 100V，100min。將電轉後的 PVDF 膜取出，封閉，過夜孵育一抗。

棄去一抗，洗滌 3 次。加入二抗，室溫搖床孵育 2 小時。棄去二抗，加入 TBST，洗滌 3 次，每次 10 分鐘。使用 ECL 超敏發光液進行顯影。

【0141】3.8 組織病理學和免疫組織化學

【0142】在 P17 從安樂死小鼠中摘除眼睛，在 P25 和 P42 脫頸處死小鼠，取腎臟，肝臟進行固定。使用蘇木精和伊紅（H&E）方案對標本進行染色，並使用光學顯微鏡進行成像。

【0143】3.9 視網膜電圖（ERG）

【0144】小鼠暗適應 18 小時，按照說明書（Phoenix Micron VI）進行操作，並以 0.01 至 1 cd-s/m 的範圍發出白光閃光。使用陷波濾波來降低 60 Hz 的信號雜訊；將低切濾波設置為 0.3 Hz；將高切濾波設置在 500 Hz。測量 a 波和 b 波的振幅。麻醉小鼠使用帶有加熱墊，並根據需要用一滴平衡鹽水溶液濕潤眼睛。

【0145】3.10OCT

【0146】使用德國海德堡 SPECTRALIS-OCT 觀察小鼠眼底結構改變情況。使用托吡卡胺以滴眼液對小鼠雙眼進行散瞳，待小鼠進入麻醉平穩期後，在小鼠眼部塗抹玻璃酸鈉凝膠，進行視網膜掃描。掃描圖像以小鼠視訊光碟為中心，進行視網膜全層厚度的掃描。

【0147】3.11 鐳射誘導的小鼠脈絡膜新生血管的模型建立

【0148】雄性 6 周齡的 C57BL/6J 小鼠用於該實驗，麻醉後散大瞳孔，使用 Phoenix 鐳射發射器對準視網膜進行鐳射照射，破壞視網膜色素上皮層及脈絡膜。7 天后由脈絡膜發出新生血管侵襲視網膜。

【0149】3.12 小鼠視網膜下注藥

【0150】雄性 6 周齡的 C57BL/6J 小鼠用於該實驗，麻醉後散大瞳孔，使用 34 號針頭（Hamilton，Reno，NV，United States）從角鞏膜緣進針，挑起視網膜將 1μl 腺相關病毒注射到小鼠視網膜下，滴度為 1×10^{12}。注射後使用抗生素凝膠覆蓋眼表防止角膜水腫。

【0151】3.13 眼底照相及眼底螢光造影

【0152】取鐳射誘導的新生血管模型鼠，麻醉後散大瞳孔，在透明凝膠的幫助下，使用 Phoenix 眼底鏡頭對準視訊光碟中心進行拍照。隨後經腹腔注射 10%螢光素鈉（5mL/kg），10 分鐘後，在暗場濾鏡下進行眼底照相顯示滲漏斑。

【0153】3.14 脈絡膜新生血管量化

【0154】在成模後 7 天脫頸處死 OIR 小鼠，取出其眼球。剝離脈絡膜，用 4%多聚甲醛固定，並切成 4 個放射狀瓣。使用山羊血清封閉 2 小時，使用 IB4（Thermo，貨號 I21411）進行脈絡膜血管染色。清洗 5 小時後，使用抗螢光衰減封片劑進行封片。使用共焦鐳射掃描顯微鏡（LSM800，德國蔡司）拍攝脈絡膜血管圖像。使用 Photoshop 進行新生血管量化分析。

【0155】4. 眼內注射 miR-15a-5p 對小鼠發育的安全性評估

【0156】4.1 血液本的採集

【0157】眼球後採集血樣，通過 2000g 離心 15 分鐘，分離血清，然後在-80℃下儲存。將肝臟、脾臟、大腦、腎臟解剖出來。

【0158】4.2 組織病理學檢測

【0159】將主要器官樣品（肝臟、脾臟、腎臟）用 4%中性緩衝多聚甲醛固定 24 小時，將樣品石蠟包埋，在 3μm 處切割並用蘇木精和伊紅染色。使用奧林巴斯 BX51 顯微鏡和奧林巴斯 DP71 CCD 相機（日本東京奧林巴斯公司）拍攝顯微照片。

【0160】4.3 血清生化參數的測定

【0161】通過市售檢測試劑盒測定肌酐（Elabscience，貨號 EBCK188M、尿素氮（Elabscience，貨號 EBCK183M）、甘油三酯（Elabscience，貨號 EBCK126M）、總膽固醇（Elabscience，貨號 EBCK109S）的血清濃度。根據製造商的說明計算每個參數的濃度。

【0162】另外，文本中使用的試劑來源：

【0163】Mimics（miR-15a-5p 模擬物）購自上海吉瑪製藥技術有限公司，貨號 B02001；

【0164】Agomir（Agomir-15a-5p 模擬物）購自上海吉瑪製藥技術有限公司，貨號 B06001；結構為：正義鏈為 SEQ ID NO：1，反義鏈為 SEQ ID NO：6 再進行 5'端 2 個硫代骨架修飾，3'端 4 個硫代骨架修飾，3'端膽固醇修飾以及全鏈甲氧基修飾。

【0165】Inhibitor（miR-15a-5p 抑制劑）購自上海吉瑪製藥技術有限公司，貨號 B03001；

【0166】Smad2-WT 載體購自上海吉瑪製藥技術有限公司，貨號 C09005-36176；

【0167】Smad2-mut 載體購自上海吉瑪製藥技術有限公司，貨號 C09006-36176。

【0168】VEGF-WT 載體購自上海吉瑪製藥技術有限公司，貨號 C09005-56969；

【0169】VEGF-mut 載體購自上海吉瑪製藥技術有限公司，貨號 C09006-56969。

【0170】腺相關病毒購自上海吉瑪製藥技術有限公司，貨號 D08001。

【0171】實施例 1：向視網膜血管內皮細胞轉染 miR-15a-5p 的模擬物或抑制劑可以分別升高和降低 miR-15a-5p 的表達水準

【0172】miRNA 的模擬物和抑制劑可以在體外類比其生物學作用，miR-15a-5p 的模擬物是體外合成的 miR-15a-5p 的鹼基序列，miR-15a-5p 的抑制劑是體外合成的 miR-15a-5p 的鹼基互補序列。

【0173】miR-15a-5p 的模擬物：

【0174】正義鏈：UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG（SEQ ID NO：1）；

【0175】反義鏈：CACAAACCAUUAUGUGCUGCUA（SEQ ID NO：6）。

【0176】首先要確定使用 lipofectamine 3000 助轉染劑轉染 miR-15a-5p 的模擬物或抑制劑確實能夠升高或降低細胞中 miR-15a-5p 的表達水準。qRT-PCR 的結果顯示與類比物對照組（模擬物的亂序）相比，轉染 miR-15a-5p 的模擬物可以將細胞內 miR-15a-5p 的含量提高約 150 倍（圖 1），且差異有統計學意義（$P<0.05$）。與抑制劑對照組（抑制劑的亂序）相比，轉染 miR-15a-5p 抑制劑的細胞內 miR-15a-5p 的含量下降了 80%（圖 1），差異有統計學意義（$P<0.05$）。

【0177】視網膜及脈絡膜含有大量的血管，其中內皮細胞是維持血管通透性的重要細胞。因此選取視網膜內皮細胞（HRMECs）進行實驗具有代表性。實施例 1 表明在體外向 HRMECs 轉染 miR-15a-5p 的模擬物和抑制劑可以高表達或者降表達 miR-15a-5p，為後續觀察 miR-15a-5p 對細胞的作用提供研究基礎。

【0178】實施例 2：VEGF 刺激視網膜血管內皮細胞引起病理性增殖的最佳濃度

【0179】VEGF 是已知的誘導體內體外血管新生的強效因數，在早產兒視網膜病變，糖尿病視網膜病變，脈絡膜新生血管中具有較強的致病作用。在體外實驗中，VEGF 作用於 HRMECs 可以建立病理性增殖的模型。因此需要確定 VEGF 刺激的濃度。選擇了 0、10、20ng/mL 的 VEGF 分別刺激 HRMECs，CCK-8 檢測結果顯示 10ng/mL 以上濃度均可以引起 HRMECs 顯著增殖（圖 2），同時該濃度不會引起 HRMECs 中 miR-15a-5p 表達量發生變化（圖 3）。

【0180】實施例 3：miR-15a-5p 在體外對視網膜血管內皮細胞病理性增殖的治療作用

【0181】在確定 10ng/mL 的 VEGF 可引起 HRMECs 病理性增殖且 miR-15a-5p 表達水準不變後，繼續研究 miR-15a-5p 在生理及病理條件（10ng/mL 的 VEGF）下對 HRMECs 的作用。CCK-8 實驗是對細胞增殖分裂活力進行測定的常用方法，結果顯示，miR-15a-5p 模擬物可以降低 VEGF 引起的細胞異常增殖（圖 4）。細胞劃痕實驗結果顯示，miR-15a-5p 模擬物可以減弱 VEGF 誘導的

細胞增殖（圖 5-圖 6）。Transwell 實驗目的是觀察細胞的遷移能力，結果顯示 miR-15a-5p 模擬物可以減弱 VEGF 誘導的細胞異常遷移（圖 7-圖 8）。管腔形成實驗模擬的是細胞在體外形成管腔的能力，結果顯示 miR-15a-5p 模擬物可以減弱 VEGF 誘導的管腔增多（圖 9-圖 11）。以上差異均具有統計學意義（$P<0.05$）。

【0182】VEGF 可以在體內引起內皮細胞增殖，進而誘導新生血管的發育，新生血管不同於生理性血管，新生血管壁缺少緊密連接，其內物質通過管壁滲漏到視網膜及玻璃體中，造成眼底滲出及出血，極大的影響了正常的視功能。在體外向 HRMECs 轉染 miR-15a-5p 模擬物後，可以減少 VEGF 誘導的細胞異常增殖、遷移及管腔形成。這表明 miR-15a-5p 模擬物在體外對 HRMECs 的病理性增殖具有顯著的治療作用。

【0183】實施例 4：小鼠視網膜對修飾後的 miR-15a-5p 模擬物的吸收更好

【0184】常見的 miRNA 的模擬物為 mimic，其是由未經修飾的鹼基組成，在體外，細胞對其有良好的吸收效果。在體內實驗中，未經修飾的鹼基容易被體內無處不在的核酸酶降解，因此，本實施例採用修飾後的 miRNA，例如添加膽固醇等修飾。為對比視網膜對修飾及未修飾的模擬物的吸收效果，本實施例對比了小鼠在不同時間吸收同樣量 miR-15a-5p 模擬物的效率。其中，經修飾的模擬物為 Agomir。結果如圖 12 所示，注射模擬物 24 小時後，出現明顯差異，Agomir 具有良好的組織相容性，視網膜對 Agomir 的吸收效果為 mimic 的 2.5 倍，並且高水準持續至注射後第 7 天。因此在後續動物實驗中，選取 Agomir（Agomir-15a-5p）作為 miR-15a-5p 的模擬物進行體內注射。

【0185】實施例 5：miR-15a-5p 對高氧誘導的小鼠視網膜新生血管的治療作用

【0186】為探究 miR-15a-5p 對新生血管的作用，選擇了氧誘導視網膜病變（OIR）模型，模型構建流程圖見圖 13，該模型是最常用的視網膜新生血管模型，類比視網膜新生血管（RNV）形成的病理過程。在此過程中，選取生長發育的時間點，檢測視網膜中 miR-15a-5p 的表達水準，結果如圖 14 所示，在新生血管的高峰期，出生後 14 天和 17 天，miR-15a-5p 的表達水準升高，差異有統計學意義。隨後為探索 miR-15a-5p 對體內新生血管的作用，首先設置 Agomir-15a-5p 模擬物的濃度梯度，在出生後第 12 天注射不同劑量的模擬物和模擬物對照，在出生後第 17 天經 IB4 染色視網膜新生血管分析。結果表明 Agomir-15a-5p 對新生血管的抑制作用具有劑量依賴性（圖 15-圖 16），0.5μg-1.5ug 的 Agomir-15a-5p 模擬物可顯著抑制視網膜新生血管（圖 15-圖 16）。隨後選取 1μg 作為治療濃度進行進一步驗證，同時選取 VEGF 單抗作為陽性對照，結果表明 Agomir-15a-5p 模擬物可以降低視網膜新生血管至對照組的 65%（圖 17-圖 18）。相比於 VEGF 單抗，Agomir-15a-5p 模擬物還可以促進視網膜無灌注區的恢復，視網膜無灌注區的面積減少至對照組的 73%（圖 17 和圖 19）。

【0187】腺相關病毒是高效的基因遞送工具，使用腺相關病毒可以感染視網膜細胞，使其高表達 miR-15a-5p。其中，腺相關病毒攜帶的核酸序列為 TAGCAGCACATAATGGTTTGTG（SEQ ID NO：9），其可以在體內轉錄為 miR-15a-5p 後發揮治療作用。

【0188】在氧誘導小鼠出生後第五天，進行球內注射包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒（1×10^{12}）以及對照病毒（1×10^{12}）。病毒結構如圖 20 所示，在第 12 天取材視網膜，通過眼球冰凍切片觀察腺相關病毒感染的部位，圖 21 結果顯示包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒感染視網膜，視網膜出現彌散的螢光。隨後通過 PCR 檢測各組視網膜 miR-15a-5p 含量，結果如圖 22 所示，注射了包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒組視網膜的 miR-15a-5p 是對照組的 13 倍，說明該病毒可以成功過表達 miR-15a-5p。在出生後第 17 天對氧誘導小鼠的視網膜新生血管進行定量，結果顯示注射了包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒組視網膜新生血管和無灌注區明

顯減少（圖 23-圖 25）。以上結果表明包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒可以將 miR-15a-5p 成功遞送到小鼠視網膜細胞中，並且對高氧誘導的小鼠視網膜新生血管具有治療作用，可以促進無灌注區恢復。

【0189】實施例 5 採用了兩種方法遞送 miR-15a-5p，一種是經修飾的 miR-15a-5p，另一種是腺相關病毒。通過玻璃體腔注射兩種物質分別達到了使視網膜中 miR-15a-5p 含量升高的目的。採取的氧誘導視網膜病變模型，是經典的眼底疾病模型，可以類比多種眼底疾病，例如糖尿病視網膜病變和早產兒視網膜病變等疾病的新生血管表型。本實施例觀察了 miR-15a-5p 對該模型的新生血管和無灌注區的治療作用，發現 miR-15a-5p 對視網膜新生血管具有治療作用，並且可以促進無灌注區恢復。

【0190】實施例 6：miR-15a-5p 對鐳射誘導的小鼠脈絡膜新生血管的治療作用

【0191】MiR-15a-5p 對新生血管的抑制作用在脈絡膜新生血管模型中也進行了驗證。首先用鐳射誘導脈絡膜新生血管模型，模型構建流程如圖 26 所示，並向小鼠玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 的模擬物、模擬物對照和 VEGF 單抗。一周後，通過眼底螢光造影觀察到與對照組相比，Agomir-15a-5p 的模擬物及 VEGF 單抗組螢光滲漏面積明顯減少，提示二者可抑制脈絡膜新生血管的形成（圖 27-圖 28）。取脈絡膜新生血管小鼠的脈絡膜鋪片行 IB4 染色以定量新生血管簇的面積（圖 29），經統計，Agomir-15a-5p 的模擬物及 VEGF 單抗組兩組可明顯抑制脈絡膜新生血管簇的形成（圖 30）。

【0192】在脈絡膜新生血管模型中同樣採取如圖 20 所示的病毒進行 miR-15a-5p 的遞送。其中，腺相關病毒攜帶的核酸序列為 TAGCAGCACATAATGGTTTGTG（SEQ ID NO：9），其可以在體內轉錄為 miR-15a-5p 後發揮治療作用。

【0193】在小鼠進行造模前 7 天，進行視網膜下注射包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒（1×10^{12} 量）以及對照病毒（1×10^{12}）。在注射後的第 7 天取材視網膜，通過眼球冰凍切片觀察腺相關病毒感染的部位，圖 31 結果顯示包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒感染視網膜和脈絡膜，視網膜色素上皮層和脈絡膜出現彌散的螢光。隨後通過 PCR 檢測各組視網膜脈絡膜 miR-15a-5p 含量，結果如圖 32 所示，注射了包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒組視網膜脈絡膜的 miR-15a-5p 是對照組的 7 倍，說明該病毒可以成功感染視網膜和脈絡膜並過表達 miR-15a-5p。在鐳射誘導後的第 7 天進行小鼠視網膜新生血管定量，結果顯示注射了包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒組視網膜新生血管明顯減少（圖 33-圖 34）。以上結果表明包含 miR-15a-5p 的腺相關病毒可以將 miR-15a-5p 成功遞送到小鼠視網膜脈絡膜細胞中，並且對鐳射誘導的小鼠視網膜新生血管具有治療作用。

【0194】實施例 6 同樣採用了兩種方法遞送 miR-15a-5p，一種是經修飾的 miR-15a-5p，另一種是腺相關病毒。通過眼內注射兩種物質分別達到了使視網膜脈絡膜中 miR-15a-5p 含量升高的目的。採取的鐳射誘導脈絡膜新生血管模型，可以類比脈絡膜新生血管。本實施例觀察了 miR-15a-5p 對該模型的新生血管的治療作用，發現 miR-15a-5p 對脈絡膜新生血管具有治療作用。

【0195】實施例 7：miR-15a-5p 對氧誘導的小鼠視網膜結構和功能損傷的治療作用

【0196】實施例 5 表明 miR-15a-5p 可恢復 OIR 視網膜的早期血流灌注，這對視網膜神經細胞的營養及發育至關重要。本實施例繼續從視網膜厚度及視神經功能兩個方面進行 miR-15a-5p 對視網膜保護作用評估。首先通過光學相干層析成像 OCT 來量化視網膜各層厚度（圖 35-圖 36），結果顯示，Agomir-15a-5p 模擬物可明顯改善氧誘導小鼠的視網膜變薄，而 VEGF 單抗組視網膜厚度與未處理小鼠無明顯差異，無法改善氧誘導小鼠的視網膜變薄（圖 37）。視網膜電生理檢測（ERG）廣泛用於視網膜功能的評估，分別在早期（小鼠出生後 25 天）及晚期（小鼠出生後 42 天）觀察了 Agomir-15a-5p 模擬物對氧誘導小鼠視網膜

功能的治療作用（圖 38）。與未處理的常氧組相比，氧誘導各組小鼠視網膜的 a 波及 b 波振幅均降低。但氧誘導組視網膜經 Agomir-15a-5p 模擬物治療後均明顯增加了早期及晚期 a 波及 b 波振幅。而 VEGF 單抗對氧誘導小鼠視網膜的神經功能損傷無治療作用（圖 39）。採用 H&E 染色可以直觀的觀察到視網膜的結構改變，圖 40 顯示 Agomir-15a-5p 模擬物治療組小鼠視網膜結構完整，外叢狀層厚度正常，而 VEGF 單抗組小鼠外叢狀層明顯變薄。因此 Agomir-15a-5p 模擬物可明顯改善氧誘導小鼠視網膜結構和功能的損傷。

【0197】視網膜是神經組織的一部分，其主要功能為將光信號轉化為電信號並傳導至大腦。視網膜的結構是正常發揮視功能的基礎，視功能直接決定了患者的視力。各種眼底病變均伴隨視網膜結構和功能的損耗。本實施例採取的氧誘導的視網膜病變模型，在發病後出現明顯的視網膜變薄及電生理功能減弱，而眼內給藥 miR-15a-5p 後，視網膜結構和神經功能均有顯著改善，並且優於 VEGF 單抗組。

【0198】實施例 8：miR-15a-5p 對鐳射誘導的小鼠脈絡膜視網膜結構和功能損傷的治療作用

【0199】使用 H&E 染色評估視網膜層間結構、細胞形態和脈絡膜新生血管的病灶。結果如圖 41 所示，在對照組中，脈絡膜發出新生血管長入視網膜層下，視網膜局部隆起。Agomir-15a-5p 模擬物治療組隆起較少，病灶基本消失，VEGF 單抗組有少許病灶殘留。使用 ERG 評估脈絡膜新生血管小鼠視網膜電生理功能，結果如圖 42-圖 43 顯示，Agomir-15a-5p 模擬物治療組大幅改善脈絡膜新生血管小鼠視網膜功能損傷，VEGF 單抗組對視網膜功能損傷無顯著治療作用。

【0200】本實施例採取的鐳射誘導的脈絡膜視網膜損傷模型，在發病後也出現明顯的視網膜變薄及電生理功能減弱，而眼內給藥 miR-15a-5p 後，視網膜結構和神經功能均有顯著改善，並且優於 VEGF 單抗組。

【0201】實施例 9：miR-15a-5p 對高氧誘導和鐳射誘導的小鼠視網膜炎症的治療作用

【0202】氧誘導的小鼠視網膜病變伴隨炎症水準的增加，為探究 miR-15a-5p 對小鼠視網膜炎症的治療作用，在 P17、P25、P42 取視網膜檢測 TNFα 表達水準，圖 44 結果顯示，注射 Agomir-15a-5p 模擬物組小鼠在 P17 時 TNFα 蛋白表達水準降低，VEGF 單抗組對視網膜 TNFα 水準升高無治療作用。在 P25 和 P42 兩個時間點各組間無統計學差異。細胞間黏附分子 1 (ICAM-1)通常表達於內皮細胞和免疫細胞，對白細胞遷移和活化具有關鍵作用。氧誘導鼠視網膜 ICAM-1 表達水準升高，注射 Agomir-15a-5p 模擬物組小鼠 ICAM-1 表達水準降低（圖 45-圖 46）。鐳射誘導的小鼠眼底出現脈絡膜新生血管，該病變伴隨視網膜脈絡膜的炎症水準的增加。圖 47 結果顯示，注射 Agomir-15a-5p 模擬物可以降低鐳射誘導的各組小鼠視網膜炎症因數水準。而 VEGF 單抗組對鐳射誘導的各組小鼠視網膜炎症無治療作用。

【0203】眼底疾病常伴隨炎症因數的表達水準升高，導致視網膜脈絡膜疾病加重並遷延不愈。TNFα 和 IL-1 常是經典的致炎因數，募集炎症細胞聚集。ICAM-1 是內皮細胞黏附分子，可以募集白細胞黏附到內皮細胞表明，增加血管通透性。本實施例檢測了不同治療節點視網膜的炎症因數水準，結果表明眼內給藥 miR-15a-5p 可以明顯減少視網膜脈絡膜的炎症因數的表達水準。VEGF 單抗組並未顯示明顯的改善視網膜炎症的效果。

【0204】實施例 10：miR-15a-5p 靶向調節 VEGF

【0205】miR-15a-5p 是一段鹼基序列，其調控下游基因的方式為鹼基互補配對結合在目標基因的 RNA 上，阻礙目標基因翻譯為蛋白質的過程。本實施例通過體內體外實驗，觀察 miR-15a-5p 對 VEGF 的靶向調節作用。體外實驗使用未經修飾的 miR-15a-5p 模擬物（mimics），體內實驗使用經修飾的 miR-15a-5p 模擬物（Agomir）。通過鹼基互補配對發現 miR-15a-5p 可以與 VEGF 的 mRNA 特異性結合（圖 48），因此後續實施例分別在細胞和動物中進行驗證。視網膜

色素上皮（RPE）細胞是眼內 VEGF 的來源之一，已知 TGF-β1 可以在體外引起 RPE 細胞分泌的 VEGF 水準升高，因此向 RPE 細胞轉染 miR-15a-5p 模擬物，並使用 TGF-β1 誘導 VEGF 分泌，結果顯示，miR-15a-5p 可以減少 TGF-β1 誘導的 VEGF 表達增加，圖 49 示 VEGF mRNA 水準，圖 50-圖 51 示 VEGF 蛋白水準，圖 52 示 RPE 細胞上清中的 VEGF 蛋白水準。圖 53 示雙螢光素酶報告實驗，野生的 VEGF mRNA 可以與 miR-15a-5p 結合，突變型的 VEGF 無法與 miR-15a-5p 結合，因此螢光僅在結合了的組中發生淬滅，提示 miR-15a-5p 可以特異性調控 VEGF 轉錄。圖 54-圖 55 示玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物可以逆轉高氧誘導的小鼠視網膜 VEGF 表達水準增加。圖 56 示玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物可以逆轉鐳射誘導的小鼠視網膜 VEGF 的 mRNA 表達水準增加。

【0206】實施例 11：miR-15a-5p 相較 VEGF 單抗可以更長時間抑制視網膜 ERK 磷酸化信號啟動

【0207】miR-15a-5p 特異性結合 VEGF 的 mRNA 抑制 VEGF 轉錄。VEGF 單抗拮抗 VEGF 蛋白，二者原理不同。因此在對比二者療效時，可以選擇 VEGF 下游信號通路的啟動情況進行觀察。VEGF 與其受體 VEGFR2 特異性結合後，通過磷酸化 ERK 等信號通路，啟動內皮細胞增殖。因此選擇 ERK 磷酸化信號通路作為觀察指標。

【0208】注射及取材示意圖見圖 57 中 A 圖　。結果顯示，高氧誘導組小鼠在注射當天即 P12，視網膜出現磷酸化 ERK 信號增強（圖 57 中 B 圖和圖 57 中 I 圖）；在注射後第一天，即 P13，VEGF 單抗組小鼠視網膜磷酸化 ERK 信號首先出現降低趨勢（圖 57 中 C 圖和圖 57 中 J 圖）；在注射後第二天，即 P14，VEGF 單抗和 Agomir-15a-5p 類比物組均出現磷酸化 ERK 信號降低趨勢（圖 57 中 D 圖和圖 57 中 K 圖）；在注射後的第四天，即 P15，VEGF 單抗組 ERK 磷酸化信號恢復高水準，而 Agomir-15a-5p 類比物組保持磷酸化 ERK 信號降低趨勢，且二者之間存在統計學差異（圖 57 中 E 圖

和圖 57 中 L 圖）；新生血管的高峰期，P17 同 P15，Agomir-15a-5p 類比物組保持磷酸化 ERK 信號降低趨勢，VEGF 單抗組無抑制作用，且二者之間存在統計學差異（圖 57 中 F 圖和圖 57 中 M 圖）；新生血管恢復期即 P20 和 P25，各組視網膜之間磷酸化 ERK 信號無顯著差異（圖 57 中 G 圖、圖 57 中 H 圖、圖 57 中 N 圖和圖 57 中 O 圖）。在上述過程中 ERK 的總蛋白水準無明顯差異，因此將各時間段磷酸化 ERK 信號的相對變化做折線圖。圖 57 中 P 圖可以明顯看出，未治療組小鼠視網膜 ERK 的磷酸化信號自 P13 起升高，到 P17 逐漸降低，一直處於最高水準，VEGF 單抗組在 P13 相較於 Agomir-15a-5p 模擬物抑制 ERK 磷酸化程度更高，但自 P14 起，Agomir-15a-5p 模擬物抑制 ERK 磷酸化程度高於 VEGF 單抗，並在 P15 和 P17 和 VEGF 單抗組比較，差異有統計學意義。二者在 P17 時差距達到高峰，在 P20 和 P25 對 ERK 磷酸化均無抑制效果。這表明 miR-15a-5p 通過結合 VEGF 的 mRNA 能夠更持久的抑制 ERK 信號通路，從而減少病理性新生血管的生成。

【0209】實施例 12：miR-15a-5p 靶向調節 Smad2 減少視網膜內皮細胞間充質轉化

【0210】通過鹼基互補配對發現 miR-15a-5p 可以與 Smad2 的 mRNA 特異性結合（圖 58），因此後續實施例分別在細胞和動物中進行驗證。體外實驗使用未經修飾的 miR-15a-5p 模擬物（mimic），體內實驗使用經修飾的 miR-15a-5p 模擬物（Agomir）。首先在視網膜內皮細胞中轉染了 miR-15a-5p 的模擬物和抑制劑，經 PCR（圖 59）、Western Blot（圖 60-圖 61）實驗表明，miR-15a-5p 可抑制 Smad2 的 RNA 和蛋白表達水準，而 miR-15a-5p 的抑制劑可促進 Smad2 的 RNA 和蛋白表達水準。這提示 miR-15a-5p 可調節 Smad2 的表達。而為了確定 miR-15a-5p 與 Smad2 的直接結合，通過雙螢光素酶報告進行驗證（圖 62）。結果表明，與對照組相比，miR-15a-5p 模擬物顯著降低了 Smad2 野生型載體的螢光素酶活性，對突變型 Smad2 的螢光素酶活性沒有任何影響。因此，miR-15a-5p

通過結合 Smad2 3'UTR 抑制其轉錄及表達，即 Smad2 是 miR-15a-5p 的直接調控靶點。

【0211】在眼底疾病中，例如糖尿病視網膜病變，新生血管性視網膜疾病，脈絡膜新生血管，增殖性玻璃體視網膜病變等疾病都伴隨著視網膜纖維化的病理改變。而 Smad2 作為 TGF-β 信號通路中的一環，是典型的促纖維化通路蛋白。因此為了驗證 miR-15a-5p 能否通過抑制 Smad2 抑制視網膜纖維化的發生，使用 TGF-β1 刺激視網膜內皮細胞誘導內皮-間充質轉化（EndoMT）模型類比視網膜纖維化改變，並向細胞內轉染 miR-15a-5p 模擬物，觀察 miR-15a-5p 模擬物對 EndoMT 的抑制作用。

【0212】通過細胞免疫螢光染色（圖 63-圖 64）和 Western Blot（圖 65-圖 66）實驗可以直觀的觀察到，TGF-β1 刺激內皮細胞後，纖維化的標誌物波形蛋白和 α-SMA 表達明顯增高，而內皮細胞標誌物 CD31 表達降低。這表明 TGF-β1 誘導內皮細胞向纖維細胞轉化，也就是發生了 EndoMT。而轉染 miR-15a-5p 模擬物逆轉了 TGF-β1 誘導後波形蛋白、α-SMA 表達增高以及 CD31 表達降低。因此，miR-15a-5p 可以通過抑制 Smad2 的磷酸化及總 Smad2 的表達而逆轉 TGF-β1 所誘導的 EndoMT（圖 67-圖 68）。

【0213】實施例 13：miR-15a-5p 靶向調節 Smad2 減少視網膜 Müller 細胞纖維化

【0214】Müller 細胞是貫穿整個視網膜的一種特化的神經膠質細胞，具有維持視網膜的正常結構和功能的作用，還參與多種病理過程，尤其是眼底增殖性病變，如視網膜新生血管、糖尿病視網膜病變等，體外培養 Müller 細胞是研究這些增殖性眼底病變的途徑之一。TGF-β2 可以在體外刺激 Müller 細胞出現纖維化的表型。圖 69 和圖 70 結果顯示 1ng/mL 的 TGF-β2 可以引起 Müller 細胞活化伴隨纖維化相關蛋白表達水準升高。因此本實施

例採取 1ng/mL 的 TGF-β2 進行造模。向 Müller 細胞轉染了 miR-15a-5p 的模擬物及模擬物對照，隨後加入 1ng/mL 的 TGF-β2 進行共培養，結果顯示轉染了 miR-15a-5p 的模擬物的 Müller 細胞 GFAP 表達水準降低，纖維化相關蛋白表達水準降低（圖 71 和圖 72）。由於在視網膜內皮細胞中證實 miR-15a-5p 可以靶向調節 Smad2 減少 TGFβ 信號通路活化，因此在 Müller 細胞中進行驗證，圖 73 顯示轉染了 miR-15a-5p 的模擬物的 Müller 細胞總 Smad2 表達水準降低，磷酸化信號減弱（圖 74）。因此 miR-15a-5p 可以靶向調節 Smad2 表達減少視網膜 Müller 細胞纖維化。

【0215】實施例 14：miR-15a-5p 靶向調節 Smad2 減少高氧誘導小鼠視網膜纖維化趨勢

【0216】在高氧誘導小鼠玻璃體腔中注射 Agomir-15a-5p 模擬物，模擬物對照以及 VEGF 單抗。在 P17 取小鼠的眼球進行冰凍切片，並提其蛋白進行 Western Blot 檢測。圖 75 示 α-SMA 和視網膜血管在視網膜上的表達共定位情況，可見高氧小鼠對照組 α-SMA 表達水準更高，與血管共定位，而玻璃體腔中注射 Agomir-15a-5p 模擬物組 α-SMA 表達水準更低，視網膜共定位少。圖 76 示纖維連接蛋白和視網膜血管的表達定位，高氧小鼠對照組纖維連接蛋白表達水準更高，與血管共定位，而玻璃體腔中注射 Agomir-15a-5p 模擬物組纖維連接蛋白表達水準更低，視網膜共定位少，VEGF 單抗組纖維連接蛋白表達水準更高。圖 77 示 α-SMA 和視網膜活化的 Müller 細胞表達定位，其中 GFAP 示活化的 Müller 細胞。結果顯示高氧小鼠對照組和 VEGF 單抗組的 α-SMA 和視網膜活化的 Müller 細胞共定位更顯著。這表明 Agomir-15a-5p 模擬物可以抑制視網膜的纖維化趨勢，而 VEGF 單抗會加重視網膜的纖維化趨勢。Western Blot 檢測結果見圖 78，進一步證實 miR-15a-5p 可以減少視網膜纖維化蛋白的表達水準，減少視網膜纖維化改變。而 VEGF 單抗治療加重了視網膜纖維化病變。

【0217】實施例 15：miR-15a-5p 通過拯救星形膠質細胞為內皮頂端細胞的生長提供範本

【0218】氧誘導小鼠模型視網膜存在大量無灌注區，是由於高氧造成的視網膜血管退化，與糖尿病視網膜病變患者視網膜無灌注區類似。在視網膜發育過程中，星形膠質細胞為血管提供生長範本，血管頂端細胞發出細小的絲，攀附在星形膠質細胞上，發育成完整的血管。實施例 5 表明 miR-15a-5p 可以促進氧誘導小鼠視網膜無灌注區恢復，而 VEGF 單抗並不具備促進無灌注區恢復的效果。因此對氧誘導小鼠視網膜進行血管染色，同時染色星形膠質細胞。圖 79 中 A 圖顯示常氧組小鼠視網膜沒有無灌注區，高氧組小鼠使用模擬物治療組無灌注區最小。血管染色、星形膠質細胞的染色、模擬物對照以及 VEGF 單抗治療組小鼠視網膜無灌注區星形膠質細胞排列紊亂，無法為血管提供範本，而類比物治療組的星形膠質細胞排列整齊。圖 79 中 B 圖將血管進一步放大，可以明顯的觀察到模擬物組血管頂端細胞發出細絲，而對照組和 VEGF 單抗組細絲較少（箭頭）。圖 79 中 C 圖為血管和星形膠質細胞的雙染放大圖，在常氧組可以明顯觀察到星形膠質細胞與血管的攀附情況，類比物對照組缺少絲狀的星形膠質細胞（箭頭），因此血管無法正常生長，模擬物組血管頂端細胞與星形膠質細胞存在攀附，有利於血管生長，而 VEGF 單抗組也缺乏血管頂端細胞絲狀纏繞。

【0219】在臨床應用中，VEGF 單抗作為一線用藥，需要進行多次玻璃體腔注射，在接受多次注射後，患者存在周邊視野缺損，視網膜變薄，視功能下降等副作用。本實施例證實 miR-15a-5p 相較於 VEGF 單抗治療可以促進星形膠質細胞存活，為血管發育提供範本，加速無灌注區恢復，改善視網膜功能。

【0220】實施例 16：miR-15a-5p 對氧誘導小鼠發育的安全性評估

【0221】實施例 5 和實施例 7 確定了玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物對氧誘導小鼠的新生血管的治療作用後，應對其藥物安全性進行評估，以確定這種治療方案對小鼠的生長發育、代謝及重要臟器有無不良影響。圖 80 中 A 圖顯示自給藥當天 P12（出生後第 12 天）至小鼠基本成年 P42

（出生後 42 天），小鼠的體重變化。結果表明，從出生後 15 天開始常氧組小鼠的體重增長率明顯高於高氧的三組小鼠，但從給藥至成年，高氧的三組小鼠體重增長率無明顯差異（圖 80 中 A 圖），因此玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物不會對高氧組小鼠的生長發育產生不良影響。為進一步觀察玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物的安全性，分別在 P17、P25、P42 三個時間點收集小鼠的血清，檢測總膽固醇、甘油三酯、肌酐及尿素氮等指標，評估各組小鼠的肝腎功能。如圖 80 中 B 圖顯示，VEGF 單抗治療組小鼠血漿顏色與其餘各組顏色不同。說明 VEGF 單抗治療可能對小鼠脂代謝產生影響。如圖 80 中 C 圖顯示，與常氧組相比，在 P17 和 P25 兩個時間點顯示，高氧的三組小鼠血清肌酐水準明顯降低，但各組間無明顯差異，可能與體重較低有關。圖 80 中 D 圖表明，P17 時，與其他組相比，VEGF 單抗治療組的小鼠血清尿素水準明顯升高。P25 時，高氧對照組小鼠血清尿素水準明顯升高，Agomir-15a-5p 模擬物治療組與常氧組小鼠血清尿素含量無明顯差異。圖 80 中 E 圖顯示血漿甘油三酯結果，除 P17 時，VEGF 單抗治療組的小鼠血清甘油三酯水準明顯升高，其餘組間無明顯差異。圖 80 中 F 圖顯示總膽固醇的變化趨勢，在 P17 時，高氧組的總膽固醇水準表達均高於常氧組，但高氧組各組間無明顯差異。此外，使用 H&E 染色觀察了 P17、P25 及 P42 小鼠的肝臟及腎臟結構（圖 80 中 G 圖和圖 80 中 H 圖）。以上結果說明玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物不會對高氧組小鼠的生長發育、代謝及臟器產生不良影響。而 VEGF 單抗眼內注射會導致模型組小鼠血脂代謝異常。

【0222】 實施例 17：miR-15a-5p 對正常小鼠發育及視網膜的安全性評估

【0223】 按照上述治療方案對未造模的小鼠進行玻璃體腔注射。對各組小鼠進行體重檢測，發現從 P21 開始，VEGF 單抗組的體重呈下降趨勢，P24 時，體重下降顯著，與其餘三組差異有統計學意義，並持續至 P42。而 Agomir-15a-5p 模擬物不會對正常小鼠的體重造成影響（圖 81 中 A 圖）。同樣分別在 P17、P25、P42 三個時間點收集小鼠的血清，觀察肌酐（圖 81 中 B 圖）、尿素氮（圖 81 中 C 圖）、甘油三酯（圖 81 中 D 圖）和總膽固醇（圖 81 中 E 圖）等指標，評

估各組小鼠脂質代謝的肝腎功能。發現除 VEGF 單抗組在 P17 時甘油三酯水準較常氧組升高外，其餘均無差異，這表明 VEGF 單抗影響小鼠的甘油三酯代謝。玻璃體腔注射螢光分子（CY3）標記的 Agomir-15a-5p 模擬物後，取小鼠肝腎進行檢測，結果顯示肝腎無明顯螢光，表明 Agomir-15a-5p 模擬物未在肝腎殘留（圖 81 中 F 圖）。取小鼠腎（圖 81 中 G 圖）肝（圖 81 中 H 圖）的組織切片進行 H&E 染色，結果顯示無明顯異常。給未造模小鼠行玻璃體腔注藥，觀察玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物對正常小鼠的眼部及生長發育是否有副作用。OCT 結果顯示 Agomir-15a-5p 模擬物對視網膜厚度無影響，但是 VEGF 單抗組小鼠視網膜變薄（圖 81 中 I 圖、圖 81 中 J 圖、圖 81 中 K 圖）。經 GFAP 染色顯示，玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物不會引起膠質細胞的啟動（圖 81 中 L 圖、圖 81 中 M 圖）。這表明玻璃體腔注射 VEGF 單抗會導致小鼠發育遲緩，血脂代謝異常，視網膜變薄。

【0224】實施例 18：miR-15a-5p 對糖尿病鼠視網膜神經損傷的保護作用

【0225】糖尿病患者血糖水準較高，對神經系統產生不可逆損傷。糖尿病患者的視功能下降明顯，本實施例選取自發的糖尿病模型鼠（瘦素敲除鼠）作為視網膜神經變性的模型進行研究，觀察 miR-15a-5p 眼內注射對神經變性的保護作用。給 12 周齡的小鼠行玻璃體腔注射 Agomir-15a-5p 模擬物，給同樣數量的小鼠玻璃體腔注射模擬物對照。在 16 周使用視網膜電生理檢測糖尿病小鼠的視網膜功能。結果表明，Agomir-15a-5p 模擬物相較於其對照可以明顯改善糖尿病鼠視網膜光感受器細胞（圖 82-圖 83）和雙極細胞（圖 82 和圖 84）的振幅強度，即 Agomir-15a-5p 模擬物對糖尿病鼠視網膜神經損傷具有保護作用。

【0226】上述 18 個實施例中，實施例 1 和實施例 4 表明，未經修飾的 miR-15a-5p 或修飾的 miR-15a-5p 具有生物活性，可在體外被細胞吸收，或者在體內被視網膜細胞吸收，並迅速發揮生物學作用。實施例 2 和實施例 3

表明，在體外，miR-15a-5p 可以抑制病理性新生血管生成。實施例 5-9 表明，在體內，通過眼內給藥的方式，miR-15a-5p 可以抑制病理性新生血管、促進無灌注區恢復、減少視網膜炎症因數表達並促進神經損傷修復。VEGF 是經典的促新生血管生成因數，參與多種眼底疾病的進展。實施例 10 表明 miR-15a-5p 可以直接靶向調節 VEGF 的 mRNA 表達水準，實施例 11 進一步對比了 miR-15a-5p 與 VEGF 單抗在抑制視網膜新生血管信號通路的持久度，結果表明 miR-15a-5p 可以更持久的發揮抑制作用。在眼底疾病中，例如糖尿病視網膜病變，新生血管性視網膜疾病，脈絡膜新生血管，增殖性玻璃體視網膜病變等疾病都伴隨著視網膜纖維化的病理改變。而 Smad2 作為 TGF-β 信號通路中的一環，是典型的促纖維化通路蛋白。實施例 12-14 表明 miR-15a-5p 通過抑制 Smad2 抑制視網膜纖維化的發生。實施例 15 表明 miR-15a-5p 可以拯救星形膠質細胞，為血管頂端細胞提供範本，相較於 VEGF 單抗可以明顯促進無灌注區恢復，血管的灌注對於神經細胞的存活至關重要。實施例 16-17 評估了眼內注射 miR-15a-5p 和 VEGF 單抗對氧誘導的小鼠發育及正常小鼠發育的影響，結果表明 VEGF 單抗可導致正常小鼠體重降低，血脂異常，而 miR-15a-5p 對小鼠發育無不良影響。實施例 18 表明 miR-15a-5p 可以緩解糖尿病鼠視網膜神經變性。綜上表明，miR-15a-5p 或修飾的 miR-15a-5p 在治療眼底疾病方面具有明確效果，在生物醫藥領域中具有非常好的應用和研究價值。

【0227】以上詳細描述了本發明的優選實施方式，但是，本發明並不限於上述實施方式中的具體細節，在本發明的技術構思範圍內，可以對本發明的技術方案進行多種簡單變型，這些簡單變型均屬於本發明的保護範圍。

【0228】另外需要說明的是，在上述具體實施方式中所描述的各個具體技術特徵，在不矛盾的情況下，可以通過任何合適的方式進行組合，為了避免不必要的重複，本發明對各種可能的組合方式不再另行說明。

【符號說明】

【0229】無

【生物材料寄存】

【0230】無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing  dtdVersion="V1_3" fileName="SEQUENCE LISTING.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-05-
31">
 <ApplicantFileReference>LK06-014/P0102023040306YZ</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>CN</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>2023107418934</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-06-21</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">天津醫科大學眼科醫院</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>TIANJIN MEDICAL UNIVERSITY EYE
HOSPITAL</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">李筱榮</InventorName>
 <InventorNameLatin>LI Xiaorong</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">miR-15a-5p在治療眼底疾病中的應用
</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>9</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q2">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>tagcagcacataatggtttgtg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q24">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctcgcttcggcagcaca</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q26">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>aacgttcacgaatttgcgt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>30</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..30</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q28">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>acactccagctgggtcaccgggtgtaaatc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="5">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>44</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..44</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q30">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ctcaactggtgtcgtggagtcggcaattcagttgagcaagctga</INSDSeq_sequence
>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q32">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cacaaaccattatgtgctgcta</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q34">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>23..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q35">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>thymine</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tagcagcacataatggtttgtgtt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q37">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>23..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q38">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>thymine</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>cacaaaccattatgtgctgctatt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q40">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>tagcagcacataatggtttgtg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p在製備治療和/或預防眼底疾病的產品中的用途。

【請求項2】 如請求項1所述的用途，其特徵在於，所述的眼底疾病選自玻璃體病變、視網膜病變、視神經病變或脈絡膜病變中的一種或兩種以上。

【請求項3】 如請求項1所述的用途，其特徵在於，所述的眼底疾病選自早產兒視網膜疾病、視網膜新生血管疾病、脈絡膜新生血管疾病或糖尿病視網膜病變中的一種或兩種以上。

【請求項4】 如請求項1所述的用途，其特徵在於，所述的miR-15a-5p包括SEQ ID NO：1。

【請求項5】 如請求項1所述的用途，其特徵在於，所述的產品包含miR-15a-5p或其模擬物和/或修飾的miR-15a-5p，或者，包含miR-15a-5p和/或修飾的miR-15a-5p的載體。

【請求項6】 如請求項5所述的用途，其特徵在於，所述的載體為病毒載體或非病毒載體。

【請求項7】 如請求項6所述的用途，其特徵在於，所述的病毒載體包括慢病毒載體、逆轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體、痘病毒載體或皰疹病毒載體中的一種或兩種以上。

【請求項8】 如請求項6所述的用途，其特徵在於，所述的非病毒載體包括脂質體、脂質納米顆粒、聚合物、多肽、抗體、適配體或N-乙醯半乳糖胺中的一種或兩種以上。

【請求項9】 如請求項1所述的用途，其特徵在於，所述的修飾的miR-15a-5p包括在鹼基上進行的修飾。

【請求項10】 如請求項9所述的用途，其特徵在於，所述鹼基的修飾位於反義鏈，包括3'端進行膽固醇修飾、5'端兩個硫代骨架修飾、3'端四個硫代骨架修飾或全鏈甲氧基修飾中的一種或兩種以上。

【請求項11】 如請求項1所述的用途，其特徵在於，所述的產品包含正義鏈和反義鏈，所述的正義鏈為SEQ ID NO：1，所述的反義鏈為SEQ ID NO：6。

【請求項12】 一種包含轉錄為miR-15a-5p的核酸的載體，其特徵在於，所述的miR-15a-5p包括SEQ ID NO：1。

【請求項13】 如請求項12所述的載體，其特徵在於，所述轉錄為miR-15a-5p的核酸包含SEQ ID NO：9。

【請求項14】 如請求項12所述的載體，其特徵在於，所述的miR-15a-5p或其模擬物包含正義鏈和反義鏈，所述的正義鏈為SEQ ID NO：1，所述的反義鏈為SEQ ID NO：6。

【請求項15】 如請求項12所述的載體，其特徵在於，所述的載體為病毒載體或非病毒載體。

【請求項16】 如請求項15所述的載體，其特徵在於，所述病毒載體包括慢病毒載體、逆轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體、痘病毒載體或皰疹病毒載體中的一種或兩種以上。

【請求項17】 如請求項15所述的載體，其特徵在於，所述的非病毒載體包括脂質體、脂質納米顆粒、聚合物、多肽、抗體、適配體或N-乙醯半乳糖胺中的一種或兩種以上。

【請求項18】 一種包含轉錄為miR-15a-5p的核酸的載體在製備治療和/或預防眼底疾病的產品中的用途。

【請求項19】 如請求項18所述的用途用，其特徵在於，所述的包含轉錄為miR-15a-5p的核酸的載體選自請求項12-17任一所述的載體。

【請求項20】 如請求項18所述的用途，其特徵在於，所述的眼底疾病選自玻璃體病變、視網膜病變、視神經病變或脈絡膜病變中的一種或兩種以上。

【請求項21】 如請求項18所述的用途，其特徵在於，所述的眼底疾病選自早產兒視網膜疾病、視網膜新生血管疾病、脈絡膜新生血管疾病或糖尿病視網膜病變中的一種或兩種以上。

【請求項22】 一種藥物或藥物組合物，其特徵在於，所述的藥物或藥物組合物包括miR-15a-5p或其模擬物、修飾的miR-15a-5p或者請求項12-17任一所述的載體，以及藥學上可接受的輔料。

[發明圖式]

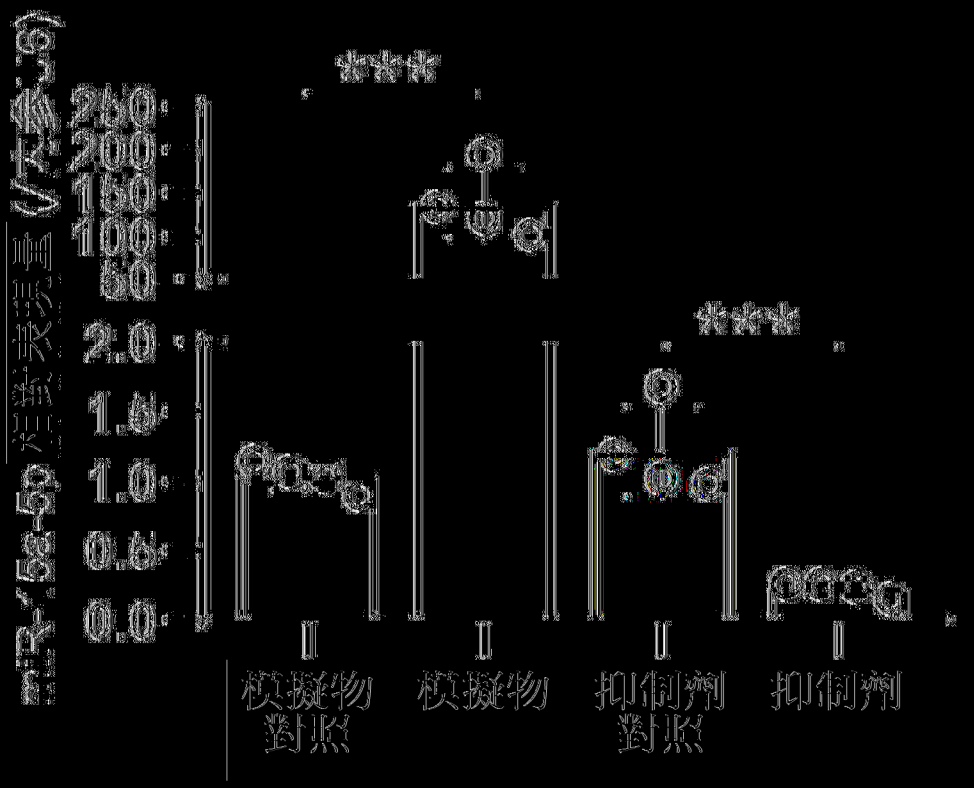

TNF-α 表現量 (pg/mL)
250
200
150
100
50
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
模擬物
對照
模擬物
抑制劑
對照
抑制劑

圖 1

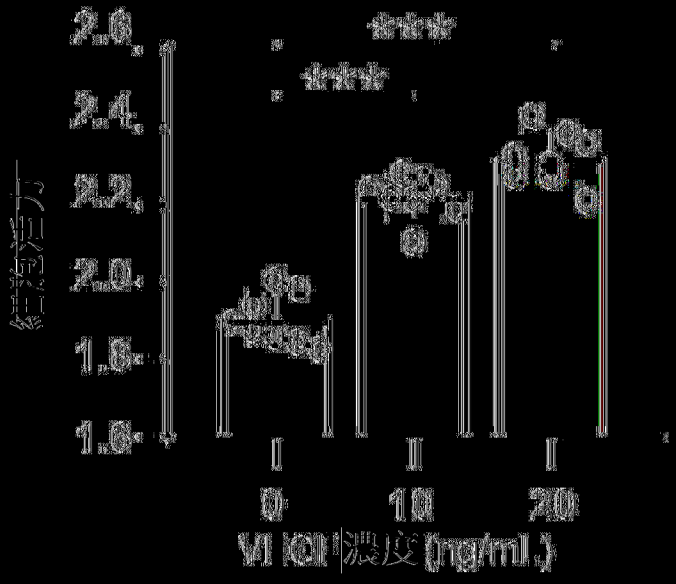

細胞存活率
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
0
10
20
VI kd 濃度 (ng/mL)

圖 2

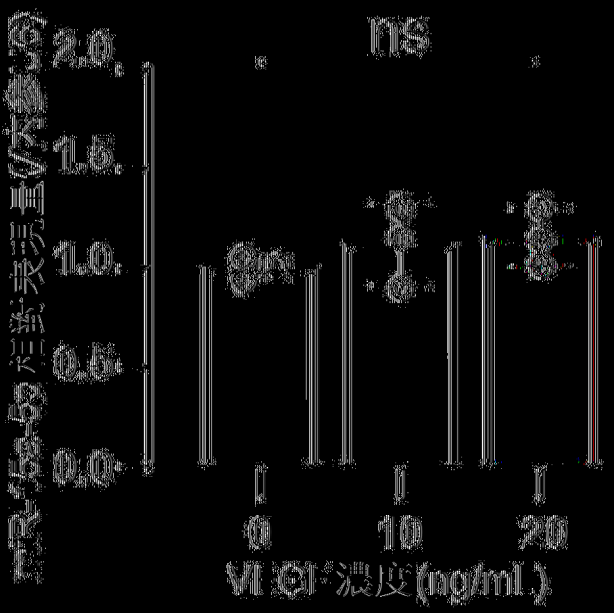

ns
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
10
20

圖 3

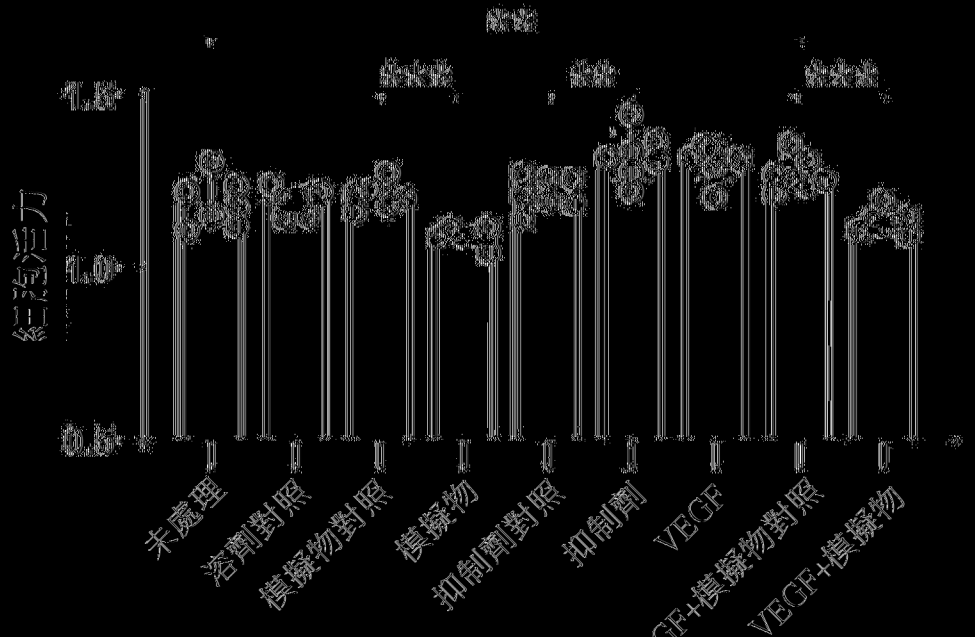

1.5
1.0
0.5
未處理
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
抑制劑對照
抑制劑
VEGF
VEGF+模擬物對照
VEGF+模擬物

圖 4

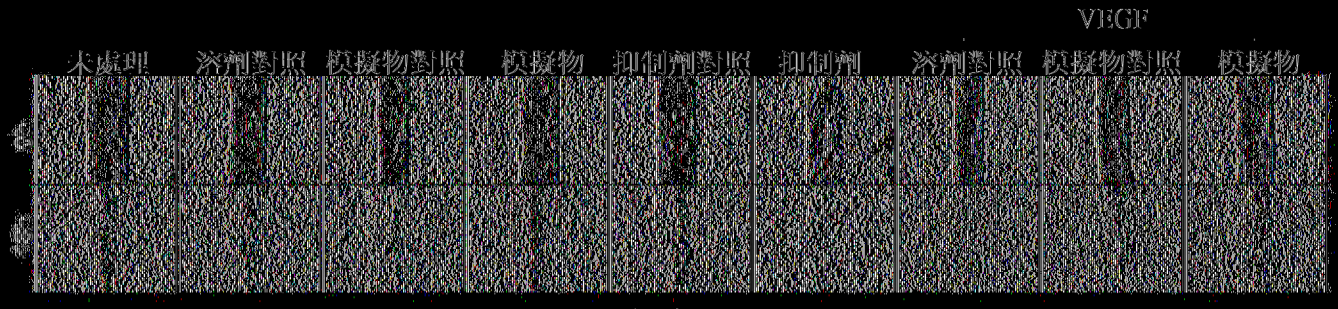

VEGF
未處理
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
抑制劑對照
抑制劑
溶劑對照
模擬物對照
模擬物

圖 5

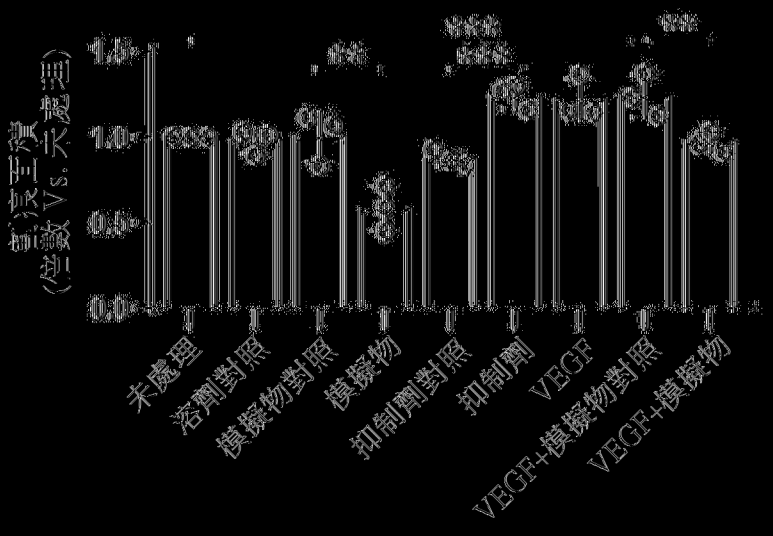

1.5
1.0
0.5
0.0
未處理
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
抑制劑對照
抑制劑
VEGF
VEGF+模擬物對照
VEGF+模擬物

圖 6

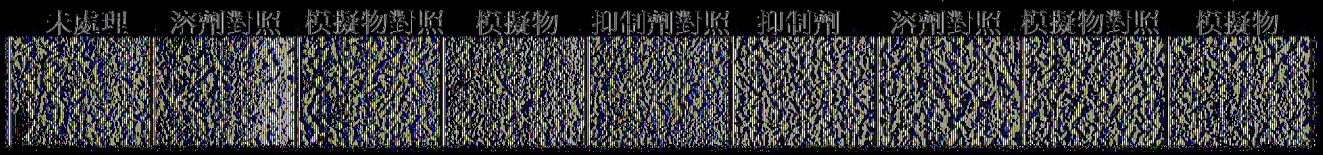

VEGF
未處理
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
抑制劑對照
抑制劑
溶劑對照
模擬物對照
模擬物

圖 7

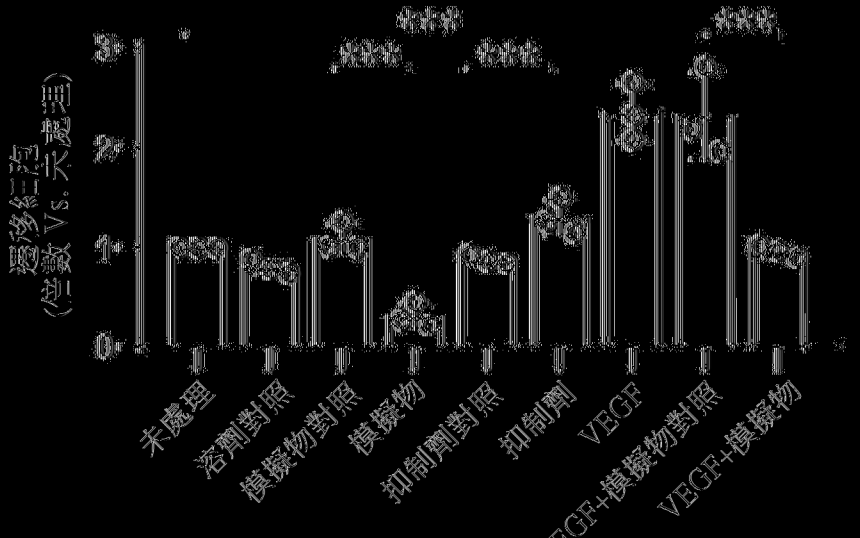

3
2
1
0
未處理
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
抑制劑對照
抑制劑
VEGF
VEGF+模擬物對照
VEGF+模擬物

圖 8

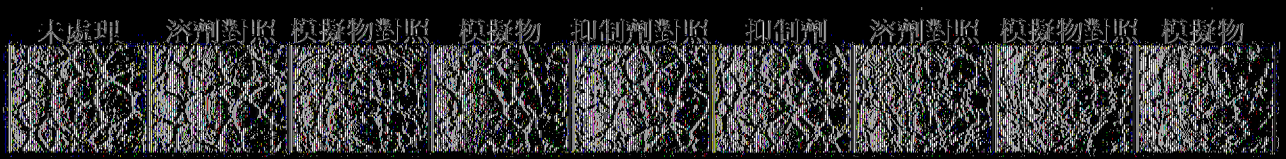

VEGF
未處理
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
抑制劑對照
抑制劑
溶劑對照
模擬物對照
模擬物

圖 9

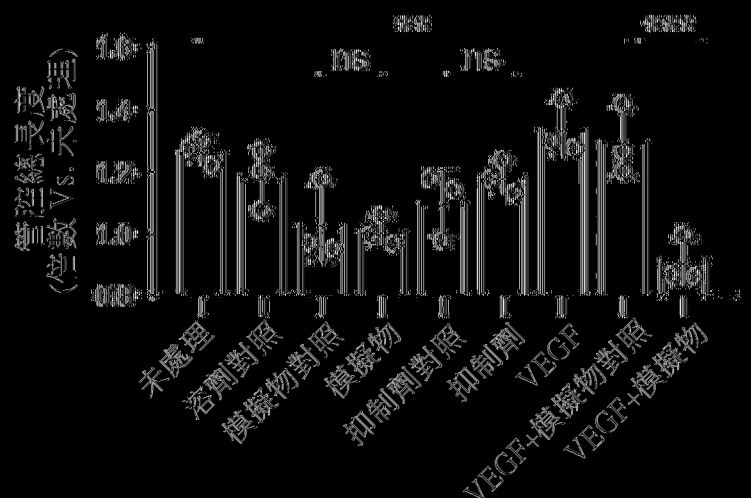

血管新生抑制率(%)(對照Vs.不同處理)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
ns
ns
未處理
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
抑制劑對照
抑制劑
VEGF
VEGF+模擬物對照
VEGF+模擬物

圖 10

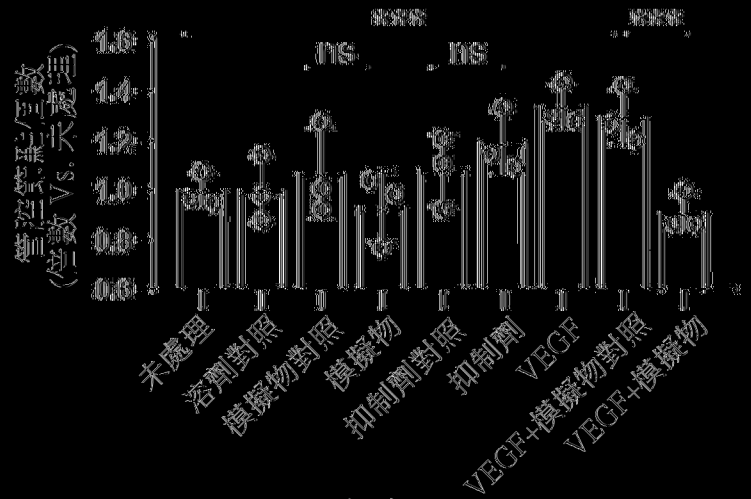

血管新生抑制率(%)(對照Vs.不同處理)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
ns
ns
未處理
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
抑制劑對照
抑制劑
VEGF
VEGF+模擬物對照
VEGF+模擬物

圖 11

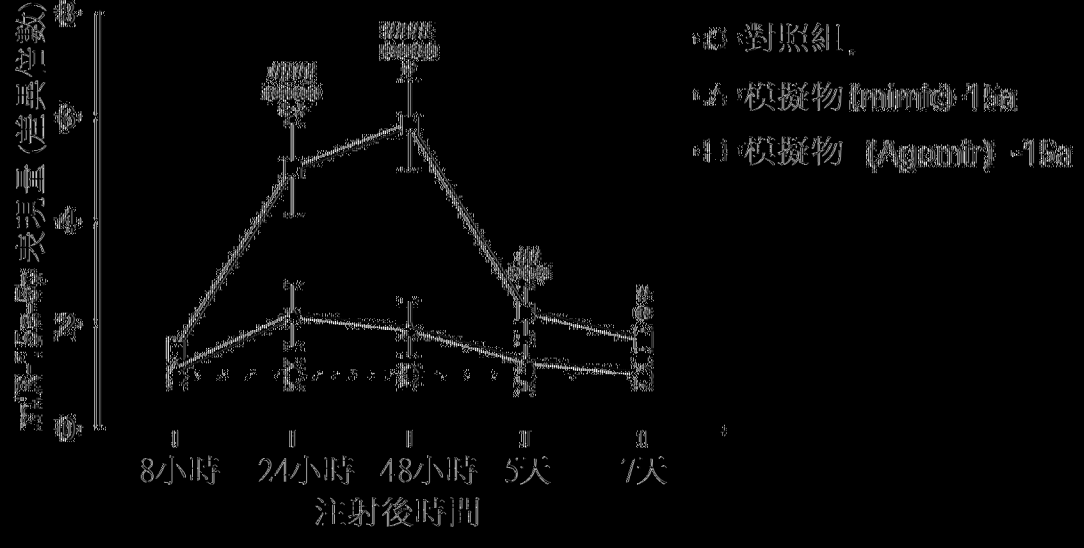

血管新生抑制率(%)
8小時
24小時
48小時
5天
7天
注射後時間
•□ 對照組
•△ 模擬物 (mimic)-1a
•○ 模擬物 (Agomir)-1a

圖 12

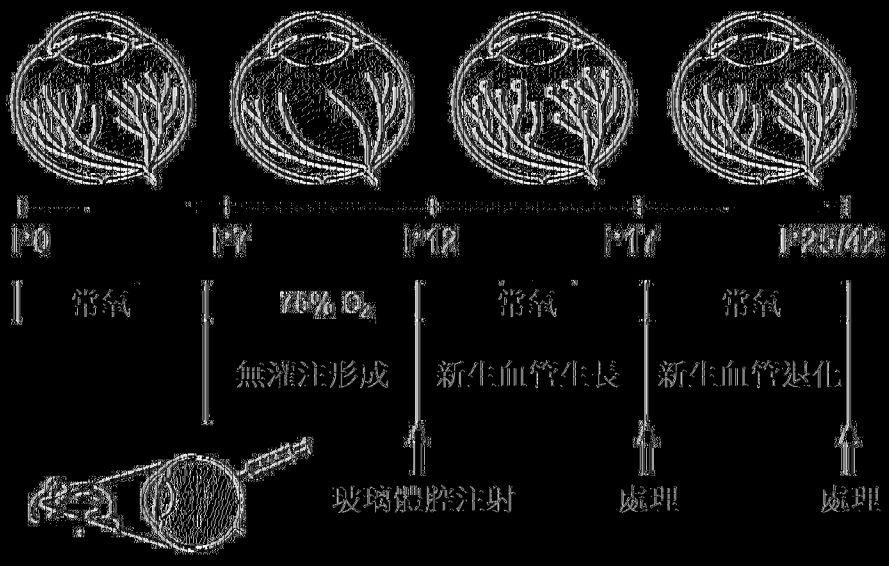

P0
P7
P12
P17
P25/42
常氣
75% O2
常氣
常氣
無灌注形成
新生血管生長
新生血管退化
玻璃體腔注射
處理
處理

圖 13

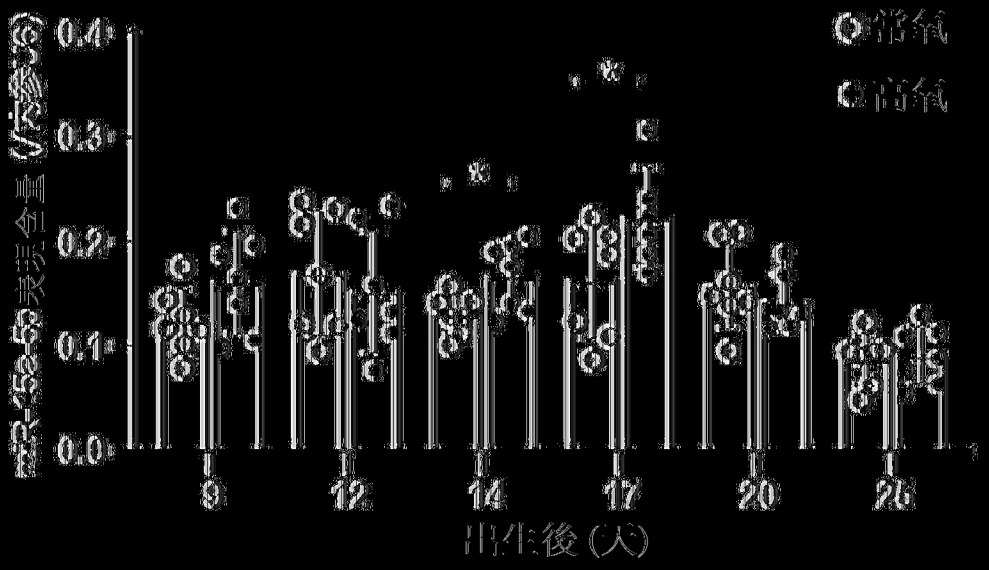

常氣
高氣
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
8
12
14
17
20
26
出生後 (天)

圖 14

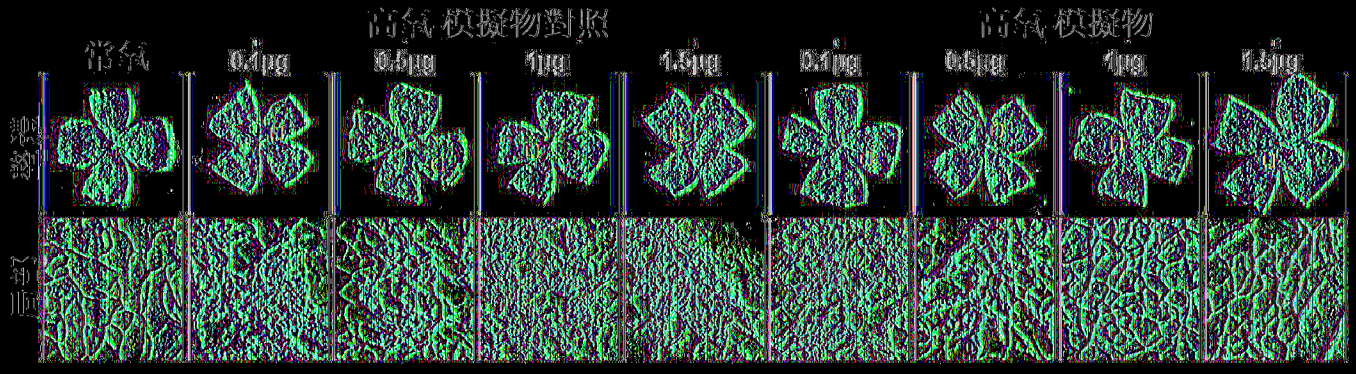

常氣
高氣 模擬物對照
高氣 模擬物
0.4ug
0.5ug
1ug
1.5ug
0.4ug
0.5ug
1ug
1.5ug

圖 15

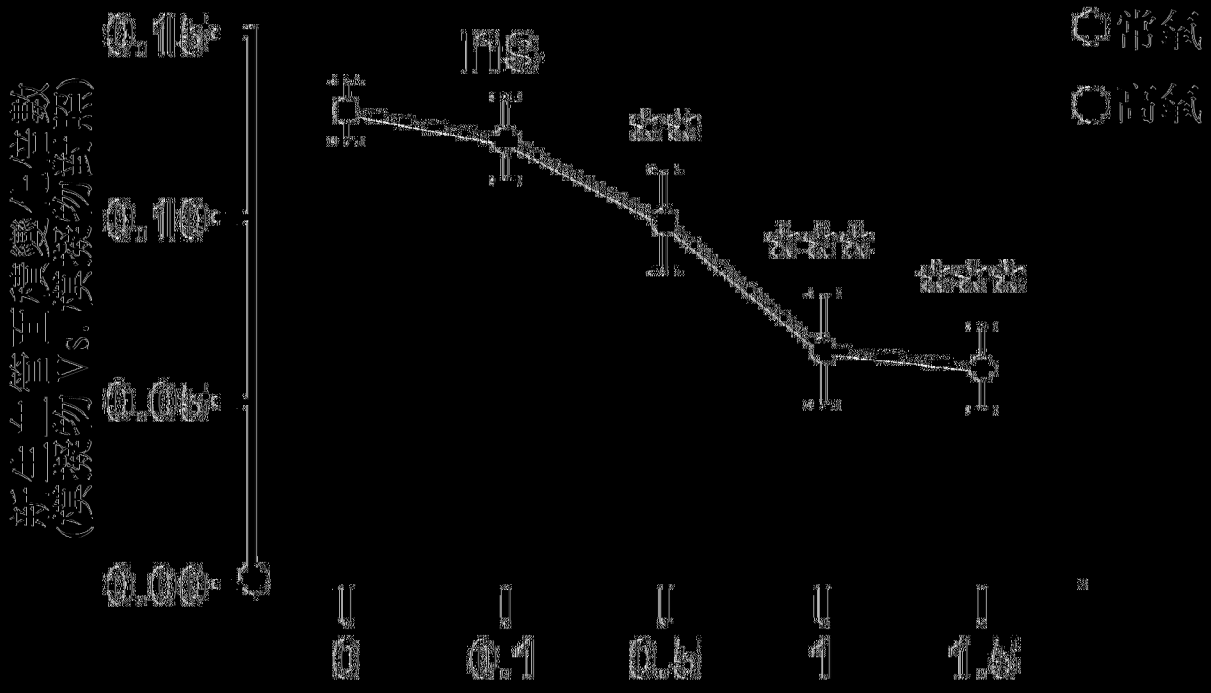


圖 16

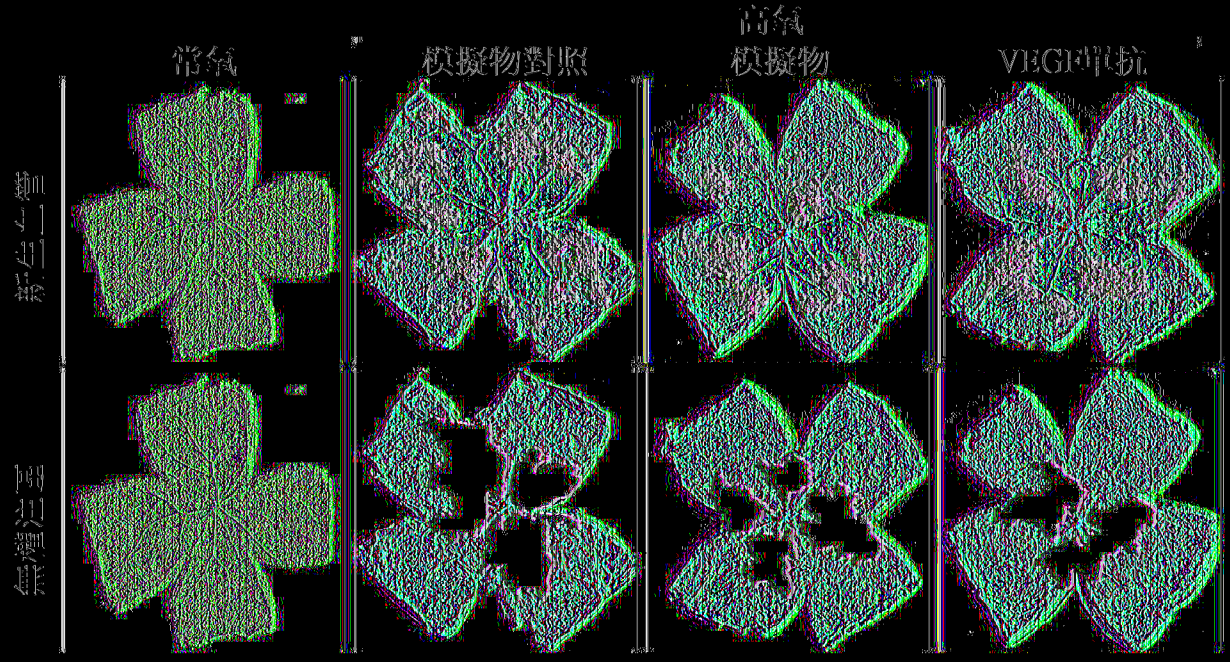


圖 17

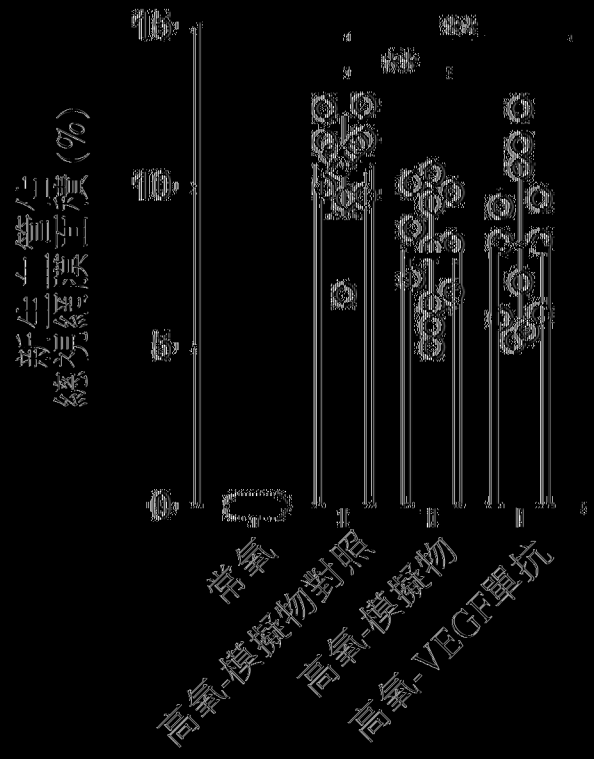

腫瘤體積增加百分比 (%)
0
5
10
15
常氧
高氧-模擬物對照
高氧-模擬物
高氧-VEGF單抗

圖 18

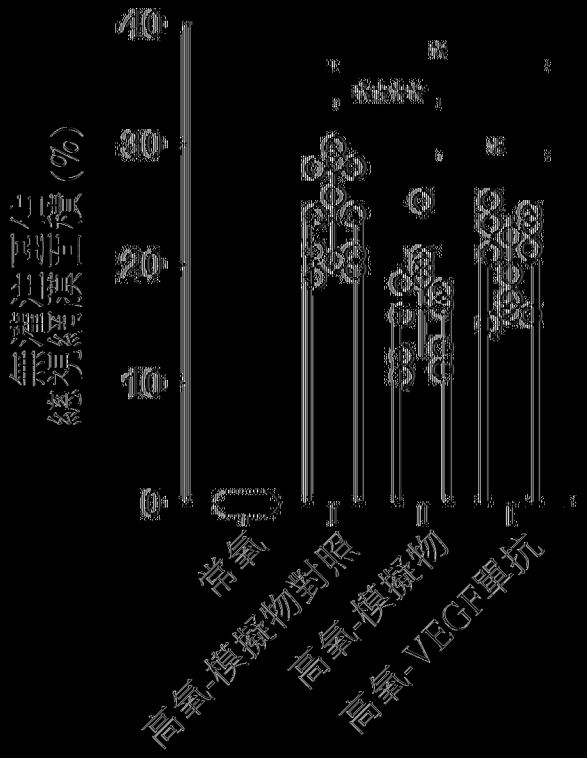

腫瘤體積增加百分比 (%)
0
10
20
30
40
常氧
高氧-模擬物對照
高氧-模擬物
高氧-VEGF單抗

圖 19

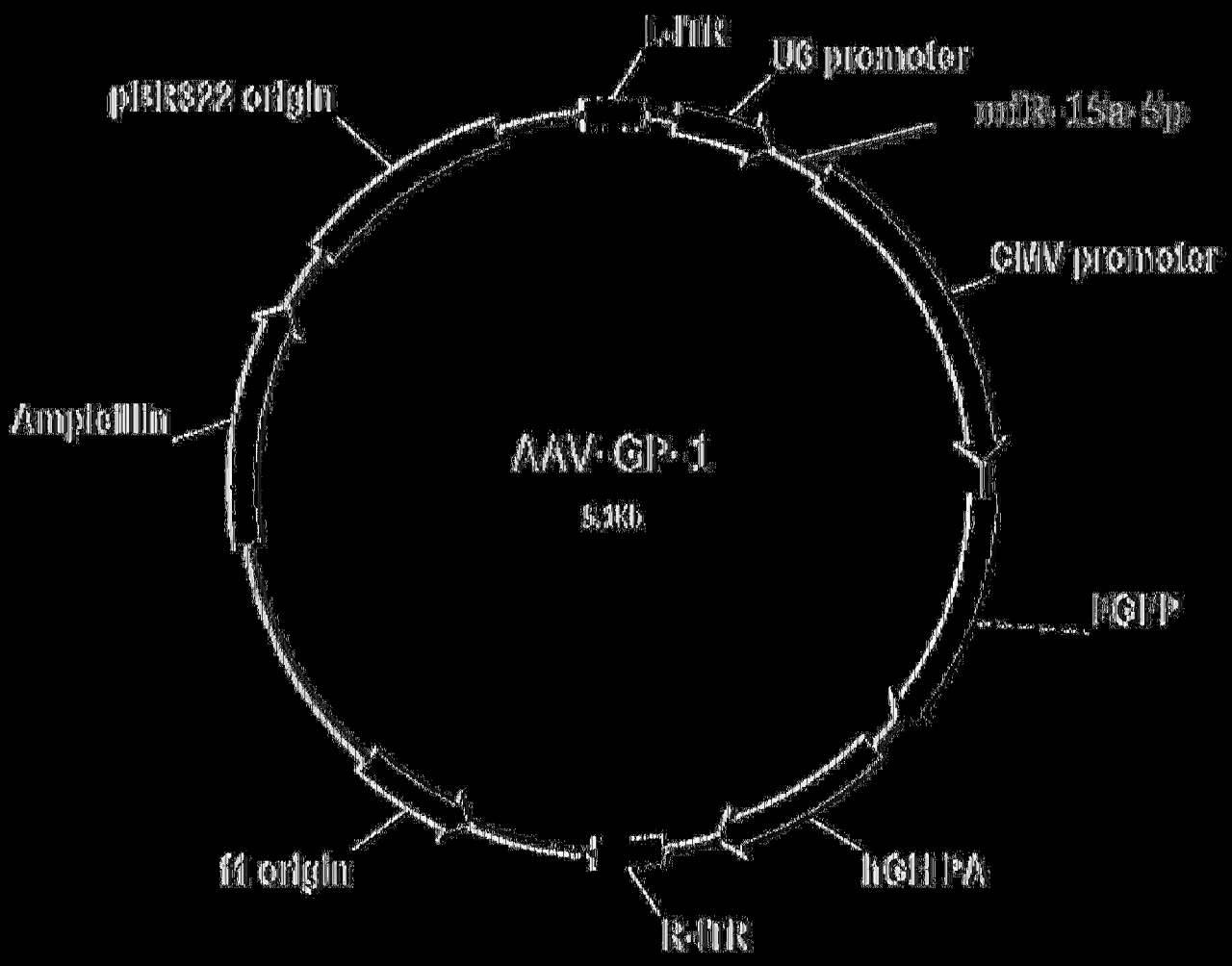

L-ITR
U6 promoter
pBR322 origin
miR-15a-5p
CMV promoter
Ampicillin
AAV-GP-1
5.1Kb
EGFP
f1 origin
hGH PA
R-ITR

圖 2.0

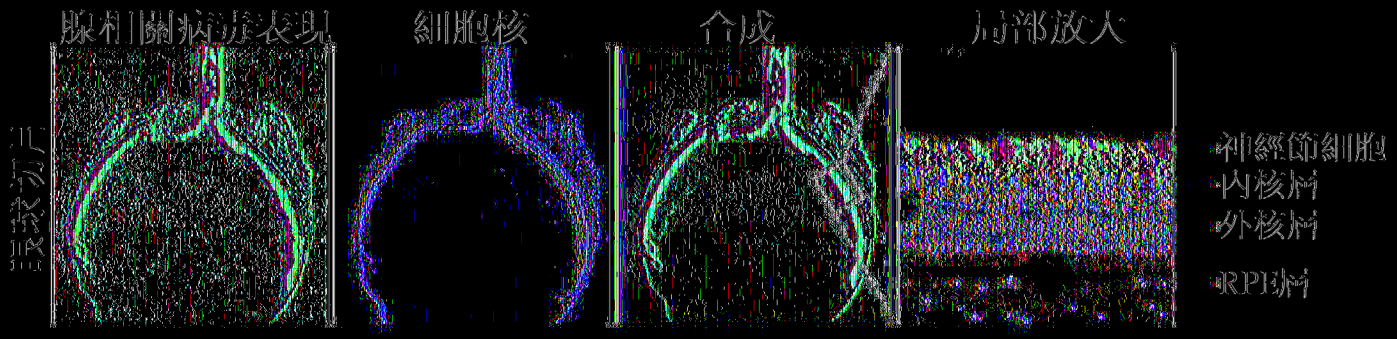

腺相關病毒表現
細胞核
合成
局部放大
神經節細胞
內核層
外核層
RPE層

圖 2.1

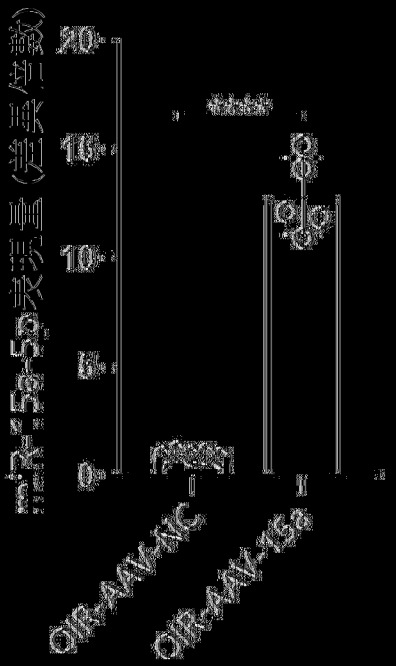

新生血管(%)
20
15
10
5
0
OIR-AAV-NC
OIR-AAV-15a

圖 2.2

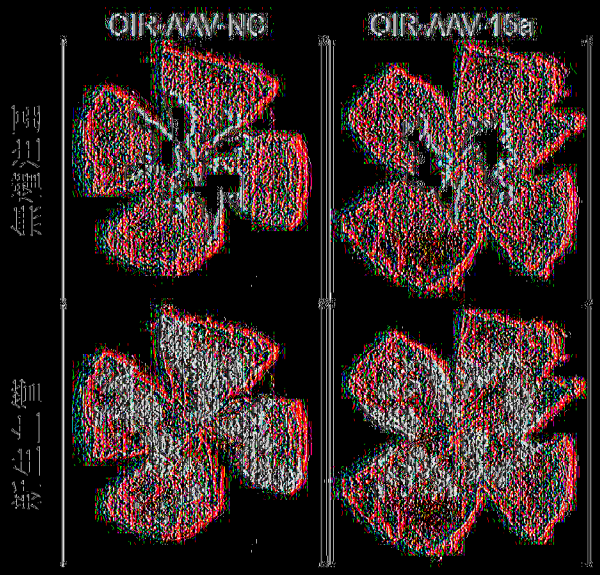

OIR-AAV-NC
OIR-AAV-15a
視網膜全景
視網膜局部

圖 2.3

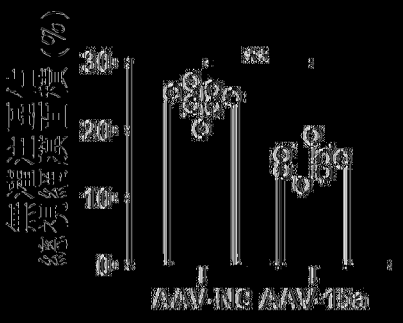

無血管區面積(%)
30
20
10
0
AAV-NC
AAV-15a

圖 2.4

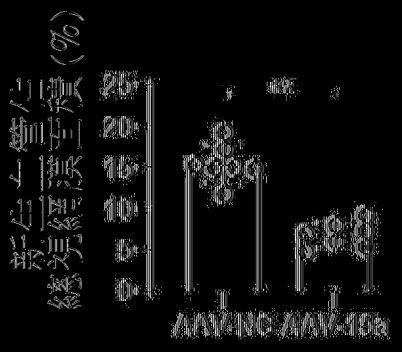


圖 2.5

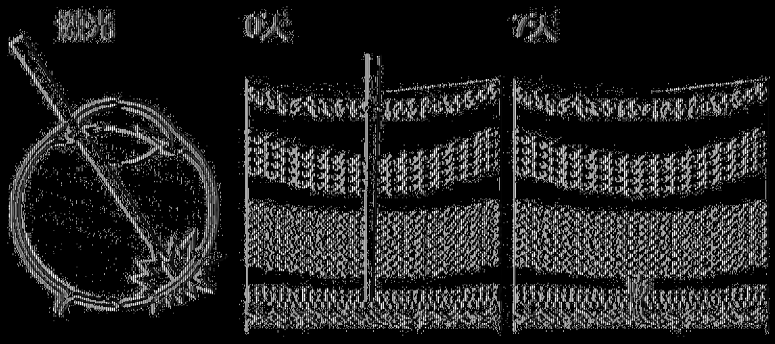


圖 2.6

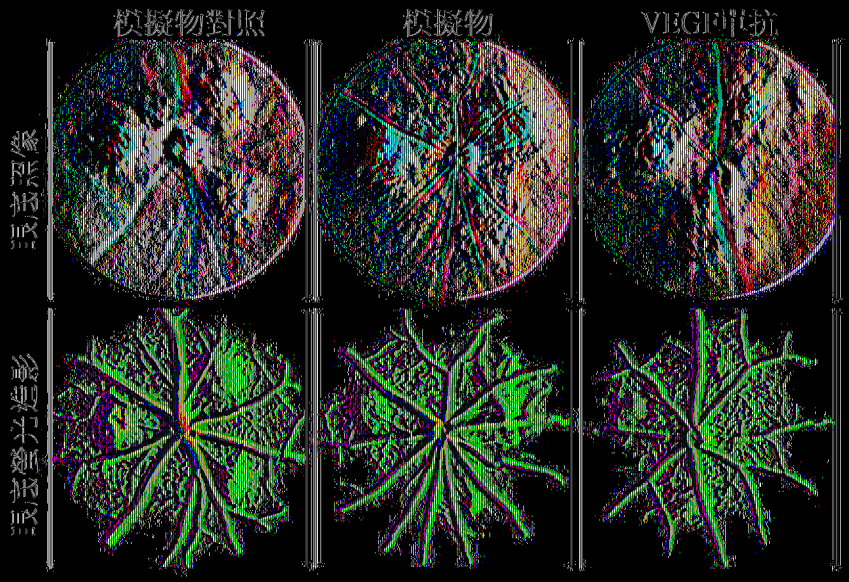


圖 2.7

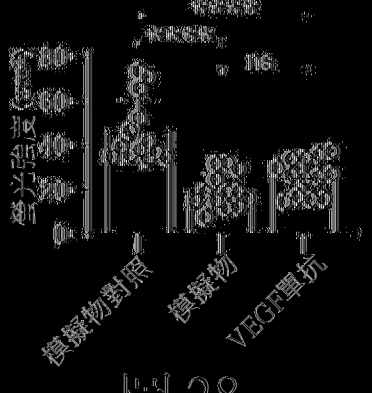


圖 2.8

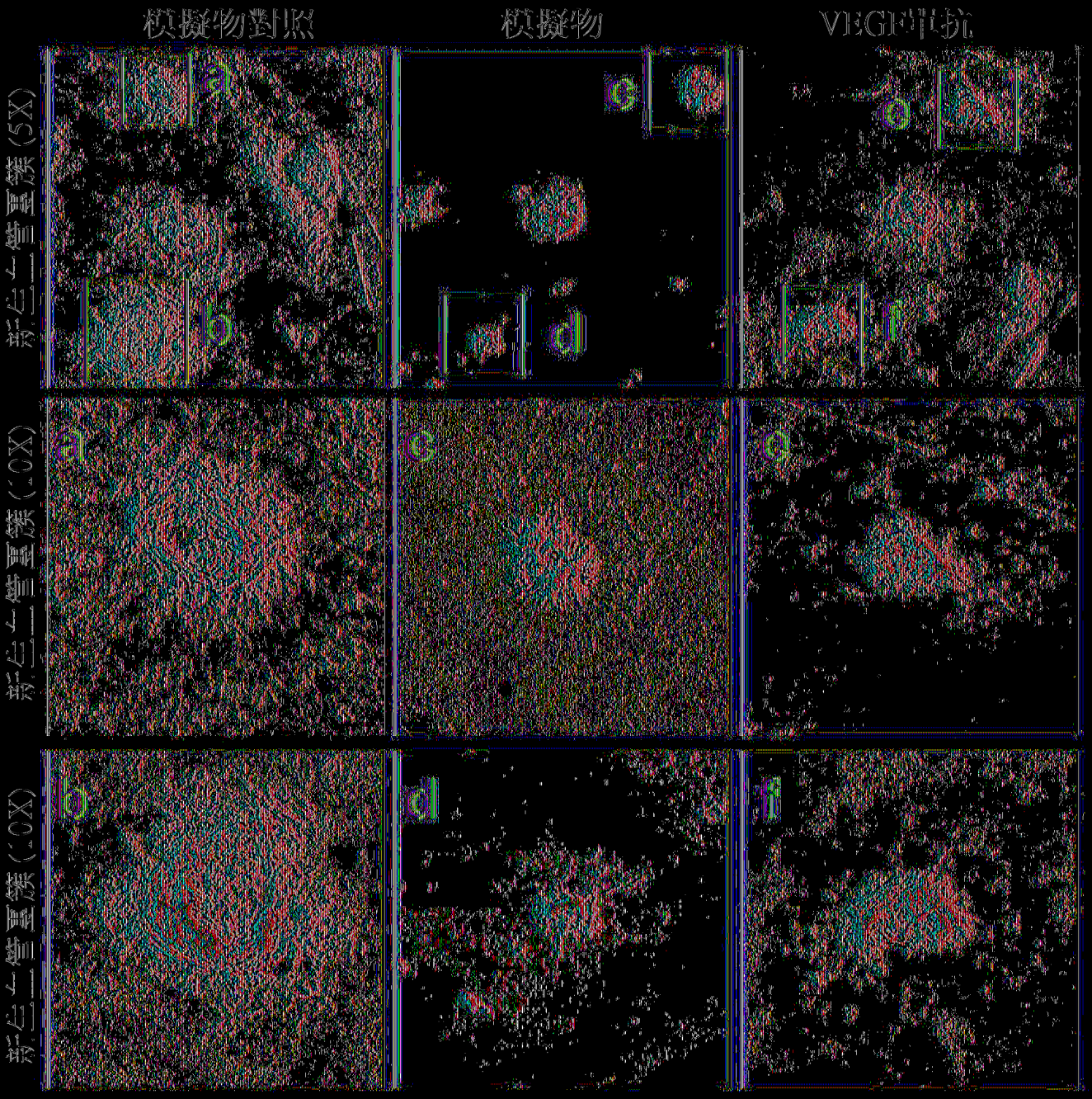

模擬物對照
模擬物
VEGF中和抗體
腎絲球區塊 (5X)
腎絲球區塊 (10X)
腎絲球區塊 (10X)
a
b
c
d
e
f
g
h
i

圖 29

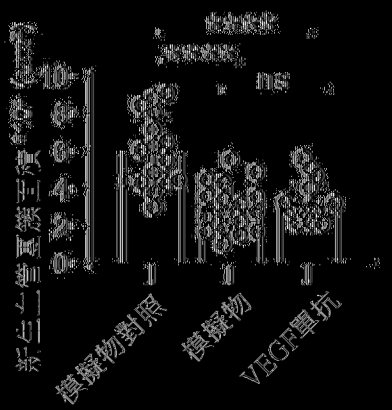

腎絲球區塊
模擬物對照
模擬物
VEGF單抗

圖 30

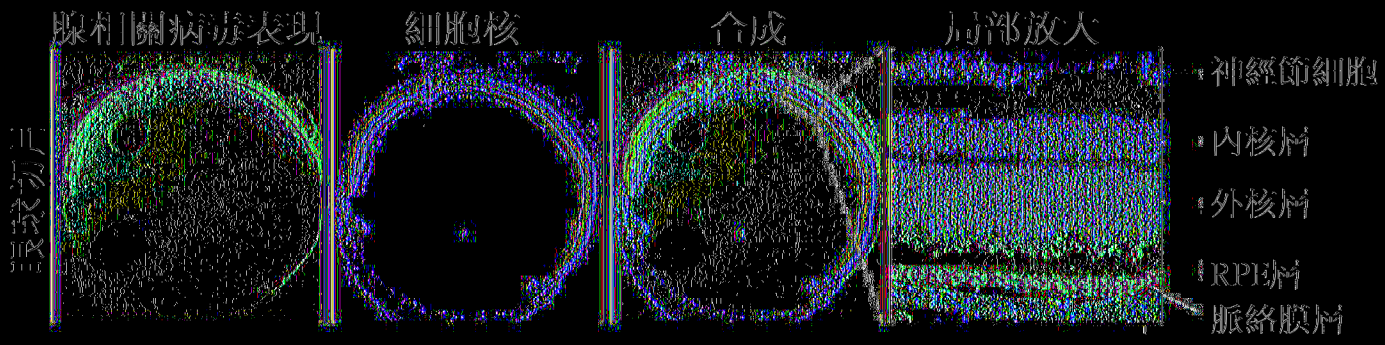

腺相關病毒表現
細胞核
合成
局部放大
視網膜
神經節細胞
內核層
外核層
RPE層
脈絡膜層

圖 31

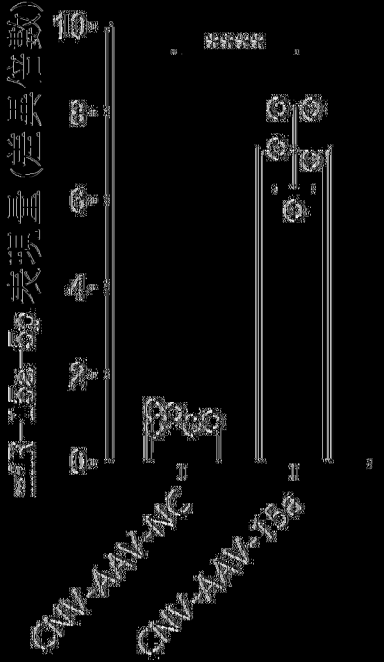

10
8
6
4
2
0
CNV-AAV-NC
CNV-AAV-15a

圖 32

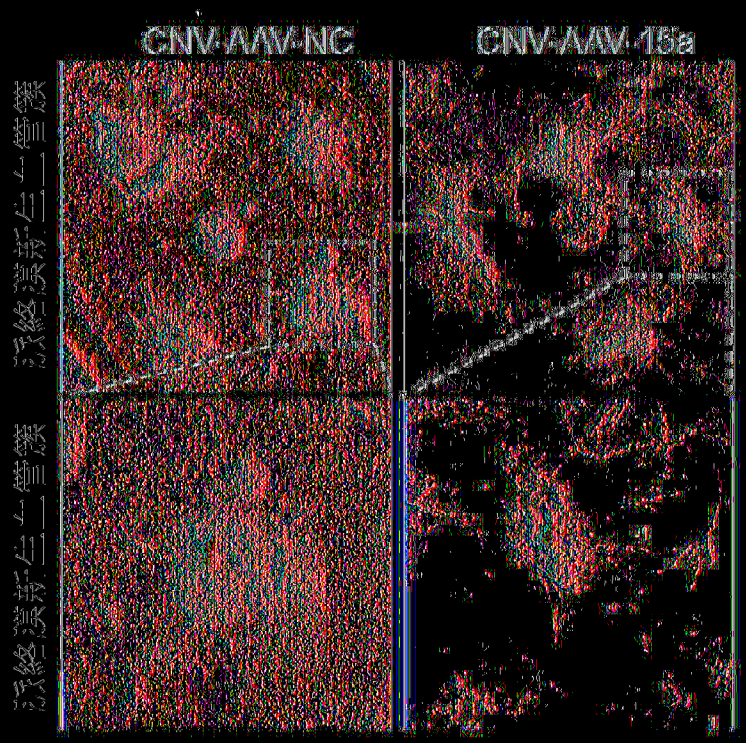

CNV-AAV-NC
CNV-AAV-15a

圖 33

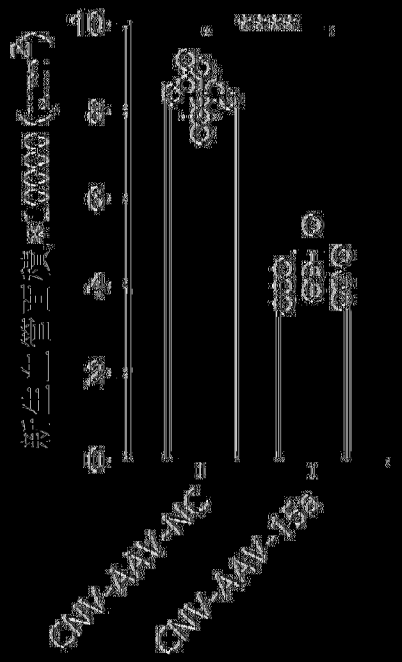


圖 34

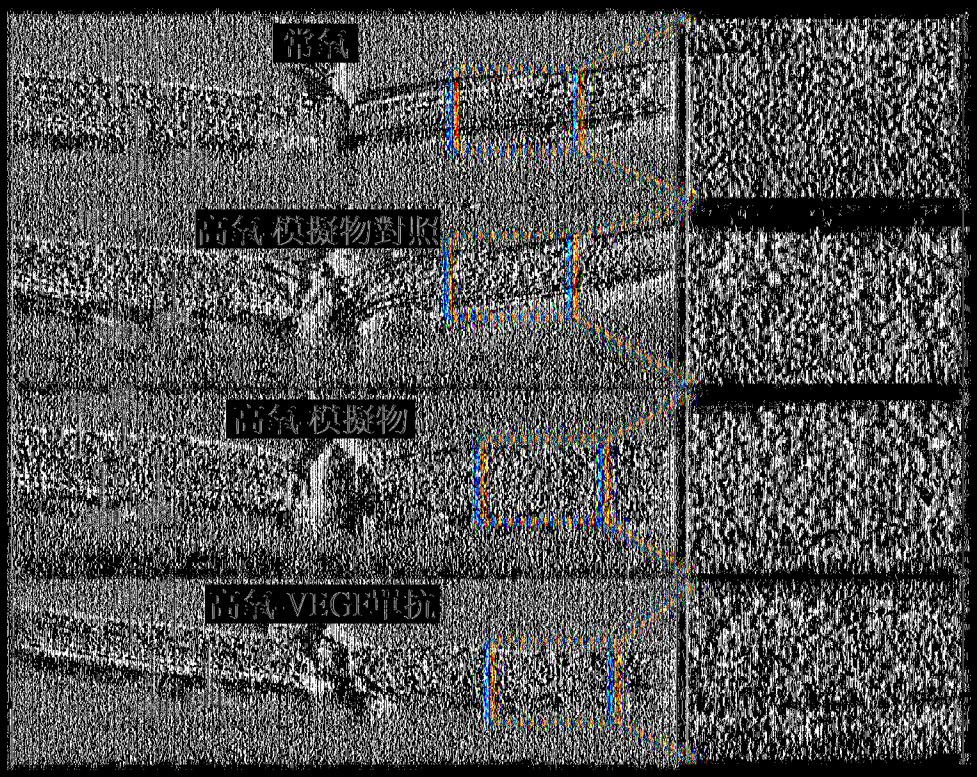


圖 35

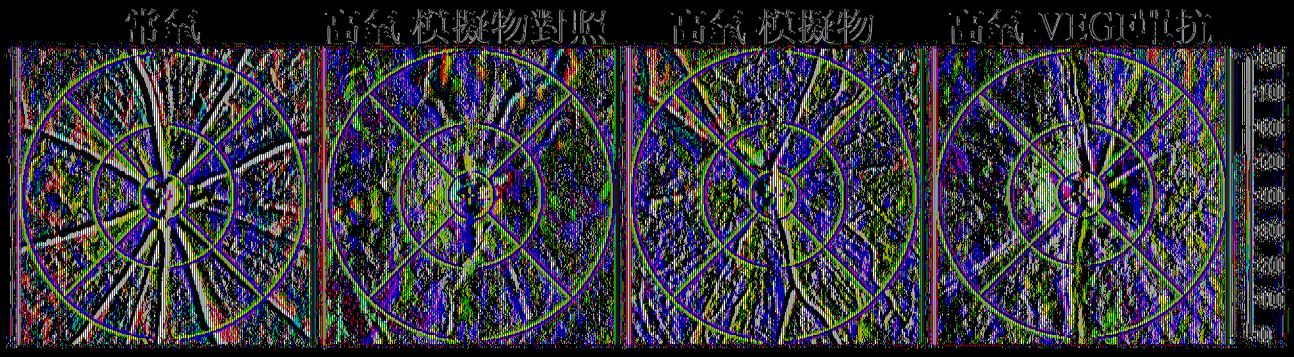

常氧
高氧-模擬物對照
高氧-模擬物
高氧-VEGFR抗

圖 36

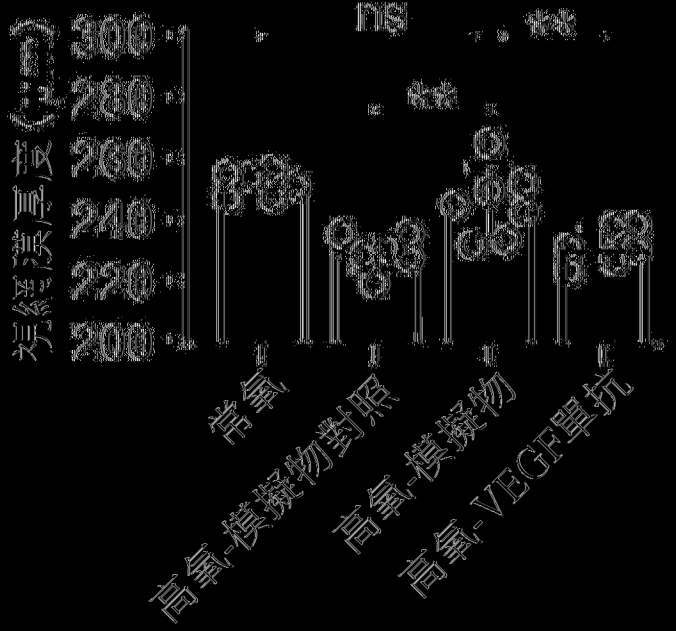

ns
300
280
260
240
220
200
常氧
高氧-模擬物對照
高氧-模擬物
高氧-VEGFR抗

圖 37

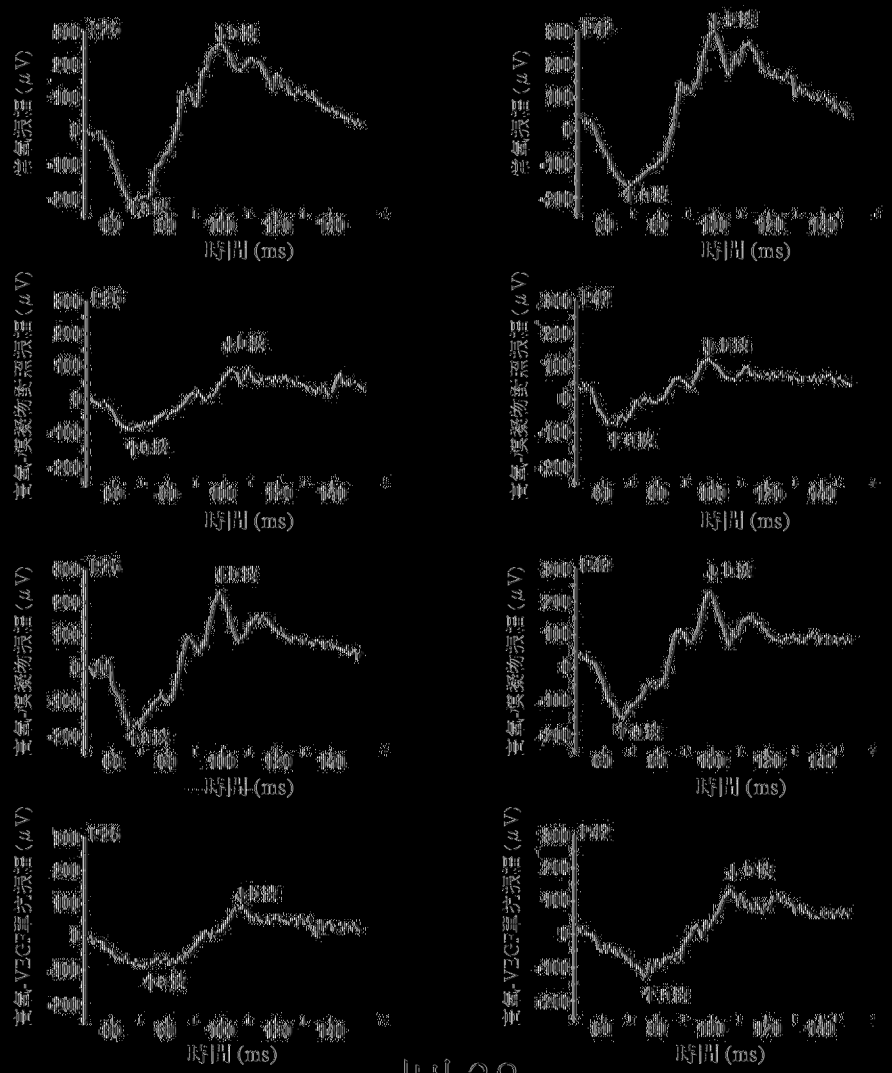

P26
P42
時間 (ms)

圖 38

P26
P42
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF抑抗
刺激強度(log cd.s/m²)

圖 39

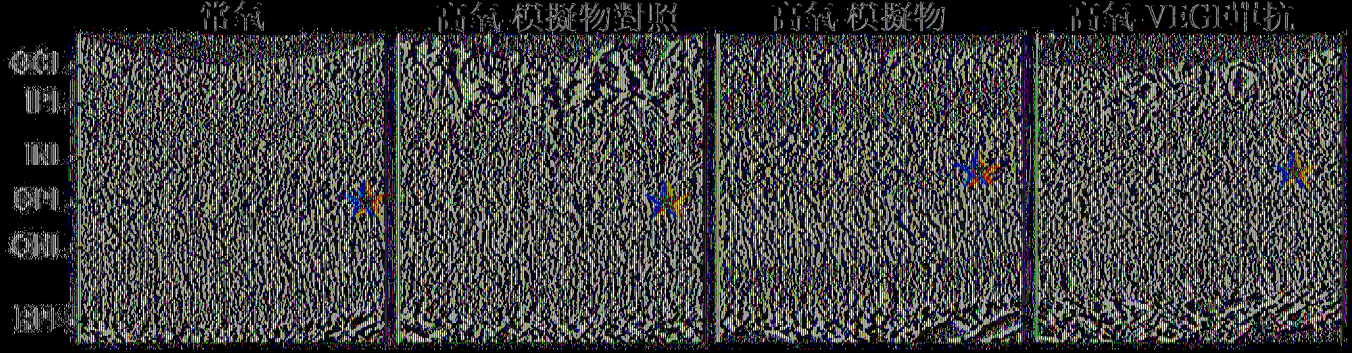

常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF抑抗
OCL
IPL
INL
OPL
ONL
IPR

圖 40

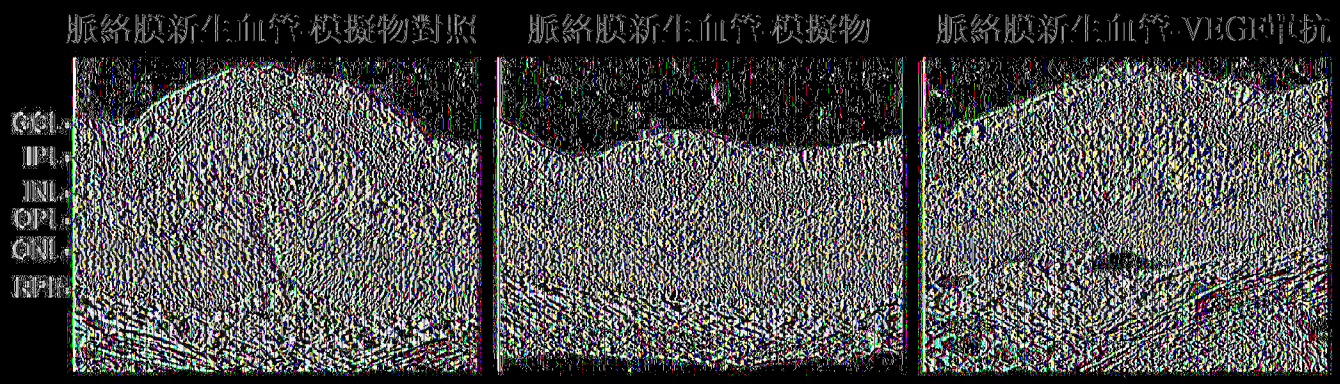

脈絡膜新生血管-模擬物對照
脈絡膜新生血管-模擬物
脈絡膜新生血管-VEGF抗
GCL
IPL
INL
OPL
ONL
IS/OS

圖 41

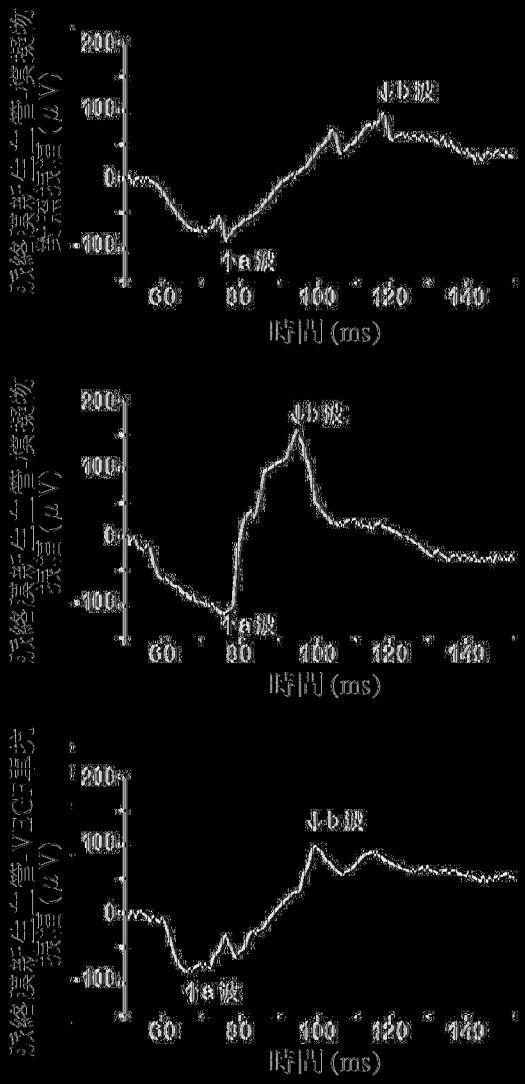

200
100
0
-100
Ia波
Ib波
60
80
100
120
140
時間 (ms)
Ib波
Ib波

圖 42

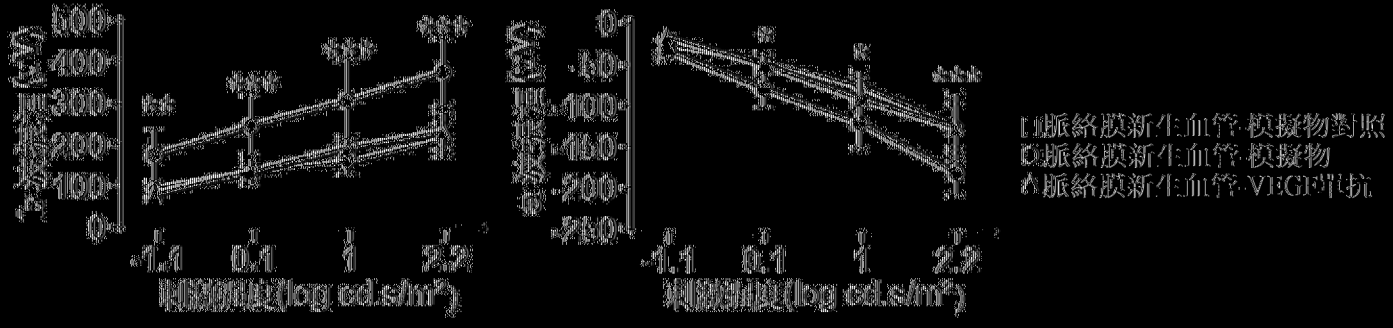


圖 43

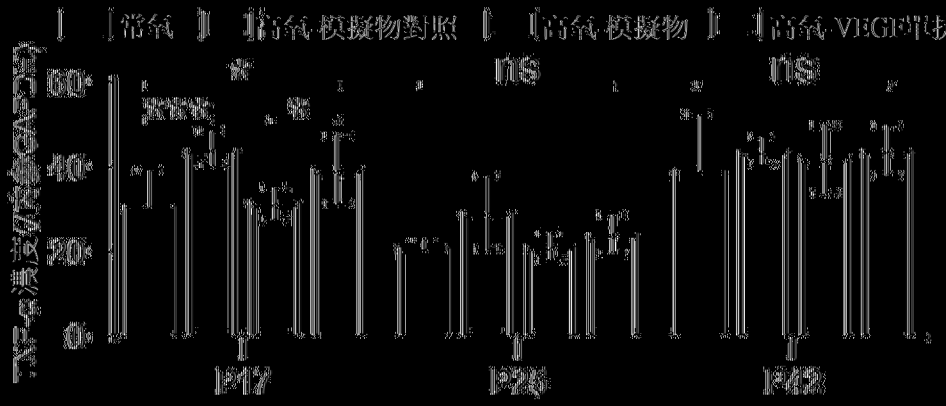


圖 44

圖 45

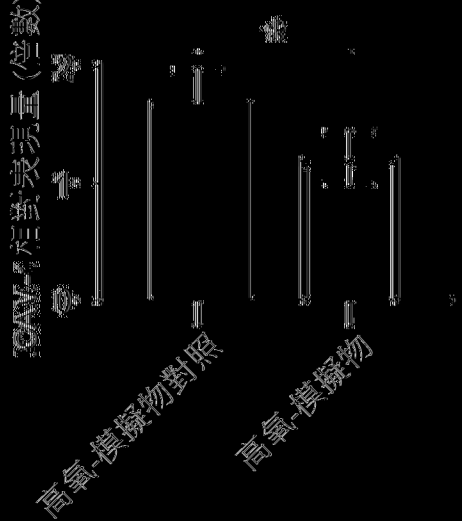


圖 46

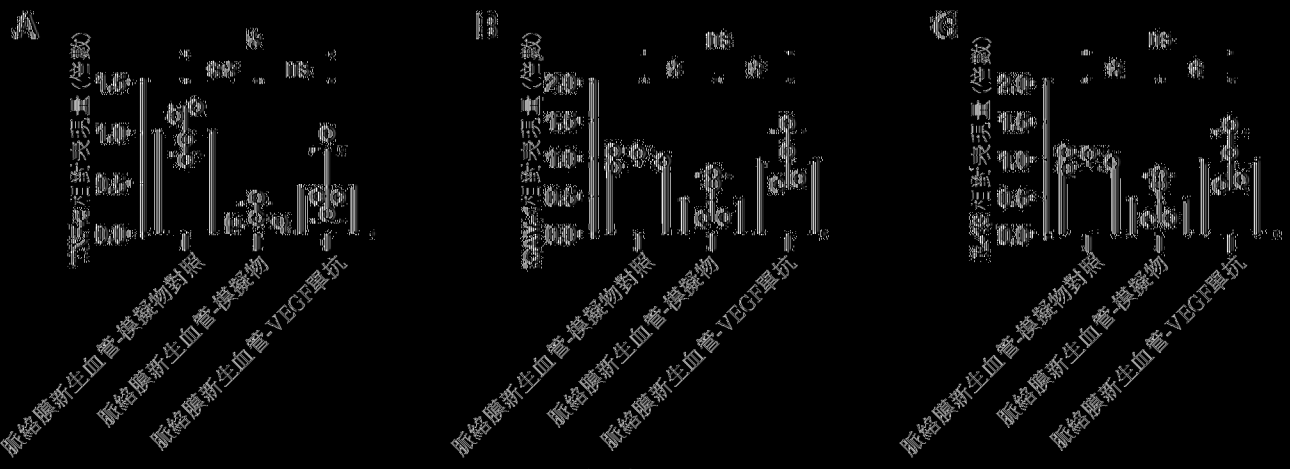

A
B
C
脈絡膜新生血管-模擬物對照
脈絡膜新生血管-模擬物
脈絡膜新生血管-VEGF單抗

圖 47

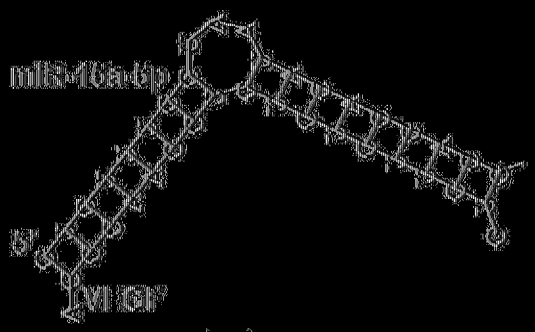

mIR-16a-5p
5'
VEGF

圖 48

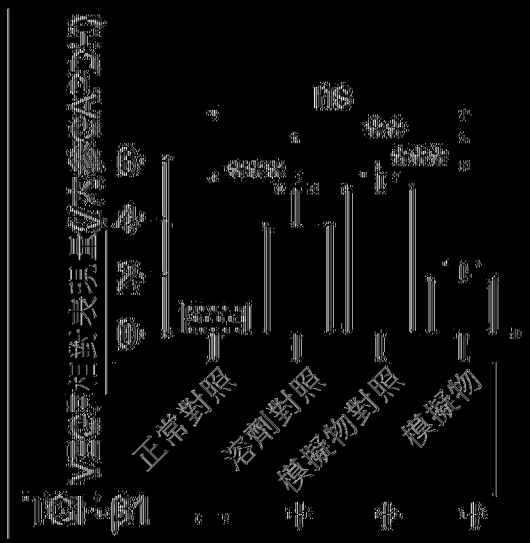

正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物

圖 49

正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
TGF-β1

圖 50

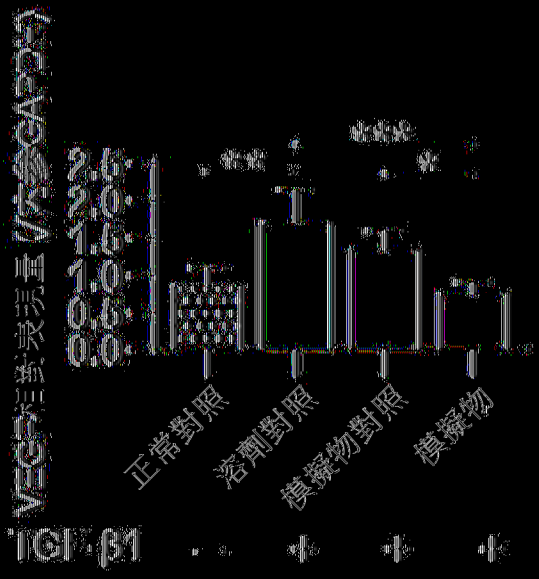

TGF-β1 蛋白表達量
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
TGF-β1

圖 51

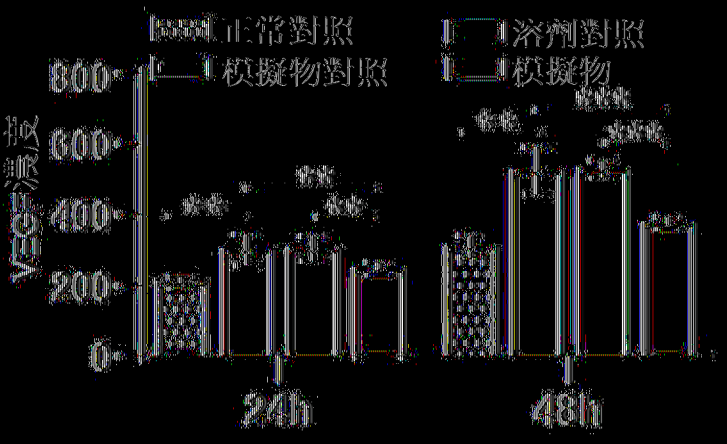

正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
800
600
400
200
0
24h
48h

圖 52

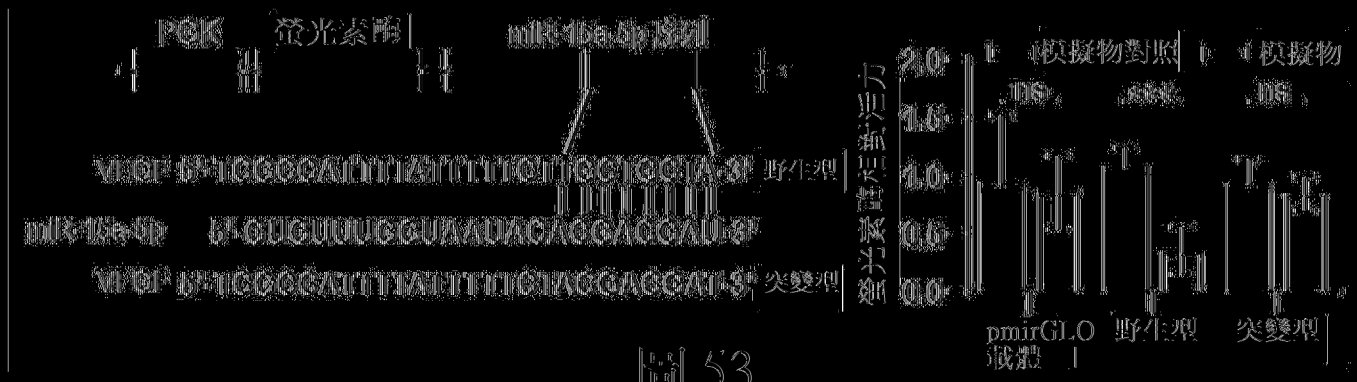

PGK
螢光素酶
miR-16a-5p 探針
VEGF 5'-TCGGCAATTTATTTTCTTCGTCGTCA-3' 野生型
miR-16a-5p 5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'
VEGF 5'-TCGGCAATTTATTTTCTAGGACGAT-3' 突變型
相對螢光強度
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
模擬物對照
模擬物
pmirGLO 載體
野生型
突變型

圖 53

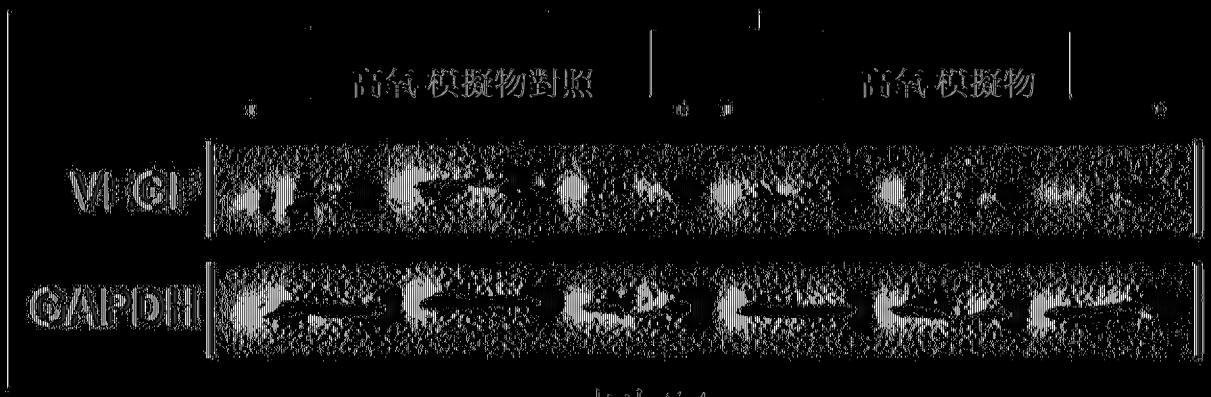

高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
VEGF
GAPDH

圖 54

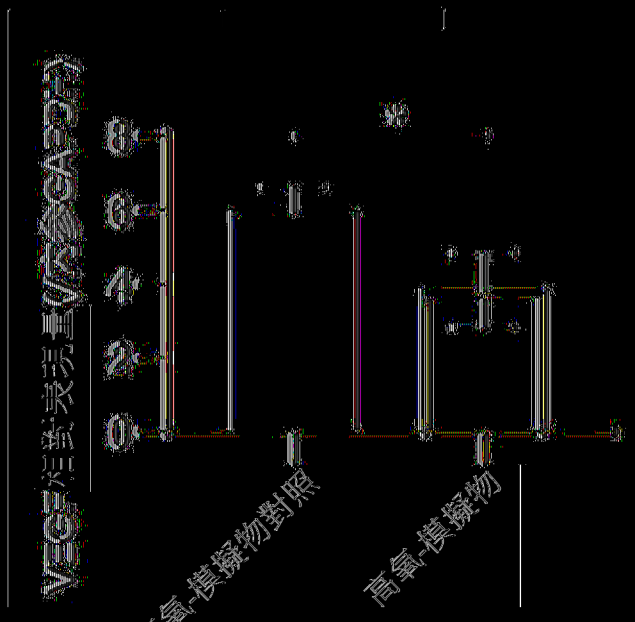

VEGF 蛋白表達(VEGF/GAPDH)
8
6
4
2
0
高氧-模擬物對照
高氧-模擬物

圖 55

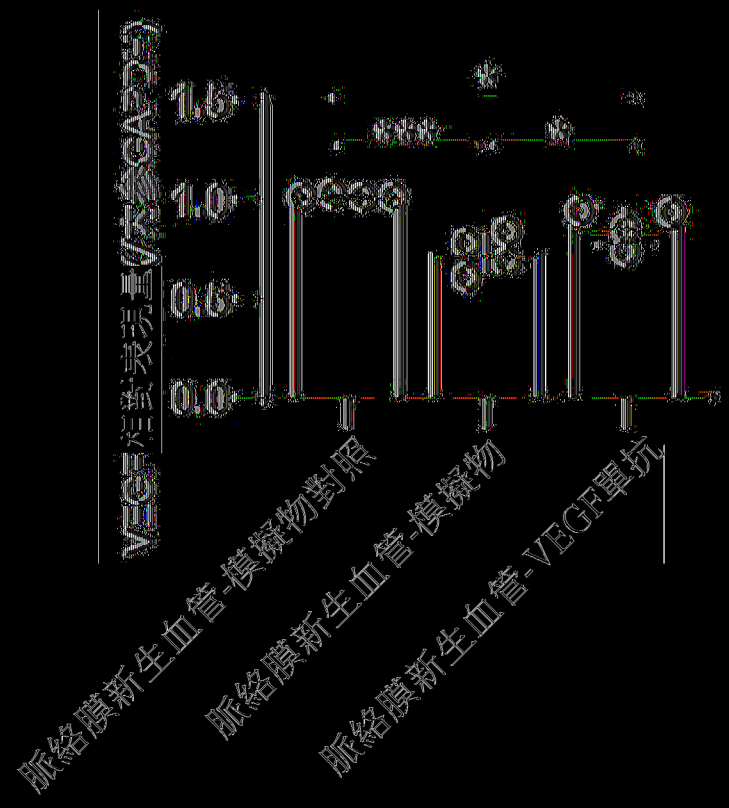

VEGF濃度(pg/mL)
1.5
1.0
0.5
0.0
脈絡膜新生血管-模擬物對照
脈絡膜新生血管-模擬物
脈絡膜新生血管-VEGF單抗

圖 56

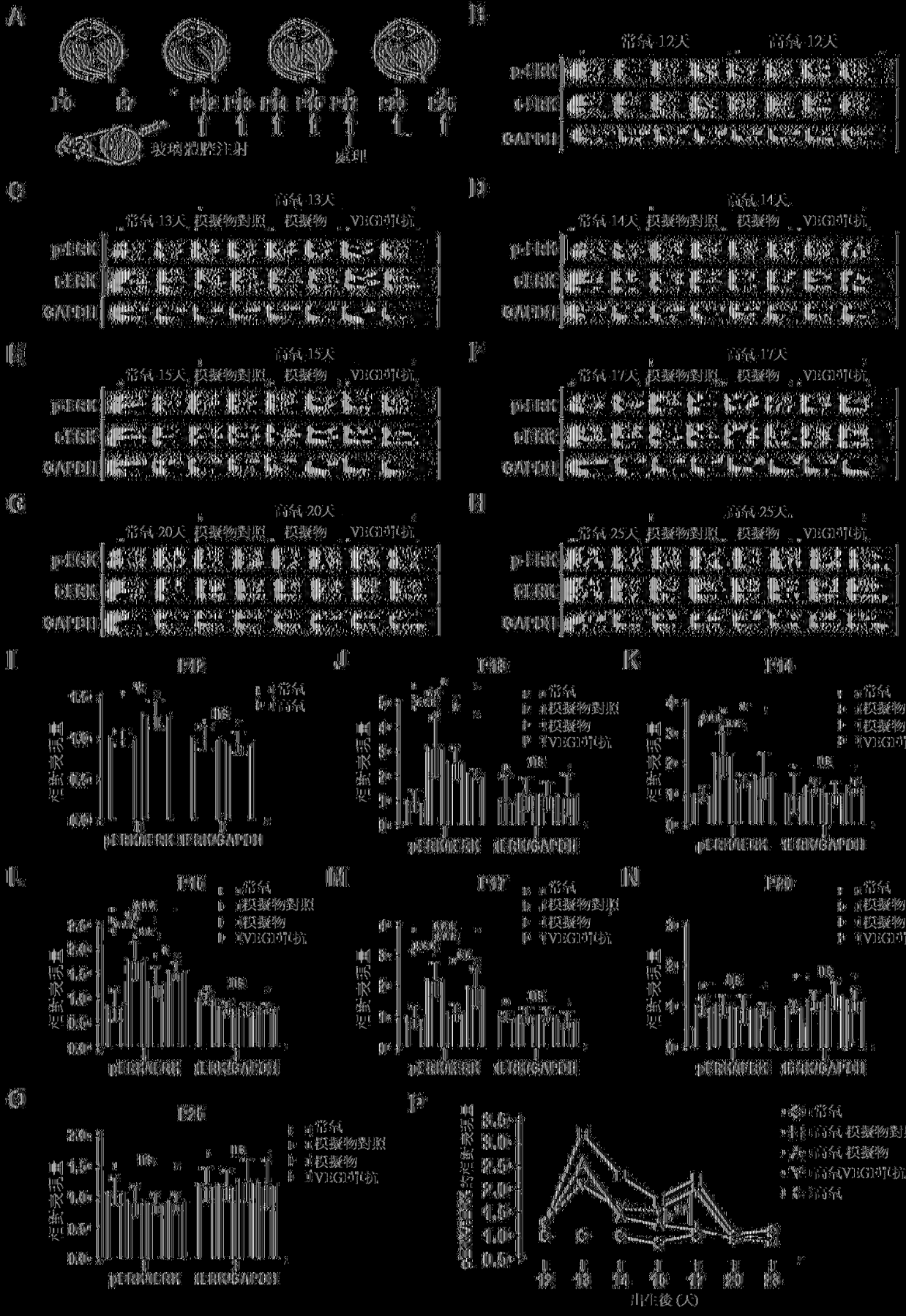

A
玻璃體腔注射
處理
B
常氧 12天
高氧 12天
p-ERK
t-ERK
GAPDH
C
高氧 13天
常氧 13天
模擬物對照
模擬物
VEGF可抗
D
高氧 14天
常氧 14天
E
高氧 15天
常氧 15天
F
高氧 17天
常氧 17天
G
高氧 20天
常氧 20天
H
高氧 25天
常氧 25天
I
P12
常氧
高氧
相對表現量
p-ERK/t-ERK
t-ERK/GAPDH
J
P13
模擬物對照
模擬物
VEGF可抗
K
P14
L
P16
M
P17
N
P20
O
P26
P
出生後 (天)

圖 5'

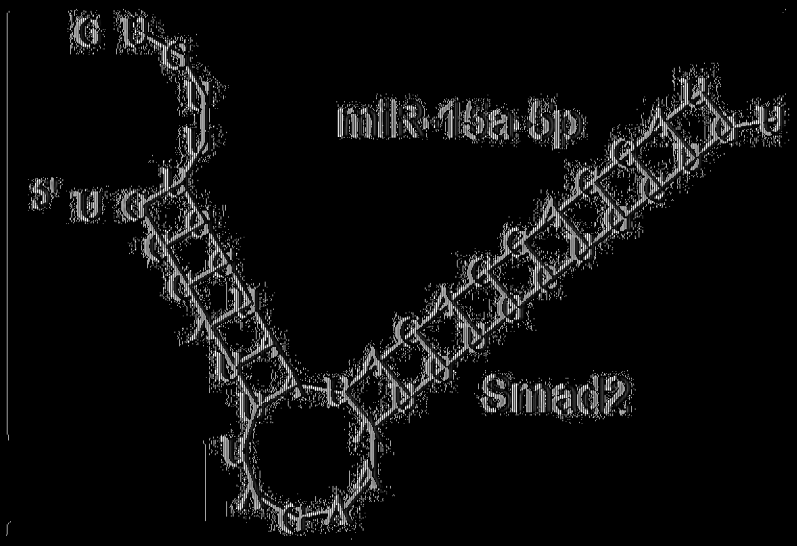

miR-15a-5p
Smad2
5'
3'

圖 58

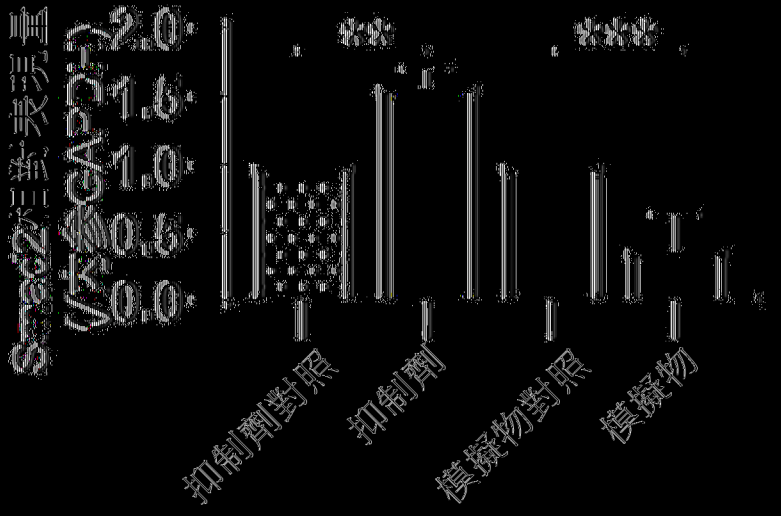

螢光素酶活性
2.0
1.6
1.0
0.5
0.0
抑制劑對照
抑制劑
模擬物對照
模擬物

圖 59

抑制劑對照
抑制劑
模擬物對照
模擬物
Smad2
GAPDH

圖 60

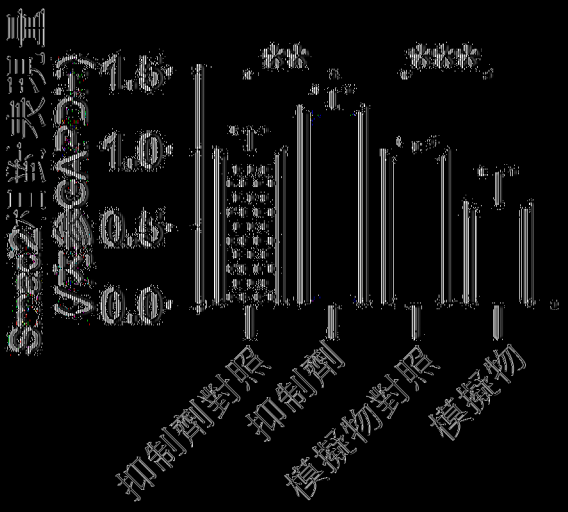

1.6
1.0
0.6
0.0
抑制劑對照
抑制劑
模擬物對照
模擬物

圖 61

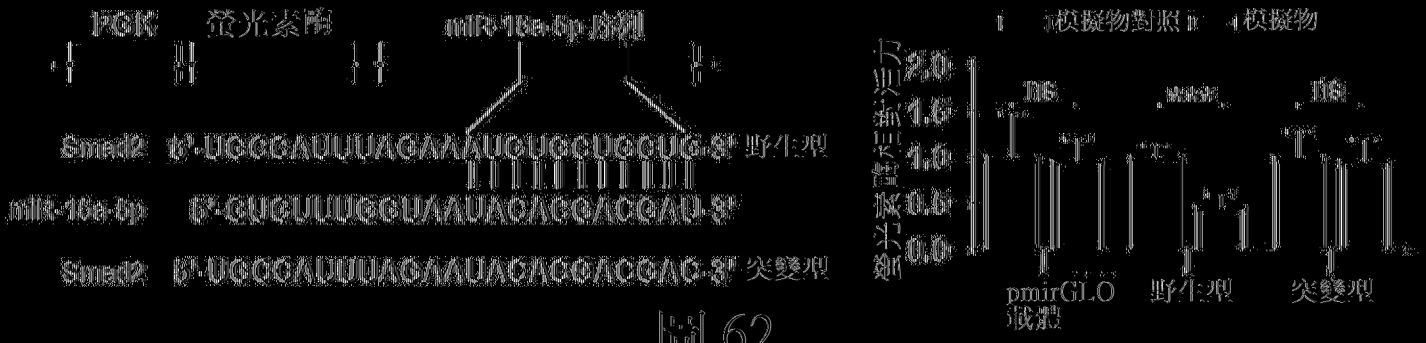

PGK
螢光素酶
miR-18a-5p 結合
Smad2
miR-18a-5p
Smad2
野生型
突變型
模擬物對照
模擬物
2.0
1.6
1.0
0.5
0.0
pmirGLO
載體
野生型
突變型

圖 62

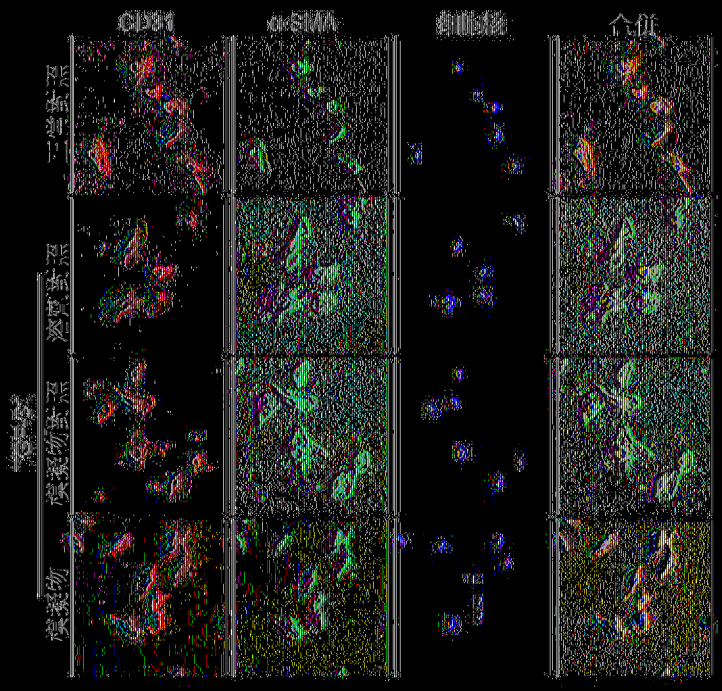

CD31
α-SMA
細胞核
合併
對照組
模擬物組
抑制劑組
模擬物+抑制劑組

圖 63

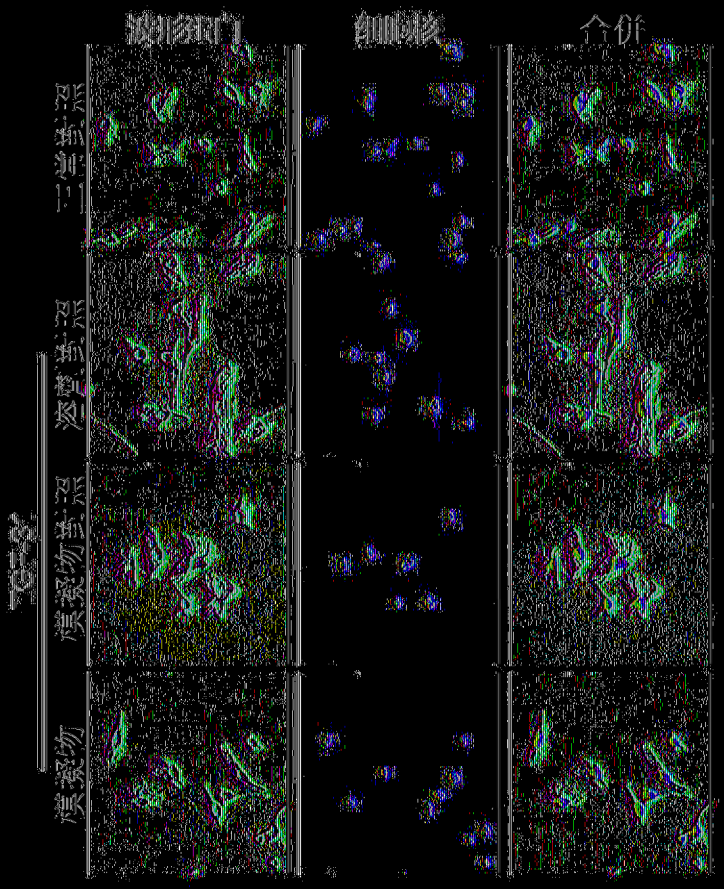

波形蛋白
細胞核
合併
正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物

圖 64

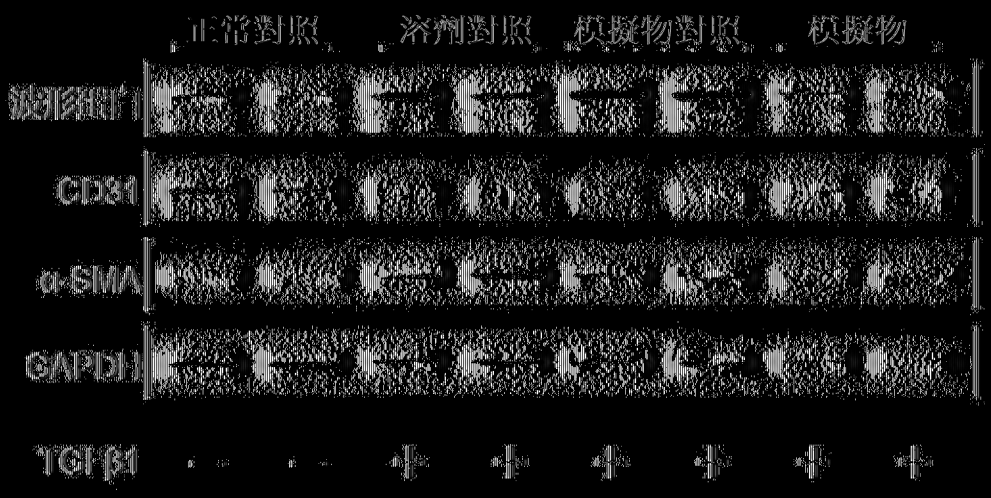

正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
波形蛋白
CD31
α-SMA
GAPDH
TGFβ1

圖 65

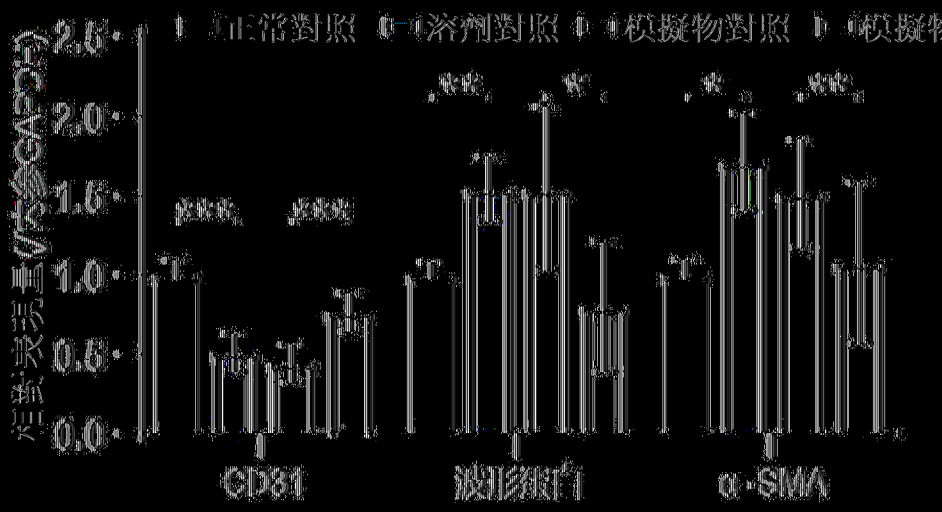

正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
蛋白質表現量
2.5
2.0
1.6
1.0
0.5
0.0
CD31
波形纖維
α-SMA

圖 66

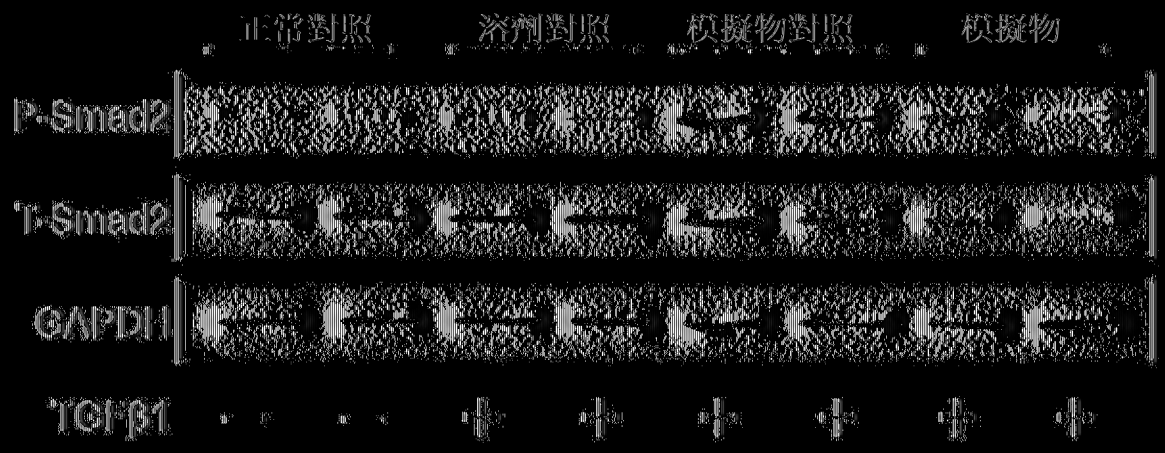

正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
P-Smad2
T-Smad2
GAPDH
TGFβ1

圖 67

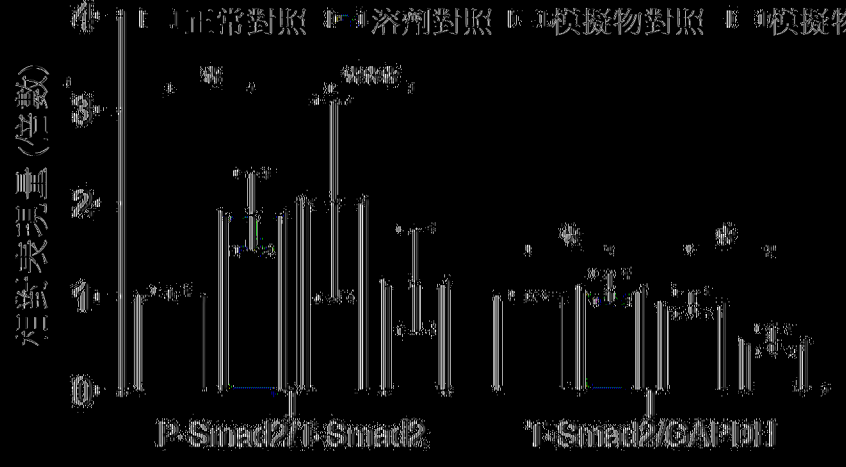

正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
蛋白質表現量(倍)
3
2
1
0
P-Smad2/T-Smad2
T-Smad2/GAPDH

圖 68

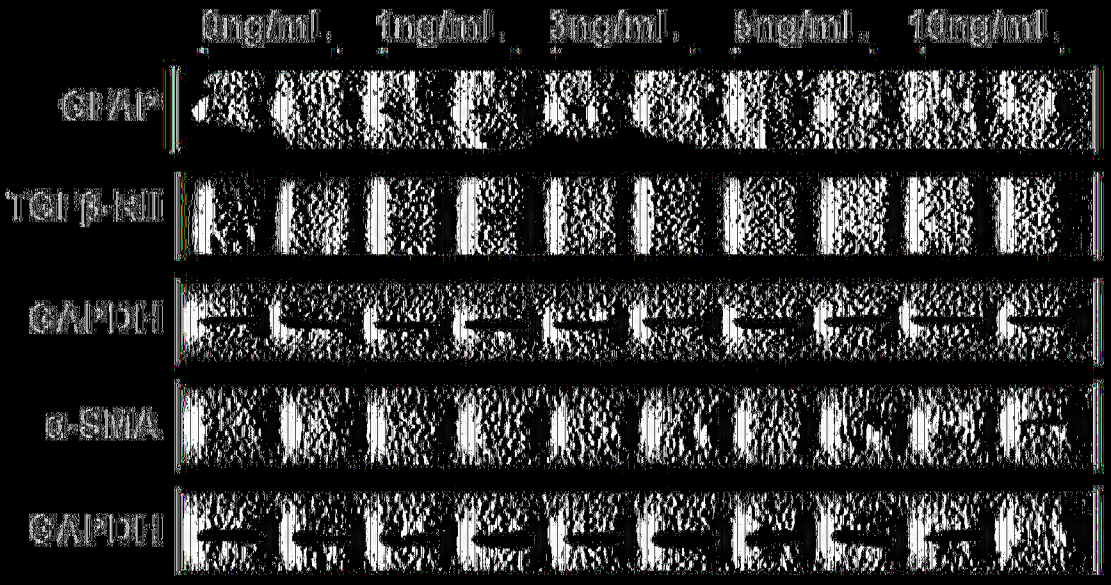

0ng/ml
1ng/ml
3ng/ml
5ng/ml
10ng/ml
GFAP
TGFβ-RII
GAPDH
α-SMA
GAPDH

圖 69

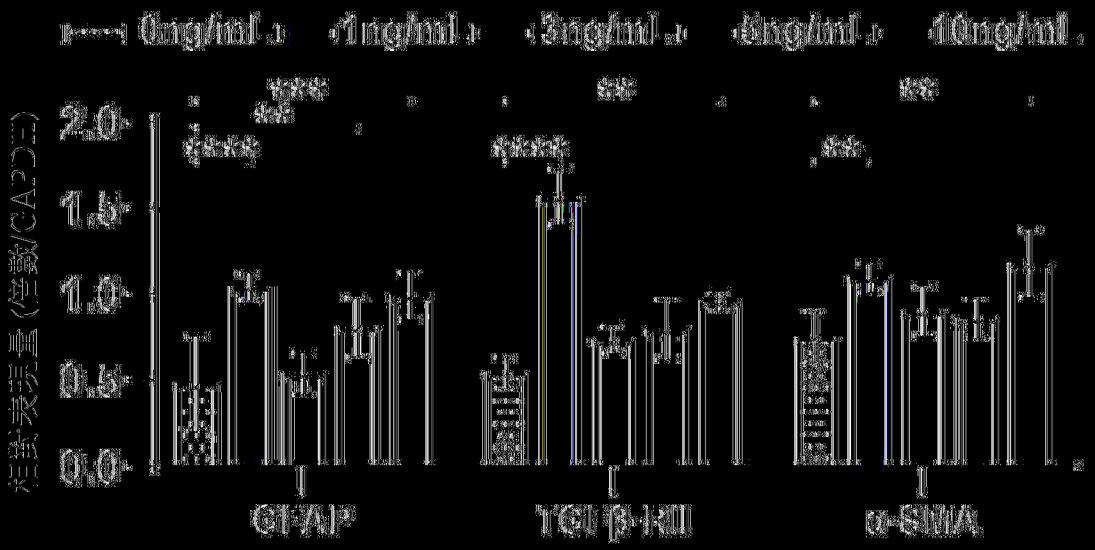

0ng/ml
1ng/ml
3ng/ml
5ng/ml
10ng/ml
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
GFAP
TGFβ-RII
α-SMA

圖 70

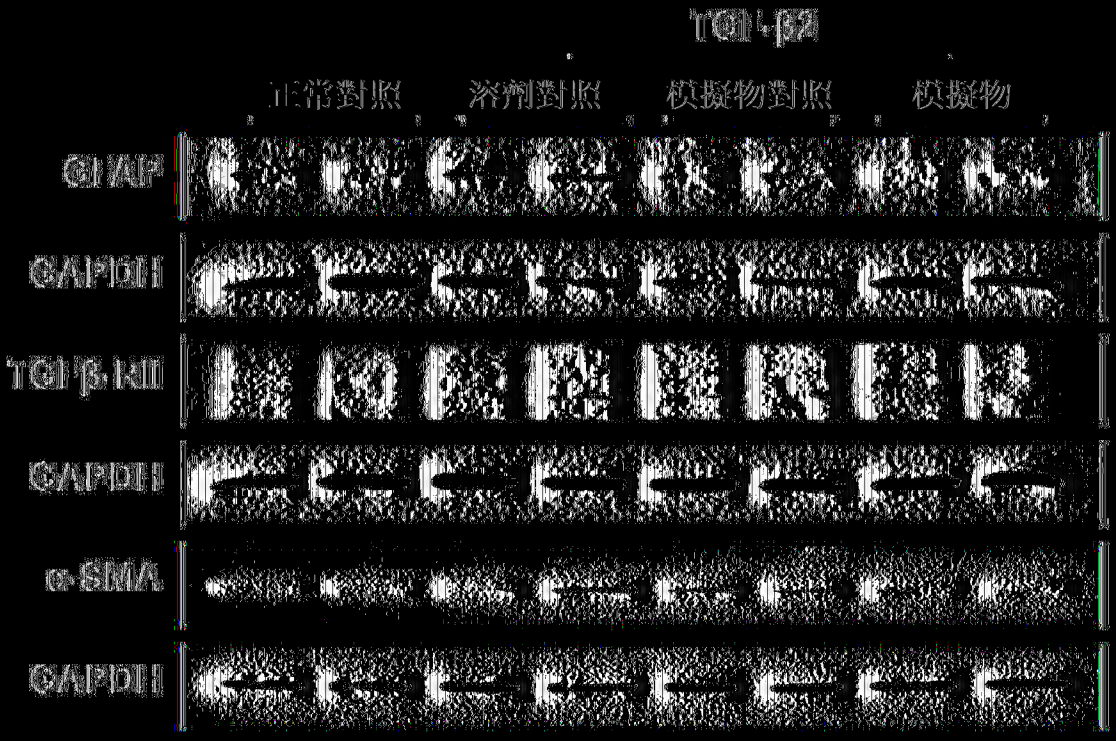

TGF-β2
正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
GFAP
GAPDH
TGFβRII
GAPDH
α-SMA
GAPDH

圖 1A

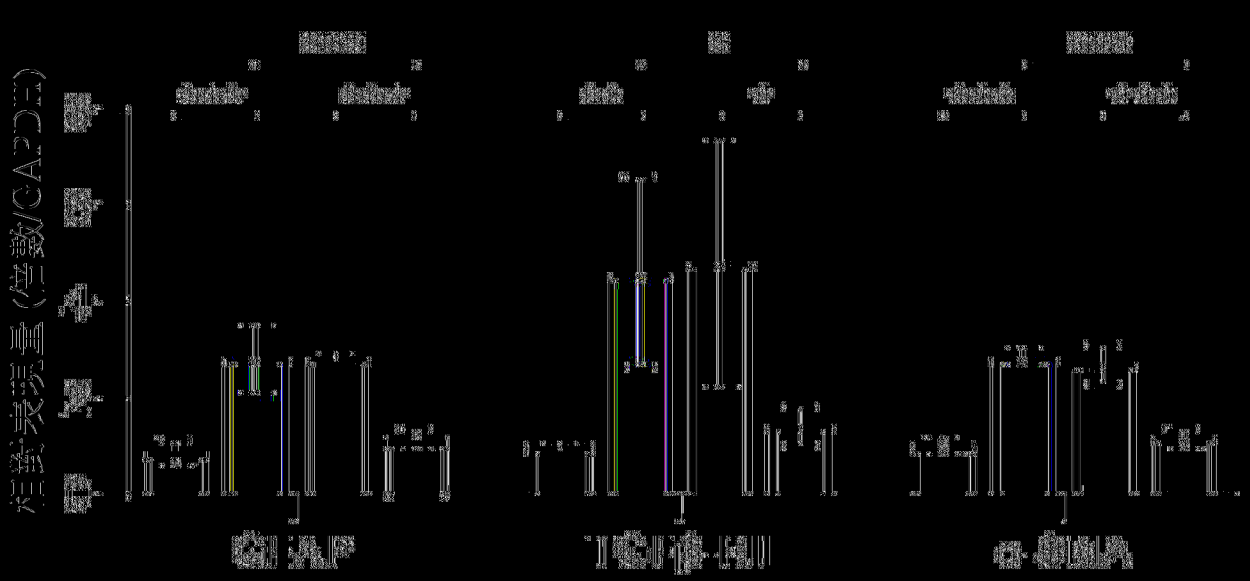

正常對照
TGF-β2
模擬物
TGF-β2
溶劑對照
TGF-β2
模擬物對照
相對表現量 (基因/GAPDH)
GFAP
TGFβRII
α-SMA

圖 1B

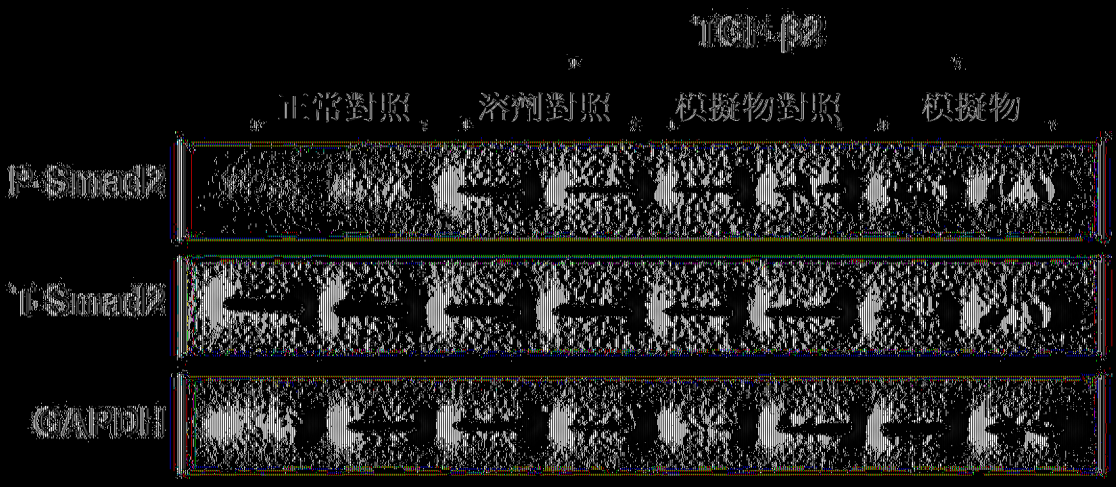

TGF-β2
正常對照
溶劑對照
模擬物對照
模擬物
P-Smad2
T-Smad2
GAPDH

圖 3

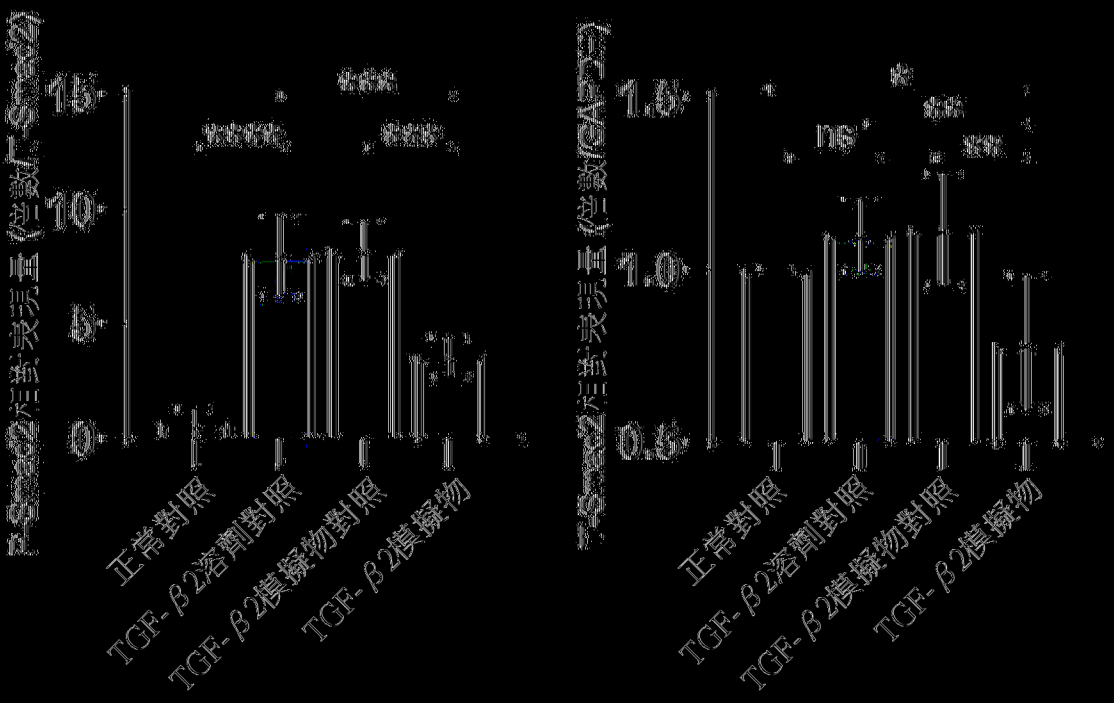

15
10
5
0
正常對照
TGF-β2溶劑對照
TGF-β2模擬物對照
TGF-β2模擬物
1.5
1.0
0.5

圖 4

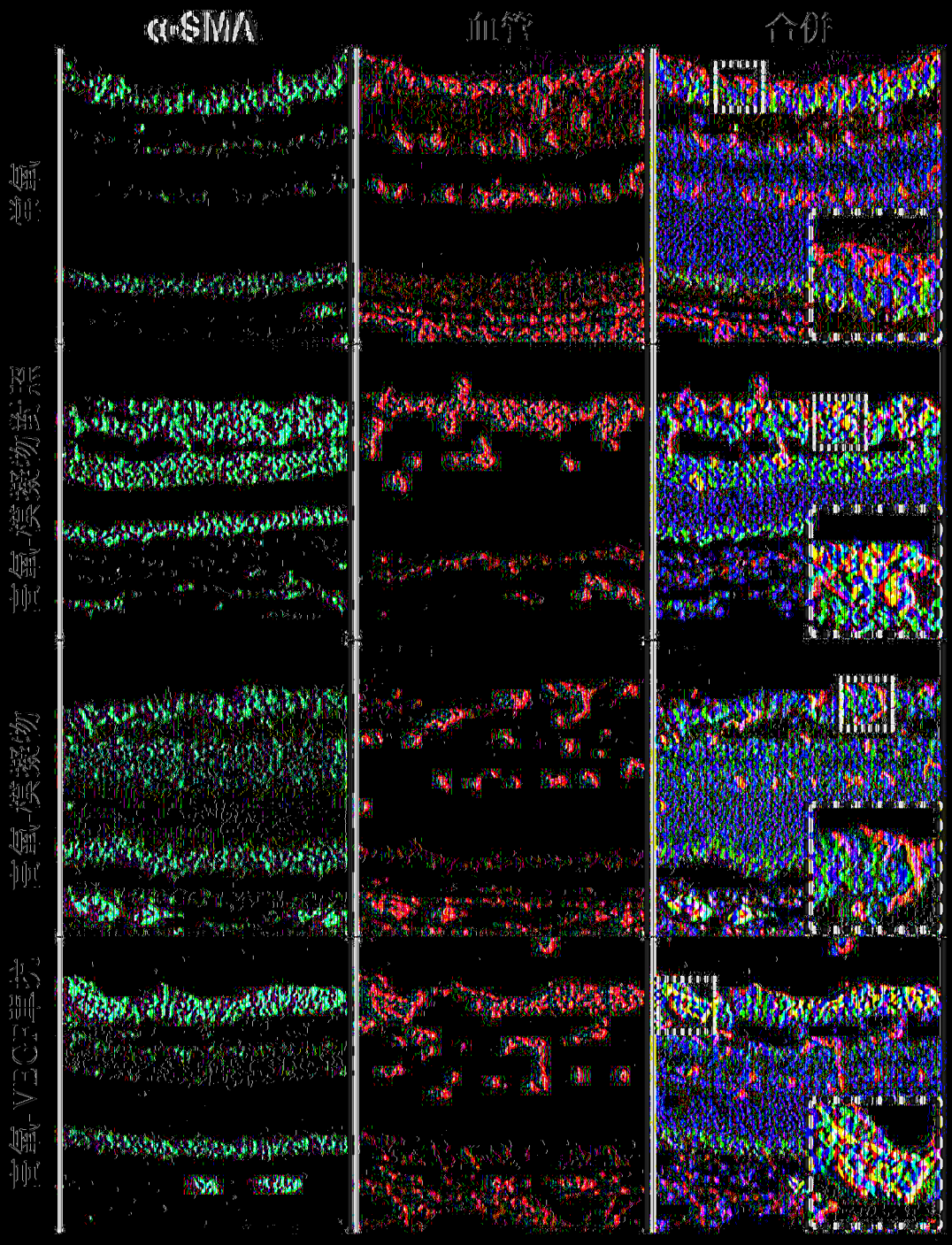


圖 15

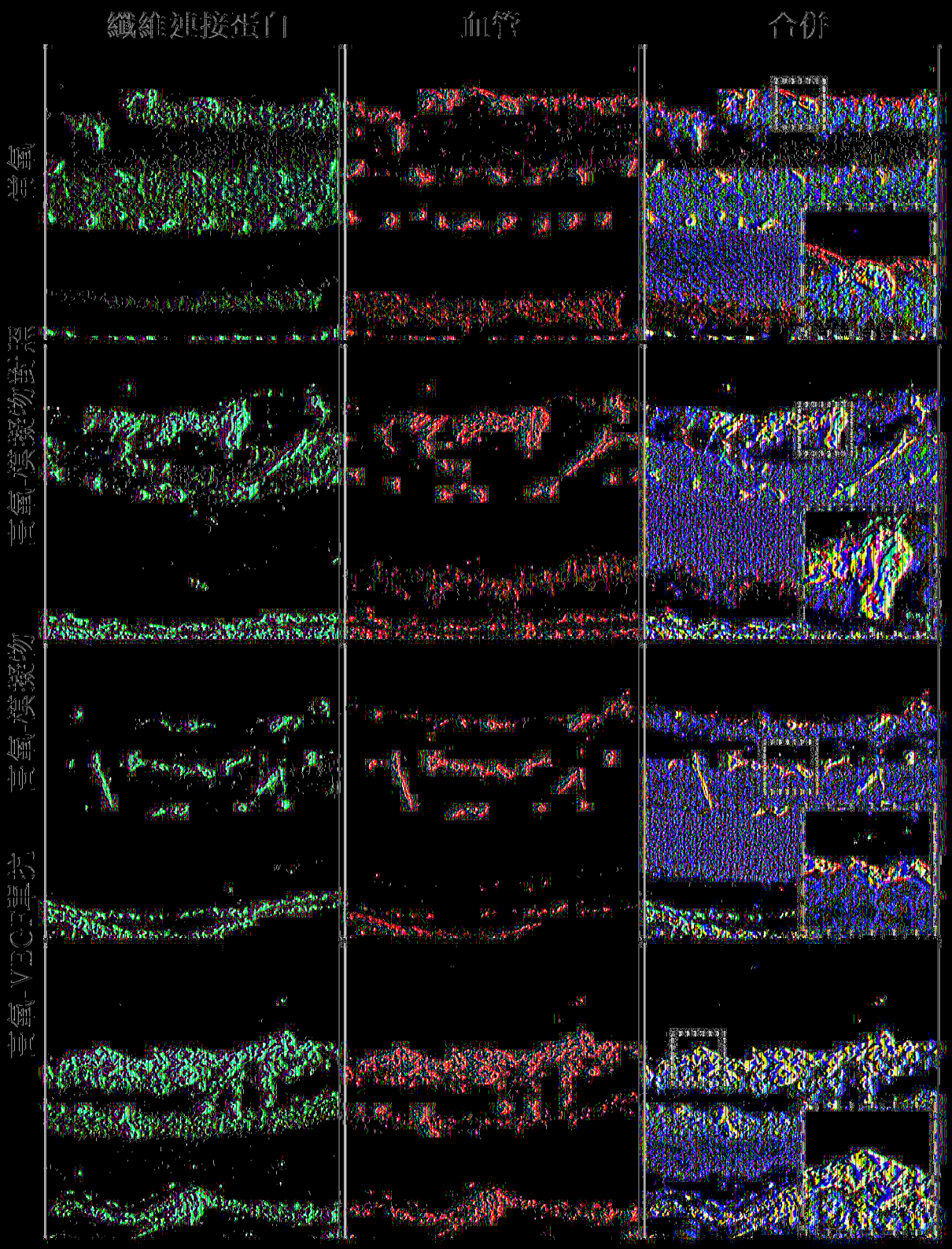
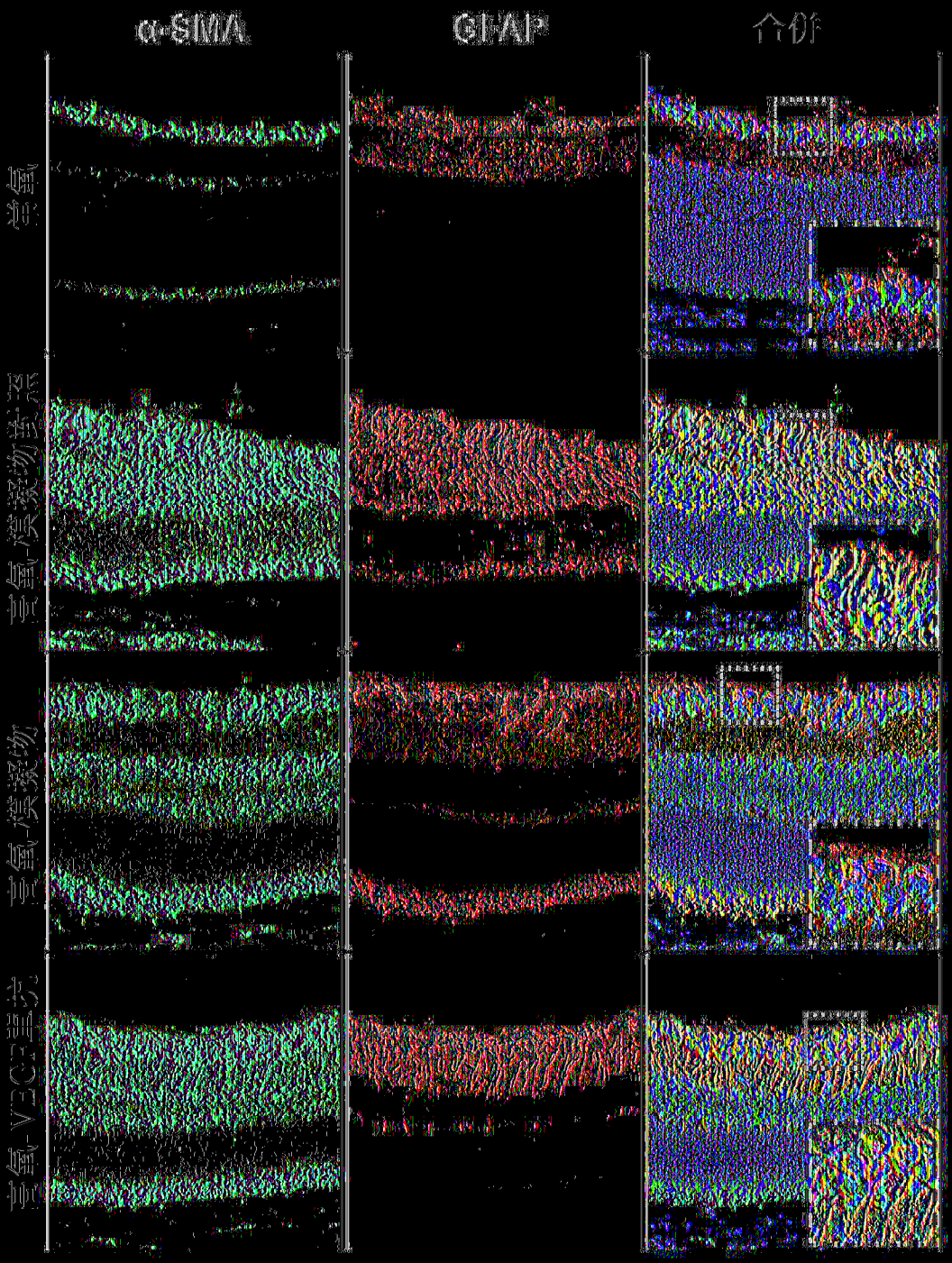


圖 16


α-SMA
GIAP
合併
無血管腫瘤基質
有血管腫瘤基質
有血管腫瘤
有血管腫瘤基質
有血管腫瘤
有血管腫瘤基質
有血管腫瘤

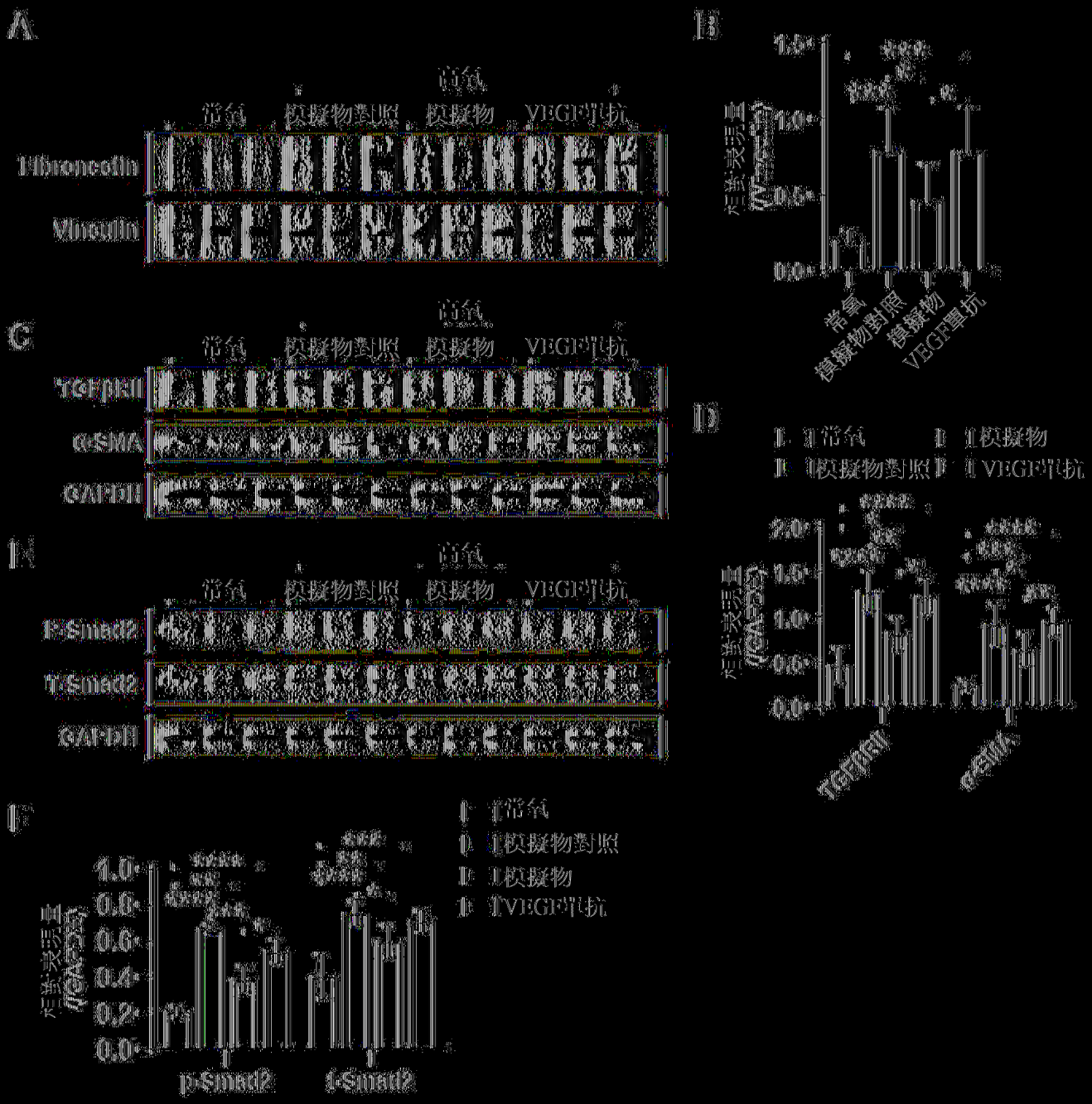

A
常氧
常氧
模擬物對照
模擬物
VEGF單抗
Fibronectin
Vimentin
B
相對表達量
常氧
模擬物對照
模擬物
VEGF單抗
C
常氧
常氧
模擬物對照
模擬物
VEGF單抗
TGFβRII
α-SMA
GAPDH
D
常氧
模擬物對照
模擬物
VEGF單抗
相對表達量
TGFβRII
α-SMA
N
常氧
常氧
模擬物對照
模擬物
VEGF單抗
P-Smad2
T-Smad2
GAPDH
F
常氧
模擬物對照
模擬物
VEGF單抗
相對表達量
p-Smad2
t-Smad2

圖 7/8

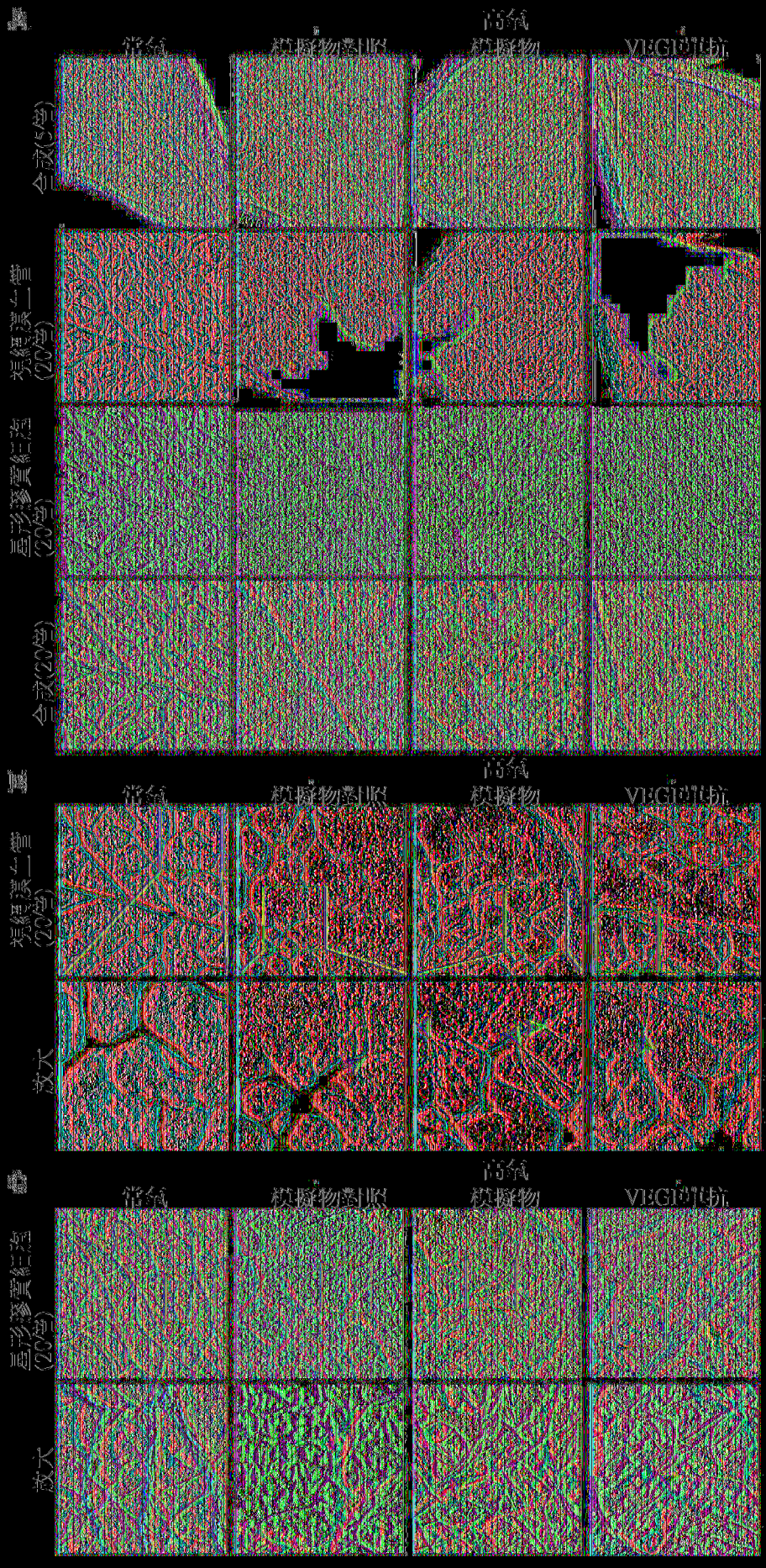

常氣
模擬物對照
高氣
模擬物
VEGF試劑
小麥(23日)
玉米(23日)
黃豆(23日)
小麥(23日)
常氣
模擬物對照
高氣
模擬物
VEGF試劑
玉米(23日)
黃豆(23日)
小麥
常氣
模擬物對照
高氣
模擬物
VEGF試劑
黃豆(23日)
小麥

圖 9

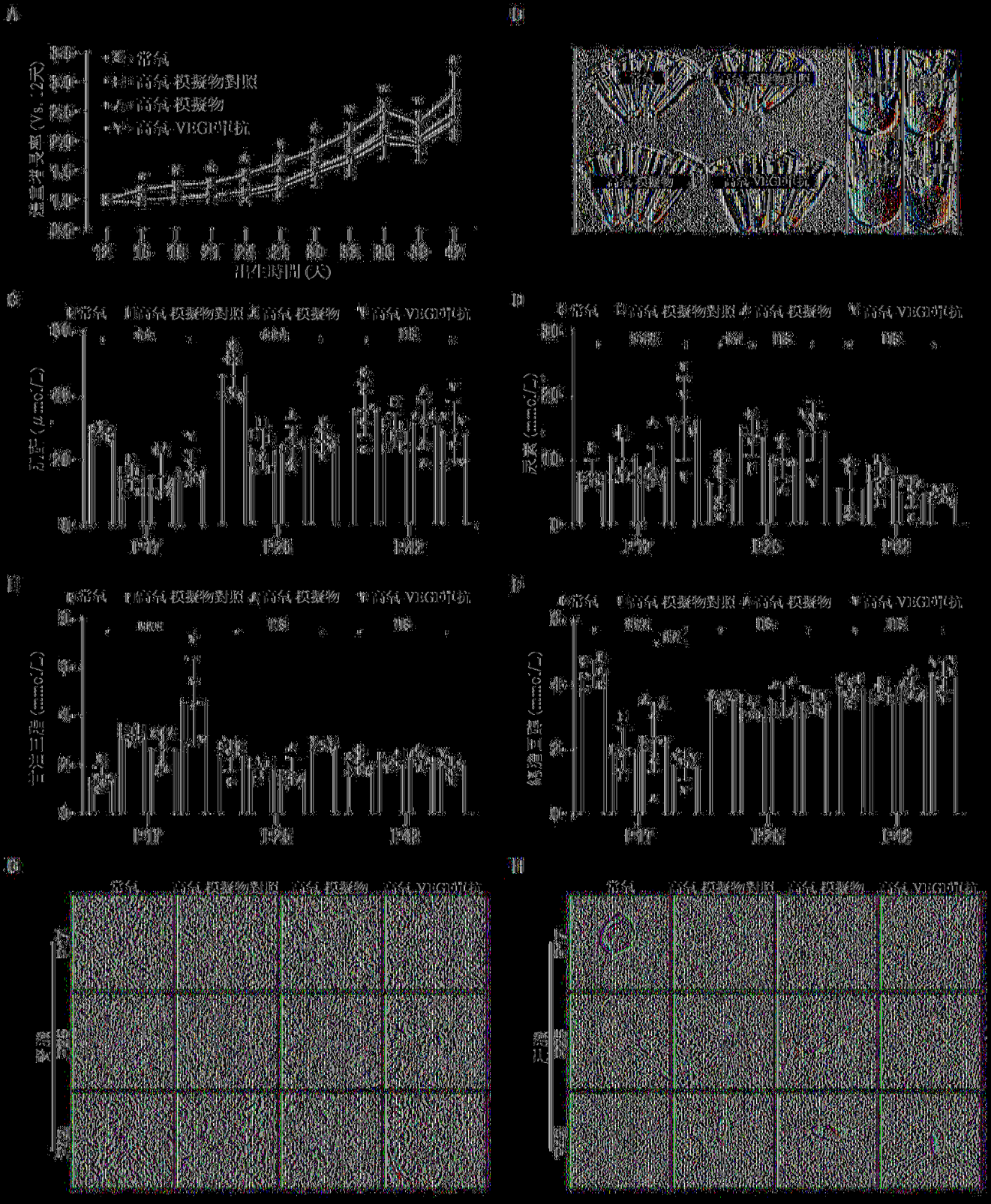
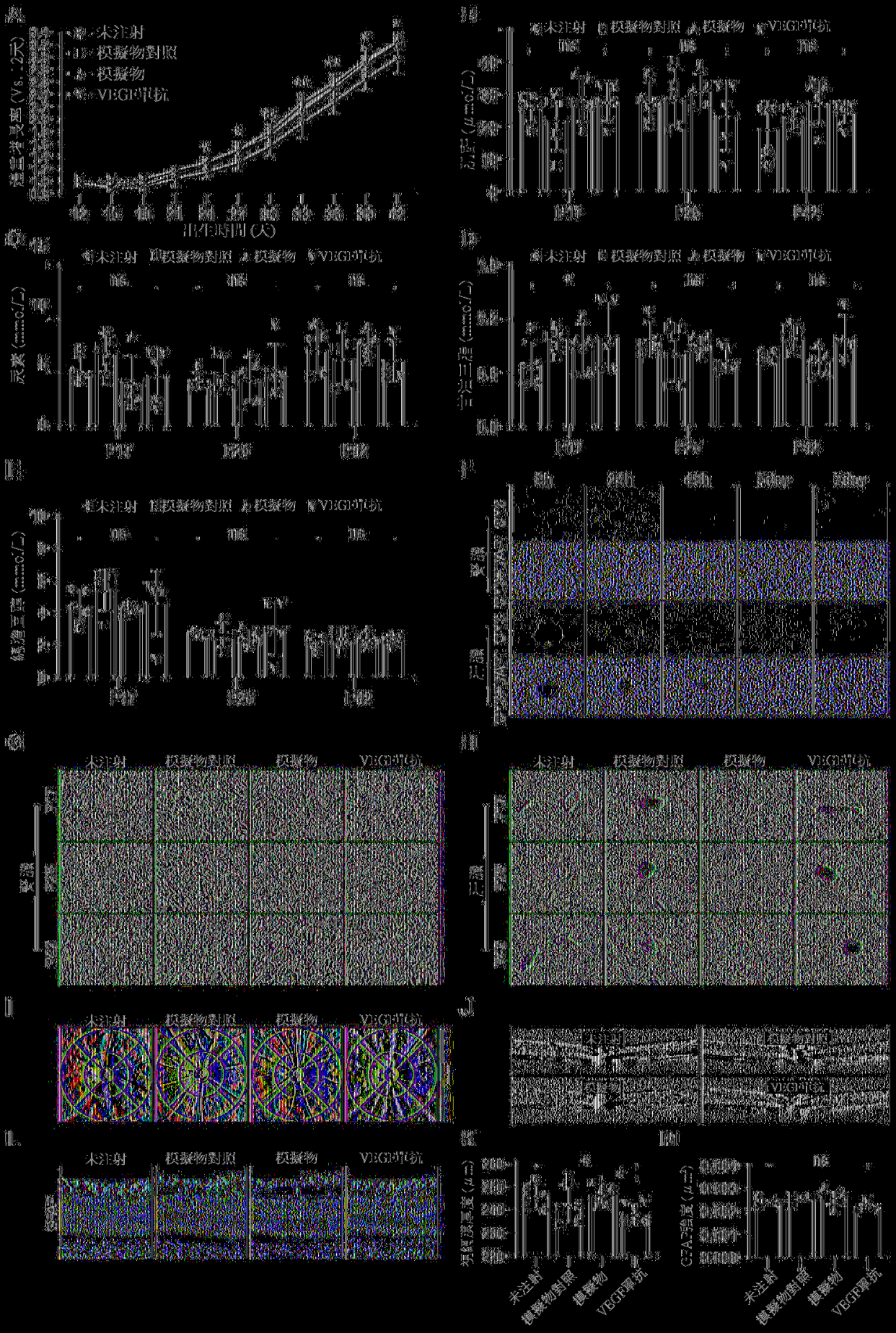

A
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF可抗
體重變異量 (Vs. 12天)
出生時間 (天)
B
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF可抗
C
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF可抗
肺泡 (μm²/個)
P07
P26
P42
D
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF可抗
肺泡 (μm²/個)
P07
P26
P42
E
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF可抗
P07
P26
P42
F
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF可抗
P07
P26
P42
G
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF可抗
H
常氧
高氧 模擬物對照
高氧 模擬物
高氧 VEGF可抗

圖 80


未注射
模擬物對照
模擬物
VEGF可抗
罹病時間 (天)
PT7
PT28
PT56
6h
24h
48h
96hr
144hr
未注射
模擬物對照
模擬物
VEGF可抗
未注射
模擬物對照
模擬物
VEGF可抗
未注射
模擬物對照
模擬物
VEGF可抗

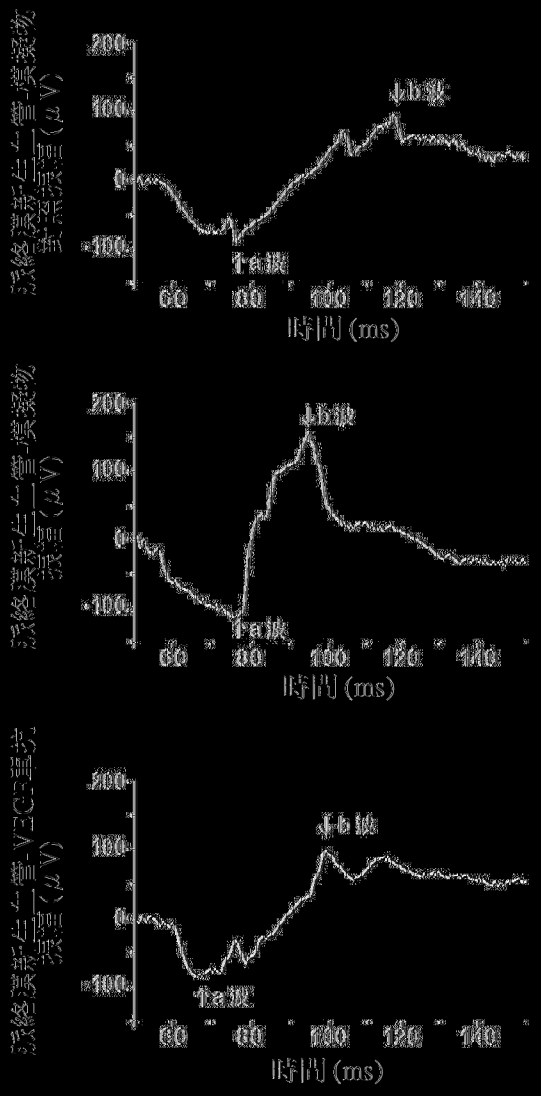

200
100
0
-100
Ta波
Tb波
60
80
100
120
140
時間 (ms)

圖 82

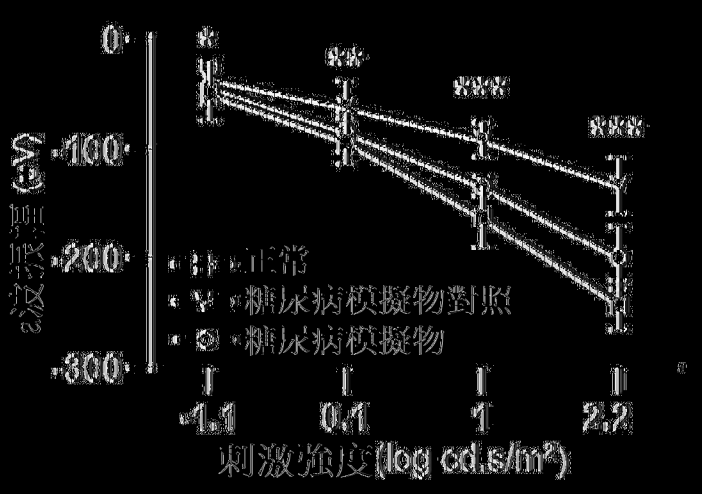

0
-100
-200
-300
正常
糖尿病模擬物對照
糖尿病模擬物
-1.1
0.1
1
2.2
刺激強度(log cd.s/m²)

圖 83

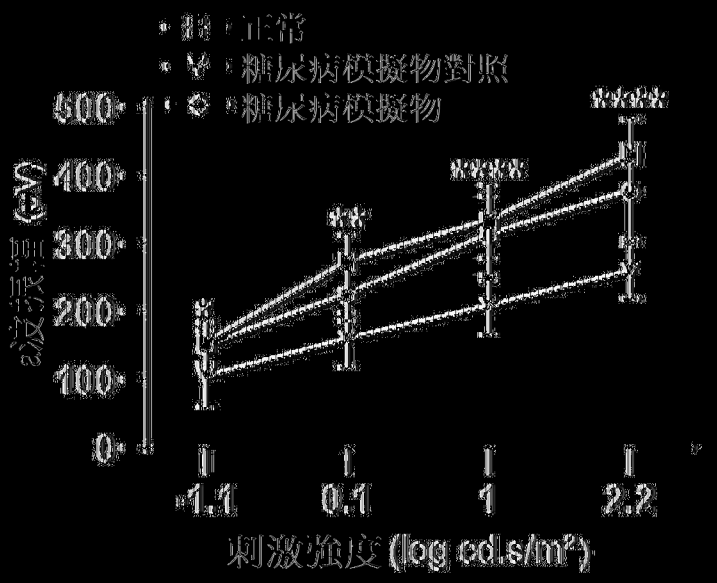

正常
糖尿病模擬物對照
糖尿病模擬物
500
400
300
200
100
0
-1.1
0.1
1
2.2
刺激強度 (log cd.s/m²)

圖 84

【發明摘要】

【中文發明名稱】　miR-15a-5p在治療眼底疾病中的應用

【中文】

本發明屬於生物醫藥技術領域，具體涉及miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p在治療眼底疾病中的應用。所述miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p具有生物活性，可在體外被細胞吸收，或者在體內被視網膜細胞吸收，並迅速發揮生物學作用。通過局部給藥的方式，所述miR-15a-5p或修飾的miR-15a-5p可以抑制病理性新生血管、促進無灌注區恢復、減少視網膜炎症因數表達、減輕視網膜纖維化並促進神經損傷修復。在生物醫藥領域中具有非常好的應用和研究價值。

【指定代表圖】　圖15

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無