



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104080911 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201280058690. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 11. 30

C12N 15/113(2006. 01)

A61K 31/7088(2006. 01)

(30) 优先权数据

11191362. 0 2011. 11. 30 EP

12163414. 1 2012. 04. 05 EP

12180419. 9 2012. 08. 14 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/074162 2012. 11. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/079701 EN 2013. 06. 06

(71) 申请人 不来梅大学

地址 德国不来梅港市 28359 图书馆路 1 号

(72) 发明人 约恩·布勒尼克 因加·弗洛尔

(74) 专利代理机构 北京国林贸知识产权代理有限公司 11001

代理人 李桂玲

权利要求书4页 说明书34页

序列表17页 附图11页

(54) 发明名称

miRNA 在胎盘组织中的表达

(57) 摘要

本发明提供了用于免疫调节的与在妊娠期间产生免疫耐受性相关的人类 miRNA 及其片段、衍生物和变体。所述 miRNA 可以用于诊断和治疗与免疫反应失调相关的病症、自身免疫病症、妊娠相关疾病、胎盘形成障碍或问题和由同种异体移植引起的并发症。另外,描述了用于诊断和治疗所述病症的新的药物组合物和诊断组合物。

1. 一种用于免疫调节的 miRNA, 其中所述 miRNA 是选自由 C19MC 簇或 miR-371-373 簇中所包含的转录单元中的任一个所编码的 miRNA。

2. 如权利要求 1 所述的 miRNA, 其中所述 miRNA 是选自: 具有 SEQ ID No: 1-66 的 hsa-miR-498、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-512-5p、hsa-miR-515-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-516a-5p、hsa-miR-516b-3p、hsa-miR-516b-5p、hsa-miR-517-5p、hsa-miR-517a-3p、hsa-miR-517b-3p、hsa-miR-517c-3p、hsa-miR-518a-3p、hsa-miR-518a-5p、hsa-miR-518b、hsa-miR-518c-3p、hsa-miR-518c-5p、hsa-miR-518d-3p、hsa-miR-518d-5p、hsa-miR-518e-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-518f-3p、hsa-miR-518f-5p、hsa-miR-519a-3p、hsa-miR-519a-5p、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-519b-5p、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-519c-5p、hsa-miR-519d、hsa-miR-519e-3p、hsa-miR-519e-5p、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-520c-5p、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-521、hsa-miR-522-3p、hsa-miR-522-5p、hsa-miR-523-3p、hsa-miR-523-5p、hsa-miR-524-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-525-3p、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-526a、hsa-miR-526b-3p、hsa-miR-526b-5p、hsa-miR-527、hsa-miR-1283、hsa-miR-1323、hsa-miR-371a-3p、hsa-miR-371a-5p、hsa-miR-371b-3p、hsa-miR-371b-5p、hsa-miR-372、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-373-5p。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 miRNA, 所述 miRNA 与由 C19MC 簇或 miR-371-373 簇所编码的 miRNA 具有共同种子序列, 其中所述 miRNA:

a.) 是选自: 具有 SEQ ID No: 67-78 的 hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302a-5p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302b-5p、hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-302c-5p、hsa-miR-302d-3p、hsa-miR-302d-5p; 和 / 或

b.) 以一致种子序列 AAGTGC 为特征。

4. 一种用于免疫调节的 miRNA 前体, 其包含如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA 的核酸序列。

5. 一种用于免疫调节的结合分子, 所述结合分子能够干扰如权利要求 1 到 4 中任一项所述的 miRNA 分子的靶基因的基因表达, 其中所述结合分子是选自用于免疫调节的包含合成 miRNA 模拟物、RNA 分子、抗体、适体、镜像异构体的分子群组。

6. 一种双链核酸, 其包含如权利要求 1 到 4 中任一项所述的 miRNA 或 miRNA 前体或如权利要求 5 所述的结合分子的核酸序列。

7. 一种载体, 其包含如权利要求 6 所述的双链核酸。

8. 一种宿主细胞, 其包含如权利要求 7 所述的载体。

9. 如权利要求 8 所述的宿主细胞, 其中所述细胞是人类细胞, 优选其中所述细胞是选自患者的自体细胞的群组。

10. 一种药物组合物或诊断剂, 其包含至少一种根据权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 6 所述的双链核酸、如权利要求 7 所述的载体和 / 或如权利要求 8 或 9 所述的宿主细胞作为药剂。

11. 如权利要求 10 所述的药物组合物或诊断剂, 其中所述活性剂被包埋在人造外来体中。

12. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子或如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物,其用于治疗自身免疫疾病。

13. 根据权利要求 12 所述的用途,其中所述自身免疫疾病是选自包括以下的疾病群组:急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、斑秃、强直性脊椎炎、抗磷脂综合征(APS)、自身免疫性心肌病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴细胞增生综合征(ALPS)、自身免疫性周围神经病变、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自身免疫性孕酮性皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、乳糜泻、冷凝集素病、克罗恩病、皮肤肌炎、1 型糖尿病、子宫内膜异位症、嗜酸性筋膜炎、胃肠道类天疱疮、古德帕斯彻氏综合征、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征(GBS)、桥本氏脑病、桥本氏甲状腺炎、特发性血小板减少性紫癜(自身免疫性血小板减少性紫癜)、红斑狼疮、米勒费雪综合征(格林-巴利综合征)、混合结缔组织病、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、复发性多软骨炎、类风湿性关节炎、斯耶格伦氏综合征、颞动脉炎(“巨细胞性动脉炎”)、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病(混合结缔组织病)、血管炎、韦格纳氏肉芽肿病。

14. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物或如权利要求 10 或 11 所述的诊断剂,其用于治疗或诊断妊娠相关疾病。

15. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物或如权利要求 10 或 11 根据权利要求 14 所述的诊断剂,其中所述妊娠相关疾病是选自由子痫、先兆子痫、HELLP 综合征和胎盘形成或植入障碍或问题组成的疾病群组。

16. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物,其用于预防或治疗同种异体移植物的排斥反应。

17. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物,其用于预防或治疗移植物对抗宿主的反应。

18. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物或如权利要求 10 所述的诊断剂,其被设计用于局部施用。

19. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物或如权利要求 10 所述的诊断剂,其被设计用于全身施用。

20. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 7 所述的载体、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物或如权利要求 10 或 11 所述的诊断剂,其用于离体和 / 或体内处理同种异体移植物。

21. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 7 所述的载体、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合

物药剂或如权利要求 10 或 11 所述的诊断剂,其用于离体和 / 或体内处理自体细胞或组织。

22. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA、如权利要求 4 所述的 miRNA 前体、如权利要求 5 所述的结合分子、如权利要求 7 所述的载体、如权利要求 10 或 11 所述的药物组合物药剂或如权利要求 10 或 11 所述的诊断剂,其用于离体和 / 或体内处理被自身免疫疾病侵袭的细胞或组织。

23. 一种针对如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 miRNA 和 / 或针对如权利要求 4 所述的 miRNA 前体的拮抗剂,所述拮抗剂选自用于治疗良性和恶性肿瘤的包含合成 miRNA 模拟物、RNA 分子、抗体、适体、镜像异构体和小分子的分子群组,所述良性和恶性肿瘤选自包括甲状腺肿瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、生殖细胞肿瘤、肝细胞癌、白血病和淋巴瘤的群组。

24. 一种获得用于免疫调节的外来体的方法,其包括分离和纯化来自表达如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 C19MC、miR-371-373 和 / 或 miR302-367 簇的 miRNA 的胚胎或胎儿细胞的细胞培养物的上清液的外来体。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述细胞培养物是选自包括来自脐带、羊膜、胎盘和绒毛膜的细胞的细胞群组。

26. 一种从生物样品获得用于免疫调节的外来体的方法,其包括以下步骤:由所述生物样品建立细胞培养物,收集所述细胞培养物的上清液,以及分离和纯化其外来体。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其中所述生物样品包含自体细胞、组织样品或吸出物。

28. 如权利要求 26 所述的方法,其中所述生物样品包含同种异体细胞、组织样品或吸出物。

29. 一种用于体外产生包含根据权利要求 1 到 3、5 和 6 中任一项所述的 miRNA、结合分子和 / 或双链核酸的外来体和根据权利要求 24 到 28 中任一项所获得的外来体的方法,其用于免疫调节。

30. 一种根据权利要求 24 到 29 中任一项所述的方法获得的外来体,其用于治疗自身免疫疾病。

31. 一种根据权利要求 24 到 29 中任一项所述的方法获得的外来体,其通过局部施用而用于治疗自身免疫疾病。

32. 如权利要求 31 所述的外来体,其中所述外来体是使用关节注射,优选关节内注射或鼻内施加来施用。

33. 一种根据权利要求 24 到 29 中任一项所述的方法获得的外来体,其通过全身施用而用于治疗自身免疫疾病。

34. 一种氮胞苷或其它 DNA 去甲基化剂的用途,其在如权利要求 24 到 28 中任一项所述的方法中用于处理细胞培养物以增强所述细胞分泌外来体的能力。

35. 一种氮胞苷或其它 DNA 去甲基化剂,其用于体内处理组织以增强其分泌关于如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 C19MC、miR-371-373 和 / 或 miR302-367 簇的 miRNA 有所增多的外来体的能力。

36. 一种诊断胚胎植入或精液样品授精的能力的方法,其包括分别在胚泡或胚胎的细胞培养基中或在精液中鉴别如权利要求 1 到 3 中任一项所述的 C19MC 簇和 / 或 miR-371-373 簇的至少一种 miRNA。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述 C19MC 簇和 / 或所述 miR-371-373 簇的所述至少一种 miRNA 的水平与对照样品相比相当或有所增加指示所述胚胎植入或精液样品授精的能力正常或有所增强,且所述至少一种 miRNA 的水平与对照样品相比有所降低指示所述胚胎植入或精液样品授精的能力降低。

38. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述 C19MC 簇和 / 或所述 miR-371-373 簇的所述至少一种 miRNA 的存在指示所述胚胎植入或精液样品授精的能力正常或有所增强,且所述簇的所述至少一种 miRNA 的不存在指示所述胚胎植入或精液样品授精的能力降低。

miRNA 在胎盘组织中的表达

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及可用于免疫调节的结合分子,特别是与调节免疫系统相关或可用于调节免疫系统的人类 miRNA 及其前体、衍生物、变体和模拟物。另外,本发明涉及包含所述结合分子、其前体和模拟物的药物和诊断组合物,所述组合物不仅在作为诊断工具用于鉴别与妊娠期间母体免疫系统的调节有关的转录单元的突变方面,而且在如妊娠相关疾病、胎盘形成障碍或问题、自身免疫疾病等与免疫系统误调节或过度活跃相关的病症的治疗策略中或在预防或治疗移植物对抗宿主的反应方面是有价值的。

背景技术

[0002] 为了成功怀孕,必需调节母体的免疫系统。已知胎盘的胚胎/胎儿部分,且确切地说是它的滋养层,能够产生可以通过与母体免疫系统局部地(即,在蜕膜内以及在外围)发生相互作用来预防胚胎排斥反应的因子。然而,免疫调节必须在早期妊娠期间就已经有效地发挥作用。在妊娠的前三个月,不少于 30%到 40%的蜕膜由母体免疫细胞组成,其中大部分(约 70%)是 NK 细胞,但已知巨噬细胞和 T 细胞也以相当大的百分比存在(Warning 等,2011)。

[0003] 尽管这些介导免疫调节的因子中有一些是已知的,但其它的仍然有待于鉴别。调节母体免疫系统的能力并不限于滋养层,胎儿基质细胞也能够与母体免疫系统的细胞进行有效的交谈(Roelen 等,2009)。旨在鉴别负责母体免疫系统的调节的机制的实验似乎指示可溶性因子以及粒子在这个过程中起重要作用。其中后者是可以由多种细胞类型释放的外来体,即,小膜囊,且含有由蛋白质、脂质以及 mRNA 和 miRNA 组成的多样性货物蛋白(cargo)(Valadi 等,2007)。在妊娠期间,滋养层的细胞可以分泌似乎会抑制母体免疫系统的外来体(Southcombe 等,2011)。然而,不知道这种抑制实际上是如何实现的和其中究竟涉及哪些因子。这些因子的鉴别将为妊娠相关病症或妊娠期间的并发症领域内的治疗和诊断策略提供新的手段,并且可能也可用于治疗若干种与免疫系统失调或过度活跃相关的疾病。

[0004] 已经通过权利要求书中所描绘的和下文所描述的实施方案解决了这一技术问题。

发明内容

[0005] 本文中所提供的数据令人惊讶地突出了 C19MC miRNA 在早期妊娠和胎盘基质细胞中的早期功能。这个数据暗示 C19MC 以及 miR-371-3 簇的 miRNA 是重要的免疫调节剂。已经指定编码这两个簇的基因在染色体 19 的长臂上紧邻彼此(图 1)。就本文中所提供的的数据而言,本发明总体上涉及提供用于免疫调节的 C19MC 以及 miR-371-3 簇的 miRNA、其前体。就此而言,也提供了共有共同种子序列 AAGTGC 的其它 miRNA 和能够干扰这些 miRNA 分子的靶基因的基因表达的结合分子。此外,本发明提供了包含如上文和下文所定义的 miRNA 分子的核酸序列的核酸、载体和宿主细胞,其中所述核酸序列可操作地连接到调节序列,例如启动子、增强子,所述调节序列用于诱导和控制本发明的上述 miRNA 分子、其前体或其它结合分子在宿主细胞和/或患者中的表达。就此而言,本发明还提供了可用于治疗或诊断总

体上与免疫系统失调有关联的病症（如同在自身免疫疾病、妊娠相关疾病、胎盘形成或植入障碍或问题的情况下）和治疗或预防同种异体移植（植入物）的排斥反应或由于移植对抗宿主的反应所致的病症的药物组合和诊断组合。此外，本发明还提供了可用于处理被自身免疫疾病侵袭的细胞或者预防或处理例如自身免疫疾病情况下的自体组织破坏现象的药剂。本发明所提供的和上述组合中所使用的药剂是被设计用于不同的施用形式，如局部或全身施用。

附图说明

[0006] 图 1 :具有两个 miRNA 簇,即 C19MC 和 miR-371-3 的染色体区 19q13 的图解

[0007] 图 2 :52 个胎盘组织中的 miRNA miR-520c-3p 的相对表达相对于妊娠周数的关系图。

[0008] 图 3 :绒毛膜的显微解剖图。首先从绒毛膜 (A) 切除基质核心 (B),然后切除滋养层 (C)。

[0009] 图 4 :以下 miRNA 在基质和滋养层细胞中的相对表达 :miR-371-3p、miR-372、miR-373 和 miR-520c-3p。

[0010] 图 5 :miR-520c-3p 和 miR-517a-3p 在蜕膜和滋养层细胞中的相对表达。

[0011] 图 6 :说明靶向基因转录物的 miRNA 充当 Fas-FasL 诱导的细胞凋亡的抑制剂的图解。已经根据 miRBase (18 发行版) 鉴别了标靶。

[0012] 图 7 :分别在 96 小时和 120 小时利用 BrdU 测定在与 JEG-3 细胞和 bAMC 共培养的 PBMC 中所测量的细胞增殖。

[0013] 图 8 :分别在 96 小时和 120 小时利用 BrdU 测定在处于混合淋巴细胞反应中且用 Con A 刺激的单独 PBMC 中所测量的细胞增殖。

[0014] 图 9 :BC280723 的基因组位置。

[0015] 图 10 :miR-517a-3p 在经编码 C19MC 的 BAC 载体转染的牛羊膜源性细胞中在转染后 24 小时、48 小时和 6 天时与模拟转染 (mock transfected) 细胞相比的相对表达。对于 24 小时和 6 天,进行重复转染。

[0016] 图 11 :(A)miR-520c-3p 在 HCT-116 和 JEG-3 细胞中的相对表达 (关于定量 RT-PCR 的描述,参见实施例 1)。(B) 分别经 JEG-3 细胞和 HCT-116 细胞的上清液处理的 Jurkat 细胞中的 c-FLIP 的相对表达。

具体实施方式

[0017] miR-371-373 (371-3) 簇仅含有 7 个 miRNA,而 C19MC 是目前已知的最大的人类 miRNA 簇,总共有大约 60 种不同的 miRNA (表 1)。已经报告了 C19MC 的成员大量地表达于胎盘的滋养层而不是基质部分中,且在妊娠期间的表达有所增加 (Luo 等,2009)。关于 miR371-373 簇在胎盘中的表达,对其细节还是未知。

[0018] 然而,尚未将两个簇的 miRNA 作为可以调节母体免疫系统的候选物加以论述。反对它们与母体免疫调节有关的有力论据来自于现有文献。首先,C19MC 簇成员的表达似乎限于滋养层 (Luo 等,2009),但胎盘基质细胞已被描述为也具有免疫抑制功能 (Roelen 等,2009)。其次,由 C19MC 簇的 miRNA 成员的表达增加 (Luo 等,2009) 得出的结论是这些

miRNA 的功能与妊娠晚期有相当大的关系。

[0019] 然而,与上文相反,本发明内所提供的数据突出了 C19MCmiRNA 在早期妊娠和胎盘基质细胞中的早期功能(参见实施例 1 到 4)。就下文更详细描述的这些实验结果而言,与此同时提供了 C19MC 以及 miR-371-3 簇的 miRNA 作为母体免疫系统的重要调节剂。

[0020] 由于单一 miRNA 能够与超过一个靶标相互作用以及由于 miR-371-3 和 C19MC 簇(后者在甚至更大的程度上)中存在多种不同的 miRNA,故 miRNA 的免疫调节功能可能基于多种机制。仅作为一个实例,不希望受理论束缚,实施例 8 中已经描绘了促细胞凋亡功能,该实施例显示 C19MC 簇的成员与拮抗 Fas-FasL 诱导的细胞凋亡的不同 mRNA 相互作用。然而,其它相关机制,包括诱导细胞衰老以及可逆细胞周期停滞和无反应性,可能也受 miRNA 影响。因此,关于这些发现的治疗意义,在本发明的一个实施方案中,使用本文中所描述的两个簇的单一 miRNA、每单个簇的 miRNA 以及其不同的组合来满足所预期的治疗目的。

[0021] 表 1: 针对染色体带 19q13 指定的 C19MC 和 miR371-3 簇的 miRNA(参考图 1)。ID 号依据 miRBase18 发行版(2011 年 11 月)的条目;也参见 Bentwich 等, *Nat Genet.* 37(2005), 766-770 和 Landgraf 等, *Cell* 129(2007), 1401-1414。表中所列的 miRNA 前体的序列可以获自相应 miRNA 的 miRBase 条目。

[0022]

依据 miRBase 的 miRNA ID	序列	簇
hsa-miR-498	UUUCAAGCCAGGGGGCGUUUUUC SEQ ID NO.: 1	C19MC
hsa-miR-512-3p	AAGUGCUGUCAUAGCUGAGGUC SEQ ID NO.: 2	C19MC
hsa-miR-512-5p	CACUCAGCCUUGAGGGCACUUUC SEQ ID NO.: 3	C19MC
hsa-miR-515-3p	GAGUGCCUUCUUUUGGAGCGUU SEQ ID NO.: 4	C19MC
hsa-miR-515-5p	UUCUCCAAAAGAAAGCACUUUCUG SEQ ID NO.: 5	C19MC
hsa-miR-516a-3p	UGCUUCCUUUCAGAGGGU SEQ ID NO.: 6	C19MC
hsa-miR-516a-5p	UUCUCGAGGAAAGAAGCACUUUC SEQ ID NO.: 7	C19MC
hsa-miR-516b-3p	UGCUUCCUUUCAGAGGGU SEQ ID NO.: 8	C19MC
hsa-miR-516b-5p	AUCUGGAGGUAAGAAGCACUUU SEQ ID NO.: 9	C19MC
hsa-miR-517-5p	CCUCUAGAUGGAAGCACUGUCU SEQ ID NO.: 10	C19MC
hsa-miR-517a-3p	AUCGUGCAUCCCUUUAGAGUGU SEQ ID NO.: 11	C19MC
hsa-miR-517b-3p	AUCGUGCAUCCCUUUAGAGUGU SEQ ID NO.: 12	C19MC
hsa-miR-517c-3p	AUCGUGCAUCCUUUUAGAGUGU SEQ ID NO.: 13	C19MC
hsa-miR-518a-3p	GAAAGCGCUUCCCUUUGCUGGA SEQ ID NO.: 14	C19MC
hsa-miR-518a-5p	CUGCAAAGGGAAGCCCUUUC SEQ ID NO.: 15	C19MC
hsa-miR-518b	CAAAGCGCUCCCUUUAGAGGU SEQ ID NO.: 16	C19MC
hsa-miR-518c-3p	CAAAGCGCUUCUCUUUAGAGUGU SEQ ID NO.: 17	C19MC
hsa-miR-518c-5p	UCUCUGGAGGGAAGCACUUUCUG	C19MC

[0023]

	SEQ ID NO.: 18	
hsa-miR-518d-3p	CAAAGCGCUUCCCUUUGGAGC SEQ ID NO.: 19	C19MC
hsa-miR-518d-5p	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCUG SEQ ID NO.: 20	C19MC
hsa-miR-518e-3p	AAAGCGCUUCCCUUCAGAGUG SEQ ID NO.: 21	C19MC
hsa-miR-518e-5p	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG SEQ ID NO.: 22	C19MC
hsa-miR-518f-3p	GAAAGCGCUUCUCUUUAGAGG SEQ ID NO.: 23	C19MC
hsa-miR-518f-5p	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCUC SEQ ID NO.: 24	C19MC
hsa-miR-519a-3p	AAAGUGCAUCCUUUUAGAGUGU SEQ ID NO.: 25	C19MC
hsa-miR-519a-5p	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG SEQ ID NO.: 26	C19MC
hsa-miR-519b-3p	AAAGUGCAUCCUUUUAGAGGUU SEQ ID NO.: 27	C19MC
hsa-miR-519b-5p	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG SEQ ID NO.: 28	C19MC
hsa-miR-519c-3p	AAAGUGCAUCUUUUUAGAGGAU SEQ ID NO.: 29	C19MC
hsa-miR-519c-5p	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG SEQ ID NO.: 30	C19MC
hsa-miR-519d	CAAAGUGCCUCCCUUUAGAGUG SEQ ID NO.: 31	C19MC
hsa-miR-519e-3p	AAGUGCCUCCUUUUAGAGUGUU SEQ ID NO.: 32	C19MC
hsa-miR-519e-5p	UUCUCCAAAAGGGAGCACUUUC SEQ ID NO.: 33	C19MC
hsa-miR-520a-3p	AAAGUGCUUCCCUUUGGACUGU SEQ ID NO.: 34	C19MC
hsa-miR-520a-5p	CUCCAGAGGGAAGUACUUUCU SEQ ID NO.: 35	C19MC
hsa-miR-520b	AAAGUGCUUCCUUUUAGAGGG SEQ ID NO.: 36	C19MC
hsa-miR-520c-3p	AAAGUGCUUCCUUUUAGAGGGU SEQ ID NO.: 37	C19MC
hsa-miR-520c-5p	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCUG SEQ ID NO.: 38	C19MC
hsa-miR-520d-3p	AAAGUGCUUCUCUUUGGUGGGU SEQ ID NO.: 39	C19MC
hsa-miR-520d-5p	CUACAAAGGGAAGCCCUUUC SEQ ID NO.: 40	C19MC
hsa-miR-520e	AAAGUGCUUCCUUUUUGAGGG SEQ ID NO.: 41	C19MC
hsa-miR-520f	AAGUGCUUCCUUUUAGAGGGUU SEQ ID NO.: 42	C19MC
hsa-miR-520g	ACAAAGUGCUUCCCUUUAGAGUGU SEQ ID NO.: 43	C19MC
hsa-miR-520h	ACAAAGUGCUUCCCUUUAGAGU SEQ ID NO.: 44	C19MC
hsa-miR-521	AACGCACUCCCUUUAGAGUGU SEQ ID NO.: 45	C19MC
hsa-miR-522-3p	AAA AUGGUUCCCUUUAGAGUGU	C19MC

[0024]

	SEQ ID NO.: 46	
hsa-miR-522-5p	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG SEQ ID NO.: 47	C19MC
hsa-miR-523-3p	GAACGCGCUUCCCUAUAGAGGGU SEQ ID NO.: 48	C19MC
hsa-miR-523-5p	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG SEQ ID NO.: 49	C19MC
hsa-miR-524-3p	GAAGGCGCUUCCCUUUGGAGU SEQ ID NO.: 50	C19MC
hsa-miR-524-5p	CUACAAAGGGAAGCACUUUCUC SEQ ID NO.: 51	C19MC
hsa-miR-525-3p	GAAGGCGCUUCCCUUUAGAGCG SEQ ID NO.: 52	C19MC
hsa-miR-525-5p	CUCCAGAGGGAUGCACUUUCU SEQ ID NO.: 53	C19MC
hsa-miR-526a	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCUG SEQ ID NO.: 54	C19MC
hsa-miR-526b-3p	GAAAGUGCUUCCUUUUAGAGGC SEQ ID NO.: 55	C19MC
hsa-miR-526b-5p	CUCUUGAGGGAAGCACUUUCUGU SEQ ID NO.: 56	C19MC
hsa-miR-527	CUGCAAAGGGAAGCCCUUC SEQ ID NO.: 57	C19MC
hsa-miR-1283	UCUACAAAGGAAAGCGCUUUCU SEQ ID NO.: 58	C19MC
hsa-miR-1323	UCAAAACUGAGGGGCAUUUUCU SEQ ID NO.: 59	C19MC
hsa-miR-371a-3p	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU SEQ ID NO.: 60	miR-371-3
hsa-miR-371a-5p	ACUCAACUGUGGGGGCACU SEQ ID NO.: 61	miR-371-3
hsa-miR-371b-3p	AAGUGCCCCACAGUUUGAGUGC SEQ ID NO.: 62	miR-371-3
hsa-miR-371b-5p	ACUCAAAAGAUGGCGGCACUUU SEQ ID NO.: 63	miR-371-3
hsa-miR-372	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU SEQ ID NO.: 64	miR-371-3
hsa-miR-373-3p	GAAGUCUUCGAUUUUGGGGUGU SEQ ID NO.: 65	miR-371-3
hsa-miR-373-5p	ACUCAAAAUGGGGGCGCUUCC SEQ ID NO.: 66	miR-371-3

[0025] 基于这个实验数据,本发明总体上涉及用于免疫调节的 miRNA,其中所述 miRNA 是选自自由如以上表 1 中所列的 C19MC 簇或 miR-371-373 簇中所包含的转录单元中的任一者编码的 miRNA。

[0026] 在一个实施方案,本发明的上述 miRNA 是选自:具有 SEQ ID Nos.:1 到 66 的 hsa-miR-498、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-512-5p、hsa-miR-515-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-516a-5p、hsa-miR-516b-3p、hsa-miR-516b-5p、hsa-miR-517-5p、hsa-miR-517a-3p、hsa-miR-517b-3p、hsa-miR-517c-3p、hsa-miR-518a-3p、hsa-miR-518a-5p、hsa-miR-518b、hsa-miR-518c-3p、hsa-miR-518c-5p、hsa-miR-518d-3p、hsa-miR-518d-5p、hsa-miR-518e-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-518f-3p、hsa-miR-518f-5p、hsa-miR-519a-3p、hsa-miR-519a-5p、

hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-519b-5p、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-519c-5p、hsa-miR-519d、hsa-miR-519e-3p、hsa-miR-519e-5p、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-520c-5p、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-521、hsa-miR-522-3p、hsa-miR-522-5p、hsa-miR-523-3p、hsa-miR-523-5p、hsa-miR-524-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-525-3p、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-526a、hsa-miR-526b-3p、hsa-miR-526b-5p、hsa-miR-527、hsa-miR-1283、hsa-miR-1323、hsa-miR-371a-3p、hsa-miR-371a-5p、hsa-miR-371b-3p、hsa-miR-371b-5p、hsa-miR-372、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-373-5p。

[0027] 种子序列对于 miRNA 与 mRNA 的结合是必需的。如本发明中所提到的“种子序列”或“种子区”是主要位于 miRNA 5' 端位置 2-7 处的保守七聚序列。纵使 miRNA 和其靶 mRNA 的碱基配对不完全匹配，“种子序列”也必须完全互补。因此，本发明还涉及与由簇 C19MC 或 miR-371-3 所编码的 miRNA 具有共同种子序列的 miRNA，其中所述 miRNA：

[0028] a.) 是选自具有 SEQ ID No:67 到 78 的 hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302a-5p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302b-5p、hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-302c-5p、hsa-miR-302d-3p、hsa-miR-302d-5p；和 / 或

[0029] b.) 以一致种子序列 AAGTGC 为特征。

[0030] 由 hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302a-5p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302b-5p、hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-302c-5p、hsa-miR-302d-3p、hsa-miR-302d-5p 组成的上述群组的 miRNA 和其前体是由簇 miR302-367 编码，其序列和登录号列于以下表 2 中。

[0031] 表 2：具有与由簇 C19MC 或 miR-371-3 所编码的 miRNA 的种子序列相同的种子序列 AAGTGC 的簇 miR302-367 的 miRNA 和其前体；也参见 Landgraf 等, Cell 1129 (2007), 1401-1414 和 Suh 等, Dev Biol. 270 (2004), 488-498

	前体miRNA序列 SEQ ID No. miRBase登录号 miRBase ID号	成熟miRNA序列 SEQ ID No. miRBase登录号 miRBase ID号	簇
[0032]	CCACCACUUAACGUGG AUGUACUUGCUUUGAA ACUAAAGAAGUAAGUG CUCCAUGUUUUGGUG AUGG SEQ ID NO.: 67 MI0000738 hsa-mir-302a	UAAGUGCUUCCAUGU UUUGGUGA SEQ ID NO.: 68 MIMAT0000684 hsa-miR-302a-3p	miR302-367
		ACUAAAACGUGGAUG UACUUGCU SEQ ID NO.: 69 MIMAT0000683 hsa-miR-302a-5p	miR302-367
	GCUCCCUUCAACUUAA CAUGGAAGUGCUUUCU GUGACUUAAAAGUAA GUGCUCCAUGUUUUA GUAGGAGU SEQ ID NO.: 70 MI0000772 hsa-miR-302b	UAAGUGCUUCCAUGU UUUAGUAG SEQ ID NO.: 71 MIMAT0000715 hsa-miR-302b-3p	miR302-367
		ACUUUAACAUGGAAG UGCUIUC SEQ ID NO.: 72 MIMAT0000714 hsa-miR-302b-5p	miR302-367
	CCUUUGCUUUAACAUGG GGGUACCUGCUGUGUG AAACAAAAGUAAGUGC UCCAUGUUUCAGUGG AGG SEQ ID NO.: 73 MI0000773 hsa-miR-302c	UAAGUGCUUCCAUGU UUCAGUGG SEQ ID NO.: 74 MIMAT0000717 hsa-miR-302c-3p	miR302-367
		UUUAACAUGGGGGUA CCUGCUG SEQ ID NO.: 75 MIMAT0000716 hsa-miR-302c-5p	miR302-367
	CCUCUACUUUAACAUGG AGGCACUUGCUGUGACA	UAAGUGCUUCCAUGU UUGAGUGU	miR302-367
[0033]	UGACAAAAUAAGUGC UCCAUGUUUGAGUGU GG SEQ ID NO.: 76 MI0000774 hsa-miR-302d	SEQ ID NO.: 77 MIMAT0000718 hsa-miR-302d-3p	
		ACUUUAACAUGGAGG CACUUGC SEQ ID NO.: 78 MIMAT0004685 hsa-miR-302d-5p	miR302-367

[0034] 如下文更详细说明,在细胞中由可能包含若干个成熟 miRNA 的序列的较长初级转录产物、前体 RNA 分子产生 miRNA (Kim, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6 (2005), 376-385)。因此,在一个实施方案中,本发明提供了包含如上文所定义的用于免疫调节的 miRNA 的核酸

序列的 miRNA 前体。如果本文中未指示,则表 1 和表 2 中所指示的 miRNA 的相应 miRNA 前体的序列可以获自 miRBase 中的相应条目。

[0035] miRNA 通过结合靶基因的 mRNA 来调节基因表达。本领域中已知也可以利用其它结合分子靶向此区域,以实现正常情况下由 miRNA 诱导的调节作用。因此,在一个实施方案中,本发明涉及一种用于免疫调节的能够干扰如上文所定义的 miRNA 分子的靶基因的基因表达的结合分子,其中所述结合分子是选自用于免疫调节的包含合成 miRNA 模拟物、RNA 分子、抗体、适体、镜像异构体的分子群组。

[0036] 在一个实施方案中,本发明还提供了一种包含如上文所定义的 miRNA 或 miRNA 前体或结合分子的核酸序列的双链核酸。

[0037] 此外,在一个实施方案中,本发明提供一种或多种具有如上文所定义的序列的上文所定义的双链核酸,其中本发明的 miRNA、前体 miRNA 和 / 或其它结合分子的编码核苷酸序列可操作地连接到至少一个表达控制序列。所述表达控制序列的实例为启动子、操纵子、增强子、沉默子序列、转录终止子、多聚腺苷酸化位点和本领域中已知的可用于表达本发明的 miRNA、前体 miRNA 和 / 或其它结合分子的其它核酸序列。

[0038] 所述表达控制序列可以增强或下调可操作地连接的 miRNA 编码核苷酸序列的表达水平。取决于用于表达本发明的 miRNA、前体 miRNA 和 / 或其它结合分子的编码核苷酸序列的细胞类型 (例如原核生物或真核生物) 或生物体,一个或若干个表达控制序列可以彼此组合和 / 或与如本发明中所定义的编码双链核酸 (核苷酸序列) 的本发明的 miRNA、前体 miRNA 和 / 或其它结合分子中的一者或多者组合使用。也可以考虑到时间 (即,发育阶段)、细胞类型和 / 或总体情形来选择表达调节序列,例如一种或多种特定物质的存在和 / 或不存在,其中由如上文所定义的核苷酸序列所编码的 miRNA 和 / 或 miRNA 前体分子在可操作地连接到多肽和 / 或肽编码核苷酸序列的所述调节序列允许其表达时因为满足了所述条件中的一个或多个而得以表达,或在不能满足允许表达的情形时未得以表达。

[0039] 所使用的表达控制序列可以与如上文所定义的本发明的 miRNA、前体 miRNA 和 / 或其它结合分子的本发明的编码核苷酸序列来源于同一生物体,或它们可以是外来的,即,在不同的分类学或系统发生学的意义上来源于另一种生物体。在一个实施方案中,本发明提供了一种包含多肽和 / 或肽编码核苷酸序列的核酸分子,其中至少一个表达控制序列相对于所述多肽和 / 或肽编码核苷酸序列是外来的。

[0040] 如根据本发明所采用的且编码本发明的上述 miRNA、前体 miRNA 和 / 或其它结合分子的聚核苷酸可以是例如包含那些聚核苷酸中的单独任一者或其组合的 DNA、cDNA、RNA 或合成产生的 DNA 或 RNA 或重组产生的嵌合核酸分子。优选地,所述聚核苷酸可操作地连接于表达控制序列,从而允许在原核或真核细胞中表达。所述聚核苷酸的表达包括所述聚核苷酸转录成可翻译 mRNA。将在本说明书下文中进一步描述说明本发明的聚核苷酸的表达的细节。

[0041] 就此而言,本发明在一个实施方案中提供了一种包含如上文所定义的双链核酸的载体。此外,在本发明的一个实施方案中,提供了包含所述载体的宿主细胞。在本发明的一个实施方案中,如上文和下文所定义的宿主细胞是人类细胞,优选其中所述细胞是选自患者自体细胞的群组。

[0042] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种药物组合物或诊断剂,其包含至少一种如

上文和下文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、双链核酸、载体和 / 或宿主细胞作为药剂。

[0043] 在药物组合物或诊断剂的一个实施方案中,所述活性剂被包埋在人造外来体中(也参见实施例 4)。

[0044] 在一个实施方案中,本发明提供了如上文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子或药物组合物,其用于治疗自身免疫疾病。

[0045] 在一个实施方案中,本发明涉及如上文所定义的用途,其中所述自身免疫疾病是选自包括以下的疾病群组:急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、斑秃、强直性脊椎炎、抗磷脂综合征(APS)、自身免疫性心肌病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴细胞增生综合征(ALPS)、自身免疫性周围神经病变、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自身免疫性孕酮性皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、乳糜泻、冷凝集素病、克罗恩病、皮肤肌炎、1型糖尿病、子宫内膜异位症、嗜酸性筋膜炎、胃肠道类天疱疮、古德帕斯彻氏综合征、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征(GBS)、桥本氏脑病、桥本氏甲状腺炎、特发性血小板减少性紫癜(自身免疫性血小板减少性紫癜)、红斑狼疮、米勒费雪综合征(格林-巴利综合征)、混合结缔组织病、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、复发性多软骨炎、类风湿性关节炎、斯耶格伦氏综合征、颞动脉炎(“巨细胞性动脉炎”)、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病(混合结缔组织病)、血管炎、韦格纳氏肉芽肿病。

[0046] 在另一个实施方案中,本发明提供了如上文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、药物组合物或诊断剂,其用于治疗或诊断妊娠相关疾病。

[0047] 在用于治疗或诊断如上文所定义的妊娠相关疾病的一个实施方案中,所述妊娠相关疾病是选自子痫、先兆子痫、HELLP 综合征和胎盘形成或植入障碍或问题组成的疾病群组。子痫、先兆子痫和 HELLP 综合征都是本领域中已知与胎盘功能障碍相关的;参见例如 Benedetto 等, *Adv Clin Chem* 53(2011), 85-104。

[0048] “同种异体移植”在本文中定义为将来自于一个个体的器官、组织或细胞移植到属于同一物种的具有不同基因型的另一个个体。在所述移植的情况下,由于宿主免疫系统将移植物识别为外来物且针对该移植物发动免疫反应而经常会观察到排斥反应。因此,在移植同种异体移植物后需要进行免疫抑制治疗以减轻急性排斥反应。就此而言,在一个实施方案中,本发明提供了如上文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、药物组合物以用于预防或治疗同种异体移植的排斥反应。由于同种异体移植物的排斥反应的预防和 / 或治疗都可以使用本发明的分子或组合物来进行,故可以在实际移植之前和 / 或之后,或考虑活生物体(例如人类患者)内部以及外部的治疗位置来使用这些分子 / 组合物以便避免和 / 或减轻同种异体移植的排斥反应。因此,在一个实施方案中,本发明提供如上文和下文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、载体、药物组合物或诊断剂以用于离体和 / 或体内处理同种异体移植物。

[0049] 当在具有不同基因型的患者之间移植免疫感受态细胞时,例如在骨髓、干细胞移植或输血的情况下,发生排斥反应的一个具体形式,即“移植物对抗宿主的反应”。如果宿主具有供体移植物中缺乏的重要同种异体抗原,则所述宿主对于所述移植物呈现为外来的,

且因此可能对其产生抗原性刺激。因此,在一个实施方案中,本发明还提供了如上文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、药物组合物以用于预防或治疗移植物对抗宿主的反应。

[0050] 在另一个实施方案中,本发明提供如上文和下文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、载体、药物组合物或诊断剂以用于离体和 / 或体内处理被自身免疫疾病侵袭的细胞或组织。此外,在一个实施方案中,本发明还提供了如上文和下文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、载体、药物组合物或诊断剂以用于离体和 / 或体内处理自体细胞或组织。

[0051] 本发明还涉及可用于通过增加生物体对确定的细胞和 / 或组织的免疫反应和 / 或降低其免疫耐受性来调节免疫系统的方法、分子和组合物。确切地说,本发明还涉及用于癌症治疗的新方法、分子和组合物。对肿瘤抗原的遗传学和生物化学表征已经导致发现了大部分癌症患者对正在形成的赘生物发动某种形式的免疫反应。然而,临床上明显的疾病的形成和进展暗示内源性反应典型地不起作用。肿瘤细胞生物学的若干个特征促成了相对较弱的抗肿瘤反应。首先,因为肿瘤细胞来源于正常的非外来细胞,所以免疫系统可能不会将肿瘤细胞识别为危险的或外来的。其次,肿瘤细胞倾向于表达较少的身体活化免疫反应所依赖的受体和分子的补体。本发明涉及第三机制,即,癌细胞使用特定的 miRNA 来保护它们自身。

[0052] 有若干种刺激和强化抗肿瘤免疫力的方法,如针对特定肿瘤细胞抗原或全部肿瘤细胞的癌症疫苗、单克隆抗体、重组细胞因子和适应性细胞输注 (Pandolfi 等, 2011), 然而, 仍然需要这方面的新方法。本发明内所提供的数据突出了如上文所定义的特定 miRNA 和 miRNA 前体分子在调节免疫系统方面的重要作用, 指示其也可能作为肿瘤疗法中的标靶。

[0053] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种针对如上文所定义的 miRNA 和 / 或 miRNA 前体的拮抗剂,所述拮抗剂是选自包含合成 miRNA 模拟物、RNA 分子、抗体、适体、镜像异构体和小分子的分子群组,且用于治疗选自包括甲状腺肿瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、生殖细胞肿瘤、肝细胞癌、白血病和淋巴瘤的群组的良性和恶性肿瘤。

[0054] 如上文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、药物组合物或诊断剂可以以如本领域中已知的不同形式应用,且可以设计成不同的施用形式。在本发明的一个实施方案中,如上文所定义的 miRNA、miRNA 前体、结合分子、药物组合物或诊断剂被设计用于局部施用。然而,在另一个实施方案中,它们被设计用于全身施用。

[0055] 本发明还涉及用于从如细胞、组织、血液、吸出物、羊水和例如细胞或细胞培养物的上清液等生物样品中获得、产生、分离和 / 或纯化外来体的新颖方法和材料。用于分离和纯化外来体及其内含物(如 miRNA)的一般方法在本领域中是已知的。另外,类似于或代替以下部分“外来体”中进一步提到的和 W099/03499、W000/44389 和 W097/05900 中所描述的方法,例如,可以利用超速离心法从生物样品分离外来体,且可以利用 TRIZOL 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 根据由制造商提供的方案来纯化其内含物,即 miRNA,并且在反转录成 cDNA 之后利用 PCR 使用特定 miRNA 引物进行鉴别,如 Gallo 等, (2012), PLoS One. ;7(3):e30679 第 4 页到第 5 页上的子部分“外来体分离”和“RNA 提取和反转录”中所描述,所述文献的公开内容以引用的方式并入在此。可以如 Gallo 等, (2012) 第 5 页上的子部分“miRNA 定量”中所描述进行 miRNA 定量,所述文献的公开内容以引用的方式并入在此。或者,可以利用如 Norgen Biotek Corp (Thorold, CANADA) 等若干个制造商提供的外来体 RNA 分离试剂盒来分离 miRNA,例如用于从尿液和组织培养基分离和富集外来体的

Norgen 尿液外来体 RNA 分离试剂盒 (Norgen ; 目录号 47200), 或用于根据供应商手册从血浆、血清和腹水分离和富集外来体 RNA 的血浆 / 血清外来体 RNA 分离试剂盒 (Norgen ; 目录号 49200)。此外, 可以使用如得自于 Gentaur (Kampenhout, Belgium) 的 ExoQuick-TC™ 等其它试剂盒代替超速离心法, 根据供应商手册来分离外来体。

[0056] 这些经过富集的样品可以用于确定存在或不存在特定类型的外来体或确定哺乳动物 (例如人类) 内所存在的特定类型的外来体的量。特定类型的独特表达产物 (如包含外来体的样品内的 miRNA) 的存在或量可能指示所述哺乳动物患有特定疾病或病症。如上文所指示, 为了成功怀孕, 必需调节母体免疫系统。下文进一步详细描述的实验结果指示特定的 miRNA, 如 C19MC 以及 miR-371-3 簇的 miRNA, 就是这种重要的母体免疫系统调节剂。因而, 如果外来体是从胚泡或胚胎的细胞培养基的上清液中分离的, 则包含外来体的样品内的特定类型的这些 miRNA 的存在或量可以用于估计胚胎植入或精液样品授精的能力。因此, 本发明还涉及一种获得用于免疫调节的外来体的方法, 包括从表达如上文和下文所定义的和如以上表 1 和表 2 中所列的 C19MC 簇、miR-371-373 簇和 / 或 miR302-367 簇的 miRNA 的胚胎或胎儿细胞的细胞培养物的上清液分离和纯化外来体。

[0057] 利用本发明的方法, 可以从不同细胞类型的细胞培养物分离外来体, 包括与胚胎植入和发育相关的细胞类型。从生物样品分离、纯化和培养脐带、羊膜、胎盘和绒毛膜细胞的方法在本领域中是已知的, 且描述于例如国际申请 W02005/001081、W02000/073421、W02002/046373 和 W02003/042405 中, 所述国际申请的公开内容以引用的方式并入本文中, 且可用于获得相关细胞培养物以便分离外来体。在本发明的一个实施方案中, 提供了用于获得外来体的上述方法, 其中所述细胞培养物是选自包括来自脐带、羊膜、胎盘和绒毛膜的细胞的细胞群组。

[0058] 此外, 本发明涉及一种从生物样品中获得用于免疫调节的外来体的方法, 包括以下步骤: 由所述生物样品建立细胞培养物, 收集所述细胞培养物的上清液, 以及分离和纯化其外来体。

[0059] 用于获得外来体的生物样品可以从与具有所获得的外来体或其内含物的设想用于免疫调节治疗的那些具有相同基因背景的细胞、细胞培养物、组织、动物或人类患者, 或从与设想用于治疗的那些具有不同基因背景的细胞、细胞培养物、组织、生物体、动物或人类患者分离。就此而言, 在一个实施方案中, 提供了从生物样品获得用于免疫调节的外来体的方法, 其中所述生物样品包含自体细胞、组织样品或吸出物。在另一个实施方案中, 提供了从生物样品获得用于免疫调节的外来体的方法, 其中所述生物样品包含同种异体细胞、组织样品或吸出物。

[0060] 本发明还涉及一种用于体外产生包含如上文和下文所定义的 miRNA、结合分子和 / 或双链核酸的外来体和根据上述方法获得的用于免疫调节的外来体的方法。用于产生人造外来体的方法在本领域中也是已知的。所述人造外来体可以来源于如 De La Peña 等, J. Immunol. Methods. 344 (2009), 121-132 中所描述的经涂布的脂质体。

[0061] 根据本发明的方法获得的外来体可用于对罹患若干种疾病和疾病类型的患者进行免疫调节。在本发明的一个实施方案中, 提供了根据上述方法获得的外来体以用于治疗自身免疫疾病。

[0062] 关于特定疾病的治疗, 可以对独特施用途施本本发明的外来体, 取决于效果是

局部（“局部”施用）或是全身（“肠内”或“肠胃外”施用）的意图，且可以根据特定施用途径要求进行配制。因此，在本发明的一个实施方案中，提供了根据上述方法获得的准备通过局部施用而用于治疗自身免疫疾病的外来体。在本发明的另一个实施方案中，准备用于治疗自身免疫疾病的外来体是使用关节注射，优选关节内注射或鼻内施加进行施用。在本发明的另一个实施方案中，制备了根据上述方法获得的外来体以便通过全身施用而用于治疗自身免疫疾病。

[0063] 在分离外来体之前，从中分离外来体的细胞、组织、器官或动物可以经过基因工程改造以表达或过度表达特定的 miRNA，如上述 miRNA，和 / 或可能暴露于一种或多种药剂，如氮胞苷（5-氮杂-2'-脱氧胞苷）或其它 DNA 去甲基化剂，所述药剂还能够增强细胞分泌外来体的能力（参见例如 Xiao 等，(2010) “Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on immune-associated proteins in exosomes from hepatoma”. *World J Gastroenterol.* 16, 2371-2377）。暴露于所述药剂可以如 Xiao 等，(2010) 第 2372 页上的“材料和方法”部分的“细胞培养”子部分中关于氮胞苷所描述来进行，所述文献的公开内容以引用的方式并入在此。

[0064] 因此，本发明还涉及氮胞苷或其它 DNA 去甲基化剂在获得或产生外来体的上述方法中用于处理细胞培养物以增强细胞分泌外来体的能力的用途。

[0065] 此外，本发明还涉及氮胞苷或其它 DNA 去甲基化剂，所述氮胞苷或其它 DNA 去甲基化剂是用于体内处理组织以增强其分泌关于如上文和下文所定义的以及表 1 和表 2 中所列的 C19MC、miR-371-373 和 / 或 miR302-367 簇的 miRNA 有所增多的外来体的能力。

[0066] 如上文所指示，包含外来体的样品内的特定类型的这些 miRNA 的存在或量可以用于估计胚胎的植入能力。就此而言，例如，可以分离相应细胞培养基的上清液并分析如以上表 1 中所定义的 miR-371-3 和 C19MC 簇的 miRNA 的存在和量。然后，这项分析的结果可以用于估计胚胎的植入概率。

[0067] 因此，本发明还涉及一种诊断胚胎植入或精液样品授精的能力的方法，所述方法包括分别在胚泡或胚胎的细胞培养基中或在精液中鉴别如上文和下文所定义的以及表 1 中所列的 C19MC 簇和 / 或 miR-371-373 簇的至少一种 miRNA。

[0068] 在本发明的一个实施方案中，提供了如上文所定义的诊断方法，其中如本文中定义的和表 1 中所列的 C19MC 簇和 / 或 miR-371-373 簇的至少一种 miRNA 的水平与对照样品相比相当或有所增加指示所述胚胎植入或精液样品授精的能力正常或有所增强，且所述至少一种 miRNA 的水平与对照样品相比有所降低指示所述胚胎植入或精液样品授精的能力降低。

[0069] 如上文所定义的诊断方法，其中如本文所定义的和表 1 中所列的 C19MC 簇和 / 或所述 miR-371-373 簇的至少一种 miRNA 的存在指示所述胚胎植入或精液样品授精的能力正常或有所增强，且所述簇的至少一种 miRNA 的不存在指示所述胚胎植入或精液样品授精的能力降低。

[0070] 定义和实施方案：

[0071] 应注意，术语“一个”或“一种”实体是指一个或多个所述实体；举例来说，“一种多肽”应理解为表示一种或多种多肽。因而，术语“一个”（或“一种”）、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可以互换使用。

[0072] 除非另外说明,否则术语“病症”和“疾病”在本文中可互换使用。

[0073] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”意指需要诊断、预后、预防或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者,例如人类患者。

[0074] 如本发明中所使用的术语“miRNA”(miRNA)涉及非蛋白质编码 RNA,如同大部分天然存在的 miRNA,其可以包含 13-35、18-25 或 21-24 个核苷酸,总体上介于约 19 到约 25 个核苷酸之间,优选为约 22 个核苷酸,所述 miRNA 指导靶转录物在转运中裂解,从而负调节各种调节和发育路径所涉及的基因的表达 (Bartel DP., *Cell*116(2004), 281-297; He 和 Hannon, *Nat. Rev. Genet.* 5 (2004), 522-531; Lagos-Quintana 等, *Science*294(2001), 853-858; Ambros V., *Cell*, 113(2003), 673-676)。成熟 miRNA 的碱基 2-8 在本文中定义为“miRNA 种子序列”。靶 RNA 序列与 miRNA 种子序列之间的 6 到 8 个 bp 的完全互补性是 miRNA 靶识别的主要决定因素。Younger 和 Corey, *Nucleic Acids Res.* 39(2011), 5682-5691。举例来说, Lewis 等, *Cell*115(2003), 787-798; John 等, *PLoS Biol*2(11):e363(2004) 中论述了对结合识别位点的成熟 miRNA 的序列要求和用于预测与给定序列结合的 miRNA 的方法

[0075] 已经鉴别了一些 miRNA 基因 (MIR 基因),且公众可以在数据库中获得 (“miRBase”,可在 microrna.sanger.ac.uk/sequences 在线获得)。其它 MIR 基因和成熟 miRNA 也描述于美国专利申请公布 2005/0120415 中。已经报告了 MIR 基因存在于基因内区域中,呈经分离形式和基因组中的簇形式,但也可以完全或部分位于其它基因 (蛋白质编码基因和非蛋白质编码基因)的内含子内 (Saini 等, *Proc Natl Acad Sci U S A*104(2007), 17719-17724)。关于 miRNA 生物合成的最近回顾,参见 Kim VN., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6(2005), 376-385。至少在一些情况下, MIR 基因的转录可以受 MIR 基因自身的启动子促进性控制。然后,转录或许总体上由 RNA 聚合酶 II 介导 (Lee 等, *EMBO J*23(2004), 4051-4060)。初级转录物 (它可以是多顺反子)称为“pri-miRNA”,即可能相当大 (数千个碱基)的 miRNA 前体分子,且含有一个或多个局部双链或“发夹”区域以及 mRNA 的常用 5' “帽”和多聚腺苷酸化尾。参见例如 Kim, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6(2005), 376-385 中的图 1。相信这种 pri-miRNA 被核 RNase III Drosha “截短”以产生称为“pre-miRNA”的较短 (约 70 个核苷酸)的 miRNA 前体分子。在利用 Drosha 进行核处理之后,将 pre-miRNA 输出到核中,其中酶 Dicer 产生较短的成熟 miRNA。参见例如 Lee 等, *EMBO Journal*21(2002), 4663-4670; Reinhart 等, *Genes&Dev.*, 16(2002):1616-1626; Lund 等, *Science*303(2004), 95-98; 以及 Millar 和 Waterhouse, *Funct. Integr Genomics*5(2005), 129-135。因而,可以从 RNA (例如成熟 miRNA 或 miRNA 前体 RNA 分子的 RNA 序列)的角度或从 DNA (例如对应于成熟 miRNA 的 DNA 序列、RNA 序列或编码 MIR 基因或 MIR 基因片段或 miRNA 前体的 DNA 序列)的角度描述 miRNA。

[0076] MIR 基因家族似乎大量存在,估计占至少一些基因组的 1% 且能够影响或调节所有基因中约三分之一的表达 (参见例如 Tomari 等, *Curr. Biol.*, 15(2005), R61-64; Tang G., *Trends Biochem. Sci.*, 30(2005), 106-114; Kim *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(2005), 376-385)。miRNA 涉及例如细胞分化、增殖和凋亡的调节,且或许涉及至少一些疾病的病理学,包括癌症,其中 miRNA 可能不同地充当致癌基因或肿瘤抑制剂。参见例如 O'Donnell 等, *Nature*435(2005), 839-843; Cai 等, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 102(2005), 5570-5575; Morris 和 McManus(2005) Sci. STKE, pe41(可在 stke.sciencemag.org/cgi/rapidprint/sigtrans;2005/297/pe41.pdf 在线获得)。miRNA(MIR)基因具有鉴别特征,包括植物物种间保守性、稳定回折结构和利用类 Dicer 酶处理特定 miRNA/miRNA* 双螺旋(Ambros 等,(2003)RNA, 9:277-279)。这些特征已经通过利用可鉴别进化保存型 miRNA 基因的系统计算方法补充分子克隆,通过检索后生动物 miRNA 发夹前体特有的序列模式和二级结构保守性而用于鉴别 miRNA 和其对应基因(Ambros 等,Curr. Biol., 13(2003), 807-818; Grad 等,Mol. Cell 11(2003), 1253-1263; Lai 等,Curr. Biol. 13(2003), R925-R936; Lim 等,Science 299(2003), 1540 和 Lim 等,Genes Dev., 17(2003), 991-1008)。公众可获得的 miRNA 基因被录入 miRBase(Griffiths-Jones 等,(2003)Nucleic Acids Res., 31:439-441)。根据本发明,术语“miRNA 前体”可互换地指成熟 miRNA 的所有前体形式,即, pri-miRNA 和 pre-miRNA。

[0077] 已经确认了 mRNA 的所有区域,包括 5' 非翻译区、编码区和 3' 非翻译区中的 miRNA 识别位点,表明 miRNA 靶位点相对于编码序列的位置可能未必影响抑制(参见例如 Rhoades 等,(2002)Cell, 110:513-520; Yekta 等,Science 304(2004), 第 594-596 页; Davis 等,Curr. Biol., 15(2005), 743-749; Lewis 等,Cell 115(2003), 787-798; Lewis 等,Cell 120(2005), 15-20; Baek 等,Nature 455(2008), 64-71; 和 Selbach 等,Nature 455(2008), 58-63)。

[0078] mRNA 与 miRNA 之间的结合不必是完美的,已经观察到一些错配对 miRNA 效能无任何影响。就此而言,实验验证的 miRNA 靶位点指示 miRNA 的 5' 端倾向于具有比其 3' 端更多的与靶互补的碱基(Moss 等,Cell 188(1997), 637-646; Johnston 和 Hobert, Nature 426(2003), 845-849; John 等,PLoS Biol 12(11):e363(2004))。因此,作为本发明的 miRNA,可能提到由与 SEQ ID. N01 到 66 和 68、69、71、72、74、75、77 和 78 中的任一者的核苷酸序列具有 80% 或更大同一性的核苷酸序列组成的 miRNA,优选由具有 90% 或更大同一性、更优选具有 95% 或更大同一性的核苷酸序列组成的 miRNA,且称为其变体。

[0079] 作为本发明的前体 miRNA,可能提到由与具有表 1 中所指示的本发明的相应 miRNA 分子条目内如 miRBase 中所指示的 SEQ ID. N01 到 66 和 SEQ ID No:67、70、73 或 76 的任一前体 miRNA 的核苷酸序列具有 80% 或更大同一性的核苷酸序列组成的前体 miRNA,优选由具有 90% 或更大同一性、更优选具有 95% 或更大同一性的核苷酸序列组成的 miRNA,且称为其变体。

[0080] 所述变体还可以是在严格条件下与参考核苷酸序列、其互补序列或基本上与其同一的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。如本领域技术人员应了解,对单链的描绘也定义了互补链的序列。因而,核酸也涵盖所描绘的单链的互补链。如本领域技术人员应了解,核酸的许多变体可以用于与给定核酸相同的目的。因而,核酸也涵盖基本上同一的核酸和其互补序列。如本领域技术人员还应了解,单链提供针对可能在严格杂交条件下与靶序列杂交的探针的探针。因而,核酸也涵盖可在严格杂交条件下杂交的探针。

[0081] 如本文中所使用的“探针”可能意指能够经由一种或多种类型的化学键,通常经由互补碱基配对,通常经由氢键形成结合互补序列的靶核酸的寡核苷酸。取决于杂交条件的严格度,探针可以结合与探针序列缺乏完全互补性的靶序列。可能有许多碱基对错配,所述碱基对错配将干扰靶序列与本发明的单链核酸之间的杂交。然而,如果突变数目过

大以致于即使在最低严格度杂交条件下也不发生杂交,则所述序列不是互补的标靶序列。

[0082] 本文中所使用的“严格杂交条件”可以意指第一核酸序列(例如探针)将与第二核酸序列(例如标靶)(如呈复杂核酸混合物形式)杂交,但不与其它序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的且在不同的情形下将不同。总体上,严格条件选择为比特定序列在所定义的离子强度 pH 值下的热熔点(T_m)低约 5°C 到 10°C。 T_m 可以是 50%的与标靶互补的探针在平衡状态下与标靶序列杂交(在标靶序列过量存在时,在 T_m 下,50%的探针在平衡状态下被占据)的温度(在所定义的离子强度、pH 值和核酸浓度下)。严格条件可以是在 pH7.0 到 8.3 下盐浓度低于约 1.0M 钠离子,典型地为约 0.01 到 1.0M 钠离子浓度(或其它盐),且温度是至少约 30°C(对于短探针,例如约 10 到 50 个核苷酸)和至少约 60°C(对于长探针,例如大于约 50 个核苷酸)的条件。严格条件还可以在加入如甲酰胺等去稳定剂的情况下实现。对于选择性或特异性杂交,正信号可以是背景杂交的至少 2 到 10 倍。示范性严格杂交条件包括以下:50%甲酰胺,5×SSC 和 1% SDS,在 42°C 下孵育;或 5×SSC,1% SDS,在 65°C 下孵育,在 0.2×SSC 和 0.1% SDS 中在 65°C 下洗涤。

[0083] 本文中所使用的“基本上互补”可以意指第一序列与第二序列的互补序列在具有 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50 或更多个核苷酸的区域上具有至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 同一性,或两个序列可在严格杂交条件下杂交。

[0084] 本文中所使用的“基本上同一”可以意指第一序列与第二序列在具有 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50 或更多个核苷酸或氨基酸的区域上具有至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 同一性,或就核酸而言,意指所述第一序列与所述第二序列的互补序列基本上互补。

[0085] 如本文中所使用,术语“结合分子”是指特异性结合相关标靶的任何试剂(例如肽、蛋白质、核酸聚合物、适体、镜像异构体或小分子)。在一个特定的优选实施方案中,术语“结合分子”在本发明的意义上包含合成 miRNA 模拟物、RNA 分子、抗体、适体、镜像异构体和 siRNA、miRNA 或其变体的经修饰变体。所述变体可以化学合成,且对于 RNA 沉默相关过程而言可能具有许多优点。这些修饰中的一些可以帮助防止 miRNA 相关分子降解,如 2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-脱氧-氟尿苷修饰或硫代磷酸酯。其它修饰还可以帮助增加 miRNA 相关分子对其标靶的亲合力或减少其脱靶效应,如锁核酸修饰,其中亚甲桥连接核糖环的 2'-氧与 4'-碳。其它修饰可以增强 siRNA 或 miRNA 的正确链在 AGO 复合物中的负载(Hammell CM., RNA Biol. 5(2008), 123-127),如通过向双链 miRNA/miRNA*复合物的一个链加入 5' 磷酸酯或甲基(miRNA* 是由所述前体中的对侧臂产生的 miRNA 配体链)。

[0086] 相关标靶在本文中定义为如上文所定义的本发明 miRNA 分子的识别位点,优选在核酸内,最优选为 pre-mRNA 或 mRNA 分子。所述干扰标靶核酸的功能的总体作用是特异性调节所述基因的表达。在本发明的上下文中,“调节”意指增加(刺激)或减少(抑制)基因的表达。在本发明的上下文中,特别是关于“免疫调节”时,抑制是调节基因表达的优选形式。因为具有与 miRNA 5' 末端侧上的核苷酸 2 到 8(种子序列)互补的核苷酸序列的 mRNA 的翻译受 miRNA 抑制(Current Biology, 15, R458-R460(2005)),所以可以提出与本发明的 miRNA 的种子序列互补的核苷酸序列作为本发明的 miRNA 或结合分子的标靶核苷酸序列。

[0087] “miRNA 模拟物”是非天然双链 miRNA 样的 RNA 片段。它们经过设计以具有携

带与靶基因所独有的 3' UTR 中的所选序列部分互补的基元的 5' 端。引入到细胞中后, miRNA 模拟物就可以特异性结合其靶基因且产生所述基因的转录后抑制, 更具体地说, 产生翻译抑制。不同于可以一次靶向若干个基因的内源性 miRNA, miR 模拟物以基因特异性方式起作用 (Wang, *Methods Mol Biol.* 676(2011), 211-223 ;Xiao 等, *J Cell Physiol* 122(2007), 285-292)。

[0088] 如本文中所使用, 术语“适体”是指基于与具有高亲和力特异性 (基于与靶分子的非沃森-克里克相互作用) 的其它分子结合的能力选自随机池的 DNA 或 RNA 分子 (参见例如 Cox 和 Ellington, *Bioorg. Med. Chem.* 9(2001), 2525-2531 ;Lee 等, *Nuc. Acids Res.* 32(2004), D95-D100)。可以选择结合核酸、蛋白质、小有机化合物、维生素、无机化合物、细胞和甚至整个生物体的适体。

[0089] 本发明的肽和适体是利用任何合适的方法来合成。举例来说, 本发明的靶向肽和适体可以利用固相肽合成法化学合成。举例来说, 以下文献描述了用于固相合成的技术: Barany 和 Merrifield(1979) *Solid-Phase Peptide Synthesis; The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, (Gross. 和 Meinehofer 编), Academic, New York, 第 2 卷, 第 1-284 页, *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.* ;Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85(1963), 2149-2154 ;以及 Stewart 和 Young(1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第 2 版, Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois。

[0090] 镜像异构体是对靶或其部分显示结合活性的包含许多 L-核苷酸的核酸。产生镜像异构体的基本方法以国际专利申请 W01998/008856 为准, 所述国际专利申请的公开内容以引用的方式并入本文中。大体上, 这种方法依赖于如例如 US5, 475, 096 中所描述的所谓的 SELEX 技术。所述方法使用包括随机化延伸物的组合 DNA 或 RNA 库, 所述随机化延伸物具有通过 5' 和 3' 端的两个引物结合区侧接的约 10 到约 100 个核苷酸。所述组合库的产生描述于例如 Conrad 等, *Methods Enzymol.*, 267(1996), 336-367 中。这种化学合成的单链 DNA 库可以经由聚合酶链反应转变成双链库。

[0091] 这种库可能已经用于选择目的。发生选择, 使得典型地为单链的库与靶分子接触, 然后扩增所述库的结合元件。通过将这些步骤重复若干次, 可以产生对所使用的靶具有显著结合活性的寡核苷酸分子。

[0092] 利用现有技术程序产生“抗体”, 例如, 如 Tijssen (Tijssen, P., *Practice and theory of enzyme immunoassays*, 11, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 全书, 尤其是第 43-78 页) 所描述。除完整抗体以外, 本发明的抗体还可以以多种形式存在; 包括例如 F(ab') 片段、F(ab) 片段和 F(ab')₂ 片段或任何其它抗原结合片段以及单链; 参见例如国际申请 W088/09344、W02005/003169、W02005/003170 和 W02005/003171。

[0093] 可以根据本发明使用的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分, 即, 含有特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。本发明的免疫球蛋白分子可以属于免疫球蛋白分子的任何类别 (例如 IgG、IgE、IgM、IgD 或 IgA) 或子类。

[0094] 聚核苷酸:

[0095] 术语“聚核苷酸”打算涵盖单个核酸以及多个核酸, 并且是指分离的核酸分子或构筑物, 例如信使 RNA (mRNA) 或质粒 DNA (pDNA)。聚核苷酸可以包含常规磷酸二酯键或非常规键 (例如酰胺键, 如肽核酸 (PNA) 中发现的酰胺键)。术语“核酸”或“双链核酸”是指聚核

昔酸中所存在的任何一个或多个核酸链段,例如 DNA 或 RNA 片段,其优选地包含编码本发明的至少一种 miRNA 分子的序列。“分离”的核酸或聚核苷酸打算为已经从其天然环境中去除的核酸分子、DNA 或 RNA。举例来说,考虑分离载体中所含有的编码至少一种 miRNA 或抗体的重组聚核苷酸以用于本发明的目的。分离的聚核苷酸的其它实例包括维持于溶液中的异源性宿主细胞或经纯化(部分或基本上)聚核苷酸中的重组聚核苷酸。分离的 RNA 分子包括本发明聚核苷酸的体内或体外 RNA 转录物。根据本发明的分离的聚核苷酸或核酸还包括合成产生的所述分子。另外,聚核苷酸或核酸可以是或可以包括调节元件,如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0096] 如本文中所使用,“编码区”是由翻译成氨基酸或包含功能 RNA(如 tRNA、rRNA、催化 RNA、miRNA 分子前体、miRNA、siRNA 和反义 RNA)的序列的密码子组成的核酸的一部分。尽管“终止密码子”(TAG、TGA 或 TAA)未翻译成氨基酸,但可以被视为编码区的一部分,但任何侧接序列,例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等等,不是编码区的一部分。此区别当然不是指从这种序列中的原始基因座中提取的编码 miRNA 的序列,例如,蛋白质编码基因的内含子序列,而是指本发明的聚核苷酸构筑体中的序列的功能。编码区还可以是对应于任选地包含与其连接的 5' 或 3' 未翻译序列的编码区的 mRNA 或 cDNA(例如外显子和 miRNA)。编码区还可以是体外产生的经扩增核酸分子,其包含全部或部分编码区和/或与其连接的 5' 或 3' 未翻译序列。

[0097] 本发明的两个或更多个编码区可以存在于单一聚核苷酸构筑体中,例如存在于单一载体上或存在于单独的聚核苷酸构筑体中,例如存在于单独的(不同的)载体上。此外,任何载体可以含有单一编码区,或可以包含两个或更多个编码区,例如单一载体可以单独地编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。另外,本发明的载体、聚核苷酸或核酸可以编码异源性编码区,所述编码区融合或未融合到编码结合分子的核酸、抗体或其片段、变体或衍生物。异源性编码区包括而限于特化元件或基元,如分泌信号肽或异源性功能域。

[0098] 在某些实施方案中,聚核苷酸或核酸是 DNA。在 DNA 的情况下,包含在正常情况下编码 miRNA 或多肽的核酸的聚核苷酸可以包括可操作地与一个或多个编码区缔合的启动子和/或其它转录或翻译控制元件。当基因产物(例如多肽)的编码区与一个或多个调节序列以在调节序列的影响或控制下安置基因产物的表达的方式缔合时,存在可操作的缔合。如果诱导启动子功能导致编码所希望的基因产物的 mRNA 的转录,且如果两个 DNA 片段之间的键合的性质不干扰表达调节序列引导基因产物表达的能力或不干扰 DNA 模板转录的能力,则两个 DNA 片段(如 miRNA/多肽编码区和与其缔合的启动子)是“可操作地缔合”或“可操作地连接”。因而,如果启动子能够实现该核酸的转录,则启动子区将可操作地与编码 miRNA/多肽的核酸缔合。启动子可以是仅引导预定细胞中的 DNA 的实质性转录的细胞特异性启动子。除了启动子以外,其它转录控制元件,例如增强子、操纵子、阻遏子和转录终止信号,也可以可操作地与聚核苷酸缔合以引导细胞特异性转录。本文中公开了合适的启动子和其它转录控制区。

[0099] 本领域技术人员已知多种转录控制区。这些转录控制区包括而限于在脊椎动物细胞中起作用的转录控制区,如但不限于来自于巨细胞病毒(立即早期启动子,连同内含子 A)、猿猴病毒 40(早期启动子)和反向病毒(如劳氏肉瘤病毒)的启动子和增强子链段。

其它转录控制区包括来源于脊椎动物基因的转录控制区,如肌动蛋白、热激蛋白、牛生长激素和兔 β -球蛋白,以及真核细胞中能够控制基因表达的其它序列。其它合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及淋巴因子可诱导性启动子(例如干扰素或白介素可诱导性启动子)。

[0100] 类似地,本领域技术人员已知多种翻译控制元件。这些翻译控制元件包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子以及来源于小核糖核酸病毒的元件(特别是内部核糖体进入位点或 IRES,也称为 CITE 序列)。

[0101] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的聚核苷酸是 RNA,例如呈信使 RNA(mRNA)、miRNA(miRNA)、miRNA 前体、小发夹 RNA(shRNA)、小干扰 RNA(siRNA) 或任何其它 RNA 产物形式。

[0102] 分子的相似性和 / 或同一性的测定:

[0103] 两种肽之间的“相似性”是通过比较一种肽的氨基酸序列与第二肽的序列来确定。如果它是同一的或是保守氨基酸取代,则一种肽的氨基酸类似于第二肽的对应氨基酸。保守取代包括 Dayhoff, M. O. 编, *The Atlas of Protein Sequence and Structure* 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C. (1978) 和 Argos, *EMBO J.* 8(1989), 779-785 中所描述的保守取代。举例来说,属于以下群组之一的氨基酸表示保守变化或取代: -Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; -Cys, Ser, Tyr, Thr; -Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; -Lys, Arg, His; -Phe, Tyr, Trp, His; 和 -Asp, Glu。

[0104] 两个序列之间的同一性或相似性百分比的确定优选使用 Karlin 和 Altschul(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 的数学算法来实现。将这种算法并入可在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 获得的 Altschul 等, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 的 BLASTn 和 BLASTp 程序中。

[0105] 同一性或相似性百分比的确定是利用如 NCBI 网页上和“BLAST Program Selection Guide”中关于特定长度和组成的序列所推荐的 BLASTn 和 BLASTp 程序标准参数来进行。

[0106] 利用 BLASTn 程序进行 BLAST 聚核苷酸检索。

[0107] 关于一般参数,如 NCBI 网页上关于短序列(少于 20 个碱基)所推荐,“Max Target Sequences”框可以设定为 100,“Short queries”框可以打勾,“Expect threshold”框可以设定为 1000,且“Word Size”框可以设定为 7。对于较长序列,“Expect threshold”框可以设定为 10 且“Word Size”框可以设定为 11。关于评分参数,“Match/mismatch Scores”可以设定为 1, -2, 且“Gap Costs”框可以设定为线性。对于筛选程序和屏蔽参数,“Low complexity regions”框不可以打勾,“Species-specific repeats”框不可以打勾,“Mask for lookup table only”框可以打勾,“DUST Filter Settings”可以打勾且“Mask lower case letters”框不可以打勾。总体上,在这方面可以使用“Search for short nearly exact matches”,由此提供大部分上文所指示的设定。这方面的其它信息可以在 NCBI 网页上公布的“BLAST Program Selection Guide”中获得。

[0108] 利用 BLASTp 程序进行 BLAST 蛋白质检索。对于一般参数,“Max Target Sequences”框可以设定为 100,“Short queries”框可以打勾,“Expect threshold”框可以设定为 10,且“Word Size”框可以设定为“3”。关于评分参数,“Matrix”框可以设定为

“BLOSUM62”, “Gap Costs” 框可以设定为 “Existence:1|Extension:1”, “Compositional adjustments” 框可以设定为 “Conditional compositional score matrix adjustment”。关于筛选程序和屏蔽参数, “Low complexity regions” 框不可以打勾, “Mask for lookup table only” 框不可以打勾, 且 “Mask lower case letters” 框不可以打勾。

[0109] 对两个程序的修改, 例如关于检索序列的长度, 是根据 NCBI 网页上的 HTML 和 PDF 版本中所公布的 “BLAST Program Selection Guide” 中的推荐来进行。

[0110] 疾病和病症:

[0111] 除非另外说明, 否则术语 “病症” 和 “疾病” 在本文中可互换使用。

[0112] 如本文中所使用的术语 “自身免疫病症” 是由个体自身的组织或器官或其共分离或表现引起的且针对个体自身的组织或器官或其共分离或表现的疾病或病症或由此引起的病状。自身免疫疾病主要由适应性免疫反应的失调引起, 且形成针对自身结构的自身抗体或自身反应性 T 细胞。几乎所有的自身免疫疾病也具有发炎性要素。自身发炎性疾病主要是发炎性的, 且一些经典的自身发炎性疾病是由固有发炎性路径中的遗传缺陷引起。在自身发炎性疾病中, 未发现自身反应性 T 细胞或自身抗体。在许多的这些自身免疫和自身发炎性病症中, 可能存在许多临床和实验室标记物, 包括但不限于高丙种球蛋白血症、高水平的自身抗体、组织中的抗原抗体复合物沉积物、来自于皮质类固醇或免疫抑制治疗的益处和受影响组织中的淋巴样细胞聚集物。不受关于 B 细胞介导的自身免疫病症的理论束缚, 人们相信 B 细胞在人类自身免疫疾病中经由众多机制路径显示病原性作用, 包括自身抗体产生、抗原抗体复合物形成、树状细胞和 T 细胞活化、细胞因子合成、直接趋化因子释放以及为异位新淋巴生成提供孳生地。这些路径各自可以不同程度地参与自身免疫疾病的病理学。

[0113] 如本文中所使用, “自身免疫病症” 可以是器官特异性疾病 (即, 免疫反应特异性针对如内分泌系统、造血系统、皮肤、心肺系统、胃肠和肝脏系统、肾系统、甲状腺、耳、神经肌肉系统、中枢神经系统等器官系统) 或可能影响多个器官系统的全身疾病 (例如全身性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎、多肌炎、自身免疫多腺病综合征等)。优选所述疾病包括急性播散性脑脊髓炎 (ADEM)、斑秃、强直性脊椎炎、抗磷脂综合征 (APS)、自身免疫性心肌病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS)、自身免疫性周围神经病变、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自身免疫性孕酮性皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、乳糜泻、冷凝集素病、克罗恩病、皮肤肌炎、1 型糖尿病、子宫内膜异位症、嗜酸性筋膜炎、胃肠道类天疱疮、古德帕斯彻氏综合征、格雷夫斯氏病、格林 - 巴利综合征 (GBS)、桥本氏脑病、桥本氏甲状腺炎、特发性血小板减少性紫癜 (自身免疫性血小板减少性紫癜)、红斑狼疮、米勒费雪综合征 (格林 - 巴利综合征)、混合结缔组织病、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、复发性多软骨炎、类风湿性关节炎、斯耶格伦氏综合征、颞动脉炎 (“巨细胞性动脉炎”)、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病 (混合结缔组织病)、血管炎、韦格纳氏肉芽肿病。

[0114] 治疗和药物:

[0115] 如本文中所使用, 术语 “治疗” 是指治疗性治疗和预防性或防治性措施, 其中目标在于防止或减缓 (减轻) 不希望的生理变化或病症, 如自身免疫性和 / 或自身发炎性疾

病的发展。有益的或所希望的临床结果包括但不限于症状减轻、疾病程度减小、病况稳定（即，不恶化）、疾病进展延迟或减缓、病况改善或减轻和症状缓解（不论是部分或是完全），不论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可能意指与未接受治疗的情况下所预期的存活时间相比延长存活时间。需要治疗的包括已经患有所述病状或病症的，以及倾向于患有所述病状或病症的，或预防所述病状或病症体现的。

[0116] 如果未另外陈述，则术语“药物”、“医药”或“药剂”在本文中可互换使用，且将包括但不限于所有以下各项：(A) 打算用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防人或其它动物的疾病的内用或外用物品、医药和制剂以及任何物质或物质混合物；和 (B) 打算影响人或其它动物的身体结构或任何功能的物品、医药和制剂（食物除外）；和 (C) 打算用作条款 (A) 和 (B) 中所规定的任何物品的组分的物品。术语“药物”、“医药”或“药剂”应包括打算用于人或其它动物的制剂的完整配方，其含有一种或多种“试剂”、“化合物”、“物质”或“（化学）组合物”且在一些其它情形下还含有其它药学上非活性的赋形剂，如填充剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、粘合剂，或确保所述“药物”、“医药”或“药剂”在人或其它动物体内的预定标靶位置上（例如皮肤上、胃或肠中）容易运输、崩解、解聚、溶解和生物可用性。术语“试剂”、“化合物”或“物质”在本文中可互换使用，且在更特定的情形下，应包括但不限于所有药理学活性剂，即，可诱导所希望的生物学或药理学作用的药剂，且利用本发明的方法研究或测试诱导所述可能的药理学作用的能力。

[0117] 如根据本发明所使用的术语“免疫调节”是指通过增强（免疫增强）或降低（免疫抑制）免疫系统产生抗体或致敏细胞的能力来改变免疫反应，所述抗体或致敏细胞可识别引发其产生的抗原且与该抗原反应。本领域中已知若干种适用于免疫调节的物质，例如皮质类固醇、细胞毒性剂、胸腺素和免疫球蛋白。

[0118] 药物载剂：

[0119] 药学上可接受的载剂和施用途径可以由本领域技术人员已知的相应文献中获得。本发明的药物组合物可以根据本领域中众所周知的方法进行配制；参见例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000), University of Sciences in Philadelphia, ISBN0-683-306472, Vaccine Protocols. 第 2 版, Robinson 等, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003 ;Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 第 2 版, Taylor 和 Francis. (2006), ISBN:0-8493-1630-8。合适的药物载剂的实例在本领域中众所周知，且包括磷酸盐缓冲生理盐水溶液、水、乳液（如油 / 水乳液）、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。可以利用众所周知的常规方法配制包含所述载剂的组合物。这些药物组合物可以以合适的剂量施用于受试者。可以利用不同的方式实现合适的组合物的施用。实例包括经由口服、鼻内、直肠、局部、腹膜内、静脉内、肌肉内、皮下、真皮下、经真皮、鞘内和颅内方法施用含有药学上可接受的载剂的组合物。如鼻喷雾制剂等气雾剂制剂包括含防腐剂和等渗剂的经纯化的活性剂水溶液或其它溶液。优选将所述制剂调节到与鼻粘膜相容的 pH 值和等渗状态。本发明中也设想了用于口服施用的药物组合物，如单域抗体分子（例如“纳米抗体™”）等。所述口服制剂可以呈片剂、胶囊剂、粉剂、液体或半固体形式。片剂可以包含固体载剂，如明胶或佐剂。用于直肠或阴道施用的制剂可以呈具有合适的载剂的栓剂形式；也参见 O' Hagan 等, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735。关于适合各种施用类

型的制剂的进一步指导可以在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 第 17 版 (1985) 和相应的更新中获得。关于药物递送方法的简单回顾, 参见 Langer, *Science* 249 (1990), 1527-1533。

[0120] 报告了未经修饰的裸反义分子被细胞不良地内在化, 不论它们是否带负电 (Grey 等, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997), 1465-1476; Stein 等, *Biochemistry* 32 (1993), 4855-4861; Bennet 等, *Mol. Pharmacol.* 41 (1992), 1023-1033)。因此, 寡核苷酸可以经其它试剂修饰或与其它试剂一起用于组合物中, 所述其它试剂为如脂质载剂 (Fattal 等, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004), 931-946)、微粒 (Khan 等, *J. Drug Target* 12 (2004), 393-404)、如外来体等囊泡 (参见实施例 4), 或通过与细胞穿透肽 (CPP) 共价结合从而允许反义分子位移通过细胞膜; 关于综述, 参见 Lysik 和 Wu-Pong, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003), 1559-1573。

[0121] 外来体:

[0122] 在这方面也可以使用囊泡或外来体。“外来体”是在晚期核内体多囊泡体与质膜融合之后细胞外环境中所分泌的来源于核内体的约 30-100nm 的囊泡 (Garin 等, *J. Cell Biol* 152 (2001), 165-180)。来自于各种组织类型的细胞已经显示可分泌外来体, 例如树状细胞、B 淋巴细胞、肿瘤细胞和肥大细胞。来自于不同起源的外来体展现蛋白质和脂质部分的离散集 (J. Thery 等, *Cell Biol* 147 (1999), 599-610; Thery 等, *J. Immunol* 166 (2001), 7309-7318)。它们显著地含有涉及抗原呈递和免疫调节的蛋白质, 表明外来体在细胞-细胞通讯中起作用 (Simons 和 Raposo, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009), 575-581; Thery 等, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009), 581-593), 从而调节免疫反应。举例来说, W099/03499、W000/44389 和 W097/05900 中已经描述了产生、纯化或使用外来体用于治疗目的或作为研究工具的方法, 所述国际公布的公开内容以引用的方式并入本文中。此外, 用于产生人造外来体的方法在本领域中也是已知的。所述人造核内体可以来源于如 De La Peña 等, *J. Immunol Methods.* 344 (2009), 121-132 中所描述的经涂布的脂质体。

[0123] 考虑到它们的免疫原性和治疗性, 将特别可用于能够修饰外来体的内含物以便改变它们的性质。在这方面, 本领域中已经描述了重组外来体, 所述重组外来体来源于经编码重组蛋白质的质粒转染的细胞。所述重组外来体含有质粒编码的重组蛋白质 (W000/28001)。

[0124] 表达:

[0125] 如本文中所使用的术语“表达”是指基因产生生物化学物质 (例如 RNA、miRNA 或多肽) 的过程。所述过程包括基因的功能存在细胞内的任何体现, 包括而不仅限于基因敲落以及瞬时表达和稳定表达。它包括而不仅限于基因转录成信使 RNA (mRNA)、转移 RNA (tRNA)、小发夹 RNA (shRNA)、小干扰 RNA (siRNA) 或任何其它 RNA 产物, 和所述 mRNA 翻译成多肽。如果所希望的最终产物是生物化学物质, 则表达包括产生该生物化学物质和任何前体。基因的表达产生“基因产物”。如本文中所使用, 基因产物可以是核酸, 例如 miRNA (miRNA)、通过基因转录产生的信使 RNA 或由转录物翻译的多肽。本文中所描述的基因产物还包括具有转录后修饰 (例如多聚腺苷酸化) 的核酸, 或具有翻译后修饰 (例如甲基化、糖基化、加入脂质、与其它蛋白质亚单位缔合、蛋白水解裂解等等) 的多肽。

[0126] 可以利用多种表达载体/宿主系统来含有和表达聚核苷酸序列。这些系统包括但

不限于微生物,如经重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌;经酵母表达载体转化的酵母;经病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;经病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒 CaMV;烟草花叶病毒 TMV)或经细菌表达载体(例如 Ti 或 pBR322 质粒)转化的植物细胞系统;动物或人类细胞系统。

[0127] 为了在宿主细胞中表达 miRNA、肽、多肽或融合蛋白(下文中称为“产物”),可以使用如下程序等程序。可以将含有编码所述产物的 DNA 序列的限制片段克隆到含有在宿主细胞中起作用的复制起点和适当可选标记物的适当重组质粒中。所述质粒可以包括用于产物的可诱导表达的启动子(例如 pTrc (Amann 等, Gene69 (1988), 301315) 和 pET1 Id (Studier 等, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990), 6089)。可以通过例如电穿孔将所述重组质粒引入到宿主细胞中,且可以通过选择所述质粒上的标记物来鉴别含有所述重组质粒的细胞。可以使用产物特异性测定在宿主细胞中诱导和检测所述产物的表达。

[0128] 在一些实施方案中,可以优化编码所述产物 /miRNA/ 多肽的 DNA 以便在宿主细胞中表达。举例来说,所述 DNA 可以包括针对一个或多个氨基酸的密码子,所述密码子在宿主细胞中相对于针对相同氨基酸的其它密码子占优势。

[0129] 可诱导启动子的一个实例是最小启动子的组合,如无上游增强子序列(来自于原始 CMV 启动子的从 +75 到 -53 的序列;参见 Gossen 和 Bujard, Proc Natl Acad Sci U S A. 89 (1992), 5547-5551) 的 CMV 启动子与抗四环素性操纵子序列启动子,所述启动子在不同的四环素 / 多西环素浓度存在下显示浓度依赖性活性。未经修饰的 CMV 启动子可以用于组成性表达。

[0130] 使用可诱导启动子可以降低 RNA 累积或过饱和在表达 miRNA 的细胞中的细胞毒性。或者,根据本发明,可以使用能够一致地表达预定 miRNA 效应因子持续一定时间段的组成性表达系统。优选地,利用 CMV 启动子驱动 miRNA 或其类似物的表达,所述 CMV 启动子经常在约一个月活化之后由于 DNA 甲基化而在人类细胞中沉默。所述一个月活化机制可能因防止经处理的细胞中的 RNA 累积或过饱和而为有益的。

[0131] 在人类细胞中表达核酸组合物的 miRNA 的递送可以使用选自以下群组的非转基因方法或转基因方法来实现:脂质体 / 聚核糖体 / 化学转染、DNA 重组、电穿孔、基因枪穿透、转座子 / 反转座子插入、跳跃基因整合、微量注射、病毒感染、逆转录病毒 / 慢病毒感染和其组合。为了防止随机转基因插入和细胞突变的风险,可以使用脂质体或聚核糖体转染将包含 miRNA 序列的载体递送到所靶向的人类细胞(例如患者的自体细胞)中。在一个特别优选的实施方案中,可以使用人造外来体;在这方面参见实施例 4。所选至少一种 miRNA、其前体、变体或类似物的表达取决于所选启动子,且可以是例如组成性的、可诱导的或暂时性的。

[0132] 本发明还涉及包含本发明的核酸与任何或所有以下各项的试剂盒:测定试剂、缓冲液、探针和 / 或引物,和无菌生理盐水或另一种药学上可接受的载剂。另外,所述试剂盒可以包括含有用于实施本发明方法的指导(例如方案)的说明材料。

[0133] 本发明的描述和实施例公开且涵盖了这些和其它实施方案。关于根据本发明采用的材料、方法、用途和化合物中的任一者的其它文献可以使用例如电子装置从公众图书馆和数据库中检索。举例来说,可以利用公众数据库“Medline”,该数据库由国家卫生研究所

的国家生物技术信息中心和 / 或国家医学图书馆主办。本领域技术人员已知其它数据库和网址,如作为欧洲分子生物学实验室 (EMBL) 的一部分的欧洲生物信息研究所 (EBI),并且还可以使用国际互联网搜索引擎获得。Berks, TIBTECH12(1994), 352-364 中给出了生物技术专利信息的概述以及可用于回溯检索和最新情报通报的相关专利信息来源的纵览。

[0134] 以上公开内容总体上描述了本发明。除非另外说明,否则对如本文中所使用的术语给予如 Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, 2000 年修订和 2003 年再版, ISBN0198506732 中所提供的定义。在本说明书全文中引用了若干个文献。可以在说明书结尾、紧靠权利要求书之前发现完整的书目引用。所有引用参考文献的内容(包括如本申请全文中引用的参考文献书目、已颁布专利、公布的专利申请和制造商技术规范、说明书等)明确以引用的方式并入在此;然而,不承认所引用的任何文献实际上为本发明的现有技术。

[0135] 可以参考本文中仅出于说明目的而提供且不打算限制本发明的范围的以下具体实施例来获得更全面的理解。

[0136] 实施例

[0137] 以下实施例进一步说明本发明,但不应被视为以任何方式限制本发明的范围。关于 miRNA 基因簇、如胎盘样品中所鉴别的个别 miRNA 基因和这些 miRNA、其前体、变体和类似物用于治疗 and 诊断若干种与免疫反应失调(例如在妊娠期间)相关的疾病的新用途说明和描述实施例 1 到 12 中的以下实验;在这方面也参见图和表 1 到 3。

[0138] 实施例 1: miR-520c-3p 在胎盘组织中相对于妊娠周数的关系相对表达

[0139] 材料和方法

[0140] RNA 分离

[0141] 从 52 份用福尔马林固定并用石蜡包埋 (FFPE) 的来自于在妊娠第 7 周和第 33 周之间发生的自发性流产和人工流产的胎盘组织中分离总 RNA。使用 innuPREP Micro RNA 试剂盒 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) 根据制造商说明书进行 RNA 分离,对 FFPE 组织进行以下修饰:通过在得自于 innuPREP DNA Micro 试剂盒 (Analytik Jena) 的 TLS 溶解溶液和蛋白酶 K 中将石蜡切片在 60°C 下孵育 1 小时且在 80°C 下孵育 15 分钟来溶解所述切片。

[0142] 反转录和实时 PCR

[0143] 利用得自于 TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 的 TaqMan microRNA 反转录试剂盒和 RT 引物,根据制造商说明书,使用 200ng 总 RNA 来产生 miR-520c 和 RNU6B 特异性 cDNA(其充当相对定量的内部对照;CGCAAGGATGACACGC AAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT SEQ ID N079)。将反应物在热循环仪中在 16°C 下孵育 30 分钟,在 42°C 下孵育 30 分钟,且在 85°C 下孵育 5 分钟。使用 TaqMan microRNA Assays 和 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 中所包括的 miRNA 特异性探针和引物建立实时 PCR 反应。将反应物在 96 孔板中在 95°C 下孵育 10 分钟,随后在 95°C 下孵育 15 秒 × 40 个循环,且在 60°C 下孵育 1 分钟。所有反应都在 Applied Biosystems 7300 快速实时 PCR 系统上重复运作三次。使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法 (Livak und Schmittgen, 2001) 计算相对定量 (RQ)。RNU6B 充当标准化的内源性对照。

[0144] 结果

[0145] 绘制 miR-520c-3p 的相对表达相对于妊娠周数的关系图(图 2)。数据指示

miR-520c-3p 的表达随着妊娠进展稍微减少,这与阐述染色体 19miRNA 的表达随着妊娠进展而增加的 Luo 等 (2009) 所述相反。

[0146] 参考文献

[0147] Livak, K. J. 和 T.D. Schmittgen (2001). “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method”. Methods 25 (4): 402-408.

[0148] Luo, S. S., O. Ishibashi 等, (2009). “Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes”. Biol Reprod 81 (4): 717-729.

[0149] 实施例 2: miR-371-3p、miR-372 和 miR-373 的相对表达与胎盘组织中的 miR-520c-3p 的关系

[0150] 材料和方法

[0151] RNA 分离

[0152] 从 52 份用福尔马林固定并用石蜡包埋的 (FFPE) 的得自于自发性流产和人工流产的胎盘组织中分离总 RNA。使用 innuPREP Micro RNA 试剂盒 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) 根据制造商说明书进行 RNA 分离,对 FFPE 组织进行以下修饰:通过在得自于 innuPREP DNA Micro 试剂盒 (Analytik Jena) 的 TLS 溶解溶液和蛋白酶 K 中将石蜡切片在 60°C 下孵育 1 小时且在 80°C 下孵育 15 分钟来溶解所述切片。

[0153] 反转录和实时 PCR

[0154] 利用得自于 TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 的 TaqMan microRNA 反转录试剂盒和 RT 引物,根据制造商说明书,使用 200ng 总 RNA 来产生 miR-520c、miR-371-3p、miR-372、miR-373 和 RNU6B 特异性 cDNA (其充当相对定量的内部对照)。将反应物在热循环仪中在 16°C 下孵育 30 分钟,在 42°C 下孵育 30 分钟,且在 85°C 下孵育 5 分钟。使用 TaqMan microRNA Assays 和 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 中所包括的 miRNA 特异性探针和引物建立实时 PCR 反应。将反应物在 96 孔板中在 95°C 下孵育 10 分钟,随后在 95°C 下孵育 15 秒 \times 40 个循环,且在 60°C 下孵育 1 分钟。所有反应都在 Applied Biosystems 7300 快速实时 PCR 系统上重复运作三次。使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法 (Livak 和 Schmittgen, 2001) 计算相对定量 (RQ)。RNU6B 充当标准化的内源性对照。

[0155] 统计分析

[0156] 使用线性回归 t 检验进行表达数据的回归分析。

[0157] 结果

[0158] 回归分析结果概括于表 3 中。miR-371-3p、miR-372 和 miR-373 的相对表达分别与 miR-520c-3p 的表达具有高度显著的相关性。这一相关性指示这些 miRNA 的协同表达,且因而表明它们共有类似功能。

[0159] 表 3: miR-371-3p、miR-372 和 miR-373 与 miR-520c-3p 的表达之间的高度显著的相关性

[0160]

	miR-520c-3p
miR-371-3p	p<0.001
miR-372	p<0.001
miR-373	p<0.001

[0161] 参考文献

[0162] Livak, K. J. 和 T. D. Schmittgen (2001). “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method”. *Methods* 25(4):402-408.

[0163] 实施例 3: 基质与滋养层细胞中的 miR-371-3p、miR-372、miR-373 和 miR-520c-3p 的相对表达的比较

[0164] 材料和方法

[0165] 显微解剖

[0166] 将一个外观正常的前三个月胎盘（妊娠第 8 周）的用福尔马林固定并用石蜡包埋的样品用于单独分析基质和滋养层隔室。

[0167] 使用如制造商所描述的激光显微解剖标准程序 (<http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/life-science-research/laser-microdissection/details/product/leica-lmd7000/downloads/>, 2011 年 11 月 17 日存取) 分离基质核心和滋养层 (图 3)。在这方面, 也可以如 Grundemann 等, *Nucleic Acids Res* 36 (2008), e38 中所描述, 确切地说, 如部分 “UV-Laser-microdissection and cDNA synthesis of microdissected cells” 的第 3 页所描述来进行激光显微解剖, 所述文献的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0168] RNA 分离

[0169] 使用 QIAGEN miRNEasy 微型试剂盒 (QIAGEN, Hilden, Germany), 根据制造商说明书从基质和滋养层细胞中分离总 RNA。

[0170] 反转录和实时 PCR

[0171] 利用得自于 TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 的 TaqMan microRNA 反转录试剂盒和 RT 引物, 根据制造商说明书, 使用 10ng 总 RNA 来产生 miR-520c、miR-371-3p、miR-372、miR-373 和 RNU6B 特异性 cDNA (其充当相对定量的内部对照)。将反应物在热循环仪中在 16°C 下孵育 30 分钟, 在 42°C 下孵育 30 分钟, 且在 85°C 下孵育 5 分钟。使用 TaqMan microRNA Assays 和 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 中所包括的 miRNA 特异性探针和引物建立实时 PCR 反应。将反应物在 96 孔板中在 95°C 下孵育 10 分钟, 随后在 95°C 下孵育 15 秒 × 40 个循环, 且在 60°C 下孵育 1 分钟。所有反应都在 Applied Biosystems 7300 快速实时 PCR 系统上重复运作三次。使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法 (Livak 和 Schmittgen, 2001) 计算相对定量 (RQ)。RNU6B 充当标准化的内源性对照。

[0172] 结果

[0173] 与由仅检测滋养层细胞而非基质细胞中的 C19MC miRNA 的 Luo 等, (2009) 先前获得的结果相反, 本文中所提供的结果显示, 基质细胞中 miR-520c-3p 的表达与滋养层细胞中同样高。对于 miR-371-3p 和 miR-372 的表达水平同样成立。miR-373 在基质细胞中的表达甚至高于滋养层细胞中 (图 4)。

[0174] 实施例 4: 测试本发明的 miRNA 和结合分子的免疫调节性质。

[0175] 通过用 miRNA 转染间质干细胞或滋养层细胞, 且分离由这些细胞释放的外来体来测试如上文中所定义的本发明的 miRNA 或结合分子抑制免疫系统的能力以用于旨在对这些外来体的靶细胞进行免疫调节的实验。用于提取外来体的方法在本领域中是已知的, 且如例如 Hedlund 等 (2009) 的 Materials and Methods 部分中所描述, 确切地说, 如部分“Isolation of exosomes from supernatants of placental explant cultures”中的第 342 到 343 页所描述, 或如 Taylor 等 (2006) 的部分“Isolation of circulating exosomes”中第 1535 页所描述加以使用, 两个文献的公开内容都以引用的方式并入本文中。或者, 类似于 HeLa 细胞和成纤维细胞, 按照如例如 Marasa 等 (2010) 在部分“Cell culture, transfections and b-galactosidase staining”中的第 340 页所概述的常规方法将 miRNA 直接用于转染靶细胞, 所述靶细胞可以是例如淋巴细胞或树状细胞, 所述文献的公开内容以引用的方式并入本文中。有若干种方式测试 miRNA 对受体细胞水平的免疫调节能力。相关靶细胞、转染方法和用于评估 miRNA 抑制免疫系统的潜能的参数在本领域中是已知的, 且如例如以下文献所描述, 确切地说, 如相应的 Materials and Methods 部分中所描述加以使用: Sabapatha 等, 2006; Taylor 等, 2006; Hegmans 等, 2008; Hedlund 等, 2009; Ren 等, 2011; Zhang 等, 2011, 所述文献的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0176] 实施例 5: 使用 miRNA 模拟物抑制 T 细胞活性

[0177] 使用电穿孔, 利用 C19MC 的 miRNA 的模拟物 (Qiagen, Hilden, Germany) 以适当浓度转染 T 细胞和 T 细胞源性细胞系, 以测试其增殖能力和细胞因子表达。使用零乱的 siRNA (Qiagen) 作为阴性对照。使用 AllStars Hs Cell Death siRNA (Qiagen) 测试转染效率。

[0178] 实施例 6: 足月胎盘和羊膜组织中的 miR-517a-3p、miR-519a-3p 和 miR-520c-3p 的相对表达

[0179] 来自于羊膜的间质细胞似乎具有强免疫调节性质, 例如, 通过主动抑制由同种异体抗原诱导的 T 细胞增殖来显现 (Wolbank 等, 2007)。因而, 测量足月羊膜中的 miR-517a-3p、miR-519a-3p 和 miR-520c-3p 的表达, 且与相应胎盘组织的表达水平相比较。

[0180] 材料和方法

[0181] RNA 分离

[0182] 从用福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的在分娩后不久获得的足月胎盘组织和相邻羊膜组织中分离总 RNA。使用 innuPREP Micro RNA 试剂盒 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) 根据制造商说明书进行 RNA 分离, 对 FFPE 组织进行以下修饰: 通过在得自于 innuPREP DNA Micro 试剂盒 (Analytik Jena) 的 TLS 溶解溶液和蛋白酶 K 中将石蜡切片在 60°C 下孵育 1 小时且在 80°C 下孵育 15 分钟来溶解所述切片。

[0183] 反转录和实时 PCR

[0184] 利用得自于 TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) 的 TaqMan microRNA 反转录试剂盒和 RT 引物, 根据制造商说明书, 使用 200ng 总 RNA 来产生 miR-571a-3p、miR-519a-3p、miR-520a-3p 和 RNU6B 特异性 cDNA (其充当相对定量的内部对照)。将反应物在热循环仪中在 16°C 下孵育 30 分钟, 在 42°C 下孵育 30 分钟, 且在 85°C 下孵育 5 分钟。使用 TaqMan microRNA Assays 和 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 中所包括的 miRNA 特异性探针和引物建立实时 PCR 反应。将反应物在 96 孔板中在 95°C 下孵育 10 分钟, 随后在 95°C 下孵育 15 秒 × 40 个循环, 且在 60°C 下孵育 1 分钟。所有反应都在 Applied Biosystems 7300 快速实时 PCR 系统上重复运作三次。使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法 (Livak 和 Schmittgen, 2001) 计算相对定量 (RQ)。RNU6B 充当标准化的内源性对照。

[0185] 结果

[0186] 测量足月羊膜组织中的 miR-517a-3p、miR-519a-3p 和 miR-520c-3p 的相对表达且与相应的胎盘组织相比较。所获得的 RQ (相对定量) 值在以下表 4 中给出。

[0187] 表 4: 胎盘和羊膜组织中所获得的 miR-517a-3p、miR-519a-3p 和 miR-520c-3p 的相对定量 (RQ) 值。

	miR-517a-3p RQ (RQ范围)	miR-519a-3p RQ (RQ范围)	miR-520c-3p RQ (RQ范围)
[0188] 足月胎盘	1 (0.954-1.048)	1 (0.911-1.098)	1 (0.859-1.165)
足月羊膜	0.522 (0.456-0.597)	0.810 (0.692 -0.949)	0.731 (0.633-0.844)

[0189] 这些数据显示, 羊膜中 miR-517a-3p、miR-519a-3p 和 miR-520c-3p 的表达与胎盘组织中同样高。

[0190] 参考文献:

[0191] Hedlund, M., A. C. Stenqvist 等, (2009). "Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function". J Immunol 183(1):340-351。

[0192] Hegmans, J. P., P. J. Gerber 等, (2008). "Exosomes". Methods Mol Biol 484:97-109。

[0193] Livak, K. J. 和 T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method". Methods 25(4):402-408。

[0194] Marasa, B. S., S. Srikantan 等, (2010). "MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence". Aging (Albany NY) 2(6):333-343。

[0195] Ren, Y., J. Yang 等, (2011). "Exosomal-like vesicles with immune-modulatory features are present in human plasma and can induce CD4+T-cell apoptosis in vitro". Transfusion 51(5):1002-1011。

[0196] Sabapatha, A., C. Gercel-Taylor 等, (2006). "Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences". Am J Reprod Immunol 56(5-6):345-355。

[0197] Taylor, D. D., S. Akyol 等, (2006). "Pregnancy-associated exosomes and their

modulation of T cell signaling”. *J Immunol*176(3):1534-1542。

[0198] Wolbank, S., A. Peterbauer 等, (2007). “Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane:a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue”. *Tissue Engineering*13(6):1173-1183。

[0199] Zhang, H., Y. Xie 等, (2011). “CD4(+) T cell-released exosomes inhibit CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumor immunity”. *Cell Mol Immunol*18(1):23-30。

[0200] 实施例 7: 蜕膜和滋养层细胞中的 miR-520c-3p 和 miR-517a-3p 的相对表达的比较

[0201] 材料和方法

[0202] 显微解剖

[0203] 将外观正常的前三个月胎盘(妊娠第 9 周)的用福尔马林固定并用石蜡包埋的样品用于单独分析滋养层和蜕膜。

[0204] 使用如制造商所描述的激光显微解剖标准程序(<http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/life-science-research/laser-microdissection/details/product/leica-lmd7000/downloads/>, 2011 年 11 月 17 日存取; 或 Asztalos 等, (2010) 第 303 页上左栏中的“Materials and methods”部分、子部分“Laser microdissection”, 其公开内容以引用的方式并入本文中) 分离滋养层和蜕膜组织。分离基质核心和滋养层(图 3)。在这方面, 也可以如 Grundemann 等, *Nucleic Acids Res*36(2008), e38 中所描述, 确切地说, 如部分“UV-Laser-microdissection and cDNA synthesis of microdissected cells”的第 3 页所描述来进行激光显微解剖, 所述文献的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0205] RNA 分离

[0206] 使用 QIAGEN miRNEasy 微型试剂盒(QIAGEN, Hilden, Germany), 根据制造商说明书从蜕膜和滋养层细胞中分离总 RNA。

[0207] 反转录和实时 PCR

[0208] 利用得自于 TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 的 TaqMan microRNA 反转录试剂盒和 RT 引物, 根据制造商说明书, 使用 10ng 总 RNA 来产生 miR-520c-3p、miR-517a-3p 和 RNU6B 特异性 cDNA (其充当相对定量的内部对照)。将反应物在热循环仪中在 16°C 下孵育 30 分钟, 在 42°C 下孵育 30 分钟, 且在 85°C 下孵育 5 分钟。使用 TaqMan microRNA Assays 和 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 中所包括的 miRNA 特异性探针和引物建立实时 PCR 反应。将反应物在 96 孔板中在 95°C 下孵育 10 分钟, 随后在 95°C 下孵育 15 秒 × 40 个循环, 且在 60°C 下孵育 1 分钟。所有反应都在 Applied Biosystems 7300 快速实时 PCR 系统上重复运作三次。使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法 (Livak 和 Schmittgen, 2001) 计算相对定量 (RQ)。RNU6B 充当标准化的内源性对照。将表达与以较低水平表达 miR-520c-3p 和 miR-517a-3p 的甲状腺肿瘤相比较。

[0209] 结果

[0210] 本文中所提供的结果显示, miR-520c-3p 和 miR-517a-3p 不仅存在于滋养层细

胞中,而且存在于蜕膜细胞中(图5)。蜕膜由不表达 C19MC miRNA 的具有母体甲基化模式的母体细胞组成。因此,本文中所提供的数据显示,这个组织中存在 miR-517a-3p 和 miR-520c-3p 细胞是由于 miRNA(最初由胎盘细胞经由外来体释放)被蜕膜细胞或更具体地说,被蜕膜免疫细胞吸收所致。

[0211] 实施例 8 :C19MC miRNA、其经验证的标靶和在免疫调节方面的潜在作用的计算机分析

[0212] 材料和方法

[0213] 在 miRNA 登记 miRBase(<http://www.mirbase.org/>) 中检索 C19MC miRNA 的已验证的标靶。然后在相关文献中检索这些已验证的标靶的已知功能。

[0214] 结果

[0215] 本文中所提供的结果显示, C19MC 标靶基因的 miRNA 的高比例与细胞凋亡和免疫调节相关。作为一个实例,存在充当 Fas-FasL 诱导的细胞凋亡的抑制剂的已验证标靶。这些标靶和 C19MC 簇的相应 miRNA 示意性地示于图 6 中。

[0216] 参考文献

[0217] “miRBase(18 发行版)”。<http://www.mirbase.org>。

[0218] Asztalos S, Gann PH, Hayes MK, Nonn L, Beam CA, Dai Y, Wiley EL, Tonetti DA: “Gene expression patterns in the human breast after pregnancy” *Cancer Prev Res(Phila)*. 2010Mar ;3(3):301-11。

[0219] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z(2005). “Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs” *Nat Genet*. 37:766-770。

[0220] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. (2006). “miRBase:microRNA sequences, targets and gene nomenclature”. *Nucl. Acids Res*. 34(增刊 1)(Database Issue):D140-D144

[0221] Griffiths-Jones S. (2004). “The microRNA Registry”. *Nucl. Acids Res*. 32(增刊 1)(Database Issue):D109-D111

[0222] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. (2008). “miRBase:tools for microRNA genomics”. *Nucl. Acids Res*. 36(增刊 1)(Database Issue):D154-D158

[0223] Kozomara A, Griffiths-Jones S. (2011). “miRBase:integrating microRNA annotation and deep-sequencing data”. *Nucl. Acids Res*. 39(增刊 1)(Database Issue):D152-D157

[0224] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M(2007). “A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing” *Cell*. 129:1401-1414。

[0225] Livak, K. J. 和 T. D. Schmittgen(2001). “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ ”

Method”. *Methods* 25 (4) :402-408。

[0226] Luo, S. S., O. Ishibashi 等, (2009). “Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes”. *Biol Reprod* 81 (4) :717-729。

[0227] Pandolfi F, Cianci R, Pagliari D, Casciano F, Bagalò C, Astone A, Landolfi R, Barone C. “The immune response to tumors as a tool toward immunotherapy”. *Clin Dev Immunol.* ;2011:894704. 电子出版, 2011 年 12 月 5 日。

[0228] Roelen, D. L., B. J. van der Mast 等, (2009). “Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells”. *Hum Immunol* 70 (1) :16-23。

[0229] Southcombe, J., D. Tannetta 等, (2011). “The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles”. *PLoS One* 6 (5) :e20245。

[0230] Valadi, H., K. Ekstrom 等, (2007). “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells”. *Nat Cell Biol* 9 (6) :654-659。

[0231] Warning, J. C., S. A. McCracken 等, (2011). “A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system”. *Reproduction* 141 (6) :715-724。

[0232] 实施例 9 :得自于牛羊膜的细胞未能抑制混合淋巴细胞反应

[0233] 已知人类羊膜细胞诱导对混合淋巴细胞反应 (MLR) 的抑制作用 (Magatti 等, 2008)。本发明内所提供的实验显示这些细胞也大量地表达 C19MC miRNA (参见实施例 6)。不表达 C19MC miRNA 的牛羊膜细胞 (bAMC) 将不发挥抑制作用或发挥不太明显的抑制作用。因而, 在存在 bAMC 的情况下进行 MLR, 且利用 BrdU 测定来测量 PBMC (周围血液单核细胞) 的增殖。

[0234] 材料和方法

[0235] 细胞培养物

[0236] 在 RPMI 完全培养基中将牛羊膜源性细胞 (bAMC) 与以下任一者一起共培养

[0237] • 来自于一个供体 (供体 A) 的 PBMC

[0238] • 来自于另一个供体 (供体 B) 的 PBMC

[0239] • 来自于两个供体 (供体 A+ 供体 B) 的 PBMC (混合淋巴细胞反应 (MLR))

[0240] • 来自于供体 A 的 PBMC+T 细胞刺激性 conA (伴刀豆凝集素 A) ;或

[0241] • 来自于供体 B 的 PBMC+T 细胞刺激性 conA

[0242] 作为阳性对照, 用 JEG-3 细胞代替 bAMC 进行相同的实验方案。绒毛膜癌源性细胞系 JEG-3 大量地表达 C19MC miRNA (Morales-Prieto 等, 2012)。此外, 已知这个细胞系对 T 细胞发挥抑制作用 (Hammer 等, 2002)。细胞系 S40.2 来源于甲状腺腺瘤且已知过度表达簇 C19MC 和 miR-371-373 的 miRNA (Rippe 等, 2010)。

[0243] 用 3000Gy 照射 JEG-3 和 bAMC 以确保所观察的增殖可以归于淋巴细胞。为了控制 PBMC 的刺激潜能, 使用得自于两种不同的供体 A 和 B 的 PBMC 在未加入 bAMC 或 JEG-3 细胞的情况下建立混合淋巴细胞反应 (MLR)。所有实验都进行 96 小时和 120 小时, 且所有培养

都重复进行三次。

[0244] BrdU 测定

[0245] 在实验结束前 24 小时,将 BrdU 加入到细胞培养物中。分别在 96 小时和 72 小时之后,收集上清液(含有 PBMC,呈悬浮液形式)且利用 BrdU 测定(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)来测量 PBMC 的增殖。

[0246] 结果

[0247] bAMC 未能诱导对 MLR 或 PBMC(经 Con A 刺激)的抑制作用,而 JEG-3 细胞有效地抑制了 PBMC 活化(图 7)。在 MLR 中且通过用 Con A 刺激来充分活化本发明内所使用的 PBMC(图 8)。同样,可以使用甲状腺腺瘤细胞系 S40.2 的细胞代替 JEG-3 细胞以显示其抑制混合淋巴细胞反应的能力。

[0248] 参考文献:

[0249] Hammer, A., M. Hartmann 等, (2002). “Expression of functional Fas ligand in choriocarcinoma”. American Journal of Reproductive Immunology48(4):226-234。

[0250] Magatti, M., S. De Munari 等, (2008). “Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities”. Stem Cells26(1):182-192。

[0251] Morales-Prieto, D. M., W. Chaiwangyen 等, (2012). “MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells”. Placenta。

[0252] Rippe, V., L. Dittberner 等, (2010). “The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas”. PLoS One5(3):e9485。

[0253] 实施例 10:含有簇 C19MC 的 BAC 克隆

[0254] BAC 克隆 BC280723(GenBank 登录号 Ac011453)跨越 C19MC 的整个染色体区,包括相邻的 CpG 岛,即,其假定启动子区(BC280723)(图 9)。将这个序列插入到 pBACe3.6 载体中。

[0255] 实施例 11:来自于转染到来自于牛羊膜的细胞中的含有整个 C19MC 簇的 BAC 克隆的 C19MC miRNA 的表达

[0256] 材料和方法

[0257] 转染

[0258] 用含有簇 C19MC 作为插入序列的 BAC 载体转染使用标准细胞培养技术/程序得自于牛羊膜的细胞培养物(参见以上实施例 10)。使用 QIAGEN(Hilden, Germany) 的 Attractene 转染试剂,根据制造商说明书进行转染。

[0259] 作为阴性对照,用不含 BAC 载体 DNA 的转染复合物模拟转染细胞。在转染后 24 小时、48 小时和 6 天(144 小时)收获细胞。

[0260] 反转录和实时 PCR

[0261] 利用得自于 TaqMan microRNA Assays(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 的 TaqMan microRNA 反转录试剂盒和 RT 引物,根据制造商说明书,使用 200ng 总 RNA 来产生 miR-517a-3p 和 RNU6B 特异性 cDNA(其充当相对定量的内部对照)。将反应物在热循环仪中在 16°C 下孵育 30 分钟,在 42°C 下孵育 30 分钟,且在 85°C 下孵育 5 分钟。使用

TaqMan microRNA Assays 和 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 中所包括的 miRNA 特异性探针和引物建立实时 PCR 反应。将反应物在 96 孔板中在 95°C 下孵育 10 分钟, 随后在 95°C 下孵育 15 秒 × 40 个循环, 且在 60°C 下孵育 1 分钟。所有反应都在 Applied Biosystems 7300 快速实时 PCR 系统上重复运作三次。使用 $\Delta \Delta Ct$ 方法 (Livak 和 Schmittgen, 2001) 计算相对定量 (RQ)。RNU6B 充当标准化的内源性对照。

[0262] 结果

[0263] 由于 miRNA 簇 C19MC 是灵长类动物特有的, 所以它不表达于牛细胞中。用 BAC 载体转染牛羊膜源性细胞导致 miR-517a-3p 的表达与经模拟转染的细胞相比较, 至少持续多达六天; 也参见图 10。

[0264] 这些结果指示, C19MC miRNA 的表达可以在不表达这些 miRNA 的细胞中实现, 且可用的 BAC 载体是适合于这一目的的载体的一个实例。

[0265] 实施例 12: 与得自于 JEG-3 细胞培养物的上清液一起孵育的 Jurkat 细胞中的 cFLIP mRNA 的下调

[0266] 许多 C19MC miRNA 似乎靶向与 Fas-FasL 诱导的细胞凋亡有关的抗细胞凋亡基因 (参见以上实施例 8)。所述靶之一为 c-FLIP (CFLAR)。经常将 C19MC miRNA 装入细胞所分泌的外来体中。在细胞培养时, 这些外来体在培养基中积聚。

[0267] 材料和方法

[0268] 细胞培养

[0269] JEG-3 是高度表达 C19MC miRNA 的绒毛膜癌源性细胞系。HCT-116 是不显著表达 C19MC miRNA 的结肠癌源性细胞系 (参见图 11A)。Jurkat 是也不显著表达 C19MC miRNA 的 T 细胞白血病源性细胞系。所使用的所有三个细胞系都可以商购。使所有细胞系在补充有 10% 胎牛血清和抗生素 (青霉素 / 链霉素) 的 RPMI 中生长。

[0270] 在培养三天后收集 JEG-3 和 HCT-116 细胞的细胞培养物的上清液。然后将 4ml 所收集的 JEG-3 上清液加入到在 3ml 培养基中生长的 Jurkat 细胞中。与 HCT-116 细胞的上清液一起孵育的 Jurkat 细胞培养物充当对照。在加入所述上清液之后 24 小时收获两次制备的 Jurkat 细胞。

[0271] RNA 分离

[0272] 使用 QIAGEN miRNeasy 微型试剂盒 (QIAGEN, Hilden, Germany), 根据制造商说明书从 Jurkat 细胞中分离总 RNA。

[0273] 反转录和实时 PCR

[0274] 使用 M-MLV 反转录酶 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 与 150ng 随机六聚物和 RNaseOUT™ 重组核糖核酸酶抑制剂, 根据制造商说明书, 用 250ng 总 RNA 进行反转录。

[0275] 使用 TaqMan Gene Expression Assays CFLAR (Hs00153439_m1) (Life Technologies, Darmstadt, Germany; 目录号 4331182) 和 TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Darmstadt, Germany), 根据制造商说明书对 c-FLIP (CFLAR) 进行实时 PCR。将反应物在 96 孔板中在 95°C 下孵育 10 分钟, 随后在 95°C 下孵育 15 秒 × 40 个循环, 且在 60°C 下孵育 1 分钟。所有反应都在 Applied Biosystems 7300 快速实时 PCR 系统上重复运作三次。使用 $\Delta \Delta Ct$ 方法计算相对定量 (RQ) (Livak 和 Schmittgen 2001)。HPRT

充当标准化的内源性对照。

[0276] 结果

[0277] 经 JEG-3 细胞的上清液处理的 Jurkat 细胞显示 c-FLIP 的表达与经 HCT-116 上清液处理的 Jurkat 细胞相比有所减少（图 11B）。JEG-3 细胞过度表达 C19MC miRNA, 且所述上清液含有含这些 miRNA 的外来体, 所述 miRNA 在本发明的实施例中递送到 Jurkat 细胞中。因此, c-FLIP mRNA 被下调。

[0278] 参考文献:

[0279] Livak, K. J. 和 T. D. Schmittgen (2001). “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method”. *Methods* 25(4):402-408。

[0280] Wolbank, S., A. Peterbauer 等, (2007). “Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue”. *Tissue Engineering* 13(6):1173-1183。

[0001]

核 苷 酸 和 氨 基 酸 序 列 表

<110> 不来梅大学

<120> miRNA 在胎盘组织中的表达

<150> EP11191362.0

<151> 2011-11-30

<150> EP12163414.1

<151> 2012-04-05

<150> EP12180419.9

<151> 2012-08-14

<160> 79

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

uuucaagcca gggggcguuu uuc

23

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

aagugcuguc auagcugagg uc

22

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cacucagccu ugaggcacu uuc

23

[0002]

<210> 4	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
gagugccuuc uuuggagcg uu	22
<210> 5	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
uucuccaaaa gaaagcacuu ucug	24
<210> 6	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
ugcuuccuuu cagaggu	18
<210> 7	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
uucucgagga aagaagcacu uuc	23
<210> 8	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 8	
ugcuuccuuu cagaggu	18

[0003]

<210>	9	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	9	
	aucuggaggu aagaagcacu uu	22
<210>	10	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	10	
	ccucuagaug gaagcacugu cu	22
<210>	11	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	11	
	aucgugcauc ccuuuagagu gu	22
<210>	12	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	12	
	aucgugcauc ccuuuagagu gu	22
<210>	13	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	13	

[0004]

aucgugcauc cuuuuagagu gu	22
<210> 14	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
gaaagcguu ccuuugcug ga	22
<210> 15	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
cugcaaagg aagccuuuc	20
<210> 16	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 16	
caaagcguc ccuuuagag gu	22
<210> 17	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 17	
caaagcguu cucuuuagag ugu	23
<210> 18	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	

[0005]

<400> 18	
ucucuggagg gaagcacuuu cug	23
<210> 19	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
caaagcgcuu ccuuuggag c	21
<210> 20	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 20	
cucuagaggg aagcacuuuc ug	22
<210> 21	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
aaagcgcuuc ccuucagagu g	21
<210> 22	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
cucuagaggg aagcgcuuuc ug	22
<210> 23	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	

[0006]

<400> 23	
gaaagcgcuu cucuuuagag g	21
<210> 24	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
cucuagaggg aagcacuuuc uc	22
<210> 25	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 25	
aaagugcauc cuuuuagagu gu	22
<210> 26	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 26	
cucuagaggg aagcgcuuuc ug	22
<210> 27	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 27	
aaagugcauc cuuuuagagg uu	22
<210> 28	
<211> 22	
<212> RNA	

[0007]

<213> Homo sapiens	
<400> 28	
cucuagaggg aagcgcuuuc ug	22
<210> 29	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 29	
aaagugcauc uuuuuagagg au	22
<210> 30	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 30	
cucuagaggg aagcgcuuuc ug	22
<210> 31	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 31	
caaagugccu cccuuuagag ug	22
<210> 32	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 32	
aagugccucc uuuuagagug uu	22
<210> 33	
<211> 22	

[0008]

<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 33	
uucuccaaaa gggagcacuu uc	22
<210> 34	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 34	
aaagugcuuc ccuuuggacu gu	22
<210> 35	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 35	
cuccagaggg aaguacuuuc u	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 36	
aaagugcuuc cuuuuagagg g	21
<210> 37	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 37	
aaagugcuuc cuuuuagagg gu	22
<210> 38	

[0009]

<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 38	
cucuagaggg aagcacuuuc ug	22
<210> 39	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 39	
aaagugcuuc ucuuuggugg gu	22
<210> 40	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 40	
cuacaaaggg aagcccuuuc	20
<210> 41	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 41	
aaagugcuuc cuuuugagg g	21
<210> 42	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 42	
aagugcuucc uuuuagaggg uu	22

[0010]

<210> 43	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 43	
acaaagugcu uccuuuaga gugu	24
<210> 44	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 44	
acaaagugcu uccuuuaga gu	22
<210> 45	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 45	
aacgcacuuc ccuuuagagu gu	22
<210> 46	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 46	
aaaauugguuc ccuuuagagu gu	22
<210> 47	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 47	
cucuagaggg aagcguuuc ug	22

[0011]

<210>	48	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	48	
	gaacgcgcuu ccuauagag ggu	23
<210>	49	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	49	
	cucuagaggg aagcgcuuuc ug	22
<210>	50	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	50	
	gaagcgcuu ccuuuggag u	21
<210>	51	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	51	
	cuacaaaggg aagcacuuuc uc	22
<210>	52	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	52	
	gaagcgcuu ccuuuagag cg	22

[0012]

<210>	53	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	53	
	cuccagaggg augcacuuuc u	21
<210>	54	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	54	
	cucuagaggg aagcacuuuc ug	22
<210>	55	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	55	
	gaaagugcuu ccuuuagag gc	22
<210>	56	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	56	
	cucuugaggg aagcacuuuc ugu	23
<210>	57	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	57	

[0013]

cugcaaagg aagcccuuc	20
<210> 58	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 58	
ucuacaaagg aaagegcuuu cu	22
<210> 59	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 59	
ucaaaacuga ggggcuuuu cu	22
<210> 60	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 60	
aagugcgcc aucuuugag ugu	23
<210> 61	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 61	
acucaaacug ugggggcacu	20
<210> 62	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	

[0014]

<400> 62	
aagugccccc acaguuugag ugc	23
<210> 63	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 63	
acucaaaaga uggeggcacu uu	22
<210> 64	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 64	
aaagugcugc gacauuugag cgu	23
<210> 65	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 65	
gaagugcuuc gauuuugggg ugu	23
<210> 66	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 66	
acucaaaaug ggggcgcuuu cc	22
<210> 67	
<211> 69	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	

[0015]

<400> 67		
ccaccacuua aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uuccauguuu		60
uggugaugg		69
<210> 68		
<211> 23		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 68		
uaagugcuuc cauguuuugg uga		23
<210> 69		
<211> 23		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 69		
acuuaaacgu ggauguacuu gcu		23
<210> 70		
<211> 73		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 70		
gcucccuuca acuuuaacau ggaagugcuu ucugugacuu uaaaaguaag ugcuuccaug		60
uuuuaguagg agu		73
<210> 71		
<211> 23		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 71		
uaagugcuuc cauguuuuag uag		23

[0016]

<210> 72	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 72	
acuuuaacau ggaagugcuu uc	22
<210> 73	
<211> 68	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 73	
ccuuugcuuu aacauggggg uaccugcugu gugaaacaaa aguaagugcu uccauguuuc	60
aguggagg	68
<210> 74	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 74	
uaagugcuuc cauguuucag ugg	23
<210> 75	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 75	
uuuaacaugg gguaccugc ug	22
<210> 76	
<211> 68	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	

[0017]

<400> 76	
ccucuacuuu acauggagg cacuugcugu gacaugacaa aaauaagugc uuccauguuu	60
gagugugg	68
<210> 77	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 77	
uaagugcuuc cauguuugag ugu	23
<210> 78	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 78	
acuuuaacau ggaggcacuu gc	22
<210> 79	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 79	
cgcaaggatg acacgcaaat tcgtgaagcg ttccatatt tt	42

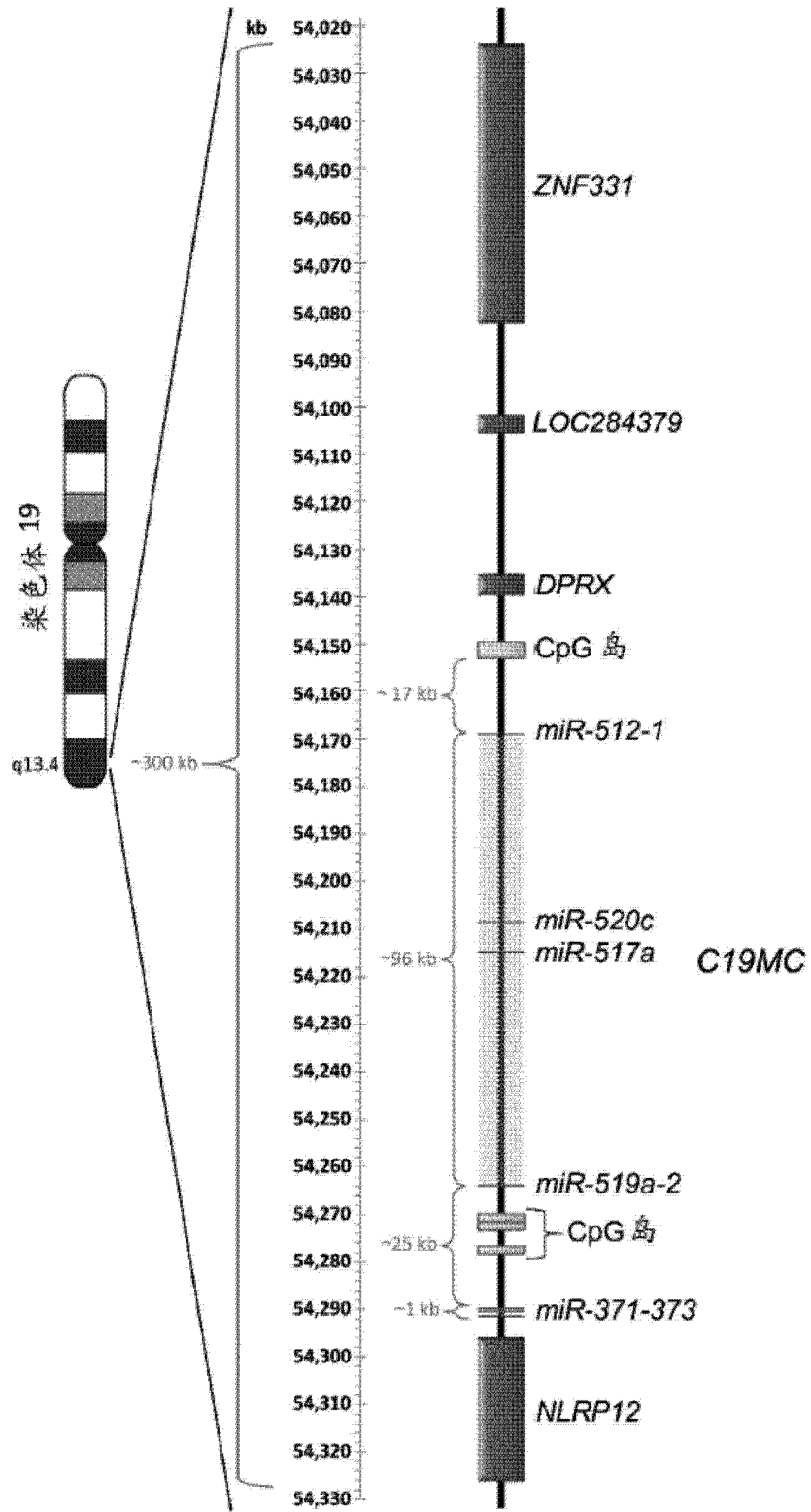


图 1

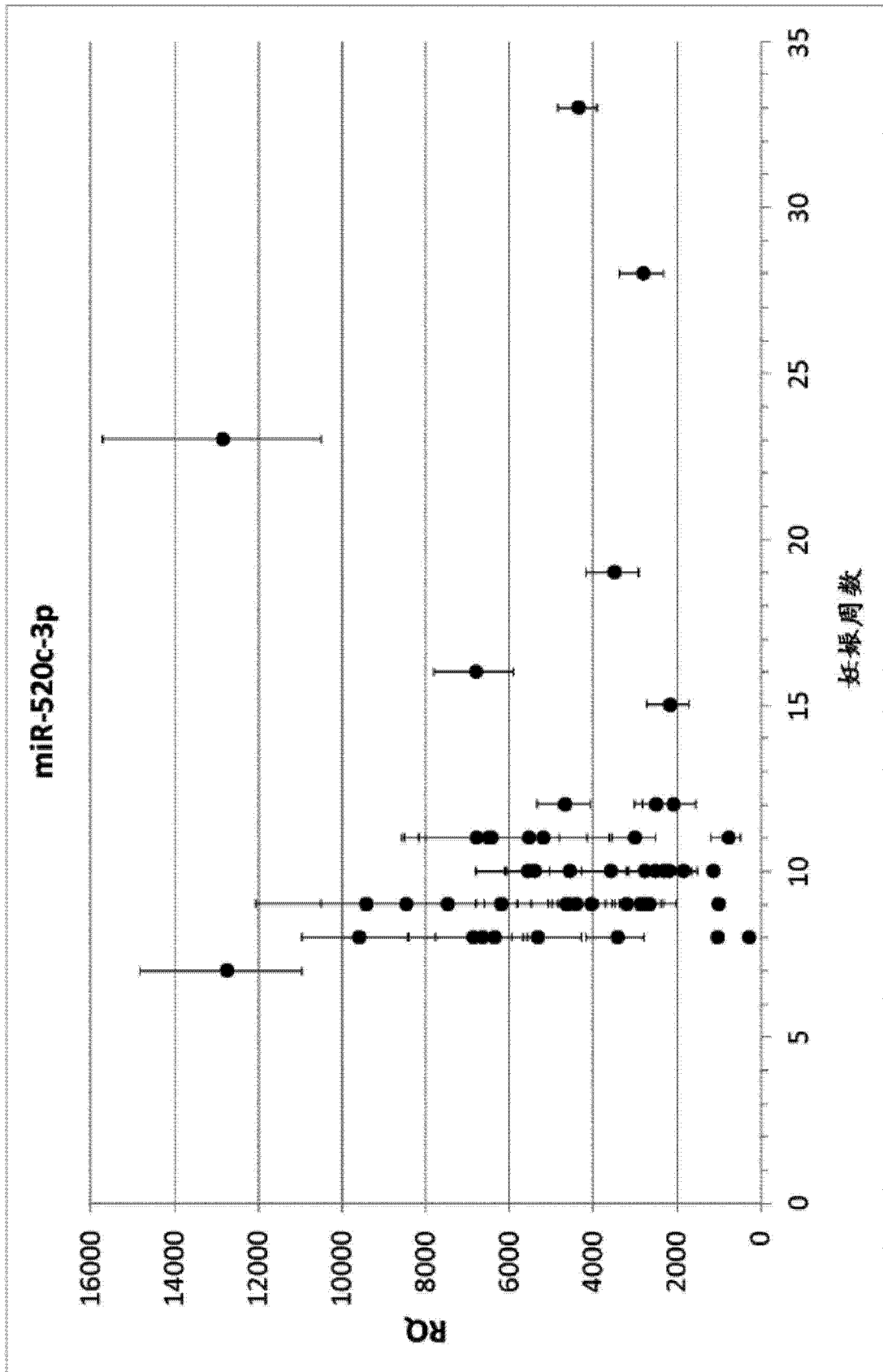


图 2

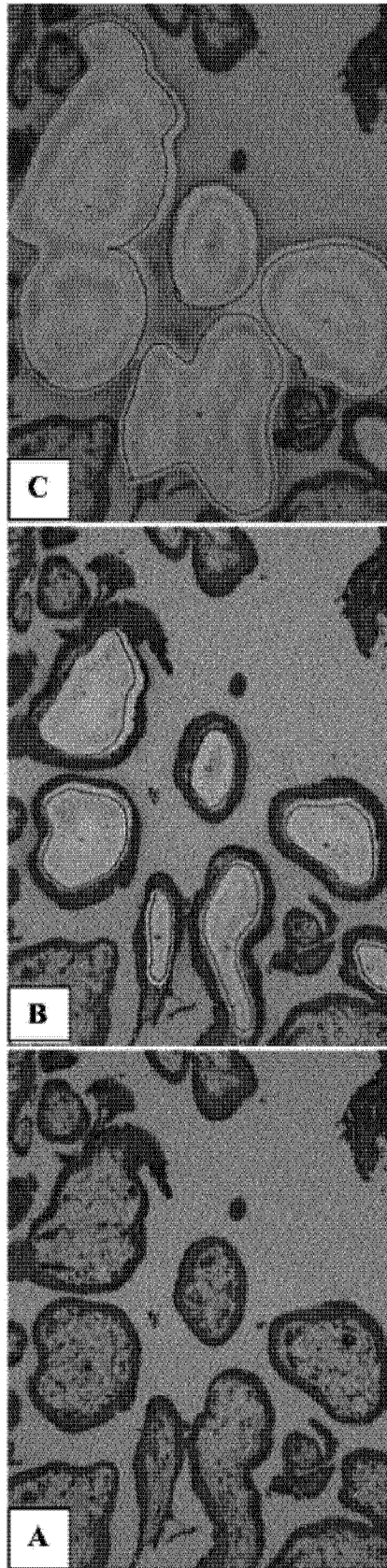


图 3

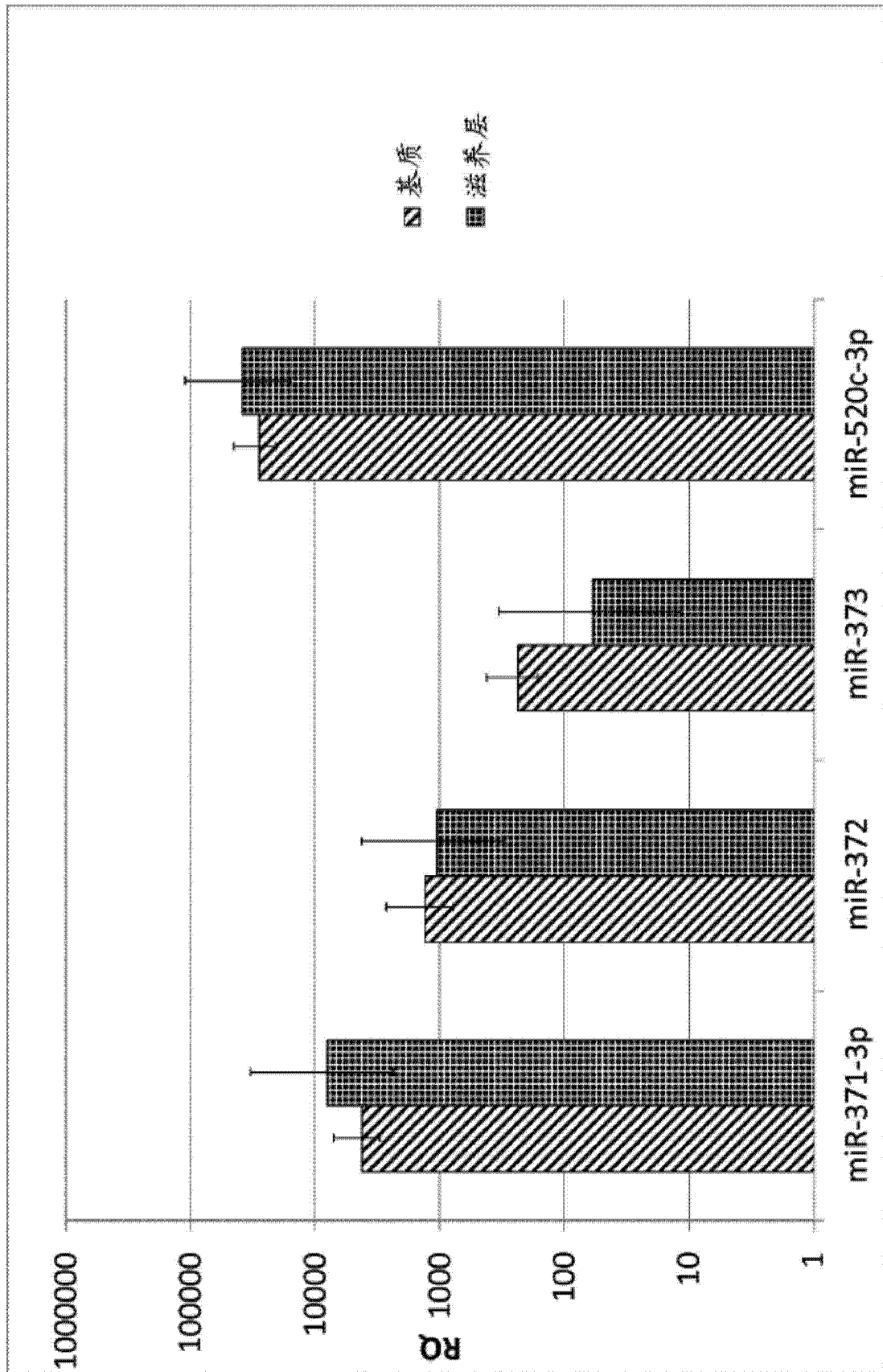


图 4

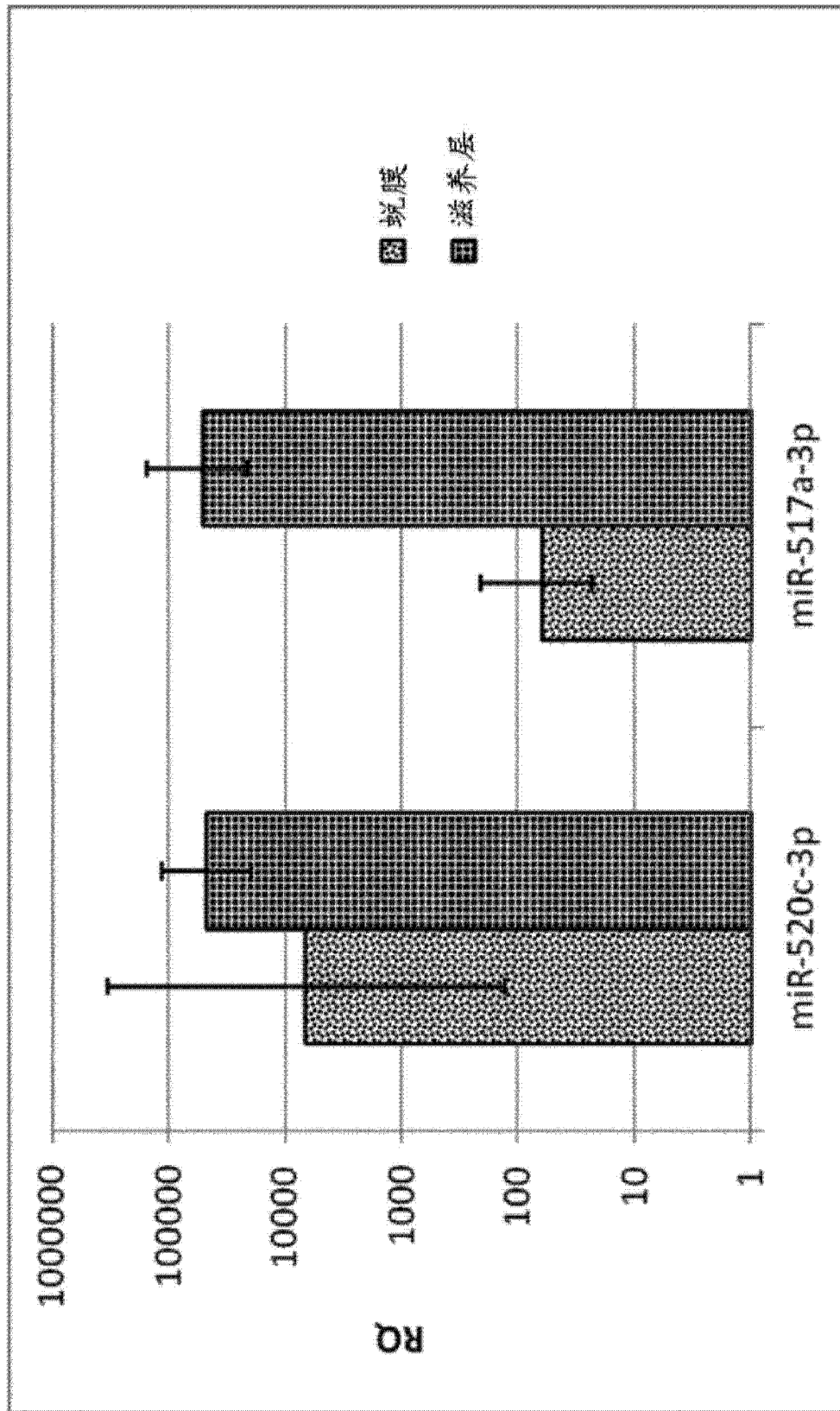


图 5

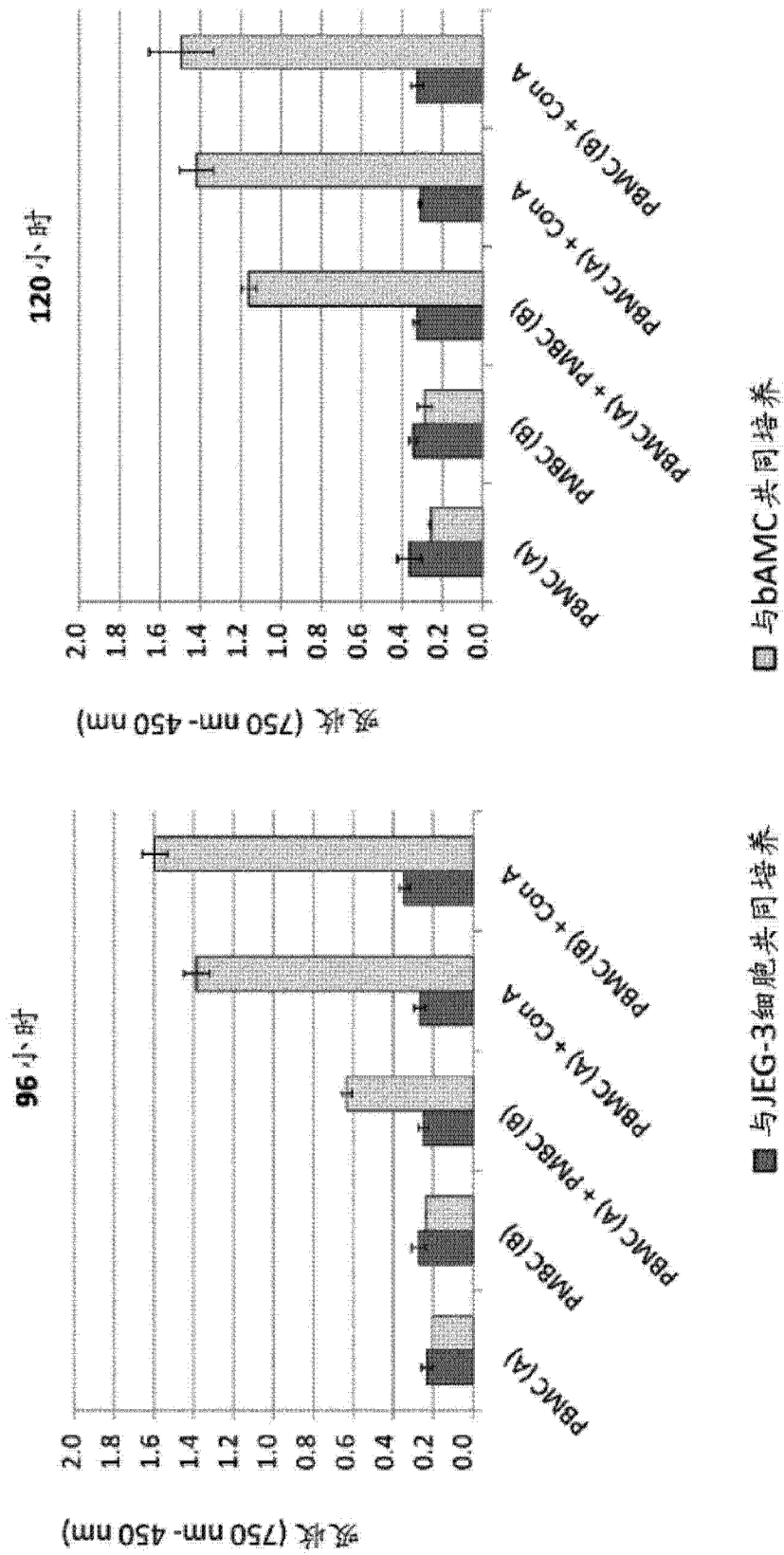


图 7

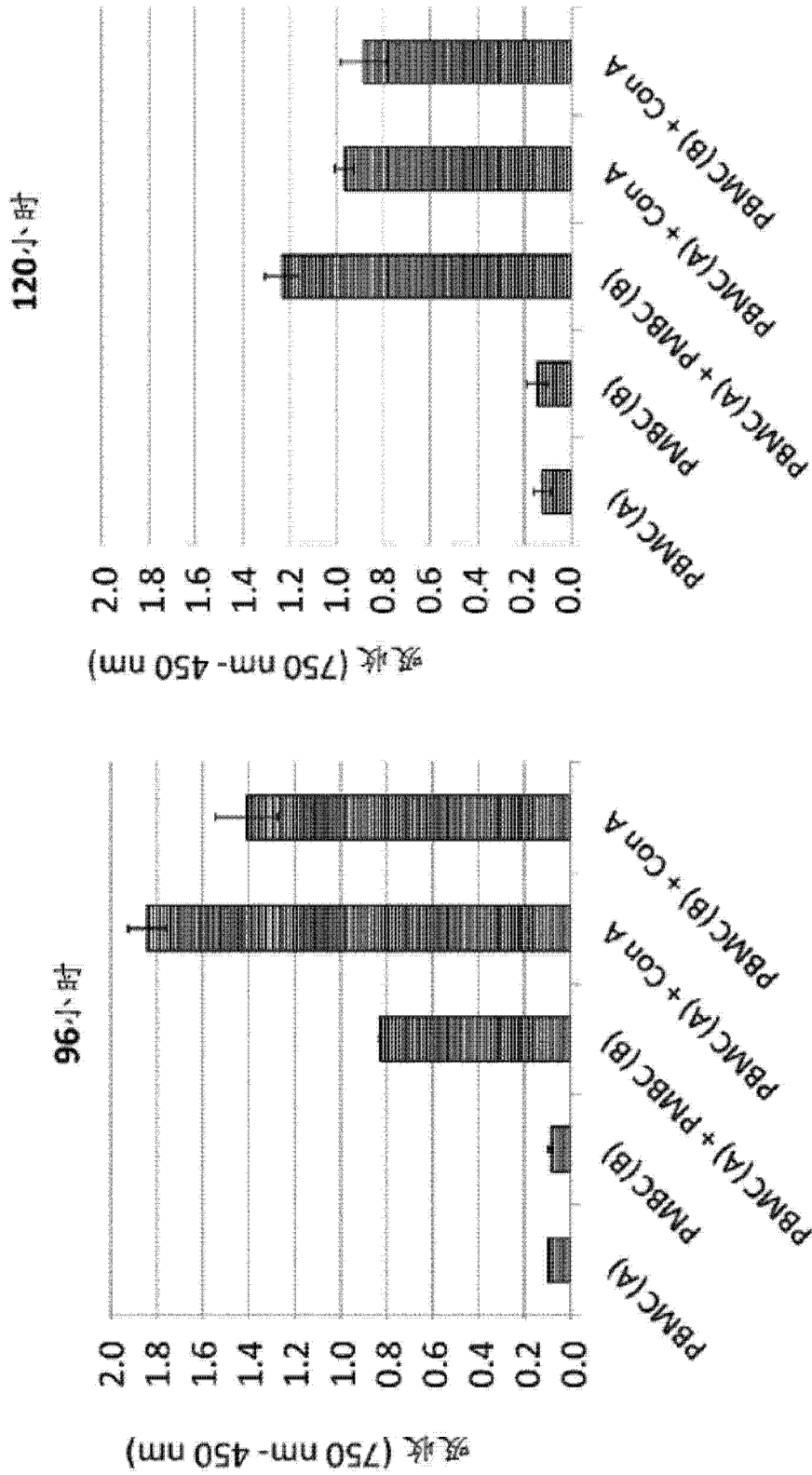


图 8

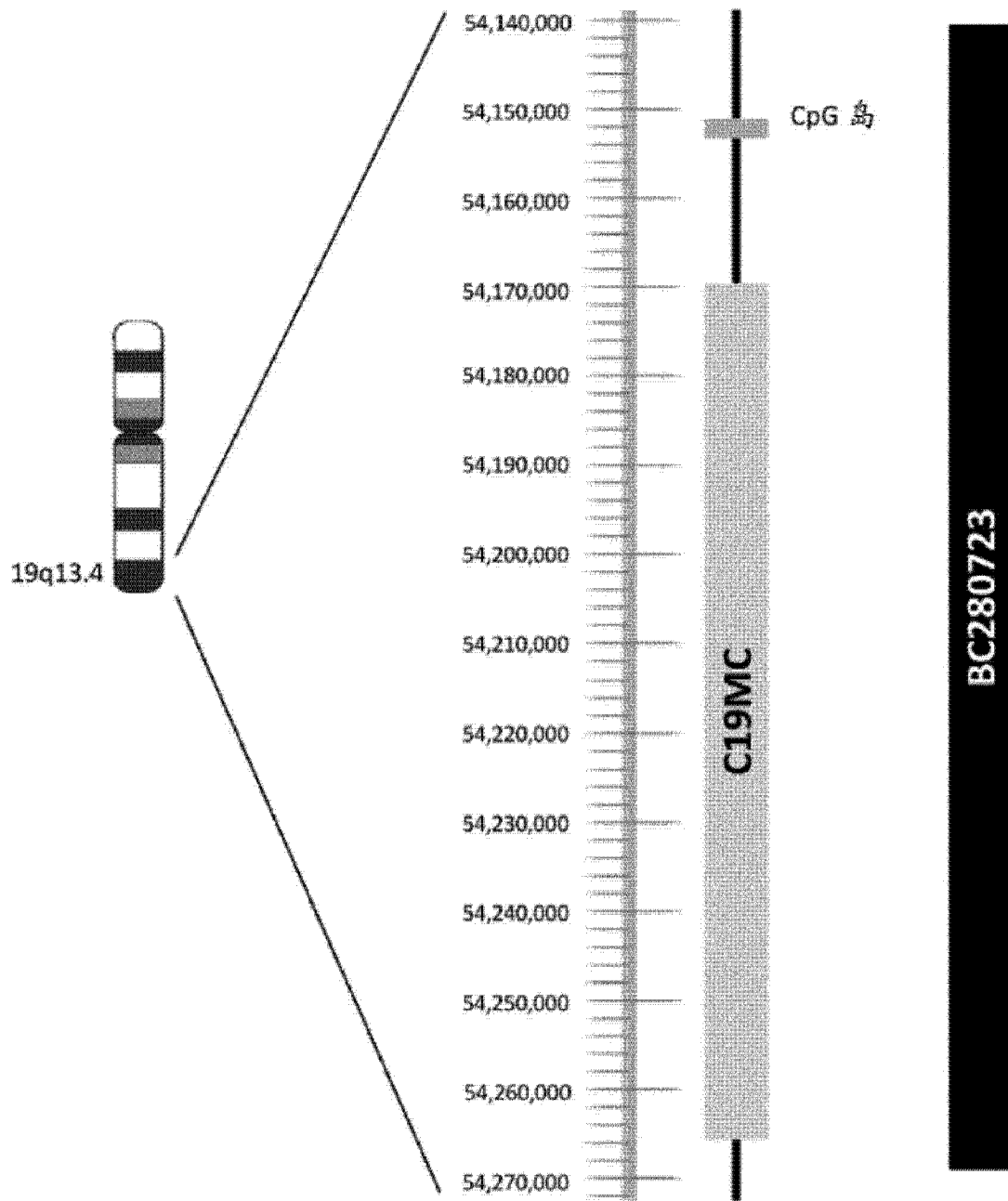


图 9

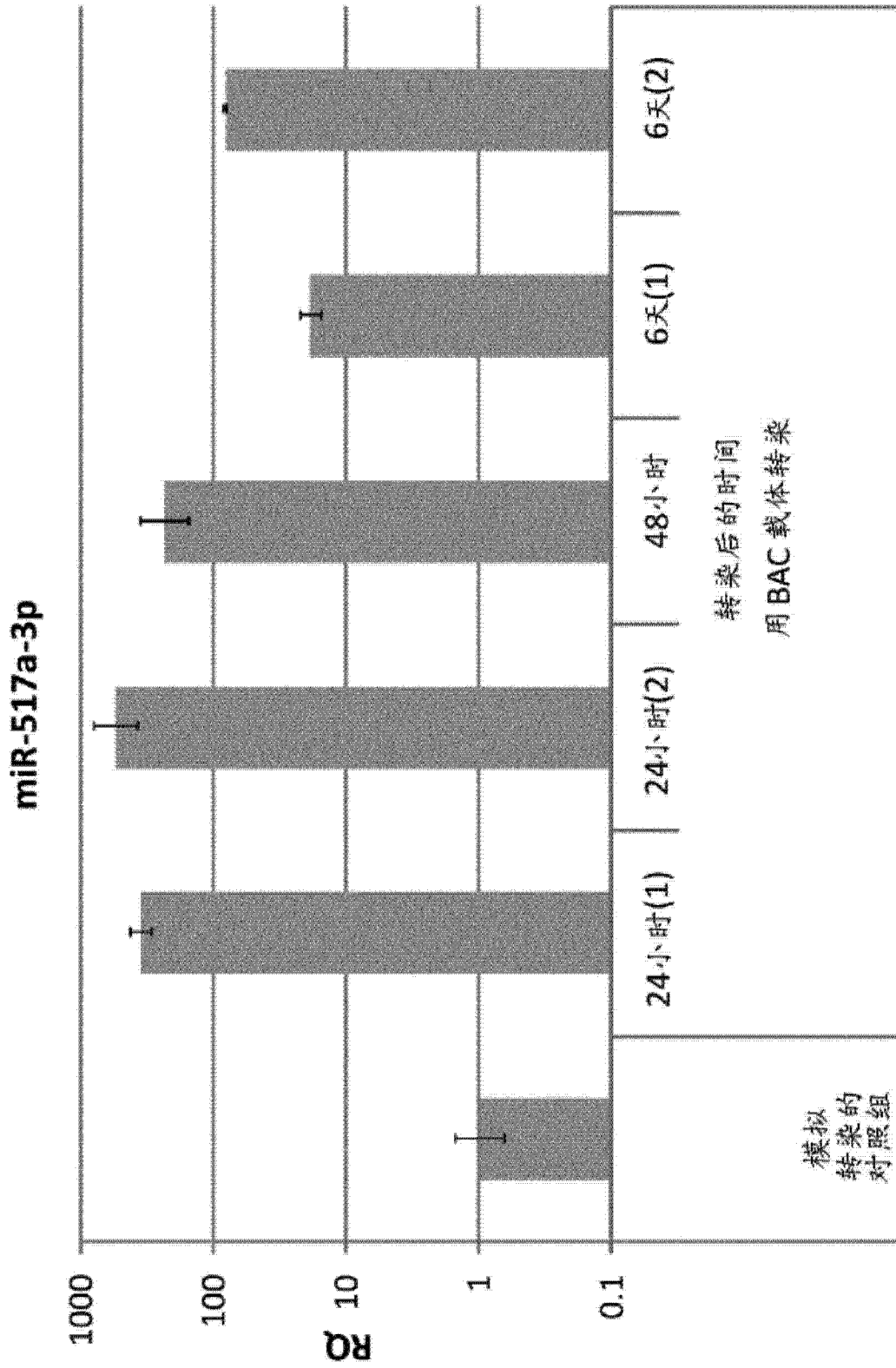


图 10

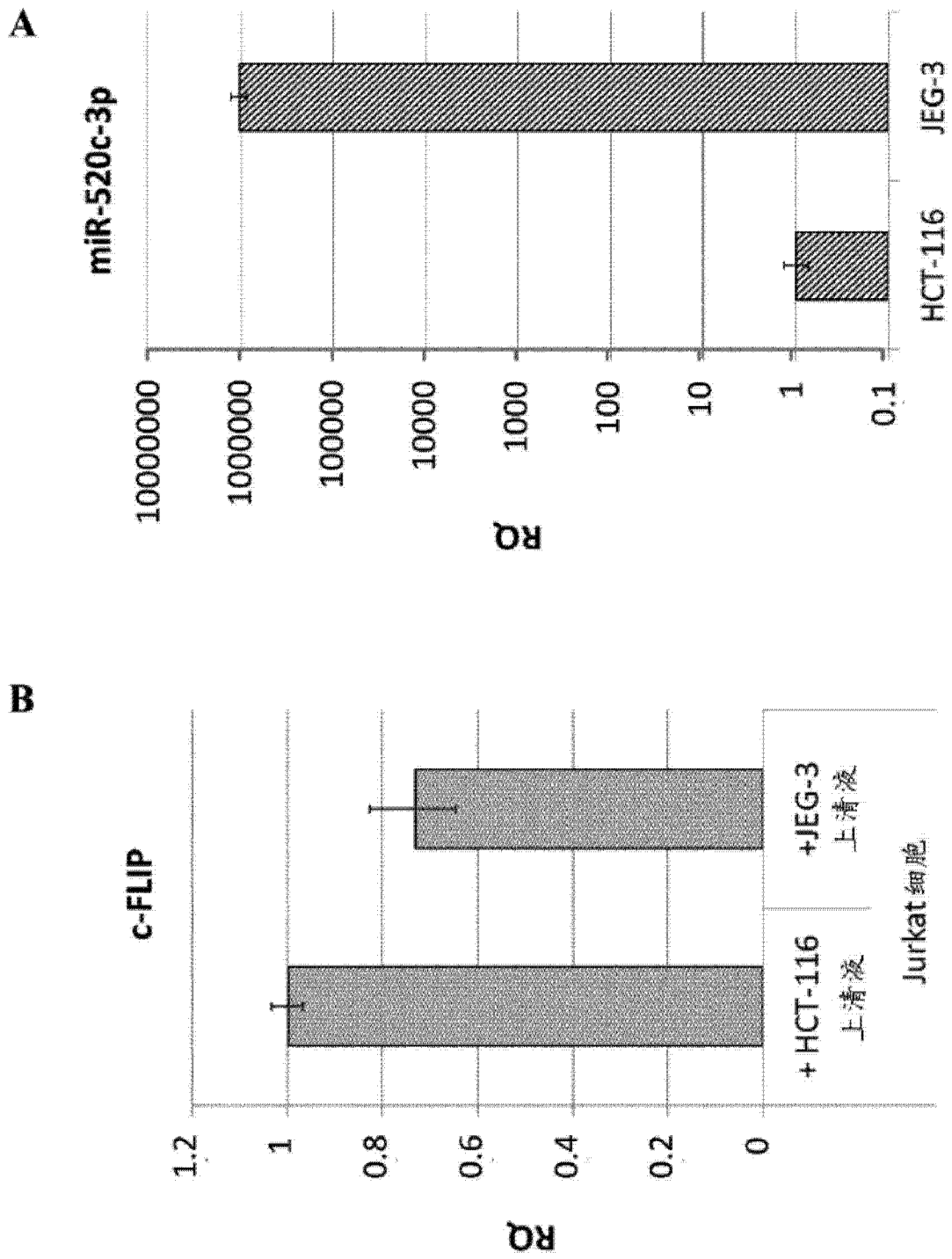


图 11