



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110177578 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 13

(21) 申请号 201780070205.9

(22) 申请日 2017.09.18

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110177578 A

(43) 申请公布日 2019.08.27

(30) 优先权数据  
62/395,701 2016.09.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.05.13

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/052035 2017.09.18

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/053414 EN 2018.03.22

(73) 专利权人 西奈山伊坎医学院  
地址 美国纽约

(72) 发明人 L·赞吉 A·马加杜姆

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.  
A61K 48/00 (2006.01)  
C12N 15/11 (2006.01)  
C12N 15/00 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2016040395 A1,2016.03.17  
US 2015315541 A1,2015.11.05  
WO 2012012739 A2,2012.01.26  
CN 102947450 A,2013.02.27  
Lior等.Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction.《Nat Biotechnol》.2014,

审查员 郭鑫鑫

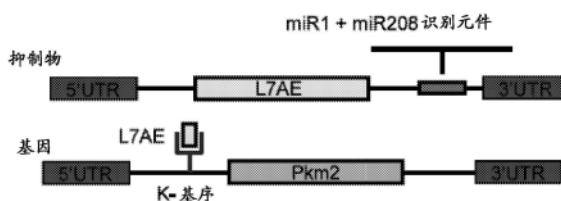
权利要求书1页 说明书32页  
序列表9页 附图59页

(54) 发明名称

modRNA的细胞特异性表达

(57) 摘要

本文公开了用于细胞特异性转录(表达)感兴趣蛋白的表达调控系统,例如在成年或新生儿心肌细胞或产生胰岛素的β细胞中再激活增殖的细胞周期诱导物。该表达调控系统包含编码特异性结合靶细胞miR的microRNA识别元件和翻译抑制蛋白的第一核酸;和包含结合翻译抑制蛋白的抑制蛋白相互作用基序和编码感兴趣蛋白的基因的第二核酸。当感兴趣细胞被该系统的第一和第二核酸共转染时,感兴趣蛋白以细胞特异性方式表达。



1. 一种用于心肌细胞特异性表达编码感兴趣蛋白的基因的表达调控系统,其包含:  
第一核酸,其编码在其3'UTR附近的microRNA(miR)识别元件和翻译抑制蛋白,所述microRNA(miR)识别元件包含SEQ ID NO:2的核苷酸445-528和SEQ ID NO:3的核苷酸445-532的一者或者两者,所述翻译抑制蛋白包含L7ae;和  
第二核酸,其包含含有k基序的抑制蛋白相互作用基序,和所述基因,  
其中在第一核酸和第二核酸中,假尿苷替换尿苷,5-甲基胞苷替换胞苷,以及3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G抗反向帽类似物在5'末端。
2. 根据权利要求1所述的系统,其中感兴趣蛋白包含报告蛋白或选择标记物。
3. 根据权利要求2所述的系统,其中报告蛋白或选择标记物是荧光蛋白或抗生素抗性标记物。
4. 根据权利要求2所述的系统,其中报告蛋白或选择标记物选自绿色荧光蛋白(GFP)、核GFP(nGFP)、无活性的人CD25(ihCD25)和无活性的小鼠CD25(imCD25)。
5. 根据权利要求1所述的系统,其中感兴趣蛋白包含细胞周期诱导蛋白。
6. 根据权利要求5所述的系统,其中细胞周期诱导物蛋白选自Lin28和Pkm2。
7. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述第一核酸包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的核苷酸序列。
8. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述第二核酸包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的核苷酸序列。
9. 一种组合物,其包含权利要求1-8中任一项所述的第一核酸和第二核酸。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述第一核酸和第二核酸通过体外转录获得。
11. 一种用于在心肌细胞中表达蛋白质的体外或离体方法,所述方法包括使所述心肌细胞与权利要求1所述的第一核酸和第二核酸接触。
12. 根据权利要求11的方法,其中所述第一核酸包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的核苷酸序列。
13. 一种载体,其包含权利要求1-8中任一项所述的第一核酸和第二核酸。
14. 一种表达调控试剂盒,其包含权利要求1所述的第一核酸和第二核酸或包含含有权利要求1所述的第一核酸和第二核酸的载体。
15. 权利要求1所述的系统在制备用于治疗心肌梗塞的药物中的用途,其中所述基因包含细胞周期诱导物基因。
16. 根据权利要求15所述的用途,其中细胞周期诱导物基因选自Lin28、Pkm2以及细胞周期蛋白D2。
17. 根据权利要求15或16所述的用途,其中所述第一核酸和第二核酸是修饰的RNA。
18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述miR识别元件包含SEQ ID NO:2的核苷酸445-528和SEQ ID NO:3的核苷酸445-532。
19. 权利要求1所述的表达调控系统、权利要求13所述的载体或权利要求14所述的试剂盒在制备用于在心肌梗塞或心力衰竭后恢复心肌细胞增殖的药物中的用途。
20. 权利要求1-8中任一项所述的表达调控系统在制备用于治疗心肌梗塞或心力衰竭的药物中的用途。

## modRNA的细胞特异性表达

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年9月16日提交的美国临时申请号62/395,701的优先权,其内容通过引用并入本申请中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含2016年9月7日创建的序列表;该文件以ASCII格式指定为3710029P\_SequenceListing\_ST25.txt,大小为11,278字节。该文件通过引用整体并入本申请中。

### 技术领域

[0005] 本公开内容一般地涉及使用基于细胞特异性miR推翻基因表达抑制的的细胞特异性转录调控系统在体外、离体和体内细胞特异性表达治疗性蛋白的平台。

### 背景技术

[0006] 化学修饰的信使RNA (modRNA) 是一种治疗策略,其使细胞机器能够在不修饰基因组的情况下产生感兴趣基因。因此,modRNA避免了常规基因治疗中出现的几个问题,包括缺乏基因组整合、表达持久性、免疫原性、可扩展性和生产中的困难、需要终身监测肿瘤发生和其他不良临床结果、以及载体逃逸到体循环以及体内其他部位的长期表达的可能性。

[0007] modRNA作为疾病治疗具有相当大的潜力。例如,通过modRNA传递细胞周期诱导物将触发糖尿病个体中 $\beta$ 细胞的生长或恢复心肌梗塞或心力衰竭后心肌细胞的增殖。通过传递编码神经生长因子的基因的能力可以减轻糖尿病性神经病变。此外,随着基因组编辑技术的出现,如果以瞬时和细胞特异性方式传递,则CRISPR/Cas9或转录激活因子样效应核酸酶 (TALEN) 转染将更安全。

[0008] 然而,可获得的modRNA的转染试剂均未提供高水平的基因表达和靶向任何感兴趣细胞的能力。例如,常见的体内转染试剂是体内 **jetPEI® (Polyplus-transfection® SA**, Illkirch, France), 其是基于聚合物的试剂,与modRNA复合以形成纳米颗粒。然而,体内-jetPEI在体内主要靶向肺组织,与裸modRNA相比显著降低转染效力。

[0009] 因此,需要的是基于modRNA的基因传递系统,其在感兴趣的细胞中排他性地实现高水平的基因表达。

### 发明内容

[0010] 本公开提供了用于细胞特异性转录的表达调控平台,其基于开发阻遏RNA结合蛋白/k-基序相互作用偶联细胞特异性miR推翻阻遏功能,以细胞特异性方式控制传递的modRNA的表达。RNA结合蛋白如古细菌蛋白L7Ae及其真核同源物如L30e识别特殊的RNA基序,扭结-转角(本文指k-转角或k-基序)。通过将k-基序并入编码感兴趣基因(GOI)的第一构建体中并且在编码RNA结合蛋白的第二构建体中包含针对细胞特异性miR的识别元件,当这两种构建体共转染到合适的细胞类型中时GOI表达的抑制被推翻。该平台包含修饰的mRNA。

[0011] 因此,本公开涉及用于实现感兴趣基因(GOI)的modRNA的细胞特异性表达的方法,仅期望该感兴趣基因(GOI)在感兴趣细胞中表达。在一个方面,本公开描述了用于细胞特异性转录的表达调控系统,该系统包含编码(1)细胞特异性microRNA(miR)识别元件和(2)翻译抑制蛋白的第一核酸;和编码(1)抑制蛋白相互作用基序,例如其5'UTR下游结合翻译抑制蛋白的K-基序,和(2)编码感兴趣蛋白的基因的第二核酸。核酸是modRNA。

[0012] 通过交换miR识别元件,可以调节细胞特异性,使系统适应其他细胞类型。

[0013] 在另一个方面,本公开涉及候选基因的心肌细胞(CM)特异性modRNA的短期表达,如细胞周期诱导物基因,其表达再激活CM再生,该CM再生在心肌梗塞后或心力衰竭条件下是重要的。该方法基于以下观察:在MI后使用本公开的细胞特异性传递系统传递作为modRNA的细胞周期物诱导基因(例如,Lin28和Pkm2),显著诱导CM和非CM增殖。由于增加的非CM增殖可导致增强的心脏瘢痕形成,因此有必要开发CM特异性modRNA,其允许仅在心肌细胞中表达基因。

[0014] 本公开描述了CM特异性modRNA,其允许仅在CM中进行modRNA翻译。在一个实施方案中,CM特异性Lin28或Pkm2modRNA表达导致显著的CM增殖而不显著改变非CM增殖。在另一个实施方案中,基于CM特异性modRNA,开发了一种新的谱系追踪成年小鼠模型,其基于使用CM特异性modRNA在Rosa26<sup>tdT</sup>omato中共表达去稳定的Cre重组酶和候选基因。

[0015] 在一个方面,本公开涉及用于心肌细胞特异性表达的表达调控系统,其包含编码microRNA识别元件的第一核酸(miR识别元件用作抗miR方法),该microRNA识别元件特异性结合靶心肌细胞miR,并阻止抑制蛋白(L7Ae)的翻译;和包含感兴趣基因和抑制蛋白(L7Ae)结合的扭结-转角基序(K-基序)的第二核酸。L7Ae与K基序的结合抑制具有K基序的基因的表达。

[0016] 在翻译调控系统的一个实施方案中,靶心肌细胞miR选自miR1、miR29、miR126、miR133a、miR199、miR208a和miR378。在另一个实施方案中,靶心肌细胞miR选自miR1、miR208a和miR1与miR208a的组合。

[0017] 在表达调控系统的一个实施方案中,抑制蛋白是L7Ae,蛋白质相互作用基序是K-基序。L7Ae是RNA结合蛋白,其抑制靶向转录本的翻译。L7Ae靶向称为k-基序或k-转角的特定序列。因此,k-基序构建在编码GOI的(核酸)对的一个核酸中。通常,当编码L7Ae的(核酸)对中的另一核酸正常表达时,L7Ae能够与k-基序结合,从而抑制由该核酸编码的GOI的表达。

[0018] 在本系统的一个实施方案中,编码L7Ae的核酸还含有细胞特异性miR识别元件。当在适当的细胞中表达时,细胞特异性miR结合miR识别元件以停止L7Ae的表达,消除对另一核酸的GOI抑制。

[0019] 在翻译调控系统的一个实施方案中,感兴趣蛋白是报告蛋白或其他感兴趣的基因。在翻译调控系统的一个实施方案中,报告蛋白或选择标记物是荧光蛋白、抗生素抗性标记物或其他感兴趣的基因。在翻译调控系统的一个实施方案中,报告蛋白或选择标记物选自绿色荧光蛋白(GFP)、失活的人CD25(ihCD25)。在本公开的转录/翻译调控系统的一个实施方案中,感兴趣蛋白是细胞周期诱导物蛋白。在翻译调控系统的一个实施方案中,细胞周期诱导物蛋白选自Lin28、Pkm2和细胞周期蛋白D2。在转录调控系统的一个实施方案中,所述第一核酸包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的核苷酸序列。在转录调控系统

的一个实施方案中,所述第二核酸包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

[0020] 在一个方面,本公开涉及包含第一和第二修饰RNA (modRNA) 的组合物,其中所述第一modRNA是权利要求1、2或3的第一核酸的表达产物,所述第二modRNA是第二核酸的表达产物。

[0021] 在一个方面,本公开涉及用于在心肌细胞 (CM) 中表达蛋白质的方法,该方法包括使所述CM与编码特异于心肌细胞miR靶的miR识别元件的modRNA接触,其中modRNA包含核苷酸序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:3。

[0022] 在一个方面,本公开涉及包含如本文所述的第一和第二核酸的载体。

[0023] 在一个方面,本公开涉及转录/翻译调控试剂盒,其包含如本文所述的第一和第二核酸或包含如本文所述的第一和第二核酸的载体。

[0024] 在一个方面,本公开涉及诱导/再激活心肌梗塞 (MI) 后心肌细胞增殖的方法,该方法包括使所述心肌细胞或所述肌细胞的一部分与编码心肌细胞特异性miR的第一modRNA和编码细胞周期诱导物基因的第二modRNA接触。

[0025] 在一个方面,本公开涉及所公开的方法,其中细胞周期诱导物基因选自Lin28、Pkm2和细胞周期蛋白D2。

## 附图说明

[0026] 图1显示用于产生本公开的modRNA的pTEMPLZ的质粒图谱。

[0027] 图2以图(上组)和表格形式(下组)显示用于合成DNA有尾的模板的PCR设置。框中显示的是必须根据插入序列的大小设置的延伸步骤。延伸步骤需要ORF插入每KB30秒。PCR设置基于2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix试剂盒的制造商说明。

[0028] 图3A-3C显示modRNA合成的质量控制分析的结果。A,1%琼脂糖凝胶确定具有ORF插入的质粒pTEMPLZ和IVT的有尾的DNA模板的正确大小。B,理想的最终modRNA产物的分光光度计(Nanodrop)结果。理想浓度为15-20 $\mu\text{g}/\text{ul}$ 。接近2的260/280值表示纯度。C,合成的modRNA质量控制的生物分析结果。

[0029] 图4A-4C A,体内注射具有LacZ基因的编码的modRNA的小鼠心脏的整体心脏视图。注射后24小时,处死小鼠,用4%PFA固定心脏,并用x-gal染色。B,体内注射具有核GFP的编码的modRNA的小鼠心脏的免疫染色。核GFP阳性(绿色)的(左)心肌细胞(TropT:红色),内皮细胞(Pecam1:红色)和平滑肌细胞(smMHC:红色)。(DAPI:蓝色)。C,注射具有Cre重组酶的编码的modRNA的Rosa26LacZ小鼠心脏的横截面。用Cre重组酶转染的细胞可以由x-gal染色,产生深蓝色。

[0030] 图5A和5B显示成年小鼠心肌梗塞和心力衰竭模型。在直接肌内注射modRNA后,使用左前降支冠状动脉(LAD)的永久性结扎进行成年小鼠心肌梗塞模型(MI模型)。MI一天或更多天后,收集心脏并用于免疫染色。B,MI后成年小鼠心脏被Luc;LacZ和nGFP modRNA高度转染。A,用modRNA转染几种细胞类型,包括心肌细胞(CM)、心脏成纤维细胞(CF)和内皮细胞(EC)。

[0031] 图6A-6H显示成年CM中Pkm2的表达诱导MI后增殖。A,出生1或10天后通过qRT-PCR测量的小鼠心脏中Pkm2的相对表达。B,在小鼠心脏发育的不同阶段免疫染色Pkm2或 $\alpha$ -辅肌

动蛋白 (CM标记物) 的实验计划。C, 小鼠心脏发育的不同阶段Pkm2表达的代表性图像。D, 体内modRNA传递后Pkm2表达的药代动力学。E, 用于测量Pkm2对CM增殖影响的实验时间轴。F, MI 7天后, CM ( $\alpha$ -辅肌动蛋白<sup>+</sup>) 和非CM细胞 ( $\alpha$ -辅肌动蛋白<sup>-</sup>) 中DNA合成 (BrdU<sup>+</sup>) 的代表性图像。G. & H, MI 7天后对成年小鼠中CM (F) 或非CM (G) 中的标志性增殖标记物的定量。结果代表2个独立实验 (n=4); 白色箭头指向CM; 黄色箭头指向非CM, \*\*\*, P<0.001, \*\*, P<0.01, 双尾学生t检验, 比率尺10 $\mu$ m。

[0032] 图7A-7K显示了体内<sub>cms</sub> modRNA的设计和功。A, 用于识别<sub>cms</sub> miR的构建体设计和实验时间轴。B, ihCD25 modRNA表达 (红色) 的免疫染色图像, 有或没有转染后不同miR的识别元件。C, c中实验的量化。D, 用于体内传递<sub>cms</sub> Cre或<sub>cms</sub> nGFP modRNA的modRNA构建体设计。E-F, 在MI后4天, nGFP-K modRNA (绿色) 单独转染或共转染miR1-208。(E) MI7天后心脏的代表性图像。(F) 具有不同的nGFP-K和miR1-208比率的转染效率。g, Cre-K+miR1-208共转染的Rosa26<sup>mTmG</sup>小鼠。G, Cre-K+miR1-208共转染。红色: 肌钙蛋白I。H, g中实验的量化。I, 评估<sub>cms</sub> Pkm2 modRNA对增殖影响的实验时间轴。MI 7天后定量CM (J) 或非CM (K) 中标志性标记物的增殖。结果代表2个独立实验 (n=3只小鼠); \*\*\*, P<0.0001, \*\*\*, P<0.001, \*\*, P<0.01, N.S, 无显著性, 双尾学生t检验 (f) 或单因素方差分析, Bonferroni事后检验 (j, c, k)。c和f或h中的比率尺分别为10 $\mu$ m或50 $\mu$ m。

[0033] 图8A-8N显示<sub>cms</sub> Pkm2 modRNA改善MI后的心脏功能和结果。A, 评估心脏功能和结果的实验时间轴。B, MI后1个月左心室收缩功能的MRI评估。图像描绘了心脏舒张期和收缩期的左心室 (以红色标出)。C, b中实验的射血分数百分比。D, 超声评估MI后第2天 (基线) 和第28天之间的分数短缩差异百分比中的delta。E, 评估MI 28天后的瘢痕大小的Masson三色染色的代表性图片。F-I, 在MI 28天后定量的瘢痕大小 (F)、心脏重量与体重的比率 (G)、CM大小 (H) 和测量的毛细血管密度 (I)。J-M, 在MI 28天后用不同处理的CM的数量。J, 每组中CM数量的代表图像。D, j中实验的量化。L, 分离CM的核的代表图像 (单、双或多)。M, 1 N中实验的量化。注射Pkm2-K或luc-K modRNA和共转染miR1-208的小鼠的长期MI后存活曲线。结果代表2次独立的实验 (n=5只小鼠); \*\*\*, P<0.001, \*\*, P<0.01, \*, P<0.05, 单因素方差分析, Bonferroni事后检验。使用Mantel-Cox对数秩检验计算长期存活的P值。比率尺10 $\mu$ m。

[0034] 图9A-9M显示在MI后表达<sub>cms</sub> Pkm2的CM的谱系示踪, 并且显示增加数量的转染的CM和Pkm2功能的关键下游调节物的诱导。A, 用于R26<sup>mTmG</sup>小鼠中心脏谱系示踪的实验时间轴。B, MI 28天后CM或非CM的转染效率 (%GFP<sup>+</sup>)。C, MI 28天后CM及其后代 (GFP<sup>+</sup>) 的代表图像。D, MI 3或28天后对GFP<sup>+</sup>CM的定量。MI 28天后心脏与体重的比率 (E)、GFP<sup>+</sup>CM的相对大小 (F)、和心脏中GFP<sup>+</sup>CM中核的数量 (G)。H, MI 28天后GFP<sup>+</sup>CM, pH3<sup>+</sup>或Ki67<sup>+</sup>的代表图像。在MI模型中用<sub>cms</sub> Luc或<sub>cms</sub> Pkm2与<sub>cms</sub> Cre modRNA转染28天后定量GFP<sup>+</sup>pH3<sup>+</sup>CM (I) 或GFP<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>CM (J)。k-m, MI 2天后和施用<sub>cms</sub> ihCD25与<sub>cms</sub> Luc或<sub>cms</sub> Pkm2 modRNA, 使用磁珠分离成年CM。K, qRT-PCR分析以验证分离的CM的纯度。L, 成年CM中PPP (G6PD) 和Pkm2的关键下游间接转录靶标的关键基因的基因表达比较。M, 细胞周期促进基因或细胞周期抑制基因的表达。结果代表2次独立的实验 (n=3只小鼠); \*\*\*, P<0.001, \*\*, P<0.01, \*, P<0.05, N.S, 非显著, 双尾学生t检验 (b-j) 或带有Bonferroni事后检验的ANOVA (k-m)。c或h中比率尺分别为50或10 $\mu$ m。

[0035] 图10 (S1) 显示成年CM在体外用modRNA成功转染。用核GFP (nGFP) 转染分离的成年CM并在转染20小时后成像 (bar=10 $\mu$ m)。

[0036] 图11 (S2) 是柱状图,其显示使用细胞周期诱导物modRNA在体内激活成年CM的增殖不会损害CM完整性。使用麦胚凝集素 (WGA) 染色测量CM大小,用于在用不同modRNA处理MI7天后的心脏中CM横截面面积的评估。结果表明,当在成年小鼠MI模型中传递细胞周期诱导物Lin28或Pkm2modRNA时,CM完整性和大小没有显著差异。结果代表两次独立的实验,其中n=3只小鼠,N.S,不显著,双尾学生t检验。

[0037] 图12A-12C (S3) 显示使用细胞周期诱导物modRNA在体内激活成年CM的增殖减少了CM凋亡并增加了毛细血管密度。在MI 7天后和不同modRNA处理的心脏左心室中测量CM增殖 (Ki67+) 凋亡 (TUNEL+) 和毛细血管密度 (Cd31+腔结构)。A,代表数据,显示在MI 7天后Lin28、细胞周期诱导物modRNA处理诱导CM增殖、减少细胞凋亡和增加毛细血管密度。用不同处理的细胞凋亡 (B) 或毛细血管密度 (C) 水平的定量结果。结果表明使用细胞周期诱导物基因如Lin28 (红色) 和PKM2显著降低CM细胞凋亡和增加毛细血管密度。结果代表两次独立的实验,其中n=3只小鼠,\*\*\*,P<0.001,双尾学生t检验。

[0038] 图13A-13C (S4) 显示miR-1和miR-208仅在体外大鼠新生儿CM中表达。A,将具有或不具有miR-208、miR1、miR133a、miR126、miR199、miR378和miR29a的miR识别元件的灭活人CD25 (ihCD25) modRNA体外转染到新生儿CM中。转染20小时后,固定细胞并用抗CD25 (红色) 和肌钙蛋白I (CM标记物,绿色) 染色。B,针对不同处理所采集的图像显示,当ihCD25modRNA具有miR-1或miR-208的识别元件时,CM (肌钙蛋白I+细胞) 不能翻译ihCD25modRNA (肌钙蛋白I+和ihCD25+CM),其他处理导致CM中ihCD25翻译。这表明只有miR-1或miR-208是CM特异性的。C,实验的量化。结果代表两次独立的实验,n=3个孔,条=10mm。

[0039] 图14A-14C (S5) 显示miR-1和miR-208仅在体外大鼠新生儿CM中表达。A,将具有或不具有miR-208或miR1的miR识别元件的ihCD25modRNA在体外与nGFP共转染到新生儿CM中。转染20小时后,固定细胞并用抗CD25 (红色) 和肌钙蛋白I (CM标记物,绿色核) 染色。nGFP用作转染对照。B,针对不同处理所采集的图像显示,当ihCD25modRNA具有miR-1或miR-208的识别元件时,CM (肌钙蛋白I+细胞) 不能翻译ihCD25modRNA (肌钙蛋白I+和ihCD25+细胞),然而无miR识别元件的ihCD25modRNA能够在CM中翻译。所有转染nGFP细胞表明modRNA成功传递。C,实验的量化。结果代表两次独立的实验,n=3个孔,条=10mm。

[0040] 图15A-15C (S6) 显示miR-1和miR-208仅在成年小鼠心脏中体内表达。A,具有或不具有miR-208或miR1的miR识别元件的ihCD25modRNA与nGFP共转染到MI模型中的成年小鼠心脏中。MI 20小时后,收集传递modRNA的心脏,固定并用抗CD25 (红色)、肌钙蛋白I (CM标记物,白色) 和nGFP (绿色) 染色。nGFP用作转染对照。B,对于不同处理采集的图像显示,当ihCD25modRNA具有miR-1或miR-208的识别元件时,CM (肌钙蛋白I+细胞) 不能翻译ihCD25modRNA (肌钙蛋白I+和ihCD25+细胞),转染不具有miR识别位点的ihCD25导致ihCD25在CM中翻译。用nGFP转染的所有细胞表明modRNA成功传递。C,实验的量化。结果代表两次独立的实验,总共n=5只小鼠,条=10mm。

[0041] 图16A-16C (S7) 显示携带miR-208、miR-1或1:1比率的两者的识别元件的nGFP CM特异性modRNA,显示主要在体外在CM中翻译nGFP。A,CM特异性modRNA设计。B,携带miR-208、miR-1或1:1比率的两者的识别元件的nGFP CM特异性modRNA在体外转染到新生大鼠CM中。转染20小时后,固定细胞并染色nGFP (核绿色) 和肌钙蛋白I (CM标记物,红色)。C,B中描述的实验的量化。结果表示两次独立的实验,n=3个孔,条=10mm。

[0042] 图17A-17C(S8)显示携带miR-208、miR-1或1:2.5或更高比率的两者的识别元件的nGFP CM特异性modRNA,显示仅在体外在CM中翻译nGFP。A,CM特异性modRNA设计。B,携带miR-208、miR-1或不同比率的两者的识别元件的nGFP CM特异性modRNA在体外转染到新生大鼠CM中。转染20小时后,固定细胞并染色nGFP(绿色核)和肌钙蛋白I(CM标记物,红色)。C,B中描述的实验的量化。结果表示两次独立的实验,n=3个孔,条=10mm。

[0043] 图18(S9)以1:0.5或更高比率携带miR-208和miR-1二者的识别元件的nGFP CM特异性modRNA,显示仅在体内在CM中翻译nGFP。结果代表两次独立的实验,n=3只小鼠,条=10mm。

[0044] 图19A-19D(S10)Pkm2CM特异性modRNA仅在CM中促进增殖。A,实验的时间轴。B,实验中使用的modRNA设计。C,Lin28/PKM2CM特异性modRNA仅在CM中促进增殖。D,在小鼠心肌梗塞模型中测试传递7天后携带k基序的PKM2modRNA与L7AE-miR1和miR208共转染对成年小鼠心肌细胞增殖的再激活。红色虚线表示控制增殖率。结果代表2次独立实验,n=2只小鼠(总共n=4只小鼠),\*\*\*P<0.001,N.S.,不显著;双尾学生t检验。

[0045] 图20(S11)L7AE modRNA在成年小鼠心肌梗塞模型中没有提高免疫应答。质量图像显示在传递具有或不具有不同miR识别元件的L7AE后可以看到免疫应答没有升高(CD45+细胞,红色)。比率尺=10 $\mu$ m。

[0046] 图21A-21C(S12)在体内在CMs增殖和大小上评估具有或不具有miR-208或miR1或两者的miR识别元件的L7AE modRNA。A,MI后向小鼠成年心脏注射Luc、没有miR识别元件或具有miR-1或miR-208或两者的识别元件的L7AE。MI 7天后收集心脏,固定并染色不同的增殖标记物,如Ki67、BrdU、H3P和Aurora B(B)和WGA,用于测量处理的的心脏中CM的大小(C)。结果表明具有miR-208或miR-1或两者的miR识别元件的L7AE诱导CM增殖而不损害CM大小。结果代表两次独立的实验,n=3只小鼠,N.S.,无显著性,\*\*\*,P<0.001,双尾学生t检验。

[0047] 图22A-22C(S13)显示用于表达nGFP的转录/翻译调控系统。

[0048] 图23显示使用CM特异性modRNA方法和磁珠分选从MI后的心脏分离转染的成年CM的结果。A,在MI和modRNA施用2天后进行成年CM的分离。抗hCD25磁珠用于分离CD25阳性细胞。B,用携带k基序的ihCD25和nGFP转染CFW小鼠。用这种方法分离的所有阳性细胞是GFP+ihCD25+。C,当一起转染携带miR1和miR208(CM特异性modRNA)的识别元件的L7AE时,得到转染的CM(nGFP+和ihCD25+)和未转染的CM和非cm的混合物。D,使用hCD25磁珠允许分离仅转染的CM。小鼠=3。

[0049] 图24显示在MI和在小鼠心肌梗塞模型中注射28天后,Lin28或Pkm2CM特异性modRNA改善心脏功能。使用超声心动图在MI后第2天和第28天测量不同处理组的心脏功能。结果显示,当Lin28或Pkm2以CM特异性方式(+L7Ae miR1+miR208)传递时,Lin28或Pkm2处理组的心脏功能改善具有协同效应。n=3只小鼠,\*\*\*,P<0.001,双尾学生t检验。

[0050] 公开的详细描述

[0051] 本文引用的所有专利、公开的申请和其他参考文献通过引用并入本申请。除非另有说明,否则用于开发本发明的方法是本领域技术人员公知的。

[0052] 在下面的描述中,关于术语的使用将遵循某些约定。通常,本文使用的术语旨在与本领域技术人员已知的这些术语的含义一致地解释。提供一些定义纯粹是为了方便读者。

[0053] 术语“miRNA的识别元件”或“miRNA识别元件”是指基于单链RNA的寡核苷酸,其设

计为结合内源miRNA并且当引入细胞时,其抑制含有识别元件的构建体的表达。

[0054] 术语“miRNA”是指与mRNA互补的序列,其参与RNA的切割或翻译的抑制。内源成熟miRNA作为RNA诱导的复合物的一部分起作用,其具有转录后调控mRNA的能力,所述mRNA具有与结合的miRNA部分互补的序列。通过抗miRNA序列与miRNA序列的杂交,通过阻止miRNA序列与靶标的选择性结合中和miRNA序列的功能。

[0055] 术语“modRNA”是指可用于表达感兴趣基因的合成修饰的RNA。在modRNA中进行的化学修饰(例如用假尿苷取代尿苷)稳定分子并增强转录。另外,与向细胞直接传递蛋白试剂可激活免疫系统不同,可以实现不影响免疫的modRNA的传递。modRNA用于体内和体外表达的用途更详细地描述于例如WO2012/138453中。

[0056] 术语“无活性的人CD25”(ihCD25)是指截短的白细胞介素-2受体,其仅具有细胞外结构域并且不能向细胞发出信号。其他物种,例如无活性的小鼠CD25也可用于本公开的方法中。

[0057] 本公开涉及用于实现细胞特异性表达编码感兴趣基因(GOI)的modRNA的方法,所述感兴趣基因在感兴趣细胞中是期望的。在一个方面,本公开描述了用于细胞特异性转录的表达调控系统,该系统包含具有5'非翻译区(UTR)和3'UTR的第一核酸和具有5'UTR和3'UTR的第二核酸,其中所述第一核酸编码(1)其3'UTR上游的细胞特异性microRNA(miR)识别元件,和(2)翻译抑制蛋白;所述第二核酸编码(1)其5'UTR下游的抑制蛋白相互作用基序,例如K-基序,其结合翻译抑制蛋白,和(2)编码感兴趣蛋白的基因。

[0058] 目前用于MI的治疗解决了肌细胞损失的后果,但是在增强失去心肌的心肌修复方面无效(3,5)。最近,证明了有一天成年哺乳动物心脏细胞(小鼠)可以通过CM增殖自身再生心脏(7)。检查了再生阶段和非再生阶段之间的遗传差异,发现这些阶段之间最差异表达的基因属于有丝分裂和细胞周期类别(7)。

[0059] 修饰的mRNA(modRNA)已经成为体细胞基因转移的有效且安全的工具,并且已经被我们和其他人成功用于向心脏的基因传递<sup>10,12-15</sup>。本文中我们表明丙酮酸激酶肌肉同工酶M2(Pkm2)是一种促增殖因子,在癌症中通常失调<sup>16,17</sup>,其在再生胎儿和早期新生儿CM中高表达,但在成年CM中则不高。MI后使用本公开的仅仅向成年CM传递的modRNA(<sub>cms</sub>Pkm2)恢复Pkm2水平,显著且仅仅诱导CM增殖并且与改善的心脏功能、减少的瘢痕大小、增加的心脏与体重比、减小的CM大小、减少的细胞凋亡和增加的毛细血管密度相关。这些再生过程转化为MI后增加的长期存活。使用谱系追踪和分离Pkm2转染的CM,然后进行MI后的基因表达分析,我们表明Pkm2转染的CM集落数量的增加和Pkm2的促增殖细胞质(通过戊糖磷酸途径(PPP)<sup>18,19</sup>)和核(通过 $\beta$ -联蛋白和Hif1 $\alpha$ 的反式激活<sup>20,21</sup>)功能的关键下游效应物的可能参与。我们的结果表明,使用高度可翻译的临床适应性平台,促增殖基因的短脉冲足以诱导CM增殖和心脏再生。这些发现强调了<sub>cms</sub>Pkm2modRNA在心脏病中的治疗潜力。

[0060] CM增殖的再激活一直是心脏再生策略中的关键因素。斑马鱼和蝾螈心脏再生主要由CM增殖介导<sup>3,5,7,8</sup>。在哺乳动物胎儿发育中,CM增殖是心脏生长和再生的独特途径<sup>9,22</sup>。已经表明,损伤后成年CM上调胎儿基因的一个子集,这表明成年CM没有终末分化并具有一定程度的细胞可塑性<sup>4,9</sup>。成年哺乳动物CM可以在体外和体内分裂,并且可以通过上调促增殖基因刺激这种能力<sup>9,22-33</sup>。多年来,一些出版物通过蛋白<sup>23,24,26,30,34</sup>、病毒<sup>26,30,31,35</sup>或促增殖基因的转基因小鼠模型<sup>25,28,33</sup>,已经表明再激活成年CM细胞周期的再进入是可能的。由于半

衰期非常短、局部施用困难、缺乏CM特异性和不能传递细胞内基因(如转录因子),用于细胞周期诱导目的蛋白施用具有挑战性。心脏特异性腺相关病毒( $CMS$ -AAV)载体不具有免疫原性并且用于许多心脏研究中,但具有非常长且持续的表达时间,这可能导致增加的不受控制的CM大小和心脏肥大和心律失常。尽管转基因小鼠可以以CM特异性和瞬时方式使用,但它们与基因传递无临床相关性。当前方法的挑战突出了对有效基因传递方法的需求,该方法可以瞬时、有效和受控的方式安全地且局部地将细胞周期诱导物基因传递至CM。丙酮酸激酶肌肉同工酶M2(Pkm2)是细胞周期诱导物。在发育期间,Pkm2在许多成年组织中表达,包括脾和肺,然而在成年期Pkm2在具有高合成代谢活性的增殖细胞中严格表达<sup>16,17</sup>。Pkm2被发现增加成年细胞和癌细胞增殖、血管生成和预防由氧化应激引起的细胞凋亡<sup>18,20,36-42</sup>。Pkm2通过其两个不同的功能发挥其功能:在细胞质中,Pkm2通过减少磷酸烯醇丙酮酸向丙酮酸的转化将代谢命运从糖酵解转变为戊糖磷酸途径(PPP)<sup>18,19</sup>。这导致半乳糖(糖酵解中间体)的积累,以及通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6pd)激活PPP<sup>43-45</sup>。PPP途径激活导致核苷酸、氨基酸和脂质的合成以及还原NADPH的产生,增加一氧化氮合酶和DNA修复<sup>38,39,41,46-48</sup>。此外,Pkm2在细胞核中也有作用。Pkm2直接与转录因子 $\beta$ -联蛋白和Hif1 $\alpha$ 相互作用。这种相互作用促进基因(如Ccdn1、c-Myc和Vegfa以及Bcl2)的表达<sup>20,21</sup>见图5(S1)中增殖性或癌细胞中Pkm2作用的总结。

[0061] 一些研究表明细胞周期诱导物基因可以诱导CM增殖(8-22)。然而,在CM中长时间激活这些基因可能导致CM肥大,并且在某些情况下导致肥厚性心肌病和HF(14)。此外,细胞周期诱导物基因的全身传递可导致心脏和整个身体中非CM细胞的不受控制的细胞生长,并且可引起安全性问题。

[0062] 在心脏发育期间心脏中不同细胞周期诱导物基因的差异表达发生变化。其他人和我们关注出生后的两个不同时间点(第1天和第10天),因为它们代表了心脏通过CM增殖具有再生能力(第1天)和缺乏这种能力(第10天)的发育阶段。如从图1a中可以看出,几个细胞周期诱导物在两个发育阶段之间显著变化。然而,在胎儿发育期间小鼠心脏中的Pkm2水平很高<sup>49</sup>,并且在出生后第10天非常显著地降低。由于Pkm2最显著的是在几个细胞周期诱导物的上游,他的变化是Pkm2和CM标记物 $\alpha$ -辅肌动蛋白的共免疫染色显示在发育期间和出生一天Pkm2在CM中高表达,然而,在出生后8周无法检测到其表达(图1b&c)。MI后心脏中的Pkm2表达局限于免疫细胞(CD45+)和非CM,但在CM中没有上调(补充图2a&b)。我们通过将Pkm2modRNA直接注射到心肌中来恢复Pkm2水平(图1c)。心肌注射后Pkm2水平的药代动力学研究表明Pkm2蛋白表达发生在注射后几小时,持续至少8天,但不超过12天(图1d)。为了测试Pkm2表达对CM增殖的作用,我们分离了4日龄新生大鼠CM并用Luc对照或Pkm2modRNA转染它们(补充图3a&b)。转染后12小时翻译Pkm2modRNA,并且水平保持长达转染后10天(补充图3c)。转染Pkm2或Luc modRNA后3天,Pkm2转染的CM的增殖显著增加(补充图3d&e)。为了在MI环境中测试Pkm2作用,我们在LAD结扎后立即将Pkm2或Luc modRNA直接注入心肌13-15。MI和注射后一周,Pkm2显著诱导CM和非CM的增殖(图1e-h)。我们假设观察到的增殖能力的改善可以转化为更好的再生,并导致MI后的改善结果。然而,诱导心脏中非CM增殖经常导致不希望的效果,主要是由促进纤维化和免疫应答引起。因此,我们开发了一种独特的CM特异性modRNA(cmsmodRNA)系统,该系统基于两种不同的modRNA(图2和补充图4&5)。第一构建体含有L7AE,一种古细菌核糖体蛋白,其调控含有扭结-转角基序(K-motif)的基因的翻译,该

扭结-转角基序是L7AE的特异性结合位点50, 51。当两者共转染到细胞中时, L7AE modRNA的翻译抑制设计的感兴趣modRNA的基因的翻译。通过向L7AE基因3' UTR添加CM特异性microRNA (cmsmiR) 识别元件, 我们能够阻止大量且主要仅表达那些miR的CM中的L7AE翻译, 从而允许严格在CM中翻译感兴趣modRNA的基因 (补充图4)。据报道, miR1-1 (miR-1)、miR-208a (miR-208) 和miR-199a (miR-199) 主要在CM中表达52-54。通过生成无活性的人CD25 (ihCD25) (仅含有hCD25的细胞外结构域的截短基因) 作为报告基因 (当在细胞/组织表面上表达时其可被免疫染色), 我们在我们的模型中测试了那些miR的表达。我们设计了两种版本的ihCD25构建体, 含有或没有miR-1、miR-208或miR-199的识别元件。将modRNA转染到新生儿CM中 (补充图5a-f), 或使用MI模型注射 (图2ga-c和补充图5g&h)。发现miR-1和miR-208是CM特异性的, 如非CM中的阳性ihCD25染色、但CM中没有所示。我们设计了包含miR-1和miR-208识别元件 (miR-1-208) 的L7AE modRNA (图2d-k), 并使用核GFP modRNA (nGFP-K) 和含有K基序的Cre重组酶 (Cre-K) modRNA。在我们的MI模型中, nGFP-K的转染导致nGFP在CM和非CM中翻译。然而, 当nGFP-K与miR-1-208共转染时, nGFP仅在CM中翻译 (图2e&f)。在我们的MI模型中使用Rosa26报告小鼠 (Rosa26mTmG) 共转染Cre-K与miR-1-208导致严格地在CM中表达GFP (图2g)。单独注射Cre-K导致左心室 (CM和非CM) 中每~2600细胞的心脏切片的~24.8%的转染效率。然而, Cre-K+miR1-208组合导致仅仅CM的每~800个细胞的7.7%的转染效率 (图2h)。我们还显示非哺乳动物蛋白L7AE不加剧MI后的免疫应答 (补充图6)。我们假设这是由于MI后立即心脏中已经存在的主动免疫应答。我们得出结论, 即, 在小鼠模型中使用L7AE是免疫学上安全的。为了在我们的MI模型中测试我们的cmsmodRNA传递平台的功能, 我们直接注射Luc-K、miR1-208、Luc K+miR1-208、Pkm2-K、Pkm2+miR1-208或Pkm2-K+miR1-208 (cmsPkm2)。转染后7天, 我们测量了心脏中的增殖率 (图2i)。与Luc modRNA相比, 单独的Pkm2-K modRNA或Pkm2+miR1-208显著增加CM和非CM的增殖 ( $P < 0.001$ ) (图2j&k)。然而, cmsPkm2modRNA显著再激活了仅CM的增殖 ( $P < 0.001$ ), 对非CM的增殖没有显著影响。使用新生大鼠CM实时成像24小时, 我们发现与单独使用cmsnGFP modRNA转染相比, cmsPkm2modRNA与cmsnGFP modRNA的共转染增加了CM增殖 (补充录像1)。另外, cmsPkm2modRNA在MI后2或7天显著减少细胞凋亡并增加心肌中的毛细血管密度 (补充图7a-e)。MRI或超声显示从MI后第2天 (基线) 到第28天的cmsPkm2显著增加射血分数百分比 (图3a-d和补充录像2和3) 以及分数短缩百分比的delta (图3d)。与MI后28天的对照相比, cmsPkm2小鼠的左心室内径收缩末期增加, 而左心室内径舒张末期显著增加 (补充图7f-h)。MI后28天, Pkm2或cmsPkm2的表达显著减少心脏瘢痕形成。此外, 注射cmsPkm2后未观察到心脏组织异常 (例如血管瘤、水肿) (图3e&f), 心脏重量与体重比显著增加 (图3g), 而CM大小显著降低, 表明CM增殖 (图3h和补充图7i), 并且与对照相比, Pkm2或cmsPkm2modRNA转染中毛细血管密度显著增加 (图3i)。最后, cmsPkm2显著增加心脏中的CM数量而不增加每个CM的细胞核数量, 同时与对照相比增加单核细胞分数 (图3j-m)。重要的是, 在MI后立即使用cmsLuc或cmsPkm2modRNA治疗的小鼠的长期存活曲线显示MI和cmsPkm2转染后小鼠存活的显著改善 (图3n)。为了理解cmsPkm2改善MI后心脏功能的机制, 我们使用组合cmsmodRNA和R26mTmG的谱系追踪模型 (图4a-j) 以仅仅在CM中表达Pkm2/Luc (通过混合cmsPkm2/cmsLuc+cmsCre modRNA; GFP标记的CM, 图4a&b), 并且在cmsmodRNA不再表达后随时间追踪转染的CM的命运和性质。与对照相比, 转染cmsPkm2+Cre modRNA的CM的数量在MI后3天更高并且在MI后28天显著更高 (图4c&d)。与对

照相比,用cmsPkm2+Cre modRNA处理的小鼠中心心脏重量与体重比显著增加(图4e),而GFP+CM大小(图4f)和核数/细胞(图4g)显著降低。重要的是,在用cmsPkm2+Cre modRNA处理后28天,GFP+CM显示在Pkm2未表达后很长时间增殖标记物如pH3和Ki67的表达升高(图4h-j)。在注射后2天测量cmsPkm2或cmsLuc与cms ihCD25modRNA一起在MI环境中传递后基因表达的变化。针对CM标记物富集分离的细胞,其中肌钙蛋白T的表达显著降低(图4k)。表达Pkm2的细胞显著上调其细胞质(G6pd)和核(c-Myc、细胞周期蛋白D1、Bcl2、VEGF-A和Pdk1)功能下游的效应物(图4l)。与增加的增殖一致,我们观察到与Luc+ihCD25+CM比较,Pkm2+ihCD25+CM中细胞周期促进基因(Cdc20、Cdk1和Ccn2、Ccnb1)上调,以及细胞周期抑制基因(p21和p27)下调(图4m)。

[0063] 出生后Pkm2的快速下调(与心脏再生能力的丧失一致)<sup>55</sup>,表明其参与胎儿和新生儿心脏再生。此外,先前描述的其在癌症中促增殖和促生存作用使其成为促进心脏功能/再生的理想候选者。我们发现<sub>cms</sub>Pkm2最有可能通过改善心脏功能来改善MI后的结果,这一发现具有生理和临床意义,因为它们突出了MI后立即表达<sub>cms</sub>Pkm2的潜在治疗价值。我们的结果与最近的出版物一致,该出版物显示合成miR的短的表达足以诱导CM增殖和心脏再生<sup>56</sup>。此外,我们的modRNA的心脏特异性及其短的表达时间使其成为心脏再生的安全和可翻译的策略。我们的数据指出Pkm2的高效能及其诱导代谢重编程的能力,这更好地支持了具有长期有益效果、在蛋白不再表达后持续数周的CM稳态。我们的实验方法和工具将允许我们进一步研究其他相关的促增殖和代谢重编程基因及其在不同疾病模型中的治疗潜力,并有效和精确地研究CM细胞的命运。值得注意的是,我们使用<sub>cms</sub> ihCD25(补充图8)的分离方法克服了成年转染的CM的FACS分选挑战<sup>31</sup>。这一研究开创性地使用<sub>cms</sub> modRNA来操纵细胞行为,并对心脏病具有巨大治疗潜力,因为modRNA是用于基因转移的安全、瞬时、局部和非免疫原性平台。

[0064] 心脏基因治疗的领域正在扩大,但其在临床环境中的使用受到限制。目前,最广泛使用的将基因表达靶向心脏的方法是通过病毒载体,特别是腺相关病毒(AAV)载体(1-3)。在过去的几十年中,使用腺病毒、相关腺病毒(AAV)、慢病毒和DNA质粒进行了几次尝试以将感兴趣基因插入CM中。AAV和腺病毒都具有高的CM转染水平,而慢病毒和DNA质粒CM的转染效率低。腺病毒可以引起强烈的免疫应答,只剩下AAV作为向心脏基因传递系统的合适选择。在AAV中使用CM特异性启动子可以允许细胞周期诱导物基因严格在CM中表达,然而其在心脏中的药代动力学(从第4天开始表达并且保持至少11个月)可能导致不受控制的生长和肥厚性心肌病和HF(3,5)。此外,超过60%的健康人类个体具有针对AAV衣壳的中和抗体,其可有效中和通过该方法传递的基因表达(21)。病毒基因治疗显示出前景,但由于其长(时间)表达和不能以可定量的剂量方式调控基因表达,其应用受到限制(1-3)。

[0065] 由于基因组整合的风险降低、可能比质粒DNA更安全,使用未修饰的外源RNA作为基因传递方法是有吸引力的,但是,由于其在细胞外的不稳定性和转染细胞时其引发的强烈的先天免疫应答,其是无效的(10,11)。

[0066] Kariko等人发现用假尿苷和5-甲基胞苷分别取代尿苷和胞苷,大大降低了外源RNA引起的免疫应答(11,12)。为了提高稳定性和翻译效率,在RNA分子的5'末端取代3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G抗反向帽类似物(ARCA)帽(4,5,10)。因此,修饰的mRNA(modRNA)提供了一种新的且有效的基因传递方法,其提供短期(1-2周)、可滴定的基因表达,用于体外或

体内应用(4-9)。

[0067] 修饰的mRNA(modRNA)已经成为体细胞基因转移的有效且安全的工具,并且已被我们和其他人成功地用于将基因传递至心脏<sup>10,12-15</sup>。文中我们表明丙酮酸激酶肌肉同工酶M2(Pkm2)(一种在癌症中经常失调的促增殖因子<sup>16,17</sup>),在再生胎儿和早期新生儿CM中高表达,但在成年CM中则不。在MI后使用仅向成年CM的modRNA传递恢复Pkm2水平( $c_{ms}$ Pkm2)显著且仅仅诱导CM增殖,并且与改善的心脏功能、减少的瘢痕大小、增加的心脏与体重比、减少的CM大小、减少的细胞凋亡和增加的毛细血管密度相关。这些再生过程转化为MI后增加的长期存活。使用谱系追踪和分离Pkm2转染的CM,然后进行MI后的基因表达分析,我们表明Pkm2转染的CM集落数量的增加和Pkm2的促增殖细胞质(通过戊糖磷酸途径(PPP)<sup>18,19</sup>)和核(通过 $\beta$ -联蛋白和Hif1 $\alpha$ 的反式激活<sup>20,21</sup>)功能的关键下游效应物的可能参与。我们的结果表明,使用高度可翻译的临床适应性平台,促增殖基因的短脉冲足以诱导CM增殖和心脏再生。这些发现强调了 $c_{ms}$ Pkm2modRNA在心脏病中的治疗潜力。

[0068] 最近已经表明(1)通过使用修饰的mRNA(modRNA)技术,modRNA可以在心脏中以高转染水平驱动瞬时、安全的基因表达,而不引起免疫应答或损害基因组(5,22)。通过细胞膜进入细胞的外源未修饰mRNA被内体Toll-样受体7/8和3识别(23,24)。该过程抑制蛋白翻译并激活先天免疫应答,最终导致宿主细胞的细胞凋亡。通过用天然修饰的核糖核苷酸取代核糖核苷酸来合成ModRNA。这些修饰的核糖核苷酸的使用导致合成mRNA二级结构的改变,这阻止了Toll-样受体识别modRNA并因此允许其通过核糖体机制翻译成功能性蛋白而不引起免疫应答或损害基因组(5,22)。

[0069] 申请人之前表明,modRNA以高效率转染心脏中包括CM的不同细胞类型,导致以瞬时、脉冲样动力学的立即和高水平的蛋白表达(体外持续3-5天和体内持续7-10天)。两个单独的modRNA共转染导致两者的共翻译。使用MI模型(5)和在心肌中传递Luc、LacZ和nGFP modRNA,申请人表明MI后心脏组织用modRNA转染良好,并且在左心室中几种细胞类型如CM和非CM高度转染。申请人随后选择了几种候选细胞周期诱导物基因,这些基因之前已被证明在心脏发育期间具有诱导新生儿CM的能力(CDK2、 $\beta$ 联蛋白)(16)或在转基因小鼠模型中再激活成年CM增殖(细胞周期蛋白D2、cMYC)(12,14),以及其他在不同器官和细胞类型中显示出强大的增殖潜力,但从未在心肌细胞和心脏中进行过测试(Lin28、PKM2)(24,25)。

[0070] 通常,用于制备细胞特异性修饰的mRNA(modRNA)的平台如下。

[0071] 首先,选择感兴趣细胞类型以制备细胞特异性modRNA。鉴定已报道在感兴趣细胞中表达的候选microRNA(miR),优选仅在感兴趣细胞中表达(例如,在心肌细胞的情况下,miR1、miR29、miR126、miR133、miR199、miR208、miR378)。鉴定每个miR序列的反向互补序列,其允许识别对该序列特异的miR。将先前计算的miR反向互补序列中的每一个添加至ihCD25k基序的3'UTR,所述ihCD25k基序为携带k基序的hCD25的截短受体。这允许ihCD25仅在那些缺乏反向互补序列靶向的特异性miR的细胞中表达。

[0072] 同样地用nGFP modRNA和不同的miR-ihCD25modRNA共转染含有感兴趣细胞和其他细胞类型(例如成纤维细胞)的细胞混合物。大约18小时后,固定细胞并针对GFP染色细胞(表示用modRNA转染的细胞)和针对报告基因染色(使用抗hCD25,表示缺乏靶向miR的细胞)和针对细胞特异性标记物染色(例如,针对心肌细胞肌钙蛋白I、针对内皮细胞、Pecam1等)。

[0073] 鉴定对细胞特异性标记物(例如心肌细胞的肌钙蛋白I)也是阳性、但对报告基因

(hCD25) 是阴性的GFP阳性细胞。这意味着尽管modRNA被传递至该细胞类型,但该特异性miR-ihCD25未被翻译。这将表明该miR在感兴趣细胞类型中特异性表达,并且可用于产生细胞特异性modRNA。通过向L7AE的3'UTR添加抑制感兴趣细胞中的ihCD25的序列来产生细胞特异性modRNA。共转染mir-L7AE和在其5'UTR携带k-基序的感兴趣基因。这两种modRNA将允许您特异性地将感兴趣基因传递至特定细胞类型。

[0074] 在一个实施方案中,申请人为上述每种基因设计并产生了modRNA。使用大鼠新生儿CM,申请人测试了每种modRNA的翻译。此外,通过用对照和候选细胞诱导物modRNA测量大鼠新生儿CM的增殖速率,测试了蛋白质的功能性。所有候选细胞周期诱导物modRNA均不同程度地增加新生大鼠CM的增殖和MI后的成年CM增殖。Lin28和PKM2显著增加CM的增殖能力。因此,选择这些基因用于进一步的研究。

[0075] Lin28是已知的Let7抑制剂,其紧密控制细胞周期调控物(25-29)。为了测试Lin28是否诱导细胞周期调控物,在LAD结扎后立即注射nGFP(对照modRNA)或Lin28modRNA,并且使用RT-PCR发现3天后Ccnb1、Ccnb2、Cdc20、Cdk1和Aurka细胞周期基因的表达显著增加。使用细胞周期诱导物modRNA(如Lin28modRNA)以非特异性方式不仅增加CM增殖,而且还增加非CM增殖,代表了实验挑战,因为该模型和假设旨在测试作为实现增加心脏再生的手段的CM增殖。

[0076] 为了解决该挑战,申请人设计了基于两种不同modRNA的CM特异性modRNA系统(图5)。第一构建体是携带L7AE的抑制性modRNA,L7AE是一种古细菌核糖体蛋白,其调控设计的具有扭结-转角基序的感兴趣modRNA的基因的翻译,该扭结-转角基序是L7AE的特异性结合位点(30,31)。当两者共转染到细胞中时,L7AE modRNA的翻译抑制设计的感兴趣modRNA的基因的翻译。通过向L7AE基因添加CM特异性microRNA(miR)识别元件,我们能够阻止大量且主要仅表达miR的CM中的L7AE翻译(“抑制抑制物”方法),以允许严格在CM中翻译感兴趣modRNA的基因。之前显示,使用miR识别元件导致靶向miR的拷贝数减少(32,33)。心脏中miR数量的减少可能对心脏有害或有益(33-42)。在我们的方法中,我们需要确保我们不会减少有益于心脏再生的miR表达,而是减少对心脏再生有害的miR表达。miR1-2(miR1)、miR208a(miR208)和miR199a(miR199)主要在CM中表达(33,39,41)。在成年动物研究和人类中发现MI后miR1和miR208上调(33,38,41,43)。miR1和miR208上调具有有害作用,而其下调对MI后和心脏病有益(32-42)。

[0077] 为了测试这些miR在CM中的表达,我们制备了无活性的人CD25(ihCD25)基因(即仅含有hCD25的细胞外结构域(ECD)的截短基因)作为报告基因。我们设计了两种版本的ihCD25构建体,含有或没有miR-1、miR-208或miR-199的识别元件。然后我们将modRNA体外和体内(使用MI模型)转染到新生儿CM中(图2)。从图6中可以看出,发现miR-1和miR-208都是CM特异性的,因为在非CM中观察到ihCD25的翻译,但在CM中没有观察到。相反,发现具有或不具有miR-199识别元件的modRNA在体外和体内不是CM特异性的。接下来,我们设计了携带miR-1和miR-208识别元件的L7AE modRNA(L7AE miR-1+miR-208)。我们还产生了核GFP modRNA(nGFP-k-motif)和不稳定的Cre重组酶(DD-Cre-k基序)modRNA,其包括k-基序(L7AE识别位点)。使用我们的成年小鼠MI模型,我们表明转染nGFP-k基序导致在CM和非CM中翻译nGFP(图7)。然而,当与L7AE miR-1+miR-208共转染nGFP-k基序时,仅CM翻译nGFP。此外,在使用Rosa26<sup>Tdtomato</sup>的MI模型中共转染L7AE miR-1+miR-208与DD-Cre-k基序导致严格在CM中

的基因激活(番茄荧光)。这两种方法的组合允许我们在CM中巧妙地表达一种或多种我们感兴趣的基因,并且允许在感兴趣modRNA的基因不再表达后较长的时间段内进行谱系追踪。

[0078] 为了测试我们的CM特异性modRNA的功能,我们使用我们的MI模型,直接注射Luc对照modRNA或Lin28-K和PKM2-k基序modRNA单独或与L7AE miR-1+miR-208(Lin28/PKM2CM特异性modRNA)一起。转染后7天,我们测量了CM和非CM的增殖(使用标志性增殖标记物,BrdU、Ki67、H3P和Aurora B)。如图8所示,与Luc modRNA相比,单独的Lin28-k或PKM2-k基序modRNA显著增加CM和非CM的增殖(P<0.001)。然而,Lin28和PKM2CM特异性modRNA仅显著再激活了CM的增殖(P<0.001),对非CM的增殖没有显著影响。重要的是,由于L7AE不是哺乳动物蛋白,为了测试MI后L7AE的免疫原性,我们在成年小鼠MI模型中注射了Luc对照modRNA或具有或不具有miR-1、miR-208或两者的L7AE modRNA。如从图8中可以看出,在MI后7天,我们没有观察到所有L7AE modRNA的显著升高的免疫应答和增加的细胞凋亡。我们得出结论,在小鼠中使用L7AE是免疫学上安全的。

[0079] 质粒

[0080] pTEMPLZ是克隆载体,其中感兴趣的ORF可以插入到UTR之间。在一个实施方案中,用于所公开方法的质粒包括表1中所示的那些质粒。

[0081] 表1

1	<p><b>无miR - L7AE</b></p> <p>TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAG AAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCatgtacgtgagattgaggtcctgaggacatgcagaacg aagctctgagctgctggagaaggttagggagagcggtaaggtaaagaaaggtaccaacgagacgacaaaggctgtg gagaggggactggcaagctcgtttacatcgagaggatgtgacccgctgagatcgttgctcatctgccccctctctgc gaggagaagaatgtccgtacattacgttaaaagcaagaacgacctggaagggctgtggcattgaggtgcatgagc cttcggcagcgataatcaacgagggagagctgagaagggagcttgaagccttggagaagattaaaggccttcaga agtaaGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGC ACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA (SEQ ID NO: 1)</p>
2	<p><b>miR 1 - L7AE</b></p> <p>TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAG AAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCatgtacgtgagattgaggtcctgaggacatgcagaacg aagctctgagctgctggagaaggttagggagagcggtaaggtaaagaaaggtaccaacgagacgacaaaggctgtg gagaggggactggcaagctcgtttacatcgagaggatgtgacccgctgagatcgttgctcatctgccccctctctgc gaggagaagaatgtccgtacattacgttaaaagcaagaacgacctggaagggctgtggcattgaggtgcatgagc cttcggcagcgataatcaacgagggagagctgagaagggagcttgaagccttggagaagattaaaggccttcaga agtaaTACATACTTCTTTACATTCCATACATACTTCTTTACATTCCATACATACTTCTTT ACATTCCATACATACTTCTTTACATTCCAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTG GCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTTGGTCTTTGAATAAAGCCT GAGTAGGAA (SEQ ID NO: 2)</p>

[0082]

[0083]

3	<p><b>miR 208a – L7AE</b></p>
	<p>TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAG                  AAGAGTAAGAAGAAAATAAGAGCCACCatgtacgtgagatttgaggttctgaggacatgcagaacg                  aagctctgagctgctggagaaggttagggagagcggtaaggtaaagaaaggtaccaacgagacgacaagggctgtg                  gagaggggactggcaagctcggttacatcgagaggatgtgacccgctgagatcgtgctcatctgcccctcctgc                  gaggagaagaatgtccgtacatttacgttaaagcaagaacgacctggaagggctgtgggcattgaggtgccatgcg                  cttcggcagcgataatcaacgagggagagctgagaagggagcttggaaagccttgggagaagattaagggccttcaga                  agtaaACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATACAAGCTTTT                  TGCTCGTCTTATACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCC                  TTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAA                  GCCTGAGTAGGAA (SEQ ID NO: 3)</p>
4	<p><b>miR 1 – miR 208a – L7AE</b></p>
	<p>TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAG                  AAGAGTAAGAAGAAAATAAGAGCCACCatgtacgtgagatttgaggttctgaggacatgcagaacg                  aagctctgagctgctggagaaggttagggagagcggtaaggtaaagaaaggtaccaacgagacgacaagggctgtg                  gagaggggactggcaagctcggttacatcgagaggatgtgacccgctgagatcgtgctcatctgcccctcctgc                  gaggagaagaatgtccgtacatttacgttaaagcaagaacgacctggaagggctgtgggcattgaggtgccatgcg                  cttcggcagcgataatcaacgagggagagctgagaagggagcttggaaagccttgggagaagattaagggccttcaga                  agtaaTACATACTTCTTTACATTCCATACATACTTCTTTACATTCCATACATACTTCTTT                  ACATTCCATACATACTTCTTTACATTCCAACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATACAAGCT                  TTTTGGCTCGTCTTATACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATACAAGCTTTTTGCTCGTCTTA                  TGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCC                  TGACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA (SEQ ID NO: 4)</p>
5	<p><b>Lin28 – K 基序</b></p>
	<p>TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGGTGGGCGTGAT                  CCGAAAGGTGACCCGGATCTGGGGCGTGATCCGAAAGGTGACCCGGAAAGCCAC                  Catgggctcgggtgtccaaccagcagtttgaggtggctgcgccaaggcagcggagaagggcagaggaggcggc                  cctgacgcccggcagcggcagacgagccgagctgctgacggggccggcatctgtaagtgttcaacgtgcgcat                  ggggttcggcttctgtatgaccgcccgcgctggggctgcgctcgacccccggggagcttctgtcaccagagcaa                  gctgcacatggaaggggtccgaagcctcaaggagggtagggcggtagttcaccttaagaagtctgccaagggctg                  gaatccatccgtgctactggcctgggtgtgttctgtattggagtgagcggcggccaaaagggagaagaacatgcagaa                  gcgaagatccaaggagacaggtgtacaactgcggtgggtagaccatcatgccaaggaatgcaagctgccacccc                  agccaagaagtgccactttgccaagcatcaaccataggtggcctcgtgctactgaaggcccagcagggcccag                  ttctagggaaagcctgctacttccgggaggaagaggaagagatccacagccctgcccagaagcccaga                  attgaGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGC                  ACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA (SEQ ID NO: 5)</p>
6	<p><b>Pkm2 – K 基序</b></p>

[0084]

	<p>TTGGACCCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGGTGGGCGTGAT          CCGAAAGGTGACCCGGATCTGGGGCGTGATCCGAAAGGTGACCCGGAAAGCCAC          Catgccgaagccacacagtgagcaggactgccttcattcagaccagcagctccatgcagccatggctgacacctt          cctggaacacatgtgccgctggacattgactctgccccatcacggccgcaactggcatcattgtaccattggcctt          gcttcccgatctgtggagatgctgaaggagatgattaagtctggaatgaatgtggctcggctgaatttctctcatggaacca          tgagtaccatgcagagaccatcaagaatgtccgtgaagccacagaagcttgcactctgatcccattctaccgtcctgtt          gcggtggctctggatacaagggacctgagatccggactggactcatcaagggcagcggcaccgctgaggtggagct          gaagaagggagccactctgaagatcacctggacaacgcttcatggagaagtgtgacgagaacatcctgtggctgga          ctacaagaacatctgaaggtggtgagggtggcagcaagatctacgtggacgatgggctcatctactgcaggtgag          gagaagggcgtgacttctggtgacggaggtggagaatggtgctcctgggagcaagaagggcgtgaacctgccc          ggcgctgtgtggatctcccgtgtgtcggaaaaggacatccaggacctgaagttggggtggagcaggatgtggacat          ggtggttgcactttcatcgcgaagcagccgacgtgcatgaagttaggaaggtgctgggagagaagggcaagaacatc          aagatcatcagcaaaatcgagaacctgaagggcgtccgaggtttgatgagatctggagccagtgatgggatcatgg          tggctcgtggtgacctgggcatgagattcctgcagagaaggtcttctggctcagaagatgatgatcgggcatgcaacc          gagctgggaagcctgtcatctgtgccacacagatgctggagagcatgatcaagaagccacgccccaccgtgctgaag          gcagtgatgtggcaatgcagtcctggatggagcagactgcacatgctgtctggagaacagccaagggggactacc          cctgagggctgttcgatgcagcaccctgattgcccgagaggcagaggctgccatctaccacttgagctattcgaggaa          ctccgccgctggcggccattaccagcagccccacagaagctgccgctgggtgcccgtggaggcctcctcaagtgtc          gcagtggggcccattatcgtgctaccaagtctggcaggagtctaccaagtgccaggtaccgccctcgggctcctatc          attgccgtgactcgaatcccagactgctcggcaggccatctgtaccgtggcatcttccctgtgctgtgaaggatgccgt          gctgaatgcctgggctgaggatgtcgacctctgttaaactggccatggatgttggcaagcccaggtcctcaagaa          gggagatgtgtcattgtgtgaccgggtggcggcctggctctggattaccaacaccatgctgtagtgcctgtacctga          GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCT          GTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA (SEQ ID NO: 6)</p>
7	<p><b>nucGFP – K 基序</b></p>
	<p>TTGGACCCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGGTGGGCGTGAT          CCGAAAGGTGACCCGGATCTGGGGCGTGATCCGAAAGGTGACCCGGAAAGCCAC          Catggtgagcaagggcgaggagctgttaccgggggtggtgccatcctggtcagctggacggcgacgtaaacggcc          acaagttcagcgtgtccgcgaggggcgagggcagatccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccg          gcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgagtgctttagccgctaccccacca          catgaagcagcagacttctcaagtccgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgac          ggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgaggcgacaccctggtgaaccgcatcagctgaagggcatcg          acttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacacgtctatatcatggccg          acaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccga          ccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccacaccactacctgagcaccagctccg          ccctgagcaaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgcccggatcactctc          gcatggacgagctgtacaagggagatcaaaaaagaagagaaggttaggcgatcaaaaaagaagagaaaggtga          ggtgatcaaaaaagaagagaaaggtataaGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATG          CCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG          GAA (SEQ ID NO: 7)</p>
8	<p><b>ihCD25 K 基序-未修饰的</b></p>

[0085]

```

TTGGACCCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGGTGGGCGTGAT
CCGAAAGGTGACCCGGATCTGGGGCGTGATCCGAAAGGTGACCCGGAAAGCCAC
Catggattacacctgctgatgtggggactgctcagttcatcatggtgcctggctgccaggcagagctctgtgacg atgac
ccgccagagatcccacacgccacattcaagccatggcctacaaggagggaaccatggtgaactgtgaatgcaagag
aggtttccgcagaataaaaagcgggtcactctatagctctgtacaggaaactctagccactcgtcctgggacaaccaatg
tcaatgcacaagctctgccactcgggaacacaacgaacaagtacacactcaacctgaagaacagaagaaaggaa
aaccacagaaatgcaaagccaatgcagccagtggaaccaagcagcctccaggtcactgcagggaaacctccacat
gggaaaatgaagccacagagagaatttatcattcgtggtggggcagatggtttattatcagtgctccagggatacaggg
ctctacacagaggtcctgctgagagcgtctgcaaatgaccacgggaagacaagggtggaccagcccagctcatat
gcacaggtgaaatggagaccagtcagttccaggtgaagagaagcctcaggaagccccgaaggccgtcctgagagt
gagacttctgcctctgcacaacaacagatttcaaatacagacagaaatggctgcaaccatggagacgtccatattaca
acagatctccaggtagcagtgccggctgtgtttcctgctgatcagcgtcctcctctgagtggtcctcctggcagcggg
gacagaggaagagtagaagaacaatctagGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATG
CCTTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG
GAA (SEQ ID NO: 8)

```

[0086] ↑ SEQ ID NO:

[0087] 5' UTR

[0088] 开放阅读框 (ORF)

[0089] 3' UTR

[0090] 基于ihCD25 modRNA的CM特异性细胞分选

[0091] 为了测试使用创新的基于无活性(仅细胞外结构域)人CD25(ihCD25)的分选(磁珠)系统,我们的新型CM特异性基于modRNA的设计(其允许仅在CM中瞬时基因表达我们感兴趣的基因)是否可以用于仅分离转染的CM,我们在MI后在心脏中注射nGFP k-基序与ihCD25k-基序modRNA,分离细胞并用CD25特异性磁珠分选。观察到nGFP阳性的CM和非CM。当nGFP k-基序、ihCD25k-基序与L7AE miR1-miR208共转染且没有磁分离时,观察到CM特异性nGFP表达。该培养物还含有nGFP阴性CM和非CM。当应用磁分离时,仅观察到纯的nGFP阳性CM(图9)。

[0092] 在一个实施方案中,外源基因的产生由来自第一复制子的抗miR的表达驱动,所述第一复制子也编码阻遏蛋白。表达的抗miR结合在人和灵长动物心肌细胞中天然存在的miR,并阻止阻遏蛋白的转录。在不存在阻遏蛋白的情况下,可以进行来自第二复制子的感兴趣基因的表达,所述第二复制子编码基因并含有阻遏蛋白识别位点。

[0093] 细胞周期诱导物基因

[0094] 通过将基因的转录/翻译置于转录/翻译调控系统的控制下,可以使感兴趣基因(例如,增殖诱导基因)的表达成为心肌细胞特异性的,在所述转录/翻译调控系统中一对核酸中的一个核酸编码特异性结合靶心肌细胞特异性miR的抗microRNA(抗miR)。第二核酸翻译抑制蛋白并且第二核酸包含结合翻译抑制蛋白的抑制蛋白相互作用基序和编码感兴趣蛋白的基因。

[0095] 使用本文所述的方法,表达是瞬时的,避免了与无限制表达相关的问题,例如肥大。

[0096] 结合在mRNA的5'-非翻译区内插入的特定RNA基序的阻遏/抑制蛋白调节信息在哺乳动物细胞中的翻译。通过在阻遏/抑制寡核苷酸中包含编码对小鼠、猪、人和非人灵长动物心肌细胞中发现的内源miRNA特异的识别元件的序列,实现对人和灵长动物心肌细胞的表达特异性。

[0097] 用于体内使用的modRNA的合成包括四个阶段:含有所需转录本的DNA模板产生、体外转录 (IVT)、用Antarctic磷酸酶去除5'磷酸盐和用5M醋酸铵盐沉淀。针对实验和临床目的的modRNA使用的研究正在迅速增加。用编码重编程因子OCT4、SOX2、MYC和KLF4的modRNA的每日转染成功地将人成纤维细胞重编程为多能性 (5, 8)。此外,通过使用导致成纤维细胞转化为骨骼肌细胞的MyoD modRNA,已表明modRNA能够在体外指导细胞命运 (2)。ModRNA也显示出在体内指导细胞命运方面的前景。modRNA技术在体内的扩大应用及其在心脏基因治疗领域的潜在用途促使我们产生逐步的、合理化方案,用于有效合成体内使用的modRNA。

[0098] 心肌细胞

[0099] 在一个实施方案中,本公开涉及在受试者中治疗心肌梗塞 (MI) 或心力衰竭 (HF) 后的受试者的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的包含至少两种合成的modRNA的组合物。

[0100] 蛋白质表达持续5至20天,在一些实施方案中持续7至14天,并且与未修饰的RNA相比导致低的免疫应答。

[0101] 尤其是,本公开描述了一组新的候选细胞周期诱导物基因:Lin28、Pkm2和细胞周期蛋白D2,当作为modRNA传递时,其可以再激活哺乳动物心肌细胞 (CM) 在体内增殖 (不增加CM大小或细胞核数量)、减少CM的细胞凋亡和增加心肌梗塞 (MI) 后的整体左心室血管化。当将细胞周期诱导物基因的表达置于心肌细胞特异性转录 (表达) 的转录/翻译调控 (表达调控) 系统的控制下时,结果是用于心肌细胞特异性表达的细胞周期诱导物基因驱动的损伤后增殖的工具,所述损伤例如,由心肌梗塞 (MI) 或心力衰竭 (HF) 导致。

[0102] 修饰的mRNA (modRNA) 是安全、有效、瞬时和非免疫原性的基因传递系统,其允许人们研究细胞周期诱导物基因对MI或HF后的CM的影响。Kariko等人发现用假尿苷和5-甲基胞苷分别取代尿苷和胞苷,大大降低了外源RNA引起的免疫应答 (11, 12)。对该机制的研究表明,核苷取代导致RNA构象变化,导致Toll-样受体3、7和8 (TLR3、TLR7、TLR8) 和视黄酸诱导基因1 (RIG-1) 的反应降低 (13)。去除5'三磷酸后,观察到来自modRNA的RIG-1反应进一步降低 (4, 10)。为了提高稳定性和翻译效率,在RNA分子的5'末端取代3'-O-Me-m7G (5') ppp (5') G抗反向帽类似物 (ARCA) 帽 (4, 5, 10)。

[0103] 通过抗hCD25亲和力选择细胞

[0104] 由于细胞的大小,通过传统的FACS细胞分选对心肌细胞的细胞选择可能是有问题的。设计了另一种细胞选择的方法。在一个实施方案中,使用本公开的转录调控系统,编码hCD25细胞外结构域 (ECD) 的核酸包含在含有编码感兴趣基因的核酸的构建体中。为了分离瞬时表达对照或候选基因modRNA的CM,在亲和色谱柱中使用抗CD25ECD抗体或使用淘选方法选择共表达hCD25ECD和感兴趣基因的细胞。这些细胞用于使用RNA-seq技术产生基因表达谱,并鉴定差异表达的基因。

## 实施例

[0105] 实施例1:材料

[0106] 以下材料与所公开的方法结合使用。

[0107] 除非另有说明,否则所有溶液均应在无核酸酶的水中制备。本方案中使用的所有材料均应无核酸酶。

[0108] 使用的设备包括以下内容:

- [0109] 1. PCR热循环仪
- [0110] 2. 微离心机
- [0111] 3. 涡旋混合器
- [0112] 4. 恒温混合器 (EPPENDORF™)
- [0113] 5. Nano-Drop
- [0114] 6. 不含核酸酶的水
- [0115] 7. 15ml无核酸酶锥形管
- [0116] 8. 无核酸酶的条带PCR管
- [0117] 9. 乙醇(100%和70%)
- [0118] 10. 2ml Ambion洗脱管

[0119] 用于有尾的PCR的引物如下:

[0120] 正向引物:

5'-TTG GAC CCT CGT ACA GAA GCT AAT ACG-3' (SEQ ID NO: 9)

[0121] 反向引物:

5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TCT TCC TAC TCA GGC TTT ATT CAA AGA  
CCA-3' (SEQ ID NO: 10)

[0122] 使用pTEMPLZ质粒用于体外转录的DNA模板如下构建:

- [0123] 1. T4多核苷酸激酶
- [0124] 2. 100mM ATP
- [0125] 3. 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR主混合物
- [0126] 4. AleI酶
- [0127] 5. AfeI酶
- [0128] 6. Antarctic磷酸酶
- [0129] 7. T4 DNA连接酶
- [0130] 8. One **Shot**® ccdB Survival™2 T1噬菌体抗性 (T1R) 细胞
- [0131] 9. **QIAquick**® 凝胶提取试剂盒
- [0132] 10. **QIAquick**® PCR纯化试剂盒
- [0133] 11. 一次性化学感受态大肠杆菌
- [0134] 12. **QIAprep**® spin Miniprep试剂盒
- [0135] 13. 10x磷酸化缓冲液
- [0136] 用于IVT反应的具有聚T尾的线性DNA模板的合成
- [0137] 1. 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR主混合物
- [0138] 2. 引物溶液: 正向和反向引物各1μM

- [0139] 3. DpnI酶
- [0140] 4. **QIAquick**<sup>®</sup> PCR纯化试剂盒
- [0141] 体外转录反应
- [0142] 1. Ambion T7 **Megascript**<sup>®</sup> 试剂盒 (life technologies Cat#: am1334-5)
- [0143] 2. GTP 75mM溶液 (**Megascript**<sup>®</sup> 试剂盒中提供)
- [0144] 3. ATP 75mM溶液 (**Megascript**<sup>®</sup> 试剂盒中提供)
- [0145] 4. CTP 75mM溶液 (**Megascript**<sup>®</sup> 试剂盒中提供)
- [0146] 5. 5-甲基假尿苷-5'-三磷酸 (Trilink)
- [0147] 6. Trilink Biotechnologies 抗反向帽类似物, 3'-O-Me-m<sup>7</sup>G (5') ppp (5') G 10μ moles (Cat#: N-7003)
- [0148] 7. T7 TURBO DNase酶 (**Megascript**<sup>®</sup> 试剂盒中提供)
- [0149] 8. Ambion MEGAclean<sup>™</sup> Transcription Clean-Up 试剂盒 (life technologies; cat#: AM1908)。
- [0150] RNA磷酸酶处理
- [0151] 1. Antarctic磷酸酶
- [0152] RNA沉淀
- [0153] 1. 5M醋酸铵盐溶液 (Ambion MEGAclean<sup>™</sup> 试剂盒中提供)
- [0154] 2. 洗脱缓冲液 (Ambion MEGAclean<sup>™</sup> 试剂盒中提供)
- [0155] modRNA注射的准备
- [0156] 1. **Lipofectamine**<sup>®</sup> RNAiMAX 转染试剂 (ThermoFisher Cat#: 137781500)
- [0157] 2. OptiMEM 简化血清培养基, 无酚红
- [0158] 3. 超细胰岛素注射器针头 31g 8mm
- [0159] 方法
- [0160] 以下方法与所公开的方法结合使用。除非另有说明, 所有步骤均在室温下、在非无菌环境中进行。使用的所有材料都应该不含核酸酶。
- [0161] modRNA的合成
- [0162] 如前所述, 使用抗反向帽类似物 3'-O-Me-m<sup>7</sup>G (5') ppp (5') G (6mM, TriLink Biotechnologies)、三磷酸鸟苷 (1.5mM, Life Technology)、三磷酸腺苷 (7.5mM, Life Technology)、三磷酸胞苷 (7.5mM, Life Technology) 和 N1-甲基假尿苷-5'-三磷酸 (7.5mM, TriLink Biotechnologies) 的定制核糖核苷酸混合物, 从质粒模板体外转录 modRNA<sup>48-50</sup>。使用 megaclear 试剂盒 (Life Technology) 纯化 mRNA, 并用 antarctic 磷酸酶 (New England Biolabs) 处理, 然后使用 Megaclear 试剂盒再纯化。通过 Nanodrop (Thermo Scientific) 定量 mRNA, 用乙醇和醋酸铵沉淀, 并重悬于 10mM TrisHCl、1mM EDTA 中。有关详细方案, 请参阅我们最近的出版物<sup>48</sup>。
- [0163] modRNA 转染。使用含有 20μl 蔗糖的无核酸酶水 (0.3g/ml)、20μl 柠檬酸盐 (0.1M pH

=7;Sigma)的蔗糖柠檬酸盐缓冲液与20 $\mu$ l不同浓度modRNA的盐水混合,至总体积为60 $\mu$ l,进行modRNA的体内转染。将转染混合物直接注射(3次单独注射,每次20 $\mu$ l)到心肌中。对于体外转染,我们使用制造商推荐使用的RNAiMAX转染试剂(Life Technologies)。

[0164] 用携带k基序的pTEMPLZ质粒构建用于体外转录的DNA模板。

[0165] pTEMPLZ是克隆载体,其中感兴趣的ORF可以插入到UTR之间(图1)。5'-和3'-UTR由合成的寡核苷酸从头合成。合成的UTR一起退火并使用正向和反向引物扩增。为了提供ORF的进入位点,在5'和3'UTR之间引入A1eI和AfeI限制性位点。(第一密码子(ATG)的腺嘌呤核苷酸(A)可以从正向引物序列中省略,因为其由A1eI位点提供)。用HindIII和NotI消化具有氨基青霉素抗性的PCR扩增片段和pZErO-2载体,并连接在一起生成pTEMPLZ。(pTEMPLZ质粒和衍生物可以在对ccdB基因产物具有抗性的细菌菌株中增殖,如OneShot<sup>®</sup> ccdB Survival<sup>™</sup>2T1噬菌体抗性(T1R)细胞)。

[0166] 在插入至pTEMPLZ之前,通过使用感兴趣基因的磷酸化正向和反向引物对扩增ORF。使用T4多核苷酸激酶根据以下反应进行引物的磷酸化:

	<b>10 x 磷酸化缓冲液</b>	<b>5<math>\mu</math>l</b>
	<b>正向引物 (100 <math>\mu</math> M)</b>	<b>3<math>\mu</math>l</b>
	<b>反向引物 (100 <math>\mu</math> M)</b>	<b>3<math>\mu</math>l</b>
[0167]	<b>100 mM ATP</b>	<b>0.5<math>\mu</math>l</b>
	<b>T4多核苷酸激酶</b>	<b>10U</b>
	<b>无核酸酶水</b>	<b>50<math>\mu</math>l</b>

[0168] 在37 $^{\circ}$ C孵育反应1小时。

[0169] 为了使酶失活,将反应在65 $^{\circ}$ C孵育20分钟。通过加入250 $\mu$ l水将反

[0170] 应稀释至300 $\mu$ l,得到最终1 $\mu$ M的引物混合物。

[0171] 使用下面的PCR反应扩增感兴趣的ORF:

	<b>来自以上的引物混合物(1 <math>\mu</math> M)</b>	<b>10 <math>\mu</math> l</b>
	<b>模板DNA</b>	<b>1-100 ng</b>
[0172]	<b>水</b>	<b>50 <math>\mu</math> l</b>
	<b>HiFi HotStart预拌混合物(2x)</b>	<b>25 <math>\mu</math> l</b>

[0173] 将混合物在热循环仪中运行,其设置如图2所示。使用QIAquick凝胶提取试剂盒分离扩增的靶标。在插入ORF之前,将pTEMPIz线性化和去磷酸化。为了线性化质粒,根据以下反应使用A1eI和AfeI消化pTEMPIz:

- |        |                     |             |
|--------|---------------------|-------------|
|        | <b>pTEMPLZ质粒DNA</b> | <b>2 μg</b> |
|        | <b>无核酸酶的水</b>       | <b>30μl</b> |
| [0174] | <b>10 x缓冲液4</b>     | <b>3 μl</b> |
|        | <i>AleI</i>         | <b>5 U</b>  |
|        | <i>AfeI</i>         | <b>5 U</b>  |
- [0175] 在37°C下在恒温混合器中孵育1小时。使用**QIAquick<sup>®</sup>** PCR纯化试剂盒纯化消化物,并在30μl洗脱缓冲液中洗脱。
- [0176] 根据以下反应将线性化的pTEMPLZ去磷酸化:
- |        |                             |              |
|--------|-----------------------------|--------------|
|        | <b>来自步骤1的线性化质粒</b>          | <b>30 μl</b> |
|        | <b>10 x antarctic磷酸酶缓冲液</b> | <b>5 μl</b>  |
| [0177] | <b>Antarctic磷酸酶</b>         | <b>5 U</b>   |
|        | <b>无核酸酶的水</b>               | <b>50μl</b>  |
- [0178] 将反应在37°C下孵育1小时。通过在65°C孵育15分钟使酶失活。
- [0179] 使用**QIAquick<sup>®</sup>** 凝胶提取试剂盒分离线性化和去磷酸化的质粒,并使用nanodrop测定pTEMPLZ产物的量。质粒可以在-20°C下保存,以备将来使用。
- [0180] 根据以下反应,将感兴趣的ORF平端连接到pTEMPLZ中:
- |        |                          |               |
|--------|--------------------------|---------------|
|        | <b>线性化、去磷酸化的TEMP1z质粒</b> | <b>50ng</b>   |
|        | <b>扩增的ORF</b>            | <b>3倍摩尔过量</b> |
| [0181] | <b>10 x T4 DNA连接酶缓冲液</b> | <b>2 μl</b>   |
|        | <b>T4 DNA连接酶</b>         | <b>4U</b>     |
|        | <b>无核酸酶的水</b>            | <b>20μl</b>   |
- [0182] 混合试剂并孵育过夜在融冰上在室温或16°C下。可能需要阴性对照连接反应来监测质粒的自身连接。
- [0183] 用感受态细胞进行质粒转化,并在氨苄青霉素琼脂平板上生长。
- [0184] 为了分离具有正确定向的阳性克隆,进行菌落PCR。用移液管尖端从氨苄青霉素琼脂平板提取8-10个菌落。将各个尖端刺入200μl Luria肉汤(LB)中,并在pH8.0的75μl TE缓冲液中漂洗数次,将尖端在37°C下在振荡器中孵育。然后将管煮沸5分钟以裂解细菌并旋转成颗粒碎片。使用正向引物和基因特异性反向引物、用2μl上清液进行菌落PCR。PCR样品在1%琼脂糖凝胶上电泳以鉴定具有阳性定向的克隆。将具有正确定向克隆的200μl LB在较大体积的LB中在37°C振荡器中过夜培养,并使用**QIAprep<sup>®</sup>** Spin Miniprep试剂盒提取。使用NANODROP<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific)测定质粒产物的量并稀释至1-5ng/μl的浓度。

[0185] 有尾的DNA模板的合成

[0186] 根据以下反应制备1600 $\mu$ l PCR主溶液:

[0187] 质粒溶液 (1-5ng/ $\mu$ l) (见注3) 400 $\mu$ l

[0188] 引物溶液 (1 $\mu$ M引物) 400 $\mu$ l

[0189] 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix 800 $\mu$ l

[0190] 将50 $\mu$ l PCR主溶液等分到32个单独的PCR管中。使用热循环仪进行PCR (图2中列出的设置)。延伸步骤的长度可以根据使用的DNA聚合酶和ORF长度而变化 (例如, 如果使用2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 则热循环仪的延伸步骤应设定为每Kb的ORF长度30秒的速率)。

[0191] 为了消化甲基化质粒DNA, 将产物组合到一个EPPENDORF™管中并用30 $\mu$ l DpnI消化。使用QIAquick PCR纯化试剂盒 (Qiagen cat#:28106) 纯化PCR产物, 并在无核酸酶的水中洗脱最终产物。使用nanodrop机器测量有尾的产物的浓度, 并使用无核酸酶的水将浓度调整至100-200ng/ $\mu$ l。

[0192] 对于质量控制分析, 在1%琼脂糖凝胶上一起检查有尾的DNA模板产物和原始DNA质粒的纯度 (图3a)。

[0193] 体外转录 (IVT) 反应 (1ml反应体积)

[0194] 根据表2在一个EPPENDORF™管中制备定制的NTP混合物。将用于IVT反应的试剂按以下顺序混合到一个EPPENDORF™管中:

[0195] a. 来自表2的400 $\mu$ l定制的NTP。

[0196] b. 400 $\mu$ l DNA有尾的模板 (200ng/ $\mu$ l)。

[0197] c. 涡旋来自T7megascript试剂盒的10x反应缓冲液, 以溶解任何沉淀物, 并加入100 $\mu$ l。

[0198] d. 加入100 $\mu$ l T7酶。这将给您一个1ml的IVT反应

[0199] e. 彻底混合并在37°C下在热混合器中孵育4-6小时。

[0200] 加入30 $\mu$ l T7Turbo DNAase并轻轻混合, 然后在37°C下在热混合器中孵育15-20分钟以停止反应 (参见注释5)。

[0201] 使用Ambion MEGAclean™ Transcription Clean-Up试剂盒纯化反应, 并用50 $\mu$ l 95°C的洗脱缓冲液洗脱每个试管三次, 以在每个管中获得150 $\mu$ l RNA产物。将来自每个管的RNA混合物组合到一个EPPENDORF™管中。

[0202] RNA磷酸酶处理

[0203] 向RNA中加入无核酸酶的水, 得到1.5ml溶液。加入150 $\mu$ l Antarctic磷酸酶缓冲液 (10x) 和150 $\mu$ l Antarctic磷酸酶, 充分混合并在热混合器中于37°C孵育1小时。

[0204] 使用醋酸铵进行RNA沉淀

[0205] 将1800 $\mu$ l RNA溶液转移至15ml锥形管中。加入180 $\mu$ l 5M醋酸铵并充分混合。将5200 $\mu$ l冷 (-20°C) 100%乙醇加入溶液中, 并等分到3-4个2ml EPPENDORF™管中。让管在-20°C下放置过夜。将管在4°C以10,000rpm离心30分钟。然后小心地丢弃上清液。将每个沉淀溶解在500 $\mu$ l 70%乙醇中。将来自每个管的modRNA乙醇溶液合并到1个EPPENDORF™管中。将管在4°C以10,000rpm离心30分钟。轻轻倒出上清液并丢弃, 并使用kimwipe, 轻轻地清洁管内部。注意不要触碰沉淀。将管倒置并静置不超过2分钟以风干沉淀。使用移液管, 轻轻地移除

留在沉淀周围的任何小滴乙醇。使用45-50 $\mu$ l洗脱缓冲液重悬沉淀。将modRNA留在洗脱缓冲液中5分钟,然后轻轻用移液管吸取直至沉淀溶解。RNA溶液现在可以在体内使用,在-20 $^{\circ}$ C下储存长达6个月,或在-80 $^{\circ}$ C下储存5年。

[0206] ModRNA产量

[0207] 使用nanodrop机器测量浓度(图3b)。A260/A280的比率应大于1.8,该值接近2.0表示更高的纯度。根据产量,浓度应接近20 $\mu$ g/ $\mu$ l。为了更好的质量控制分析,将来自最终modRNA溶液的1 $\mu$ l样品在100 $\mu$ l无核酸酶的水中稀释。使用生物分析仪器分析样品(图3c)。

[0208] 制备用于小鼠心肌注射的modRNA

[0209] 将40 $\mu$ l RNAiMax在EPPENDORF<sup>TM</sup>管中与5 $\mu$ l OptiMEM组合并涡旋。将混合物在室温下静置10分钟。在另一个EPPENDORF<sup>TM</sup>管中,将150-200 $\mu$ g modRNA与5 $\mu$ l OptiMEM组合。将管旋转以去除管侧面的液体。使RNAiMAX和OptiMEM混合物在室温下静置10分钟后,将含有modRNA混合物的管中的液体加入含有RNAiMAX混合物的管中(在一些实施方案中,重要的是将modRNA混合物加入到RNAiMAX混合物中而不是相反的方式)。将组合的混合物在室温下静置15分钟。将混合物提取到31号胰岛素注射器中并注射到小鼠心肌中(结果的示例如图4所示)。

[0210] 小鼠

[0211] 所有动物步骤均在西奈山机构护理和使用委员会的伊坎医学院(Icahn School of Medicine at Mount Sinai Institutional Care and Use Committee)批准的方案下进行。使用CFW(Swiss Webster)小鼠或Rosa26<sup>mTmG</sup>小鼠,雄性和雌性。如上所述通过体外转录合成ModRNA。修饰的核苷酸(Trident)是假尿苷、5-甲基-胞苷和帽类似物。在MI诱导后的开胸手术中,将总共100-200 $\mu$ g与RNAiMax转染试剂复合的修饰的RNA注射到心肌的梗塞周围区域。MRI在轻度麻醉下进行(滴定至心率和镇静水平)。如前所述(46)进行LAD结扎和组织学分析。每个实验使用三到八只动物。为了长期存活,在诱导MI后用CM特异性Luc或Pkm2modRNA(n=10)处理CFW(8-10周龄),并在动物设施中恢复6个月。监测和记录随着时间推移的死亡。

[0212] 从成年小鼠心脏中分离细胞

[0213] 使用Langendorff技术切除心脏并灌注,通过使用CD25特异性磁珠(dynabeads CD25, Thermo Fisher Scientific)进一步处理细胞,并使用RNeasy mini试剂盒(Qiagen)从细胞中分离RNA。RNA进一步用于RNA-seq和RT-PCR分析。

[0214] 成年小鼠心肌梗塞和心力衰竭模型

[0215] 图5中描述的MI模型用于测试在CFW或Rosa26<sup>CD25</sup>小鼠中用CM特异性Lin28、Pkm2处理后的治疗效果。实验设计包括4个对照组,其通过以下处理:a)仅溶媒、b)100 $\mu$ g/心脏携带K-基序modRNA的Luc、c)100 $\mu$ g/心脏携带miR-1和miR-208识别元件的L7AE modRNA(L7AE miR1+miR208)和d)Luc CM特异性modRNA,其含有携带K-基序modRNA和L7AE miR1+miR208的Luc的混合物,每种modRNA 100 $\mu$ g/心脏(总共200 $\mu$ g/心脏)。对照组将用于评估miR-1和miR-208在心脏中减少的任何非特异性作用,其与细胞周期诱导物CM特异性modRNA不直接相关。申请人比较了对照与使用100 $\mu$ g/心脏的以下物质的4个实验组:a)Lin28和b)Pkm2,携带K-基序modRNA和d)Lin28的混合物,和e)Pkm2,携带K-基序modRNA与L7AE miR1+miR208(细胞周期诱导物CM特异性modRNA,每个modRNA 100 $\mu$ g/心脏(总modRNA 200 $\mu$ g/心脏)。与对照

modRNA相比,我们将使用MRI分析MI后28天改善的心脏功能和减少的瘢痕形成,以及增加的毛细血管密度至更高的长期生存率。我们还将使用Rosa26<sup>Tdtomato</sup>小鼠用于MI模型中转染CM的谱系追踪模型。我们的实验设计包括1个对照组,其用CM特异性Luc (50pg/心脏)和DD-Cre (50pg/心脏)与100pg/心脏的L7AE miR1+miR208混合在一起处理。我们将比较对照组与用CM特异性细胞周期诱导物modRNA处理的3个实验组。我们将使用含有DD-Cre (50pg/心脏)和携带K-基序modRNA的细胞周期诱导物基因 (Lin28和Pkm250pg/心脏)与100pg/心脏的L7AE miR-1+miR-208 (总modRNA 200pg/心脏)混合在一起的混合物。Rosa26<sup>Tdtomato</sup>小鼠的心脏将被直接肌肉内注射总共100或200pg的modRNA。使用CM谱系追踪模型,我们将在注射后28天使用CM横截面积评估与抗麦胚凝集素 (WGA) 抗体的免疫荧光分析测试转染CM的大小。我们将计数每个左心室转染CM的数量,并评估每个处理中每个CM的细胞核数量。使用Rosa26<sup>Tdtomato</sup>小鼠进行的这些测试将允许我们评估使用CM特异性modRNA的不同处理后CM功能随时间的变化。

[0216] 图5中描述的MI模型也用于测试左心室的转染CM和未转染细胞中的基因表达变化。我们的实验设计包括3个对照组,其用以下处理:不同的CM特异性Luc (50μg/心脏)和失活的(仅细胞外结构域)人CD25 (ihCD25,参见图1和8,50μg/心脏)与100μg/心脏的L7AE miR1+miR208混合在一起(总modRNA200μg/心脏)。将对照组与用CM特异性细胞周期诱导物modRNA处理的3个实验组进行比较。申请人使用含有ihCD25 (50μg/心脏)和携带K-基序modRNA的细胞周期诱导物基因 (Lin28和Pkm2,50μg/心脏)与100pg/心脏的L7AE miR-1+miR-208混合在一起(总modRNA 200μg/心脏)的混合物。在CFW小鼠(n=10)中用200μg CM特异性的不同Luc对照或细胞周期诱导物Lin28或Pkm2处理3天后,处死小鼠并用胶原酶解离心脏。使用我们的CM特异性modRNA分选方法从心脏细胞悬浮液中分离转染的CM。该分选方法基于使用CM特异性modRNA ihCD25和市售可获得的抗hCD25磁珠(Thermo Fisher)。磁珠分离被用于多种应用已有30多年的历史,包括细胞分选。用于细胞分选的磁珠与可识别细胞表面基因的抗体预偶联。由于转染的CM通常不携带特定的细胞表面基因,我们使用截短的hCD25标记转染的CM并允许抗hCD25磁珠识别并仅附着于转染的CM。使用磁体和残留珠子和未转染细胞的洗脱将产生纯的分离的转染CM细胞群。分离后立即从分选的转染CM和洗脱的细胞级分(未转染的细胞)中提取RNA,并送至使用Mount Sinai Genomics Core Facility中的HIseq2500系统进行RNA-seq。一些RNA用于使用定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)验证RNA-seq测量。下游靶标选择基于:a)对照Luc与CM特异性modRNA中差异表达的基因;b)不同细胞周期诱导物modRNA处理之间重叠的候选物;c)在未转染细胞中观察到的可能影响基因表达的CM中差异表达的基因。例如,未转染群体中相关受体的上调表明从CM分泌其配体。d)文献的数据挖掘。使用上述方法选择3-5个靶标进行验证。为了测试这一假设,在MI后我们注射了CM特异性nGFP k基序、失活的(仅细胞外结构域)人CD25 (ihCD25)与L7AE miR1-miR208混合在一起,在注射后24小时我们成功分选出nGFP和ihCD25表达的CMs,图19。

[0217] 磁共振成像(MRI)和超声心动图(Echo)。

[0218] 用Luc k基序、Luc k基序+miR1-208、miR1-208、Pkm2k基序和Pkm2k基序+miR1-208modRNA处理的CFW小鼠(8周龄)在LAD结扎<sup>11</sup>后第28天进行MRI评估。我们在具有心脏和呼吸门控的7-T Bruker Pharmascan(SA Instruments, Inc, Stony Brook, New York)上获得

延迟增强的CINE图像。用1-2%异氟烷/空气混合物麻醉小鼠。将ECG、呼吸和温度探针置于小鼠上,在扫描期间保持温热。静脉注射0.3mmol/kg钆-二亚乙基三胺五乙酸后10至20分钟进行成像。使用以下参数通过ECG触发和呼吸门控FLASH顺序获取心脏跨越尖部到基部的八到十个短轴切片的堆叠:回声时间(TE)2.7毫秒,分辨率为200 $\mu$ m x 200 $\mu$ m;切片厚度为1mm;每个R-R间隔16帧;具有60°翻转角的4个激发。射血分数计算为舒张末期和收缩末期容积的差异除以舒张末期容积。对处理组进行盲MRI获取和分析。对于左心室收缩功能的超声评估,使用配备有40MHz小鼠超声探头的现场GE护理(V7R5049)。基于从M模式超声获得的舒张末期和收缩末期规模计算分数缩短。在6-8个心脏/处理组上进行超声心动图。

[0219] 使用实时PCR进行RNA分离和基因表达谱

[0220] 根据制造商的说明书,使用RNeasy mini试剂盒(Qiagen)分离总RNA,并使用Superscript III逆转录酶(Invitrogen)进行逆转录。使用SYBR Green(Quantitect™ SYBR Green PCR试剂盒,Qiagen)在Mastercycler realplex 4序列检测器(Eppendorf)上进行实时qPCR分析。在适当的情况下将数据相对18s表达标准化(内源对照)。通过 $\Delta\Delta$ CT方法确定基因表达的倍数变化,并相对于内部对照表示。PCR引物序列显示在补充表3中。

[0221] 表3

[0222]

基因	正向引物	反向引物
Pkm2	gtctggagaaacagccaagg	cggagttcctcgaatagctg
Tnnt2	ctgagacagaggaggccaac	ttccgctctgtcttctggat
Mhy6	cagaacaccagcctcatcaa	cccagtagctccgaaagtca
Pecam1	ctgccagtccgaaaatggaac	cttcatccaccggggctatc
Cdh5	attgagacagacccaaacg	ttctggttttctggcagctt
aSMA	aagctgctggctagagggtca	ccctccctttgatggctgag
VVT1	agacacacaggtgtgaaacca	atgagtcctgggtgtgggtct
Myc	aggcagctctggagtggagag	cctggctcgcagattgtaag
Hif1a	gggtacaagaaaccacccat	gaggctgtgtcgcactgagaa
Pdk1	accaggacagccaatacaag	cctcggctcactcatcttcac
Cdc20	ttcgtgttcgagagcgatttg	accttggaactagatttgccag
Cdk1	tttcggccttgccagagcggtt	gtggagtagcgcagccgagcc
Ccnd2	gtcaccctcagcacttcat	ttccagttgcaatcatcgac
Ccnb1	aaggtgctgtgtgtgaacc	gtcagcccatcatctgcg
18s	agtccctgccctttgtacaca	cgatccgagggcctcacta
HDac4	aaccttagtgggggtgctgtg	aaggcacaactcgcactctt
Hand2	ccagctacatgcctacctc	tggttttcttgtcgttgctg
Meox2	cacagtgcctgaaatcacca	ctggctgtgtttgtcaatgg
Gata4	tccagcctgaacatctacc	ccatagtcaccaaggctgct
Mstn	tggctcctactggacctctc	tgcttttaagatgcagcag
MYHC	cagaacaccagcctcatcaa	gctccttcttcagctcctca

[0223] R26<sup>mTmG</sup>小鼠中的谱系追踪

[0224] 从Jackson实验室获得Rosa26<sup>mTmG</sup>小鼠。所有实验均在年龄和性别匹配的小鼠上进行,雄性和雌性小鼠的比率相等。对于每个实验,从展开的群体中随机选择健康小鼠。在该小鼠系中,膜靶向的tdTomato在Rosa26基因座上泛素启动子(ubiquitous promoter)的控制下表达,而膜靶向的eGFP在Cre介导的floxed tdTomato切除后变得有活性。CM特异性Cre modRNA(Cre K-基序+miR1-miR208)用于仅仅在转染的CM中表达Cre。这使得在modRNA表达减弱后很长时间(>10天)能够进行转染的CM及其后代的谱系追踪。如Jackson实验室基因型分型方案中所述,用尾DNA通过PCR对Rosa26<sup>mTmG</sup>小鼠进行基因型分型。引物序列如下:Rosa26mT/mG,野生型正向,5'CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT-3',野生型反向,5'-CGAGGCGGATCACAAGCAATA-3'和突变体反向,5'-TCAATGGGCGGGGTCGTT-3'。在该模型中,我们测量了CM特异性Cre modRNA的转染水平、CM大小和数量、以及用CM特异性Luc或Pkm2modRNA转染后CM中细胞核的数量。

[0225] 新生大鼠和成年小鼠CM分离

[0226] 如前所述分离来自3-4日龄新生大鼠心脏的CM<sup>1</sup>。从4日龄Sprague Dawley大鼠(Jackson)分离新生大鼠的心室CM。我们使用0.14mg/mL胶原酶II(Invitrogen)进行多轮消化。每次消化后,将上清液收集在马血清(Invitrogen)中。将总细胞悬浮液以1500rpm离心5分钟。弃去上清液,将细胞重悬于含有0.1mM抗坏血酸(Sigma)、0.5%胰岛素-转铁蛋白-硒(100x)、青霉素(100U/mL)和链霉素(100μg/mL)的DMEM(GIBCO)培养基中。将细胞铺板于塑料培养皿中90分钟,直至大部分非肌细胞附着于培养皿而肌细胞保持悬浮状态。然后将肌细胞以1x10<sup>5</sup>个细胞/孔接种在24孔板中。将新生大鼠CM在含有5%马血清加Ara c的DMEM培养基中孵育48小时。孵育后,如文中所述,用不同剂量的不同modRNA转染细胞。在MI和使用如前所述的Langendorff方法注射modRNA后28天从CFW小鼠中分离成年CM<sup>2</sup>。对于CM计数,我们使用血细胞计数器对每个样品3个不同的计数和每组3个心脏取平均值。计数的CM总数约为150-200CM/等分试样(使用宽口径移液管从消化后获得的总体积CM取10u1等分试样)。用α-辅肌动蛋白(CM,Red)抗体(abcam)和Hoechst 33342染色培养的CM以进行细胞核计数。对于细胞核计数,每个样品计数约1x10<sup>3</sup>个CM,每组使用3-4个独立样品。将细胞核计数作为计数的CM的百分比。对于转染的成年CM的分离和RNA分离,请参见补充图8。

[0227] 小鼠MI模型和组织学

[0228] 所有使用小鼠的外科手术和实验步骤均按照西奈山机构动物护理和使用委员会(IACUC)的伊坎医学院(Icahn School of Medicine at Mount Sinai Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC))的动物护理和使用委员会以及MSSM比较医学和外科中心(MSSM Center for Comparative Medicine and Surgery)(CCMS)批准的方案进行。用异氟烷麻醉CFW,R26<sup>mTmG</sup>小鼠(6-8周龄)。如先前所述<sup>3</sup>,通过LAD的永久性结扎诱导MI。简而言之,将左胸区域剃毛并消毒。插管后,通过左胸廓切开术暴露心脏。放置缝线以结扎LAD。将切开的胸廓和皮肤按层缝合。从胸腔中除去过量空气,在建立正常呼吸时将小鼠从通气设备中取出。为了确定modRNA对MI后心血管结果的影响,在LAD结扎后立即将modRNA(100-150μg/心脏)注入梗塞区。在尖部附近的梗塞周区域快速冷冻用于RNA分离和随后的实时qPCR研究,或固定在4%PFA中用于冷冻切片和免疫染色。在所有实验中,外科医生对治疗组不知情。为了评估心脏组织学,在每次研究结束时收集心脏。切除心脏,在PBS中简单洗涤,用灌注缓冲液灌注,称重并在4°C下在4%PFA中过夜固定。第二天,用PBS洗涤心脏并在

30%蔗糖中孵育过夜。接下来,将心脏置于OCT中,冷冻并储存在-80℃。使用低温恒温器将心脏块以8-9 $\mu$ m横切。使用免疫染色(参见下文)或使用Masson三色染色试剂盒(Sigma)进行组织学瘢痕染色进一步处理载玻片用于评估,根据标准步骤进行。使用天平测量心脏重量与体重的比率。在每个实验的终点测量该比率。该比率根据相对于小鼠总体重(以克(g)计)的心脏组织重量计算。

[0229] modRNA处理后心脏切片的免疫染色

[0230] 收获小鼠心脏并使用灌注缓冲液和4%多聚甲醛(PFA)灌注。将心脏在4%PFA/PBS中在振荡器上过夜固定,然后用PBS洗涤1小时,并在30%蔗糖/PBS中于4℃孵育过夜。第二天,将心脏固定在OCT中并在-80℃冷冻。通过低温恒温器制备心脏横切面切片(8-10 $\mu$ m)。将冷冻切片在PBS中再水合5分钟,然后用含有0.1% Triton X100的PBS(PBST)透化7分钟。然后将载玻片用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理5分钟。用PBST洗涤3次,每次5分钟后,用PBS+5% 驴正常血清+0.1% Triton X100(PBSST)在室温下封闭样品2小时,并加入用PBSST稀释的一抗。然后将载玻片在4℃下孵育过夜。用PBST洗涤载玻片(5次,每次4分钟),然后与在PBST中稀释的二抗(Invitrogen, 1:200)在室温下孵育2小时。将样品进一步用PBST洗涤(3次,每次5分钟),并用PBST中稀释的Hoechst 33342(1 $\mu$ g/ml)染色7分钟。用PBST洗涤5次,每次4分钟,用自来水洗涤一次(4分钟),然后用封片介质(VECTASHIELD)封片载玻片用于成像。将染色的载玻片储存在4℃。所有染色均在3-8个心脏/组上进行,其中2-3个切片/心脏。在用麦胚凝集素(WGA)进行免疫染色用于CM大小定量的情况下,捕获20X放大倍数的图像,并使用ImageJ测定每个细胞的面积。定量分析包括从每组3-6个独立心脏和3个切片/心脏计数多个视野(每个视野估计约50个细胞,每个样品总共约250个细胞)。对于BrdU免疫染色,将BrdU(1mg/ml, Sigma)加入成年小鼠(2-3月龄)的饮用水中,持续7-10天,然后收获心脏。定量分析包括从每组三个独立样品和3个切片/心脏计数多个视野中的BrdU阳性CM。计数的CM总数约为每个切片约1-2 $\times 10^3$ 个CM。根据制造商的推荐(In-Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Cat#11684795910, Roche)进行TUNEL免疫染色。对于modRNA处理后新生儿CM的免疫染色,将modRNA转染的新生儿CM在室温下用3.7%PFA固定在盖玻片上,持续15分钟。用含有0.5% Triton X的PBS在室温下透化10分钟后,用5%正常山羊/驴血清+0.5% Tween20封闭细胞30分钟。将盖玻片与一抗(参见补充表1)在室温下在潮湿室中孵育1小时,然后与缀合Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 647和Alexa Fluor 555的相应二抗孵育, Hoechst 33342染色用于细胞核可视化(全部来自Invitrogene)。在10X、20X和40X放大率下在Zeiss荧光显微镜上拍摄荧光图像。

[0231] 分离的大鼠新生儿心肌细胞的活细胞成像

[0232] 24小时的延时获取后用共聚旋转盘显微镜(Zeiss)每隔10秒用10x物镜获取用nGFP CM特异性modRNA转染后或用nGFP和CM特异性Pkm2modRNA共转染的分离的大鼠新生儿心肌细胞的延时图像。

[0233] 统计学分析

[0234] 通过MRI结果的配对t检验、生存曲线的Log-rank (Mantel-Cox) 检验或学生t检验或单因素方差分析、其他实验的Bonferroni post hoc检验确定统计学显著性,如相应的图形标记中详述的,\*p<0.05或更低被认为是显著的。所有图代表平均值,并且值报告为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。双侧学生t检验基于假设的正态分布。为了定量CD31腔结构、WGA、

CD45、CD3、TUNEL、BrdU<sup>+</sup>、ki67<sup>+</sup>、pH3<sup>+</sup>或Aurora B<sup>+</sup>CM的数量,从至少3个心脏切片获得结果。

[0235] 表2

	核苷酸	储备液浓度(mM)/储备液量(μmoles)	加入的量 (μl)	终浓度(mM)
[0236]	ARCA	10 μmoles	使用整个 Trilink 小瓶	6
	GTP	75mM	36μl, 来自 Ambion 试剂盒	1.5
	ATP	75mM	183μl, 来自 Ambion 试剂盒	7.5
[0237]	CTP	75mM	183μl, 来自 Ambion 试剂盒	7.5
	1.1-甲基假尿苷	100 mM	138μl 来自 Trilink 小瓶	7.5
	无核酸水	N/A	205 μl 来自 Ambion 试剂盒	-

[0238] 参考文献

[0239] 1 Dargie,H.Heart failure post-myocardial infarction:a review of the issues.Heart 91Suppl 2,ii3-6;discussion ii31,ii43-38,doi:10.1136/hrt.2005.062018(2005) .

[0240] 2 Lin,Z.&Pu,W.T.Strategies for cardiac regeneration and repair.Science translational medicine 6,239rv231,doi:10.1126/scitranslmed.3006681(2014) .

[0241] 3 Bader,D.&Oberpriller,J.O.Repair and reorganization of minced cardiac muscle in the adult newt (Notophthalmus viridescens).Journal of morphology 155,349-357,doi:10.1002/jmor.1051550307(1978) .

[0242] 4 Engel,F.B.Cardiomyocyte proliferation:a platform for mammalian cardiac repair.Cell cycle 4,1360-1363,doi:10.4161/cc.4.10.2081(2005) .

[0243] 5 Major,R.J.&Poss,K.D.Zebrafish Heart Regeneration as a Model for Cardiac Tissue Repair.Drug discovery today.Disease models 4,219-225,doi:10.1016/j.ddmod.2007.09.002(2007) .

[0244] 6 Poss,K.D.Getting to the heart of regeneration in zebrafish.Seminars in cell&developmental biology 18,36-45,doi:10.1016/j.semcd.2006.11.009(2007) .

[0245] 7 Poss,K.D.,Wilson,L.G.&Keating,M.T.Heart regeneration in zebrafish.Science 298,2188-2190,doi:10.1126/science.1077857(2002) .

[0246] 8 Singh,B.N.,Koyano-Nakagawa,N.,Garry,J.P.&Weaver,C.V.Heart of newt:a recipe for regeneration.Journal ofcardiovascular translational research 3,

397-409,doi:10.1007/s12265-010-9191-9(2010) .

[0247] 9 Leone,M.,Magadam,A.&Engel,F.B.Cardiomycocyte proliferation in cardiac development and regeneration:a guide to methodologies and interpretations.American journal of physiology.Heart and circulatory physiology 309,H1237-1250,doi:10.1152/ajpheart.00559.2015(2015) .

[0248] 10 Turnbull,I.C.et al.Myocardial Delivery of Lipidoid Nanoparticle Carrying modRNA Induces Rapid and Transient Expression.Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 24,66-75,doi:10.1038/mt.2015.193(2016) .

[0249] 11 Chien,K.R.,Zangi,L.&Lui,K.O.Synthetic chemically modified mRNA (modRNA):toward a new technology platform for cardiovascular biology and medicine.Cold Spring Harbor perspectives in medicine 5,a014035,doi:10.1101/cshperspect.a014035(2015) .

[0250] 12 Huang,C.L.et al.Synthetic chemically modified mrna-based delivery of cytoprotective factor promotes early cardiomyocyte survival post-acute myocardial infarction.Molecular pharmaceutics 12,991-996,doi:10.1021/mp5006239(2015) .

[0251] 13 Kondrat,J.,Sultana,N.&Zangi,L.Synthesis of Modified mRNA for Myocardial Delivery.Methods in molecular biology 1521,127-138,doi:10.1007/978-1-4939-6588-5\_8(2017) .

[0252] 14 Zangi,L.et al.Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction.Nature biotechnology 31,898-907,doi:10.1038/nbt.2682(2013) .

[0253] 15 Zangi,L.et al.Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor-Dependent Pathway Drives Epicardial Adipose Tissue Formation After Myocardial Injury.Circulation 135,59-72,doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022064(2017) .

[0254] 16 Israelsen,W.J.et al.PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells.Cell 155,397-409, doi:10.1016/j.cell.2013.09.025(2013) .

[0255] 17 Zheng,X.et al.Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation.eLife 5,doi:10.7554/eLife.13374(2016) .

[0256] 18 Dong,G.et al.PKM2 and cancer:The function of PKM2 beyond glycolysis.Oncology letters 11,1980-1986,doi:10.3892/ol.2016.4168(2016) .

[0257] 19 Riganti,C.,Gazzano,E.,Polimeni,M.,Aldieri,E.&Ghigo,D.The pentose phosphate pathway:an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate.Free radical biology&medicine 53,421-436,doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.006(2012) .

[0258] 20 Luo,W.et al.Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator

for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 145,732-744,doi:10.1016/j.cell.2011.03.054(2011).

[0259] 21 Azoitei,N.et al.PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1alpha through NF-kappaB activation. *Molecular cancer* 15,3,doi:10.1186/s12943-015-0490-2(2016).

[0260] 22 Heo,J.S.&Lee,J.C.beta-Catenin mediates cyclic strain-stimulated cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells through ROS-dependent and integrin-mediated PI3K/Akt pathways. *Journal of cellular biochemistry* 112,1880-1889,doi:10.1002/jcb.23108(2011).

[0261] 23 Beigi,F.et al.C3orf58,a novel paracrine protein,stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K-AKT-CDK7 pathway. *Circulation research* 113,372-380,doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301075(2013).

[0262] 24 Bersell,K.,Arab,S.,Haring,B.&Kuhn,B.Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 138,257-270,doi:10.1016/j.cell.2009.04.060(2009).

[0263] 25 D'Uva,G.et al.ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature cell biology* 17,627-638,doi:10.1038/ncb3149(2015).

[0264] 26 Engel,F.B.et al.p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes&development* 19,1175-1187,doi:10.1101/gad.1306705(2005).

[0265] 27 Lee,H.G.et al.Cell cycle re-entry and mitochondrial defects in myc-mediated hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *PloS one* 4,e7172,doi:10.1371/journal.pone.0007172(2009).

[0266] 28 Liao,H.S.et al.Cardiac-specific overexpression of cyclin-dependent kinase 2 increases smaller mononuclear cardiomyocytes. *Circulation research* 88,443-450(2001).

[0267] 29 Ozhan,G.&Weidinger,G.Wnt/beta-catenin signaling in heart regeneration. *Cell regeneration* 4,3,doi:10.1186/s13619-015-0017-8(2015).

[0268] 30 Kuhn,B.et al.Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nature medicine* 13,962-969,doi:10.1038/nm1619(2007).

[0269] 31 Lin,Z.et al.Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circulation research* 115,354-363,doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303632(2014).

[0270] 32 Heallen,T.et al.Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development* 140,4683-4690,doi:10.1242/dev.102798(2013).

[0271] 33 Heallen,T.et al.Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain

cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 332,458-461,doi:10.1126/science.1199010(2011) .

[0272] 34 Wei,K.et al.Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* 525,479-485,doi:10.1038/nature15372(2015) .

[0273] 35 Ebelst,H.et alDirected expression of dominant-negative p73 enables proliferation of cardiomyocytes in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 45,411-419,doi:10.1016/j.yjmcc.2008.06.006(2008) .

[0274] 36 Gao,X.,Wang,H.,Yang,J.J.,Liu,X.&Liu,Z.R.Pyruvate kinase M2regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Molecular cell* 45,598-609,doi:10.1016/j.molcel.2012.01.001(2012) .

[0275] 37 Gupta,V.&Bamezai,R.N.Human pyruvate kinase M2:a multifunctional protein. *Protein science:a publication of the Protein Society* 19,2031-2044, doi:10.1002/pro.505(2010) .

[0276] 38 Luo,W.&Semenza,G.L.Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget* 2,551-556,doi:10.18632/oncotarget.299(2011) .

[0277] 39 Mazurek,S.Pyruvate kinase type M2:a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The international journal of biochemistry&cell biology* 43,969-980,doi:10.1016/j.biocel.2010.02.005(2011) .

[0278] 40 Spoden,G.A.et al.Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a glycolytic sensor differentially regulating cell proliferation,cell size and apoptotic cell death dependent on glucose supply. *Experimental cell research* 315,2765-2774,doi:10.1016/j.yexcr.2009.06.024(2009) .

[0279] 41 Vander Heiden,M.G.,Cantley,L.C.&Thompson,C.B.Understanding the Warburg effect:the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*324, 1029-1033,doi:10.1126/science.1160809(2009) .

[0280] 42 Wu,S.&Le,H.Dual roles of PKM2 in cancer metabolism. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 45,27-35,doi:10.1093/abbs/gms106(2013) .

[0281] 43 Kumar,B.&Bamezai,R.N.Moderate DNA damage promotes metabolic flux into PPP via PKM2 Y-105 phosphorylation:a feature that favours cancer cells. *Molecular biology reports* 42,1317-1321,doi:10.1007/s11033-015-3876-8(2015) .

[0282] 44 Salani,B.et al.IGF1 regulates PKM2 function through Akt phosphorylation. *Cell cycle* 14,1559-1567,doi:10.1080/15384101.2015.1026490(2015) .

[0283] 45 Wong,N.,De Melo,J.&Tang,D.PKM2,a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. *International journal of cell biology* 2013,242513,doi: 10.1155/2013/242513(2013) .

[0284] 46 Luo,N.et al.Induction of Apoptosis in Human Leukemic Cell Lines by

Diallyl Disulfide via Modulation of EGFR/ERK/PKM2 Signaling Pathways. *Asian Pacific journal of cancer prevention:APJCP* 16,3509-3515(2015).

[0285] 47 Zhang,J.et al.Nuclear translocation of PKM2 modulates astrocyte proliferation via p27 and-catenin pathway after spinal cord injury.*Cell cycle* 14,2609-2618,doi:10.1080/15384101.2015.1064203(2015).

[0286] 48 David,C.J.,Chen,M.,Assanah,M.,Canoll,P.&Manley,J.L.HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer.*Nature* 463,364-368,doi:10.1038/nature08697(2010).

[0287] 49 Haubner,B.J.et al.Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction.*Aging* 4,966-977,doi:10.18632/aging.100526(2012).

[0288] 50 Hamma,T.&Ferre-D'Amare,A.R.Structure of protein L7Ae bound to a K-turn derived from an archaeal box H/ACA sRNA at 1.8 Å resolution.*Structure* 12,893-903,doi:10.1016/j.str.2004.03.015(2004).

[0289] 51 Wroblewska,L.et al.Mammalian synthetic circuits with RNA binding proteins for RNA-only delivery.*Nature biotechnology* 33,839-841,doi:10.1038/nbt.3301(2015).

[0290] 52 van Rooij,E.&Olson,E.N.MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease:opportunities and obstacles.*Nature reviews.Drug discovery* 11,860-872, doi:10.1038/nrd3864(2012).

[0291] 53 Williams,A.H.,Liu,N.,van Rooij,E.&Olson,E.N.MicroRNA control of muscle development and disease.*Current opinion in cell biology* 21,461-469, doi:10.1016/j.ceb.2009.01.029(2009).

[0292] 54 Ye,Y.,Perez-Polo,J.R.,Qian,J.&Birnbaum,Y.The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury.*Physiological genomics*43, 534-542,doi:10.1152/physiolgenomics.00130.2010(2011).

[0293] 55 Porrello,E.R.et al.Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart.*Science* 331,1078-1080,doi:10.1126/science.1200708(2011).

[0294] 56 Lesizza,P.et al.Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction.*Circulation research*,doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309589(2017).

<110> 西奈山伊坎医学院  
 L·赞吉  
 A·马加杜姆  
 <120> modRNA 的细胞特异性表达  
 <130> 3710.029P  
 <160> 10  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 536  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

[0001]

<400> 1  
 ttgaccctc gtacagaagc taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga 60  
 gtaagaagaa atataagagc caccatgtac gtgagatttg aggttcctga ggacatgcag 120  
 aacgaagctc tgagtctgct ggagaagggtt agggagagcg gtaaggtaaa gaaaggtacc 180  
 aacgagacga caaaggctgt ggagagggga ctggcaaagc tcgtttacat cgcagaggat 240  
 gttgaccgcg ctgagatcgt tgctcatctg ccctcctct gcgaggagaa gaatgtgccg 300  
 tacatttacg ttaaaagcaa gaacgacctt ggaagggctg tgggcattga ggtgccatgc 360  
 gcttcggcag cgataatcaa cgagggagag ctgagaaagg agcttgaag ccttgtggag 420  
 aagattaaag gccttcagaa gtaagctgcc ttctgcgggg cttgccttct ggccatgccc 480  
 ttcttctctc ccttgcacct gtacctcttg gtctttgaat aaagcctgag taggaa 536

<210> 2  
 <211> 620

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 2	
	ttggaccctc gtacagaagc taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga	60
	gtaagaagaa atataagagc caccatgtac gtgagatttg aggttcctga ggacatgcag	120
	aacgaagctc tgagtctgct ggagaagggtt agggagagcg gtaaggtaaa gaaaggtacc	180
	aacgagacga caaaggctgt ggagagggga ctggcaaagc tcgtttacat cgcagaggat	240
	gttgaccgcg ctgagatcgt tgcctcatctg cccctcctct gcgaggagaa gaatgtgccg	300
	tacatttacg ttaaaagcaa gaacgacctt ggaagggtct tgggcattga ggtgccatgc	360
	gcttcggcag cgataatcaa cgaggagag ctgagaaagg agcttgaag ccttgtggag	420
[0002]	aagattaaag gccttcagaa gtaatacata cttctttaca ttccatacat acttctttac	480
	attccataca tacttcttta cattccatac atacttcttt acattccagc tgccttctgc	540
	ggggcttgcc ttctggccat gcccttcttc tctcccttgc acctgtacct cttggtcttt	600
	gaataaagcc tgagtaggaa	620
	<210> 3	
	<211> 624	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 3	
	ttggaccctc gtacagaagc taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga	60
	gtaagaagaa atataagagc caccatgtac gtgagatttg aggttcctga ggacatgcag	120
	aacgaagctc tgagtctgct ggagaagggtt agggagagcg gtaaggtaaa gaaaggtacc	180

aacgagacga caaaggctgt ggagagggga ctggcaaagc tcgtttacat cgcagaggat	240
gttgaccgcg ctgagatcgt tgctcatctg ccctctctct gcgaggagaa gaatgtgccg	300
tacatttacg ttaaaagcaa gaacgacctt ggaagggctg tgggcattga ggtgccatgc	360
gcttcggcag cgataatcaa cgagggagag ctgagaaagg agcttgaag ccttgtggag	420
aagattaaag gccttcagaa gtaaacaagc tttttgctcg tcttatacaa gctttttgct	480
cgtcttatac aagctttttg ctctctttat acaagctttt tgctctcttt atgtctcctt	540
ctgcggggct tgcttcttgg ccatgccctt cttctctccc ttgcacctgt acctcttggg	600
ctttgaataa agcctgagta ggaa	624

<210> 4

<211> 708

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 4

ttgaccctc gtacagaagc taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga	60
gtaagaagaa atataagagc caccatgtac gtgagatttg aggttcctga ggacatgcag	120
aacgaagctc tgagtctgct ggagaaggtt agggagagcg gtaaggtaaa gaaaggtacc	180
aacgagacga caaaggctgt ggagagggga ctggcaaagc tcgtttacat cgcagaggat	240
gttgaccgcg ctgagatcgt tgctcatctg ccctctctct gcgaggagaa gaatgtgccg	300
tacatttacg ttaaaagcaa gaacgacctt ggaagggctg tgggcattga ggtgccatgc	360
gcttcggcag cgataatcaa cgagggagag ctgagaaagg agcttgaag ccttgtggag	420
aagattaaag gccttcagaa gtaatacata cttctttaca ttccatacat acttctttac	480
attccataca tacttcttta cattccatac atacttcttt acattccaac aagctttttg	540

	ctcgtcttat acaagctttt tgctcgtctt atacaagctt tttgctcgtc ttatacaagc	600
	tttttgcctg tcttatgctg ccttctgcgg ggcttgcctt ctggccatgc ccttcttctc	660
	tcccttgcac ctgtacctct tggctcttga ataaagcctg agtaggaa	708
	<210> 5	
	<211> 832	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 5	
	ttggaccctc gtacagaagc taatacgact cactataggg aaaggtgggc gtgatccgaa	60
	aggtgacccg gatctggggc gtgatccgaa aggtgaccgg gaaagccacc atgggctcgg	120
	tgtccaacca gcagtttgca ggtggctcgc ccaaggcagc ggagaaggcg ccagaggagg	180
[0004]	cgccgcctga cgcggcccga gcggcagac agccgcagct gctgcacggg gccggcatct	240
	gtaagtgggt caacgtgcgc atggggttcg gcttctctgc tatgaccgcc cgcgctgggg	300
	tcgcgctcga cccccgggtg gacgtctttg tgcaccagag caagctgcac atggaagggt	360
	tccgaagcct caaggagggt gaggcgggtg agttcacctt taagaagtct gccaaagggtc	420
	tggaatccat ccgtgtcact ggccttgggt gtgtgttctg tattgggagt gagcggcggc	480
	caaaagggaa gaacatgcag aagcgaagat ccaaaggaga caggtgctac aactgcggtg	540
	ggctagacca tcatgccaag gaatgcaagc tgccacccca gcccaagaag tgccactttt	600
	gccaaagcat caaccatag gtggcctcgt gtccactgaa ggcccagcag ggccccagtt	660
	ctcagggaaa gcctgcctac ttccgggagg aagaggaaga gatccacagc cctgccttgc	720
	tcccagaagc ccagaattga getgccttct gcggggcttg ccttctggcc atgccttct	780
	tctctccctt gcacctgtac ctcttggctt ttgaataaag cctgagtagg aa	832

<210>	6	
<211>	1798	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	6	
	ttggaccctc gtacagaagc taatacgaact cactataggg aaaggtgggc gtgatccgaa	60
	aggtgacccg gatctggggc gtgatccgaa aggtgacccg gaaagccacc atgccgaagc	120
	cacacagtga agcagggact gccttcattc agaccagca gctccatgca gccatggctg	180
	acaccttctt ggaacacatg tgccgcctgg acattgactc tgccccatc acggcccga	240
	acactggcat catttgtacc attgggcctg cttcccgatc tgtggagatg ctgaaggaga	300
	tgattaagtc tggaatgaat gtggctcggc tgaatttctc tcatggaacc catgagtacc	360
[0005]	atgcagagac catcaagaat gtccgtgaag ccacagaaag ctttgcattc gatcccattc	420
	tctaccgtcc tgttgcggtg gctctggata caaagggacc tgagatccgg actggactca	480
	tcaaggcag cggcaccgct gaggtggagc tgaagaagg agccactctg aagatcacc	540
	tggacaacgc ttacatggag aagtgtgacg agaacatcct gtggctggac tacaagaaca	600
	tctgcaaggt ggtggagggtg ggcagcaaga tctacgtgga cgatgggctc atctcactgc	660
	aggtgaagga gaaaggcgt gacttcttgg tgacggaggt ggagaatggt ggctccttgg	720
	gcagcaagaa ggcgtgaac ctgccggcg ctgctgtgga tctccccgt gtgtcgaaa	780
	aggacatcca ggacctgaag tttgggggtg agcaggatgt ggacatggtg tttgcatctt	840
	tcattccgaa ggcagccgac gtgcatgaag tcaggaaggt gctgggagag aagggaaga	900
	acatcaagat catcagcaaa atcgagaacc atgaaggcgt ccgagggtt gatgagatct	960
	tggaggccag tgatgggatc atggtggctc gtggtgacct gggcatgag attcctgcag	1020

	agaaggtctt cctggctcag aagatgatga tcgggcgatg caaccgagct gggaagcctg	1080
	tcattctgtgc cacacagatg ctggagagca tgatcaagaa gccacgcccc acccgtgctg	1140
	aaggcagtga tgtggccaat gcagtcctgg atggagcaga ctgcatcatg ctgtctggag	1200
	aaacagccaa gggggactac cctctggagg ctgttcgcat gcagcacctg attgcccgag	1260
	aggcagaggc tgccatctac cacttgcagc tattegagga actccgcccg ctggcgccca	1320
	ttaccagcga cccacagaa gctgccgccg tgggtgccgt ggaggcctcc ttcaagtget	1380
	gcagtggggc cattatcgtg ctcaccaagt ctggcaggag tgctcaccaa gtggccaggt	1440
	accgccctcg ggctcctatc attgccgtga ctcgaaatcc ccagactgct cgccaggccc	1500
	atctgtaccg tggcatcttc cctgtgctgt gtaaggatgc cgtgctgaat gcctgggctg	1560
	aggatgtcga ccttcgtgta aacttggcca tggatgttgg caaggcccga ggctttctca	1620
	agaagggaga tgtggtcatt gtgctgaccg ggtggcgccc tggctctgga ttcaccaaca	1680
[0006]	ccatgcgtgt agtgcctgta ccttgagctg ccttctgcgg ggcttgcctt ctggccatgc	1740
	cctttctctc tcccttgcaac ctgtacctct tggcttttga ataaagcctg agtaggaa	1798
	<210> 7	
	<211> 975	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 7	
	ttgaccctc gtacagaagc taatacgaact cactataggg aaagtgggc gtgatccgaa	60
	aggtgaccg gatctggggc gtgatccgaa aggtgaccg gaaagccacc atggtgagca	120
	aggcgagga gctgttcacc ggggtgggtc ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa	180
	acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga	240

ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctcgtgacca	300
ccctgacctg cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag cagcacgact	360
tcttcaagtc cgccatgccc gaaggtctacg tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg	420
acggcaacta caagaccgac gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca	480
tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac aagctggagt	540
acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg	600
tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc	660
agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca	720
cccagtcgac cctgagcaaa gaccccaacg agaagegcga tcacatggtc ctgctggagt	780
tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgca tggacgagct gtacaagga gatccaaaaa	840
agaagagaaa ggtaggcgat ccaaaaaaga agagaaaggt aggtgatcca aaaaagaaga	900
[0007] gaaaggtata agctgccttc tgccgggctt gccttctggc catgcccttc ttctctcct	960
tgcacctgta cctct	975
<210> 8	
<211> 1021	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 8	
ttggaccctc gtacagaagc taatacgaact cactataggg aaagtgggc gtgatccgaa	60
aggtgaccgc gatctggggc gtgatccgaa aggtgaccgc gaaagccacc atggattcat	120
acctgctgat gtggggactg ctcacgttca tcatgggtgcc tggetgccag gcagagctct	180
gtgacgatga cccgccagag atcccacacg ccacattcaa agccatggcc tacaaggaag	240

	gaaccatggtt gaactgtgaa tgcaagagag gtttccgcag aataaaaagc gggtcactct	300
	atatgctctg tacaggaaac tctagccact cgtcctggga caaccaatgt caatgcacaa	360
	gctctgccac tcggaacaca acgaaacaag tgacacctca acctgaagaa cagaaagaaa	420
	ggaaaaccac agaaatgcaa agtccaatgc agccagtgga ccaagcgagc cttccaggtc	480
	actgcaggga acctccacca tgggaaaatg aagccacaga gagaatttat catttcgtgg	540
	tggggcagat ggtttattat cagtgcgtcc agggatacag ggctctacac agaggtcctg	600
	ctgagagcgt ctgcaaaatg acccacggga agacaagggtg gaccagccc cagctcatat	660
	gcacaggtga aatggagacc agtcagtttc caggtgaaga gaagcctcag gcaagccccg	720
	aagccgtcc tgagagtgag acttcctgcc tcgtcacaac aacagatfff caaatacaga	780
	cagaaatggc tgcaacctg gagacgtcca tatttacaac agatctccag gtagcagtgg	840
	ccggctgtgt tttcctgctg atcagcgtcc tctcctgag tgggctcacc tggcagcgga	900
[0008]	gacagaggaa gtagtagaaga acaatctagg ctgccttctg cggggcttgc cttctggcca	960
	tgcccttctt ctctccttg cacctgtacc tcttggctct tgaataaagc ctgagtagga	1020
	a	1021
	<210> 9	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 9	
	ttggaccctc gtacagaagc taatacg	27
	<210> 10	
	<211> 150	

<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

[0009]

<400> 10  
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60  
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 120  
tcttcctact caggctttat tcaaagacca 150

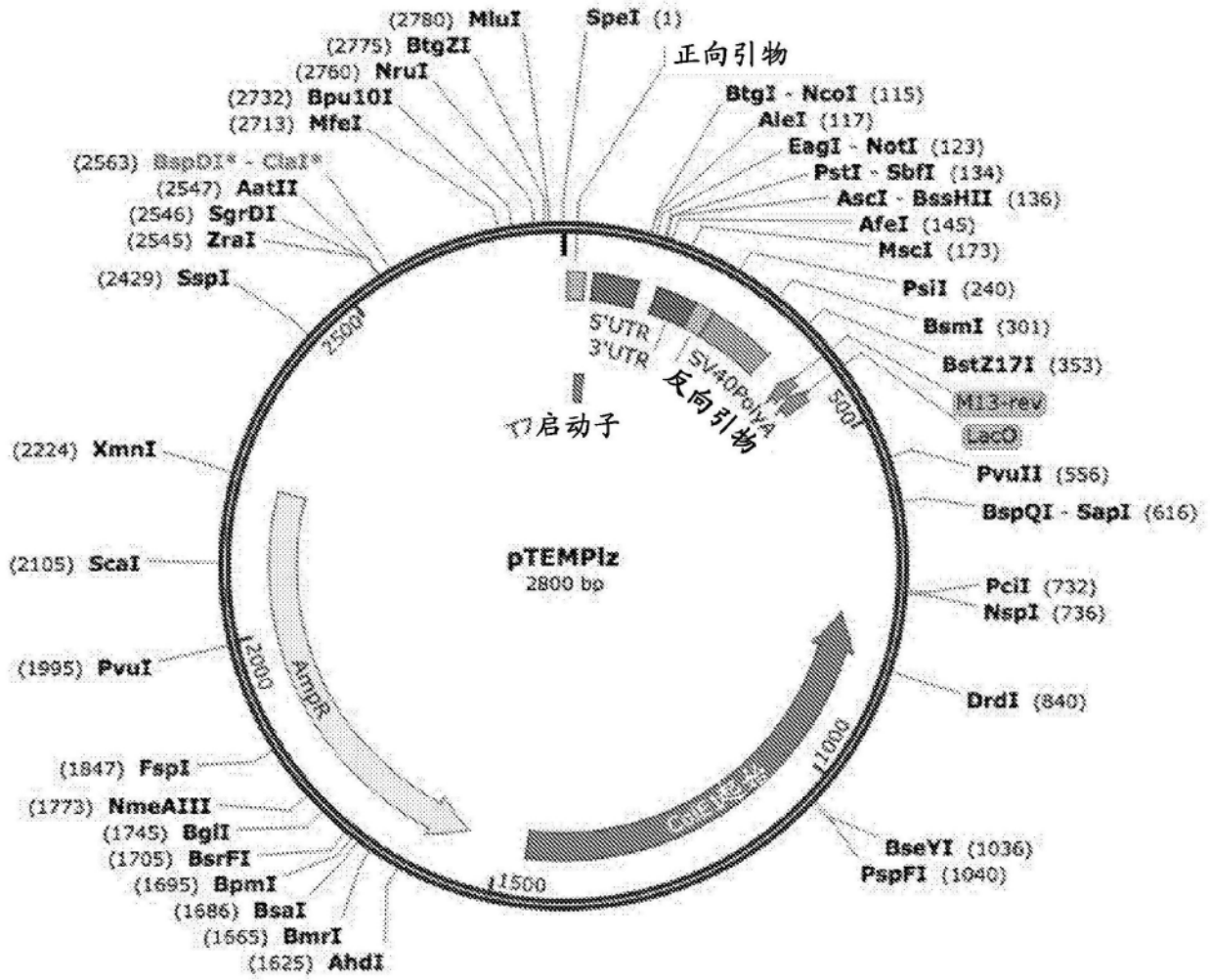


图1

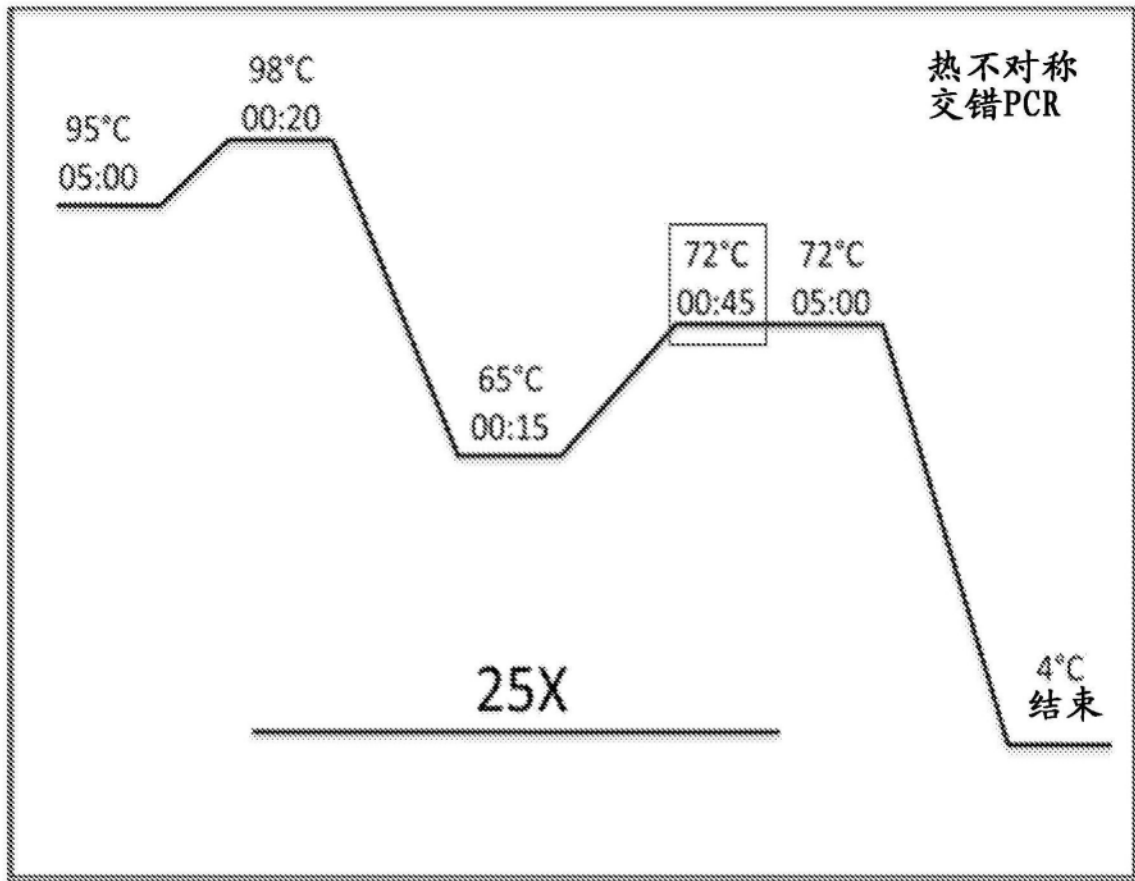


图2

步骤	温度	时间	循环#
初始变性	95 <sup>o</sup> C	5 min	1
变性	98 <sup>o</sup> C	20 sec	25
引物退火	65 <sup>o</sup> C	15 sec	
延伸	72 <sup>o</sup> C	30 sec/kb ORF 插入	
最后延伸	72 <sup>o</sup> C	5 min	1

图2续

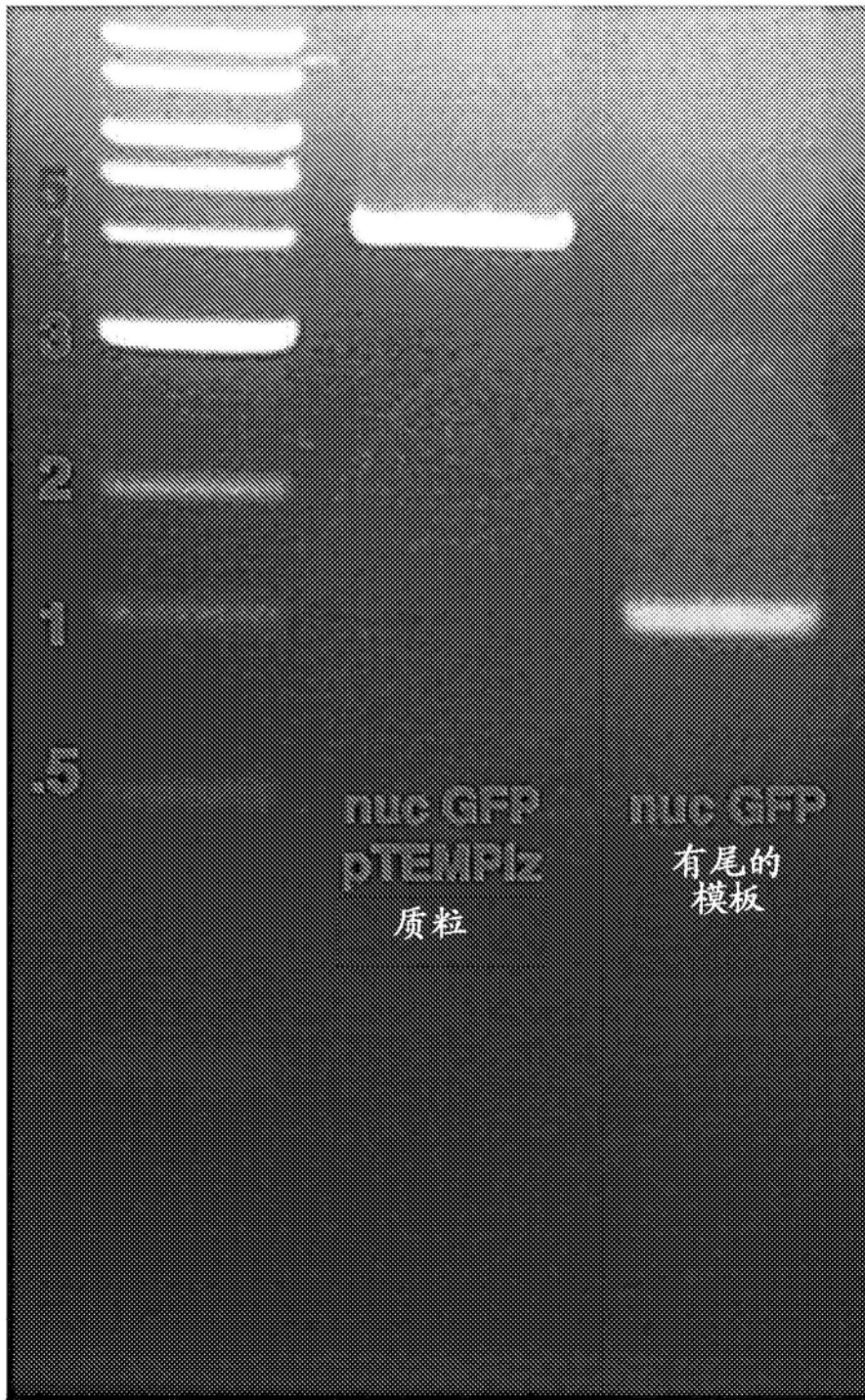
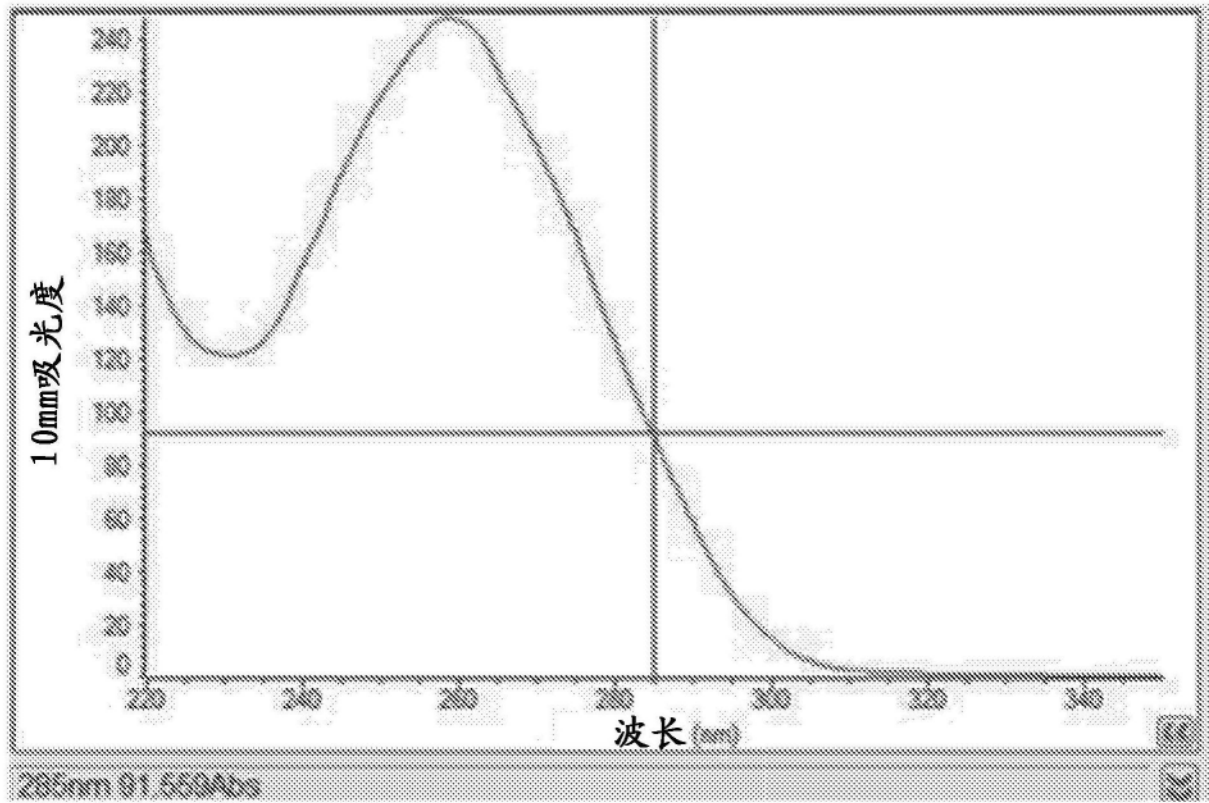
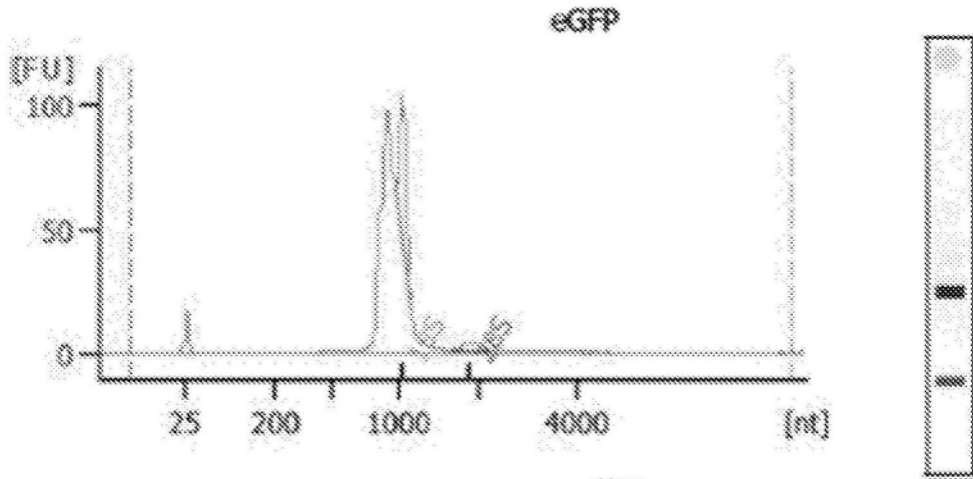


图3A




样品 ID:	nucGFP	Pedestal
类型:	RNA	40.00
浓度:	17.8693	µg/µl
A260 (10 mm path)	246.732	
A280 (10 mm path)	127.496	
260 / 280	1.94	
260 / 230	2.04	
<input checked="" type="checkbox"/> 基线校正	340	nm

图3B



样品5的总体结果:

RNA 面积: 555.7  
 RNA 浓度: 191 ng/μl  
 rRNA 比 [28s / 18s]: 0.1  
 RNA 完整指数 (RIN): 5.4 (8.02.08, 手动调整异常阈值)  
 结果标志颜色:   
 结果标志标签: RIN: 5.40

样品5的片段表:

名称	起始大小[nt]	结束大小[nt]	面积	总面积的%
18S	968	1,152	74.1	13.3
28S	1,666	2,318	9.7	1.7

图3C

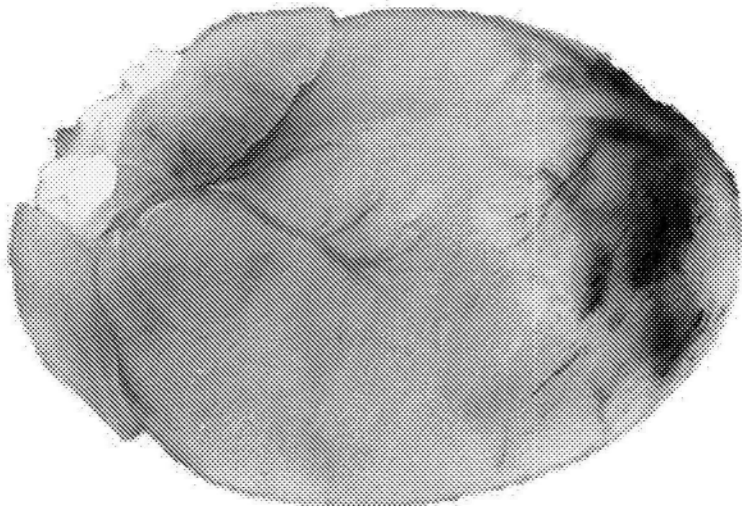


图4A

nucGFP modRNA / DAPI / 细胞标记物

心肌细胞  
(Troponin)

内皮细胞  
(Pecam1)

平滑肌细胞  
( $\alpha$ SMA)

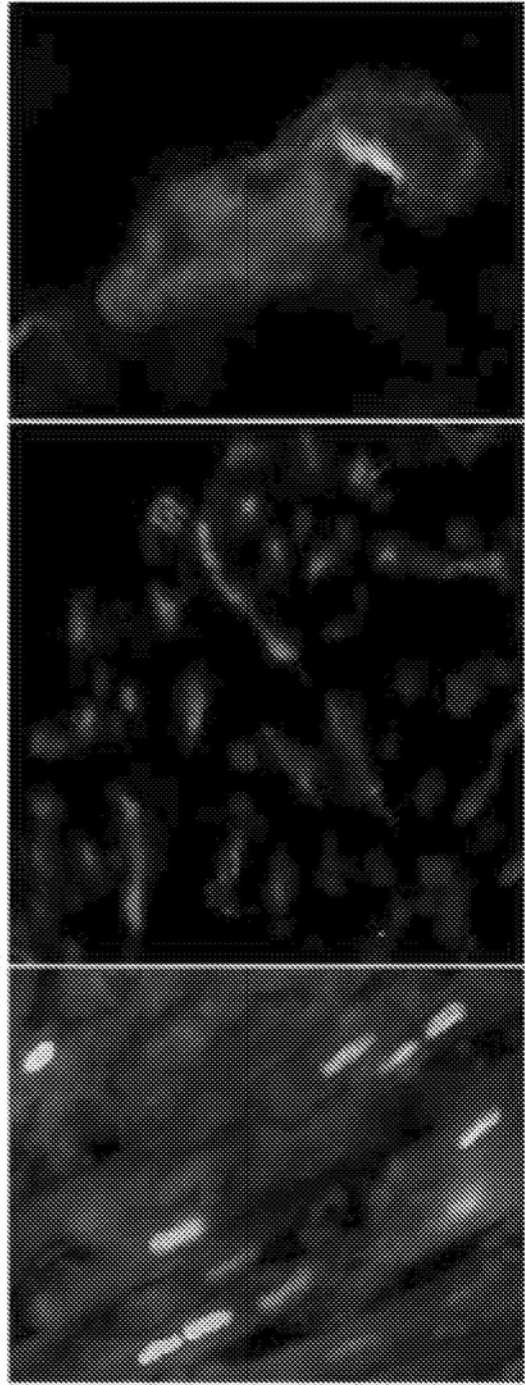


图4B

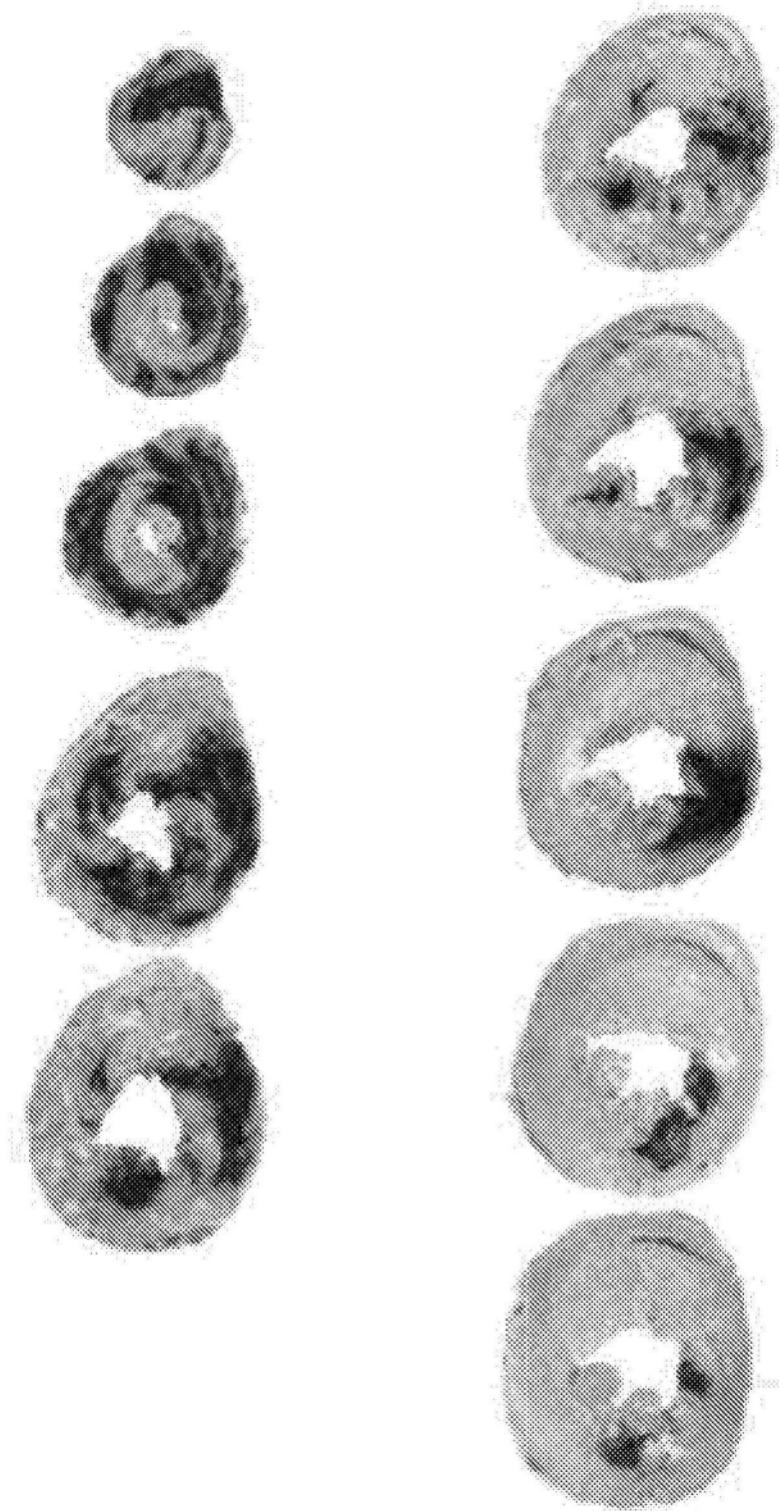


图4C

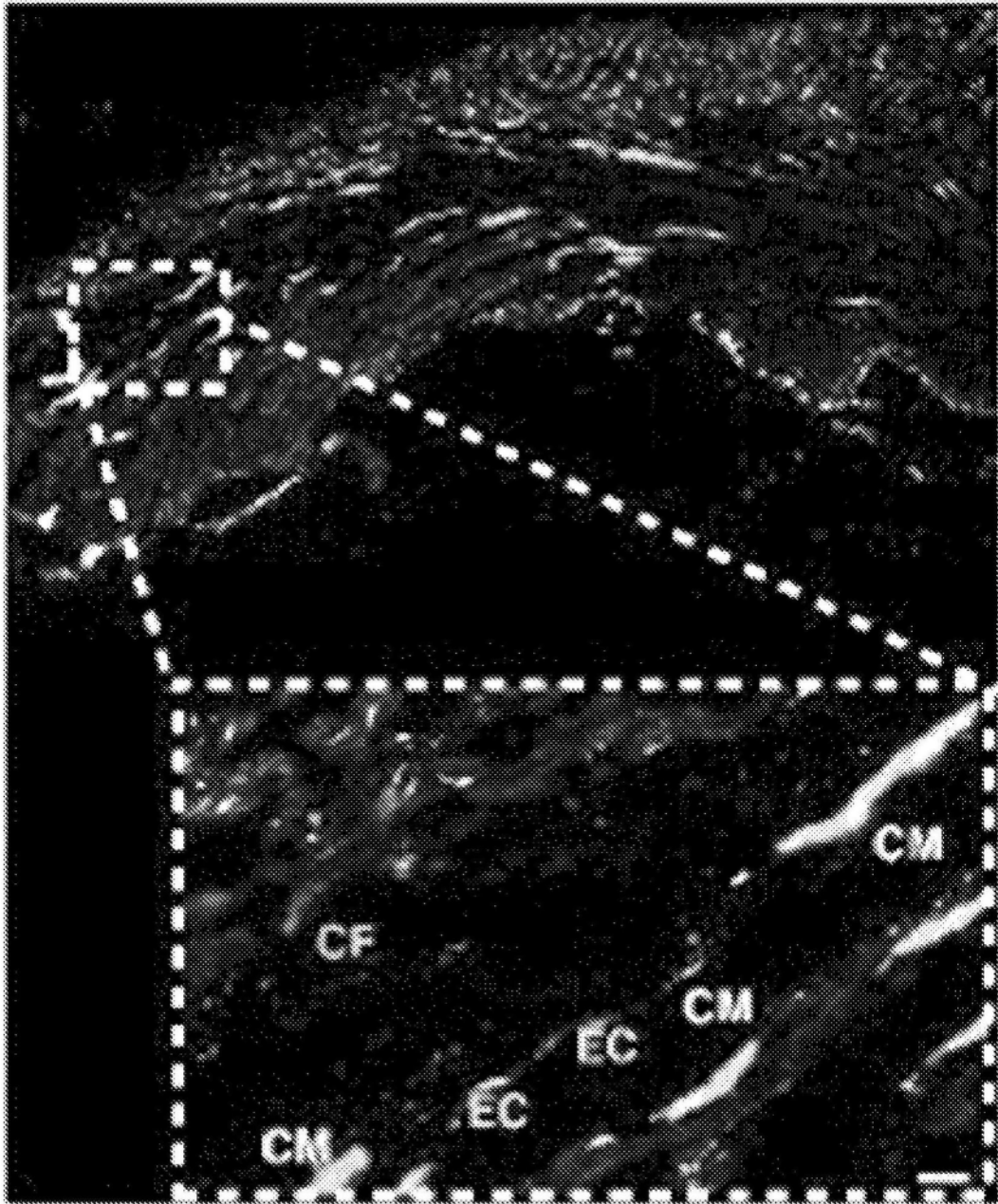


图5A

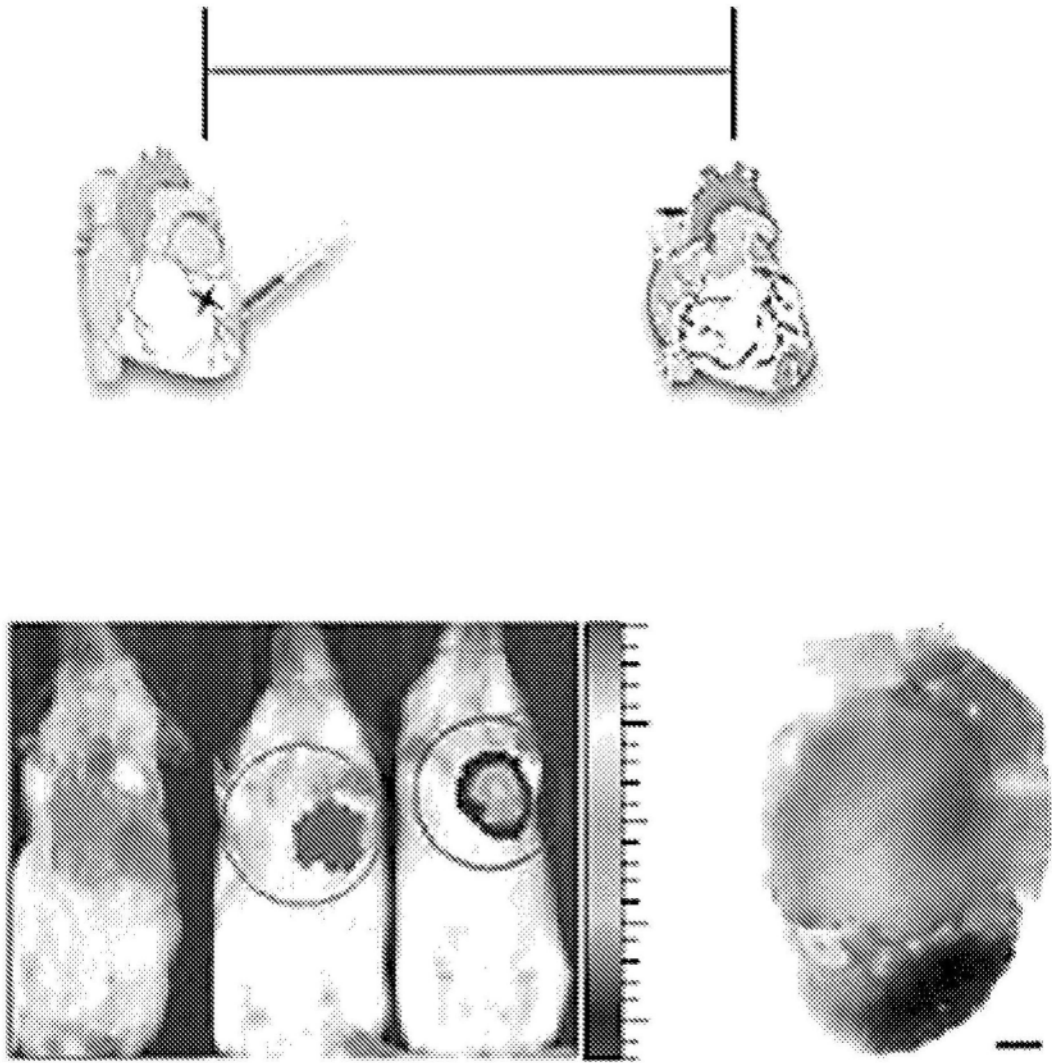


图5B

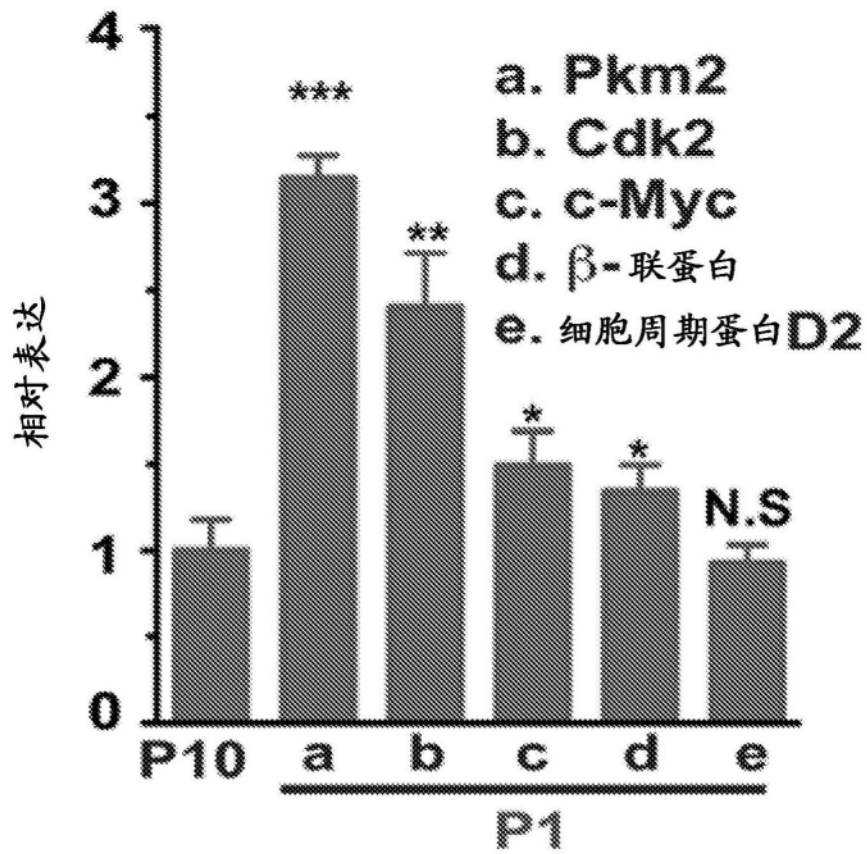


图6A

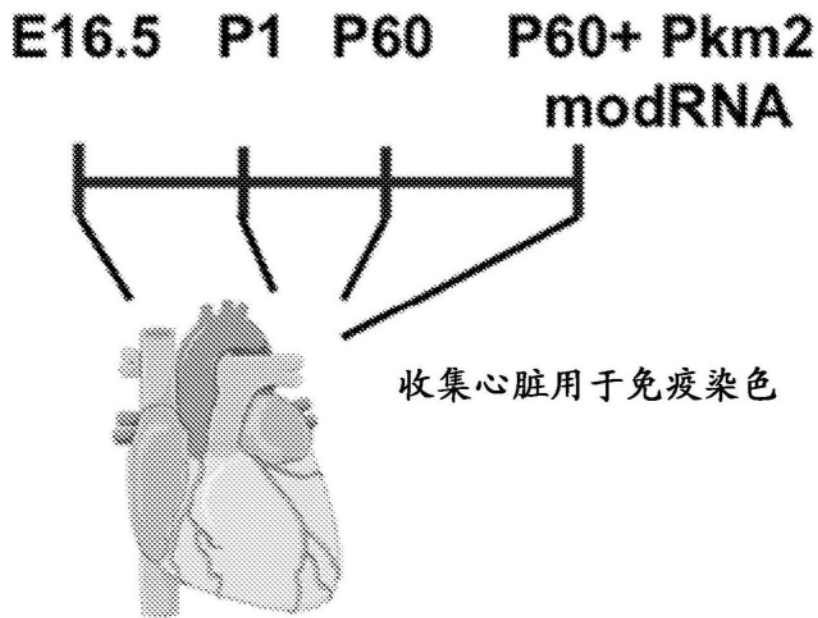


图6B

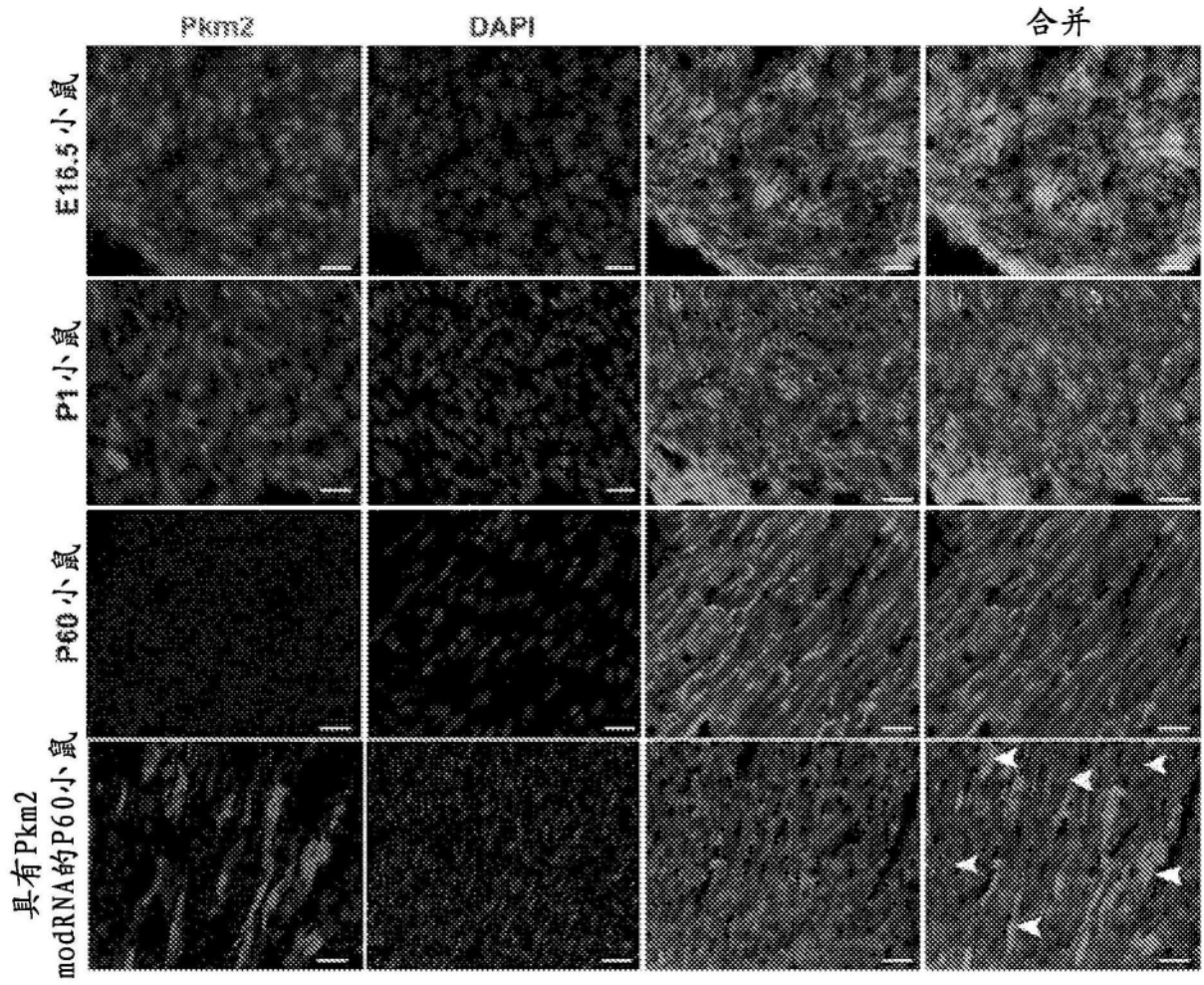


图6C

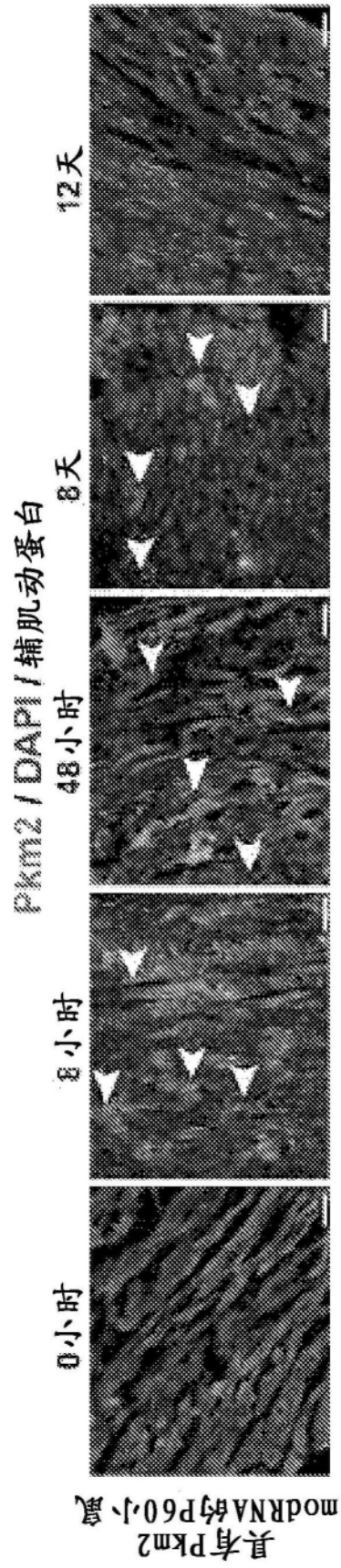


图6D

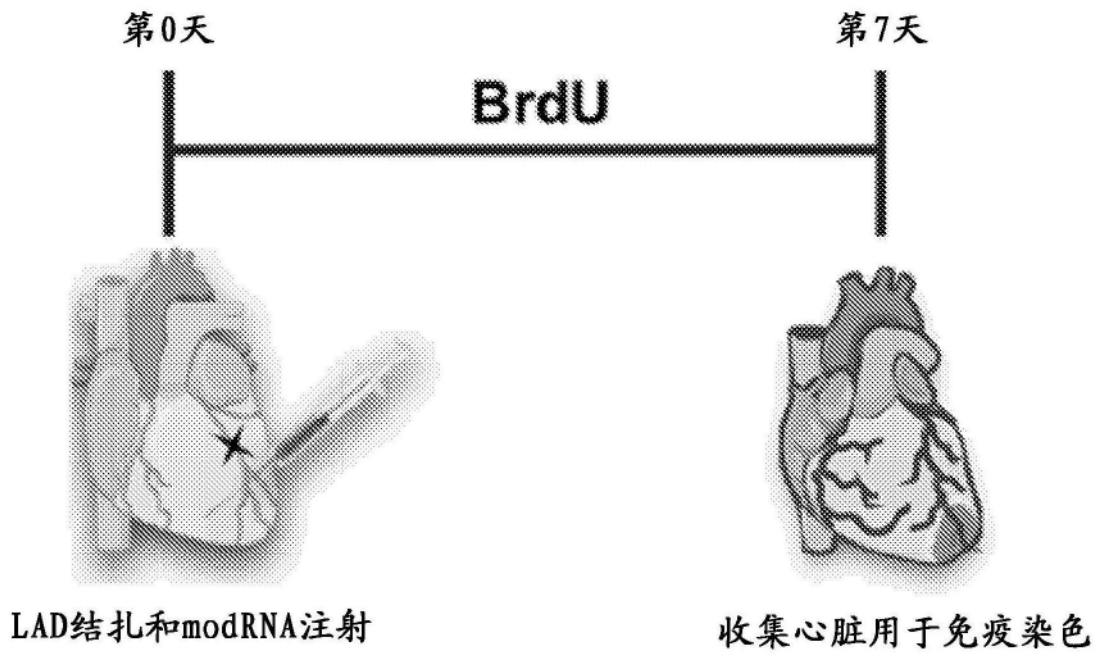


图6E

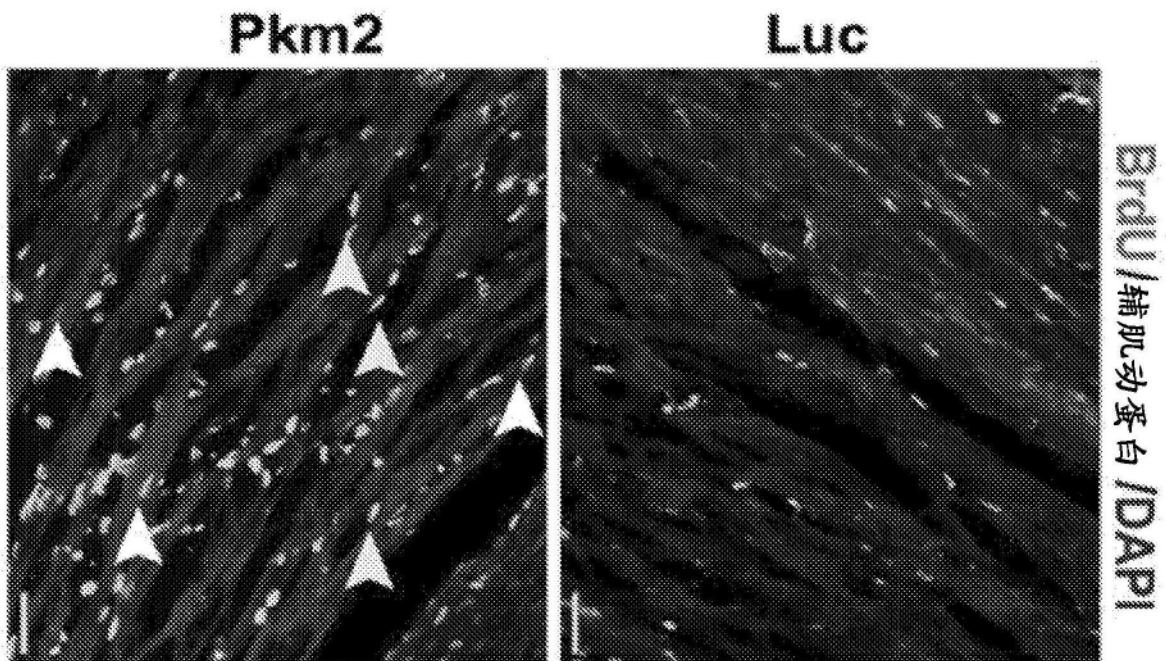


图6F

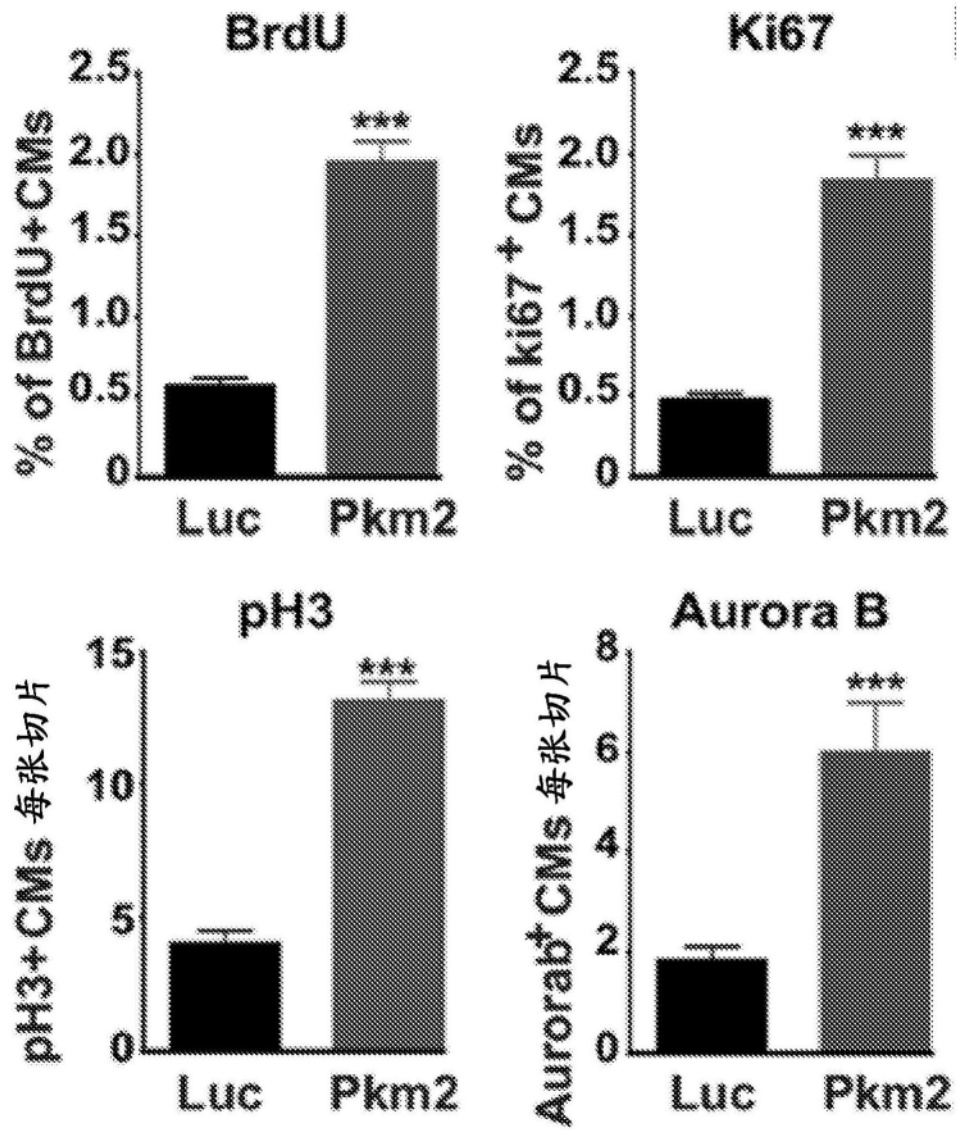


图6G

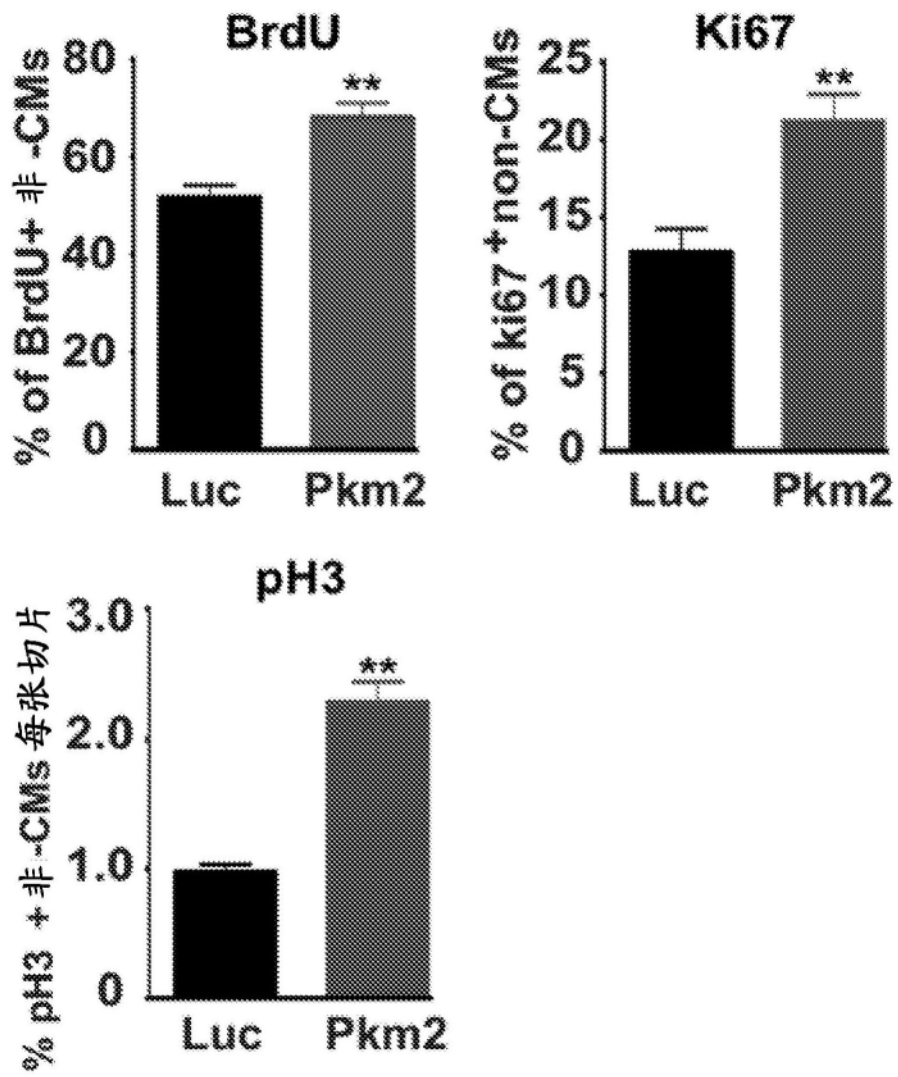


图6H

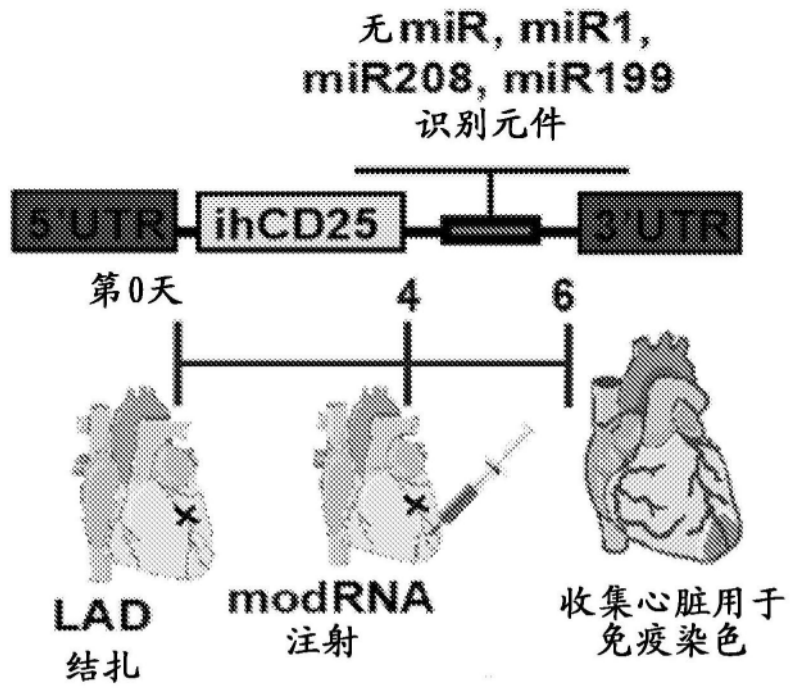


图7A

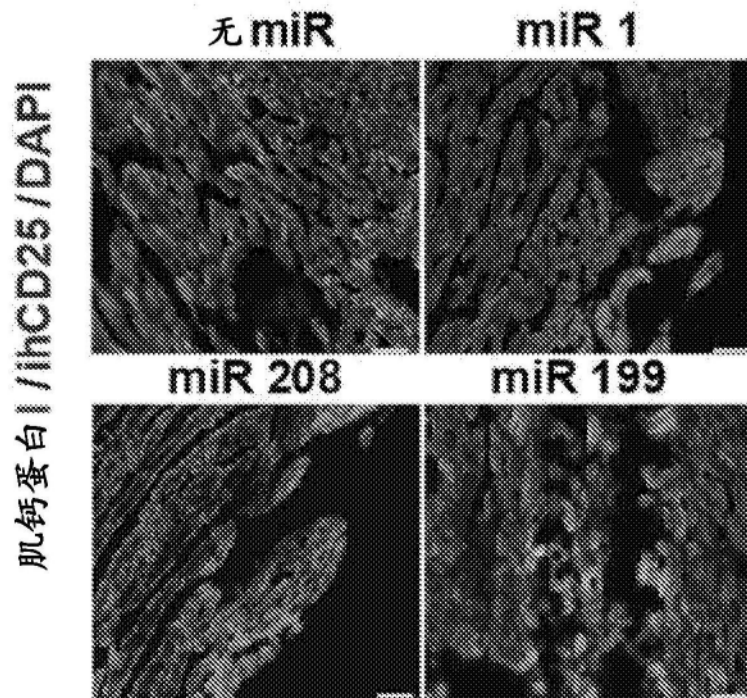


图7B

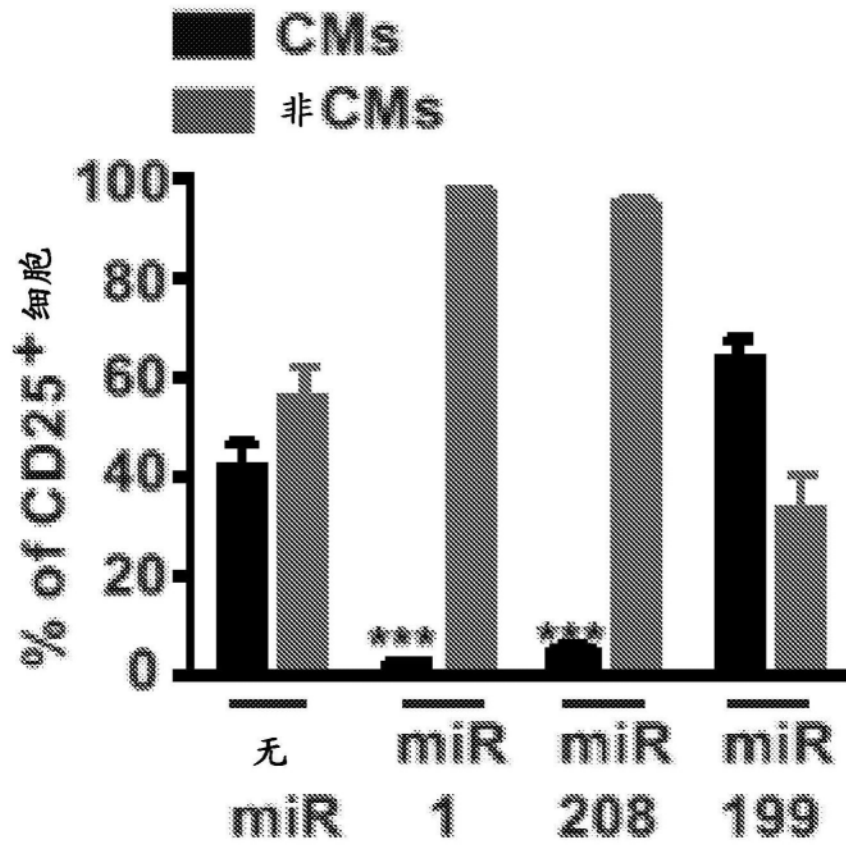


图7C

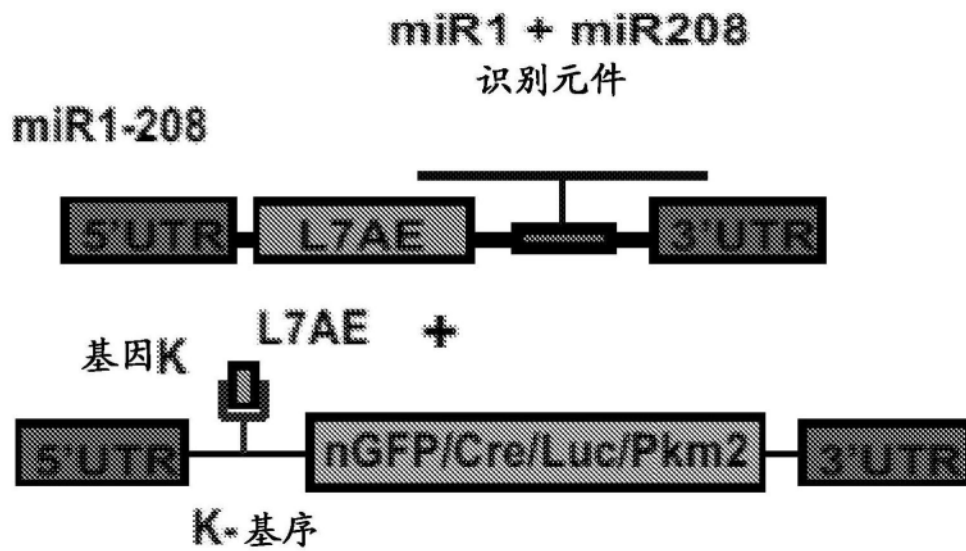


图7D

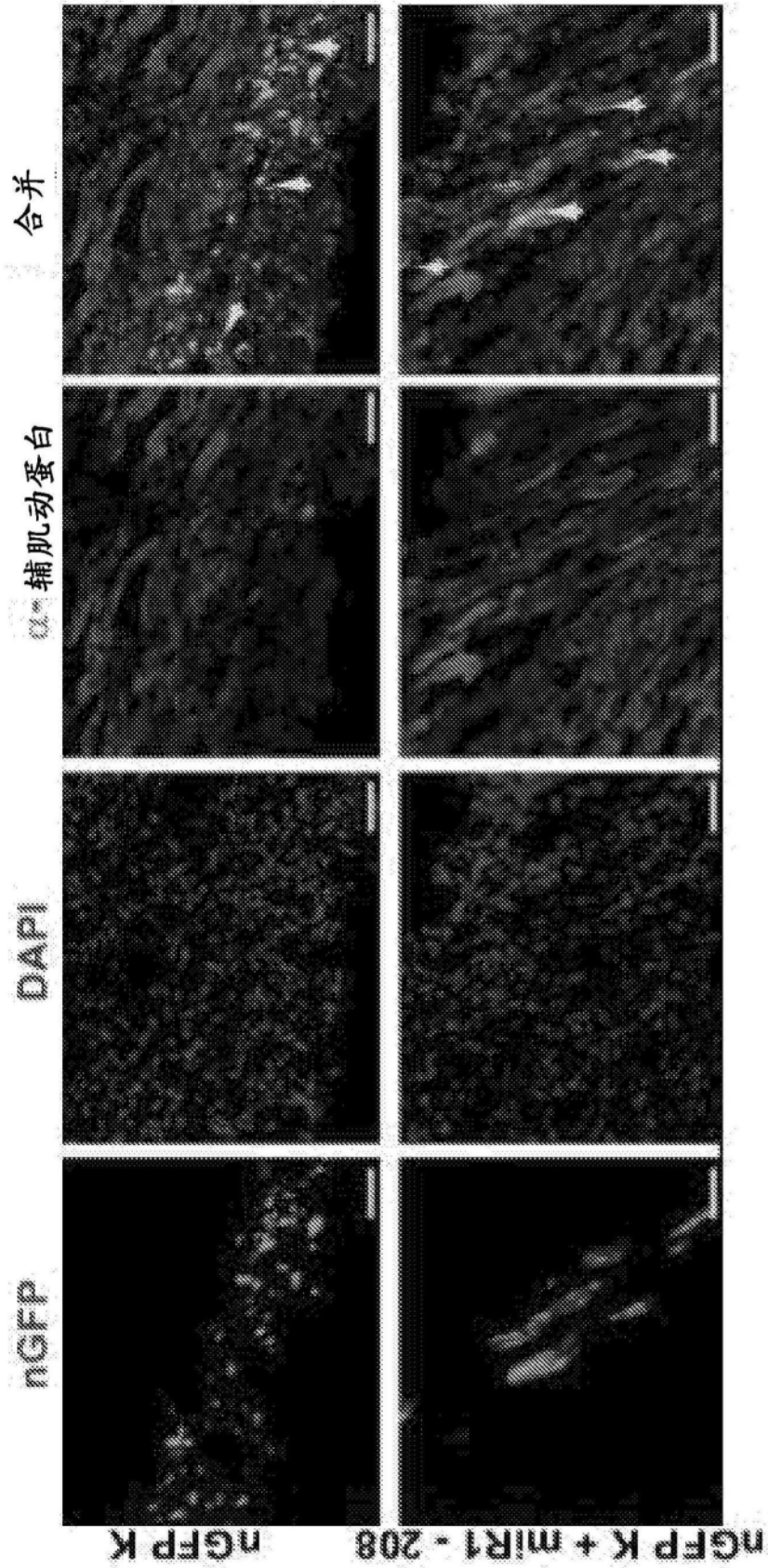


图7E

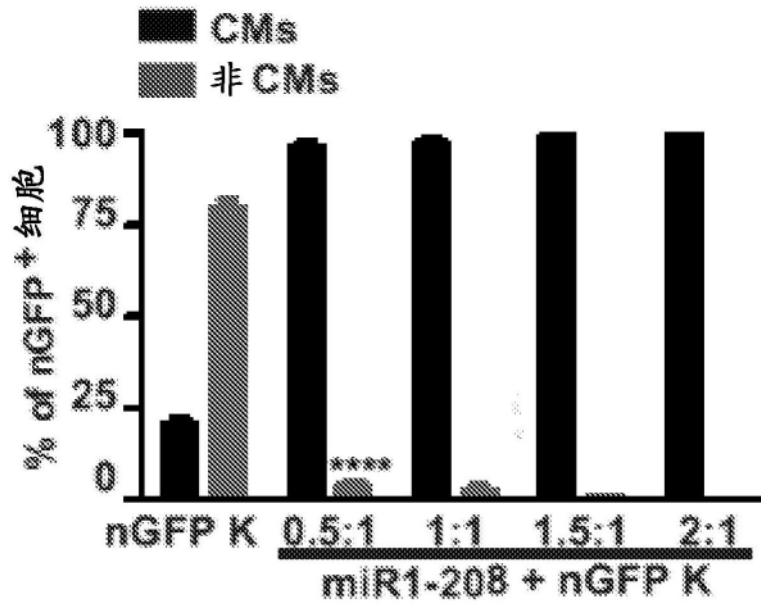


图7F

Cre activated 细胞 / DAPI / 肌钙蛋白 I

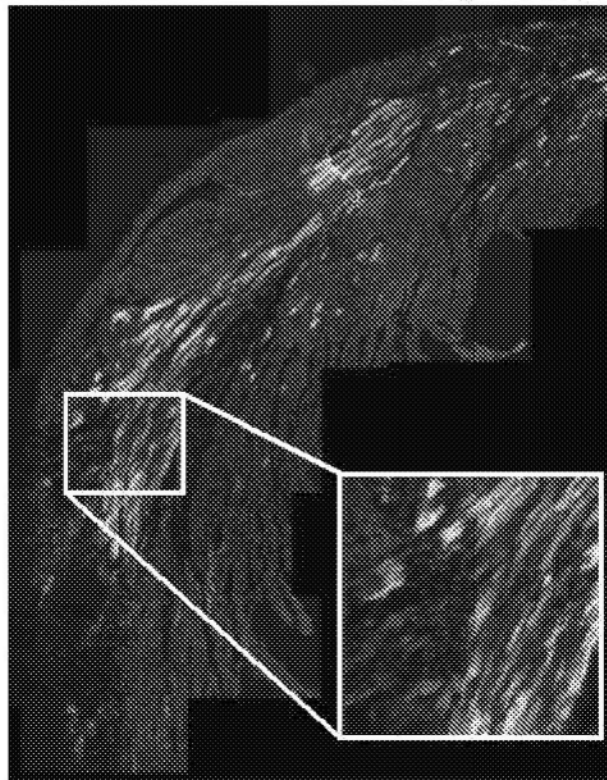


图7G

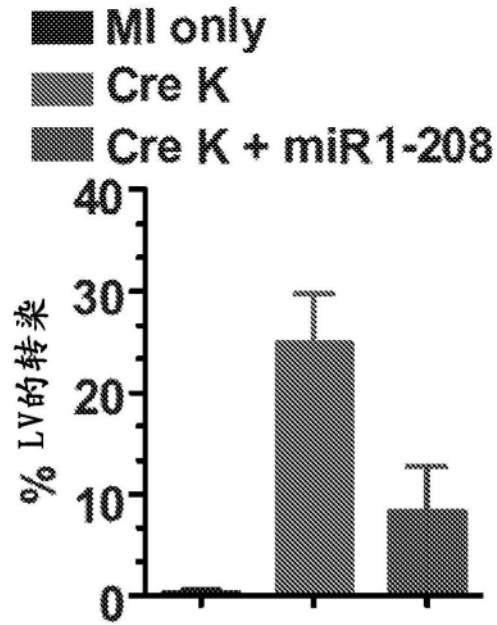
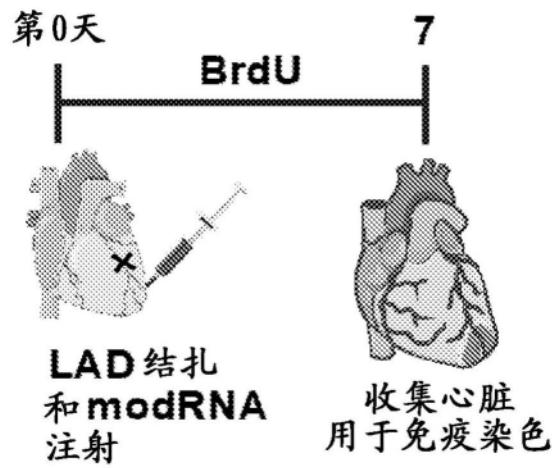


图7H



图例:

- a) Luc K
- b) miR1-208
- c) Luc K + miR1-208
- d) Pkm2 K
- e) Pkm2 + miR1-208
- f) Pkm2 K + miR1-208

图7I

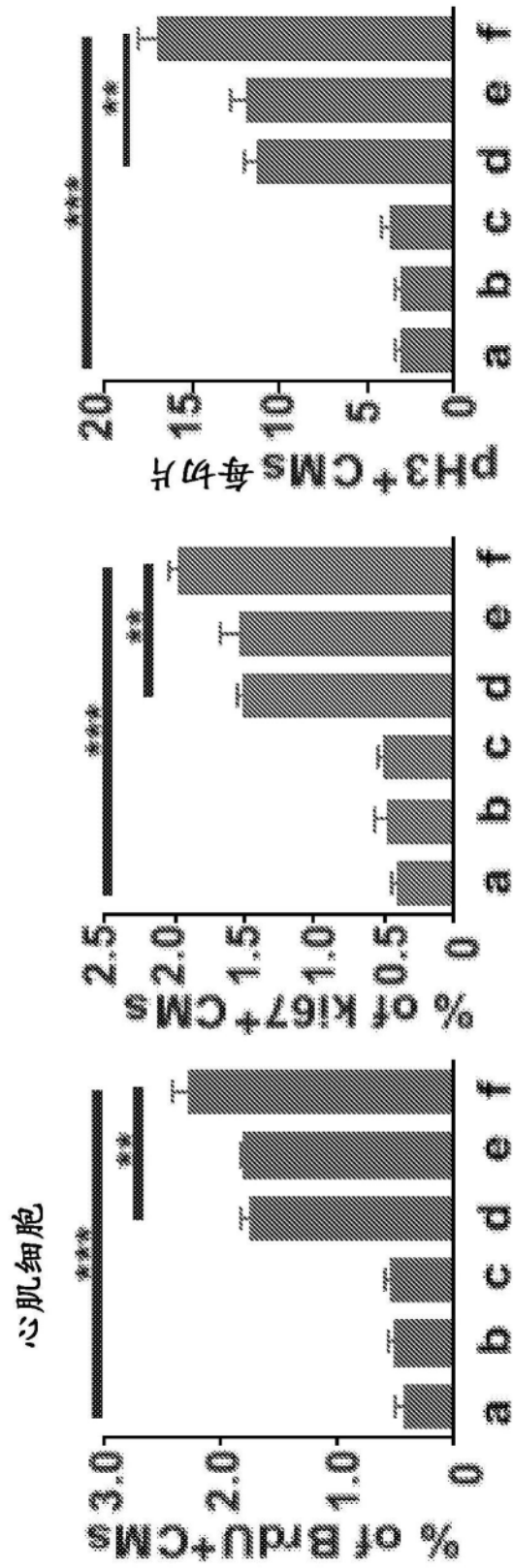


图7J



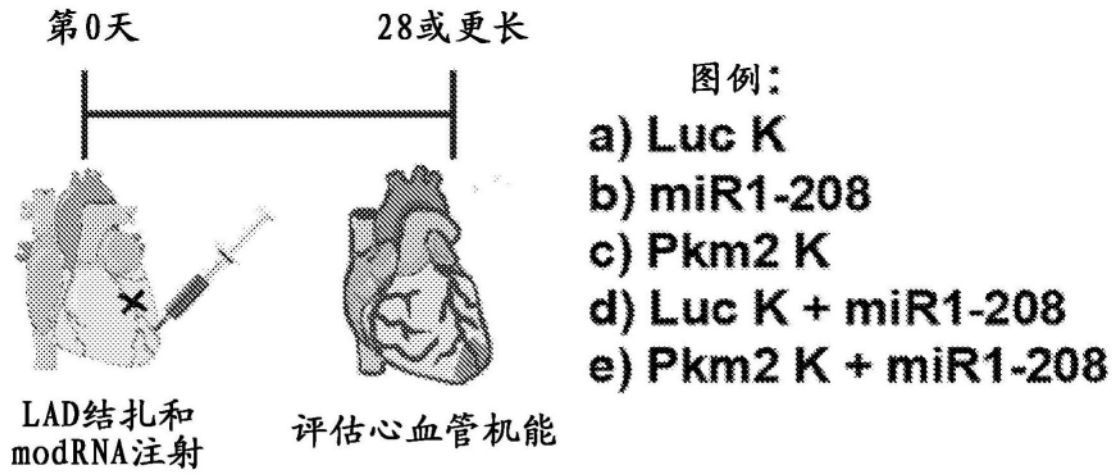


图8A

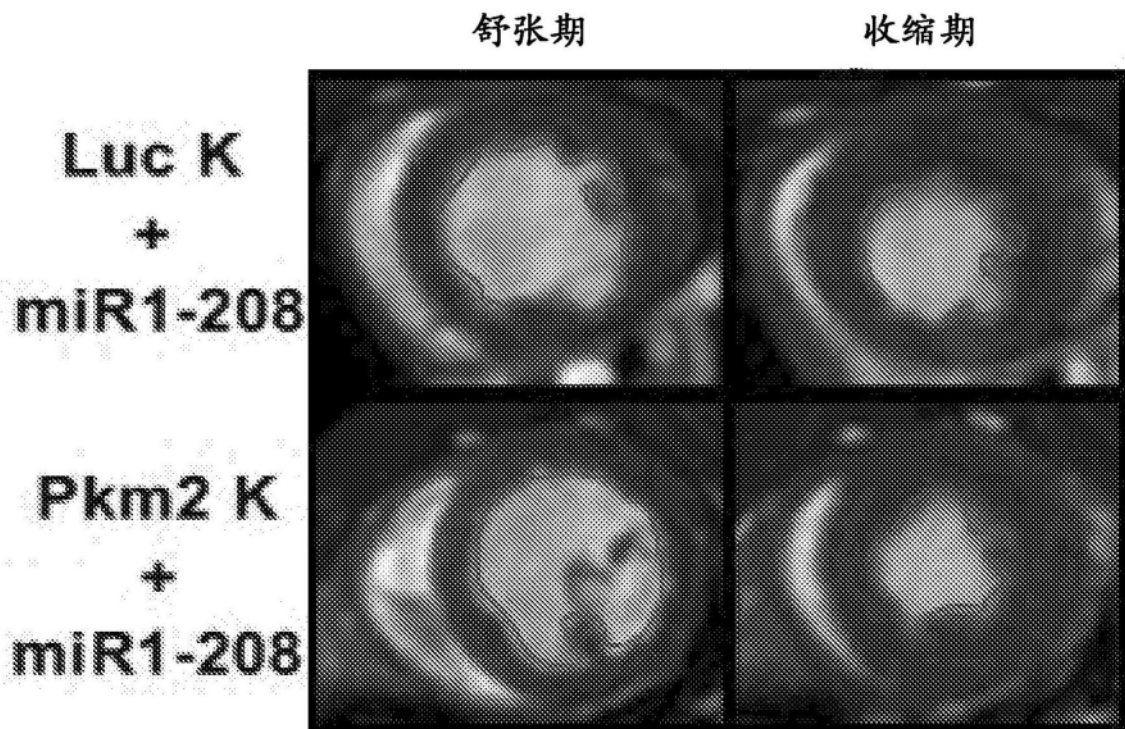


图8B

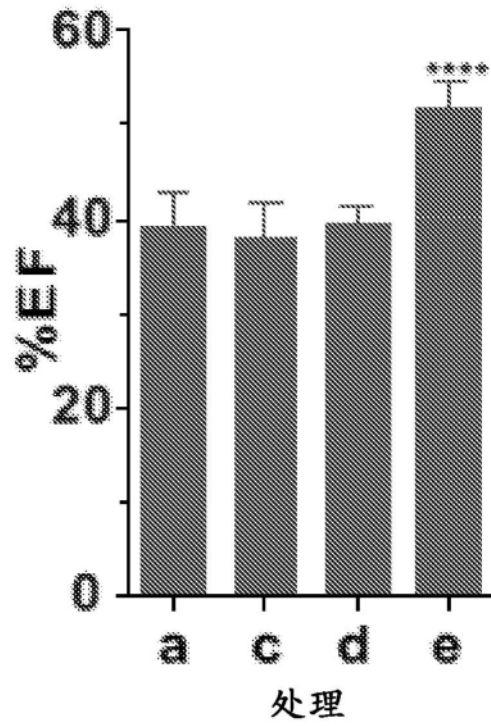


图8C

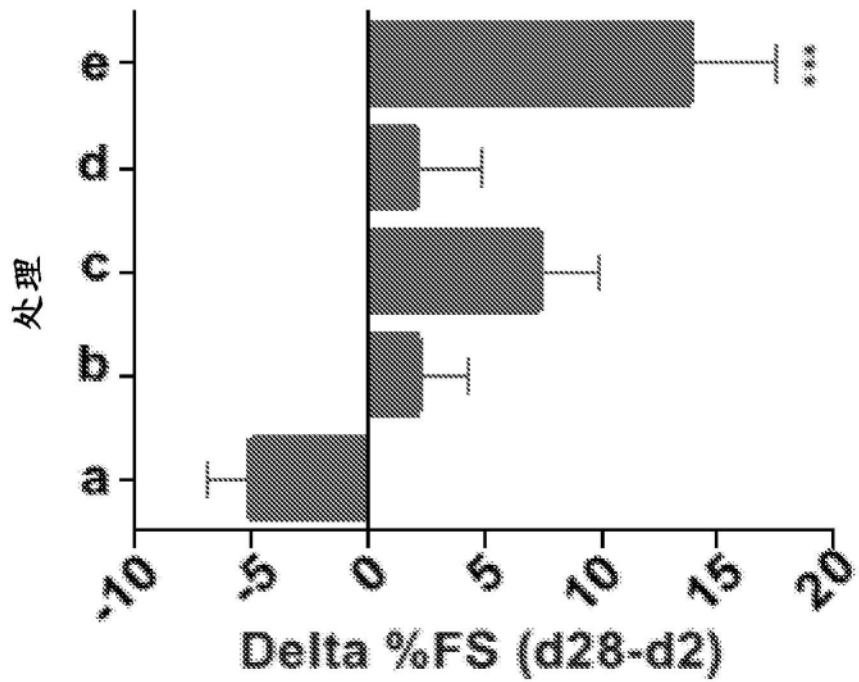


图8D

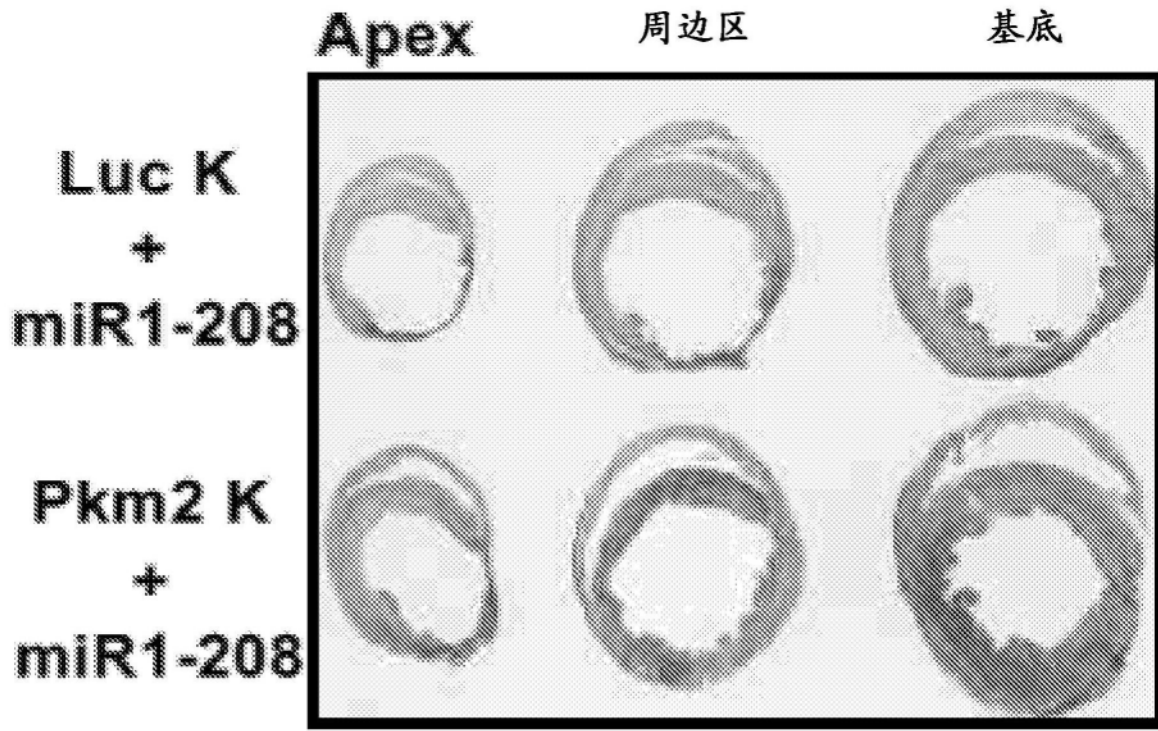


图8E

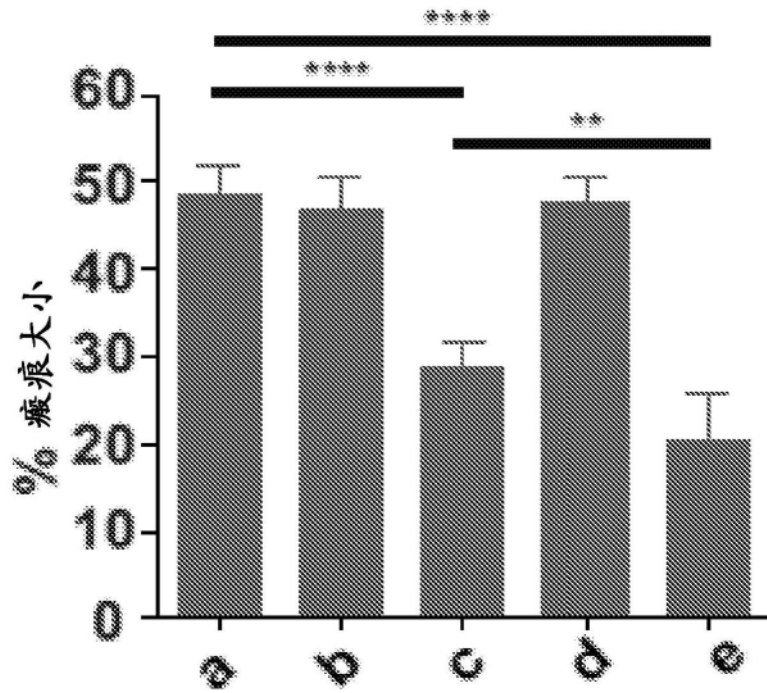


图8F

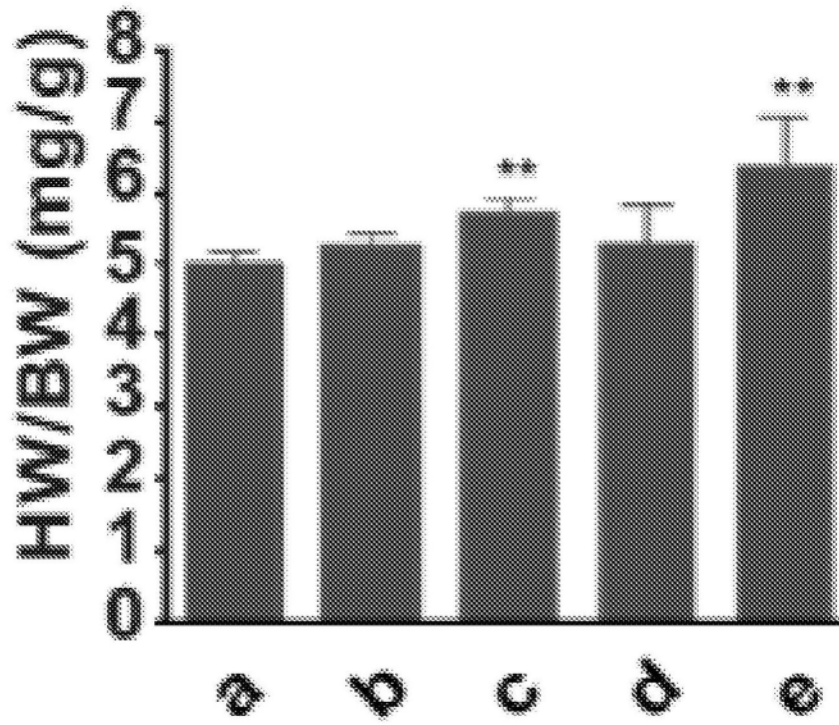


图8G

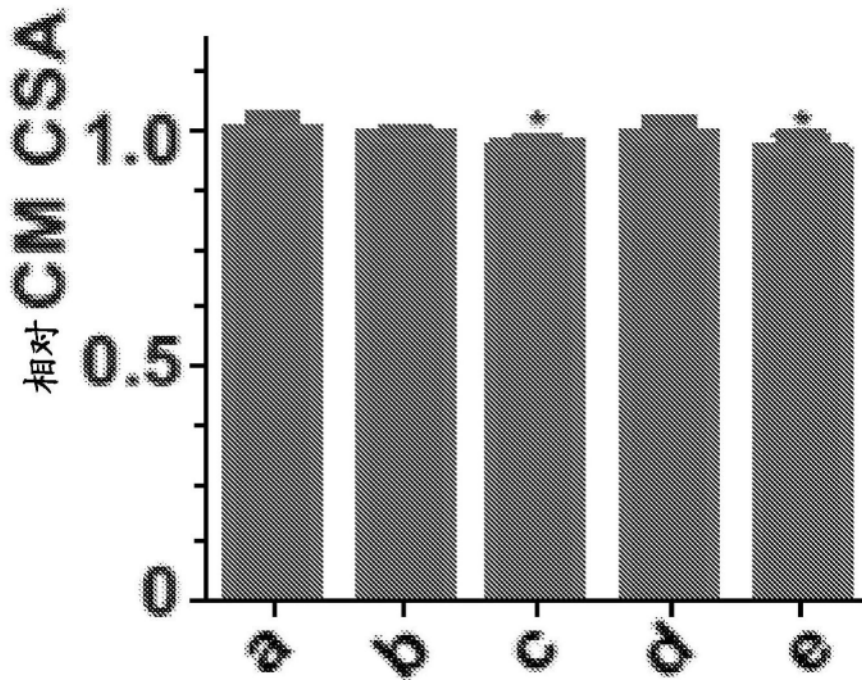


图8H

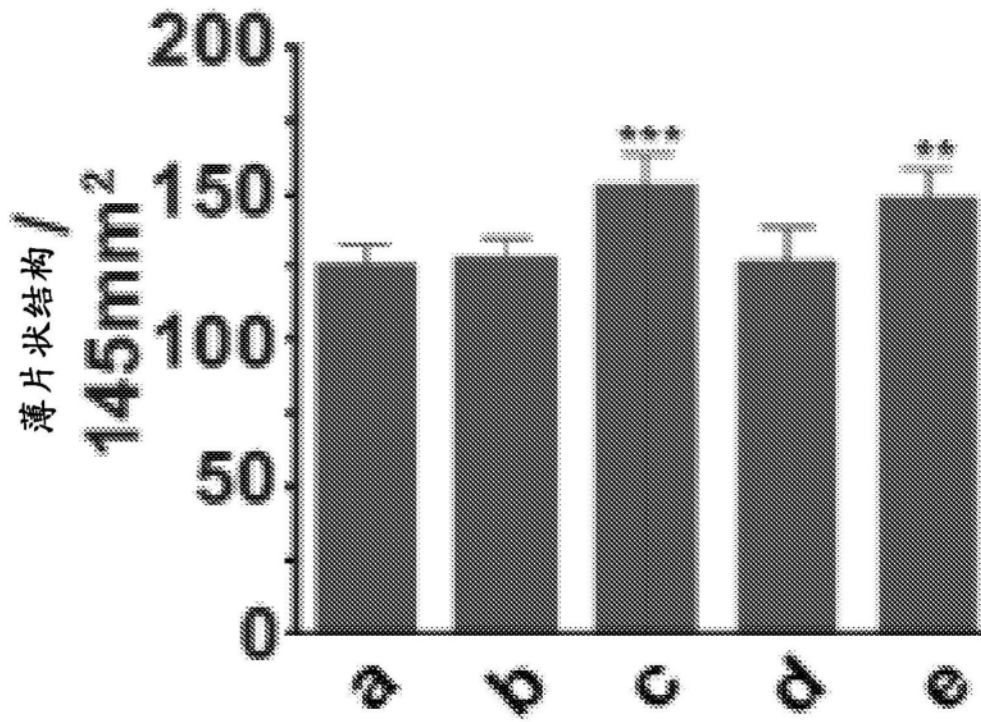


图8I

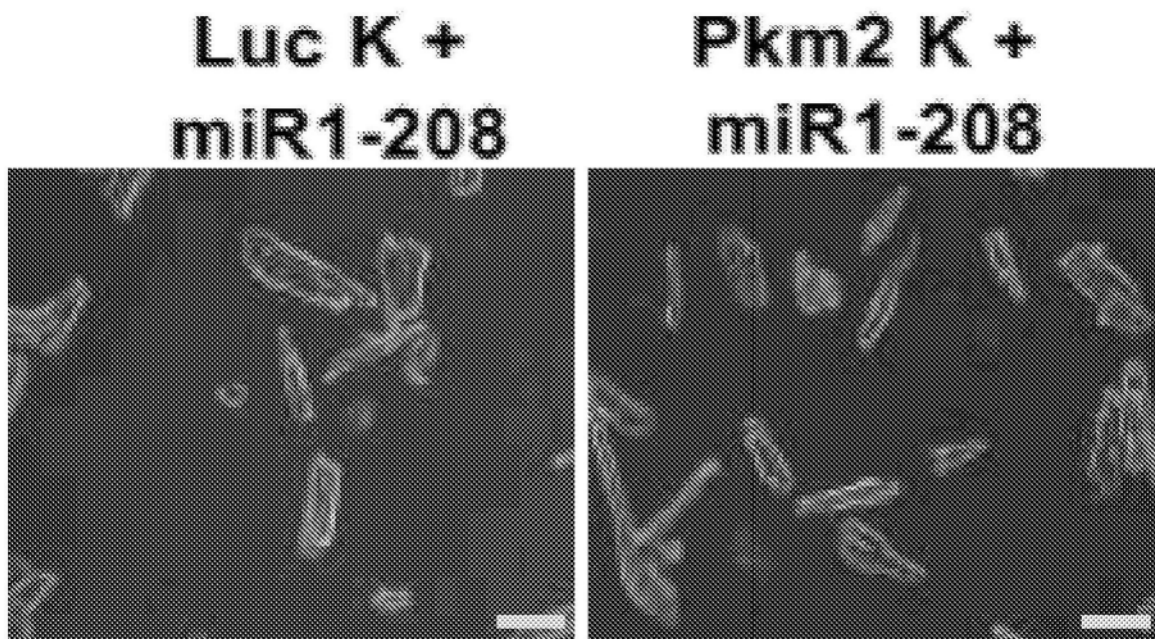


图8J

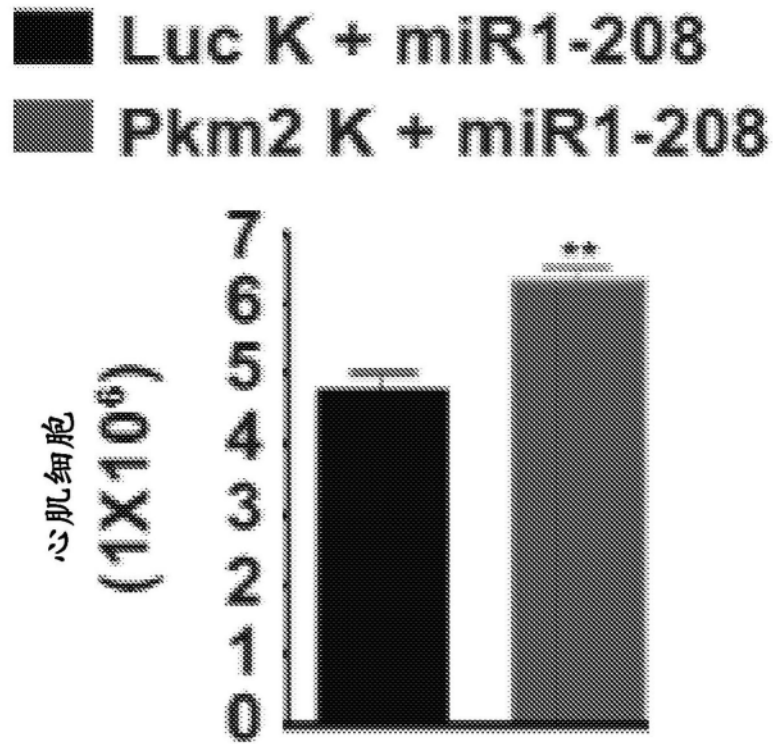


图8K

成核作用

辅肌动蛋白 / DAPI

单

双

多

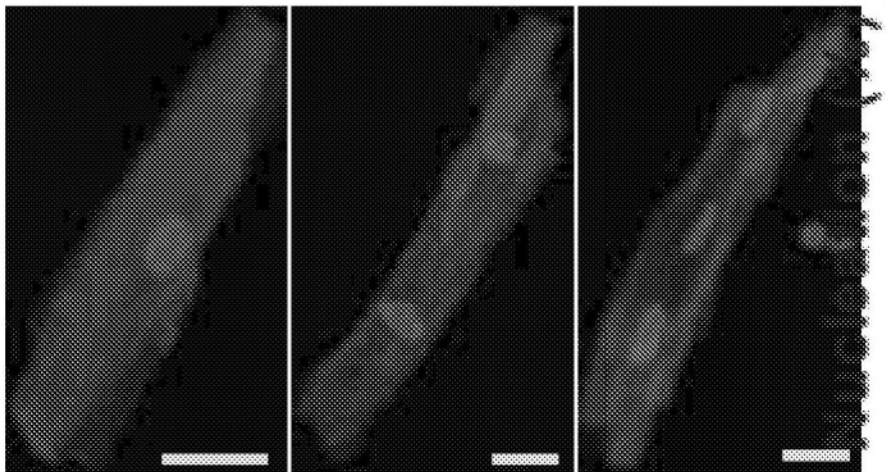


图8L

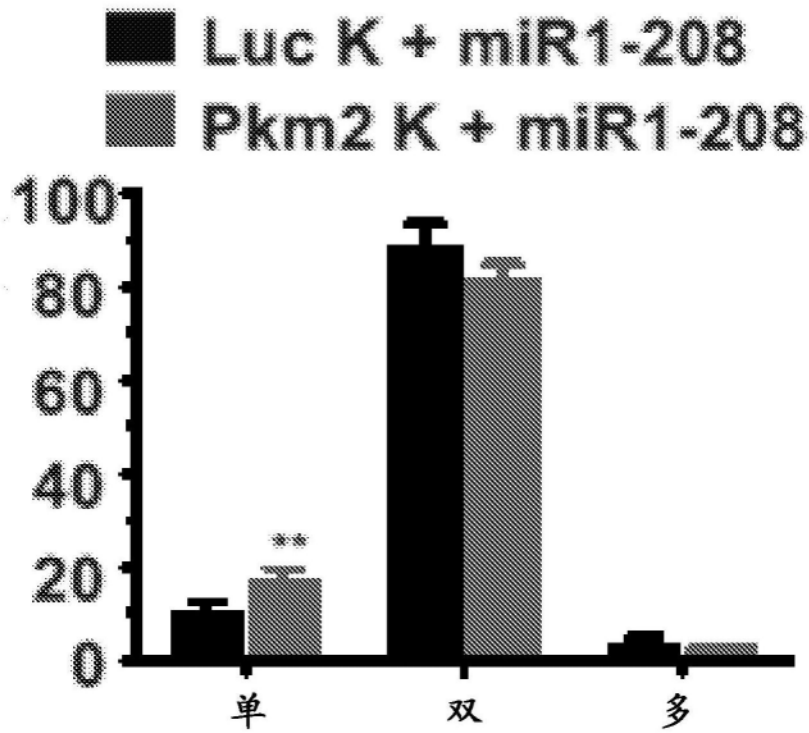


图8M

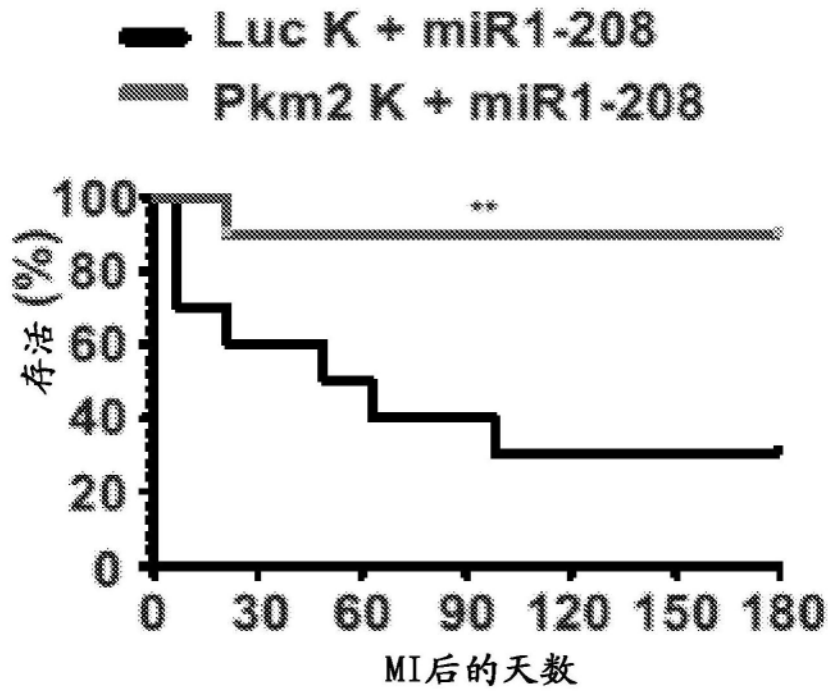


图8N

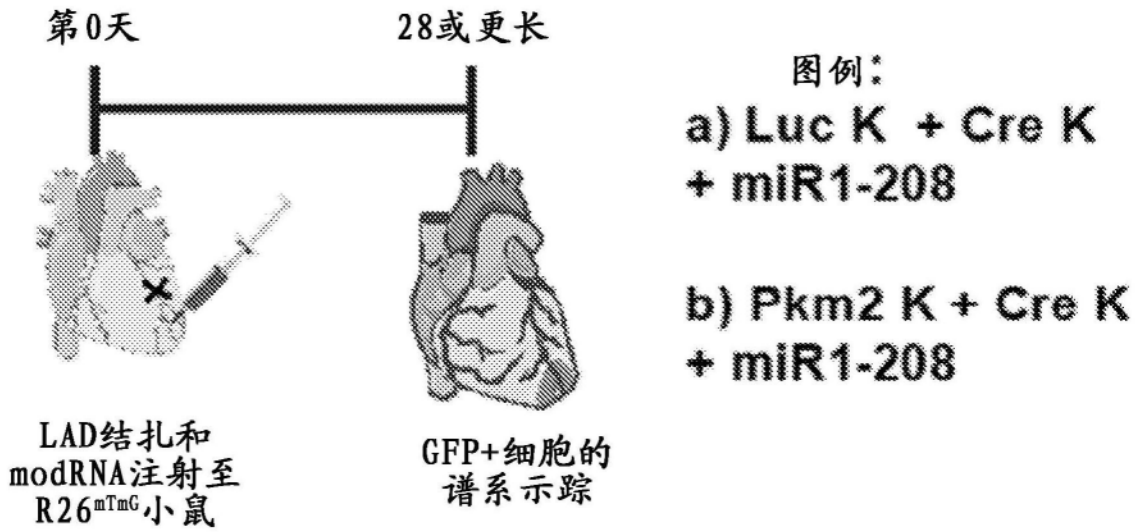


图9A

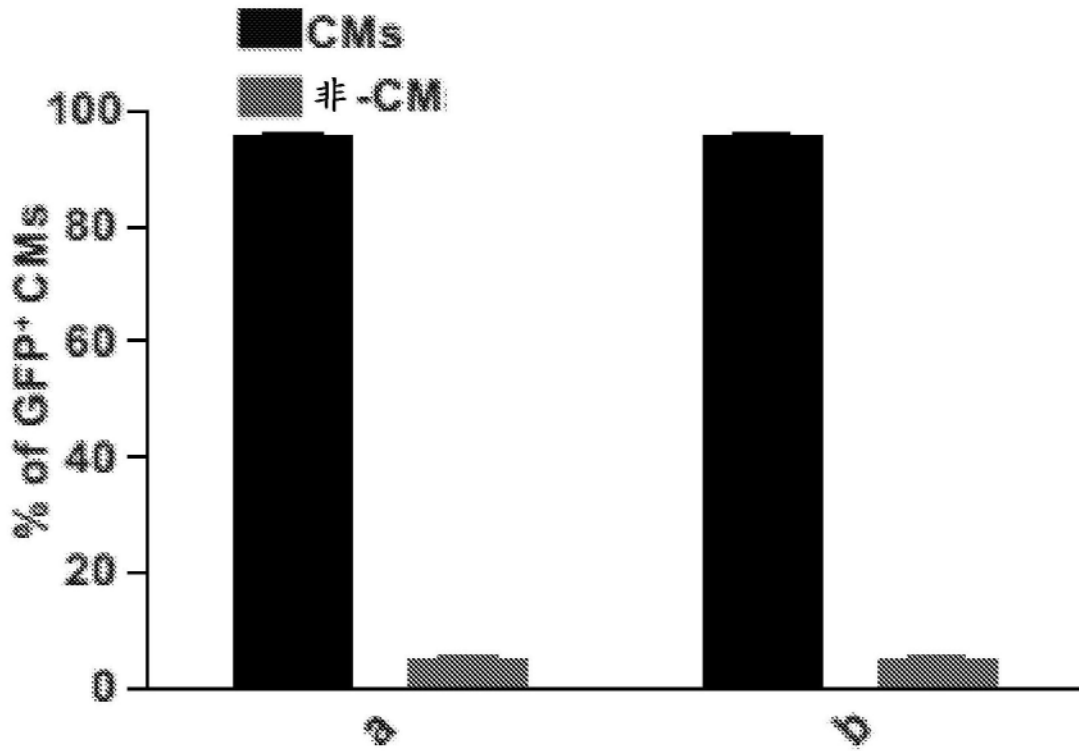


图9B

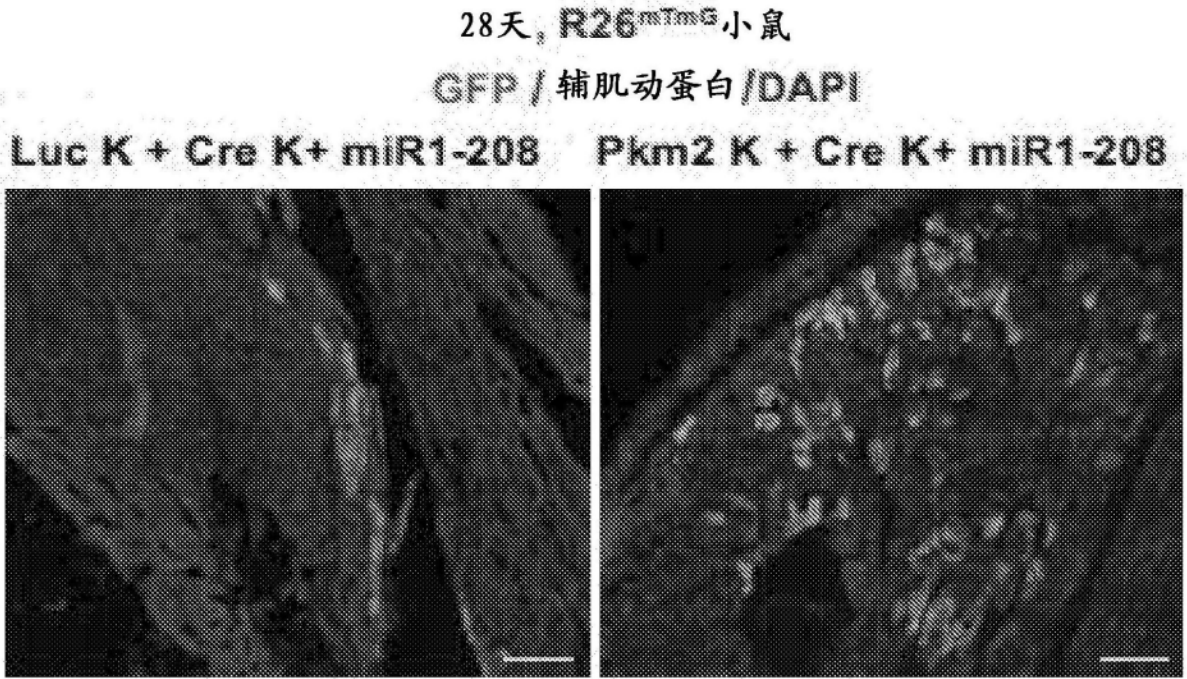


图9C

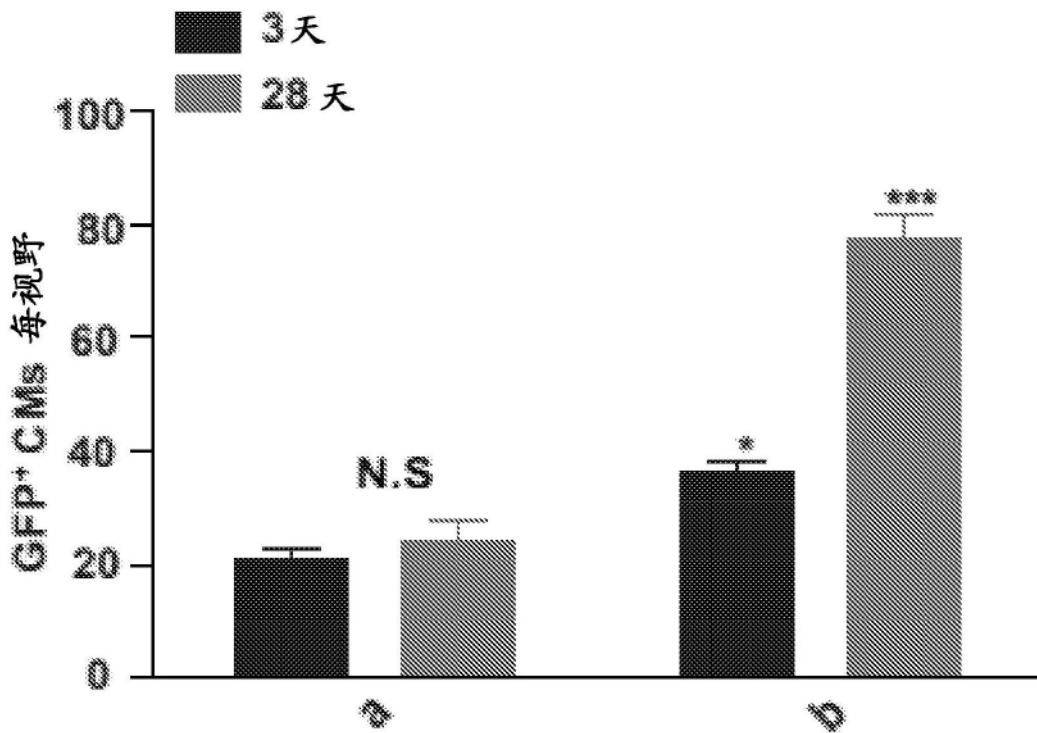


图9D

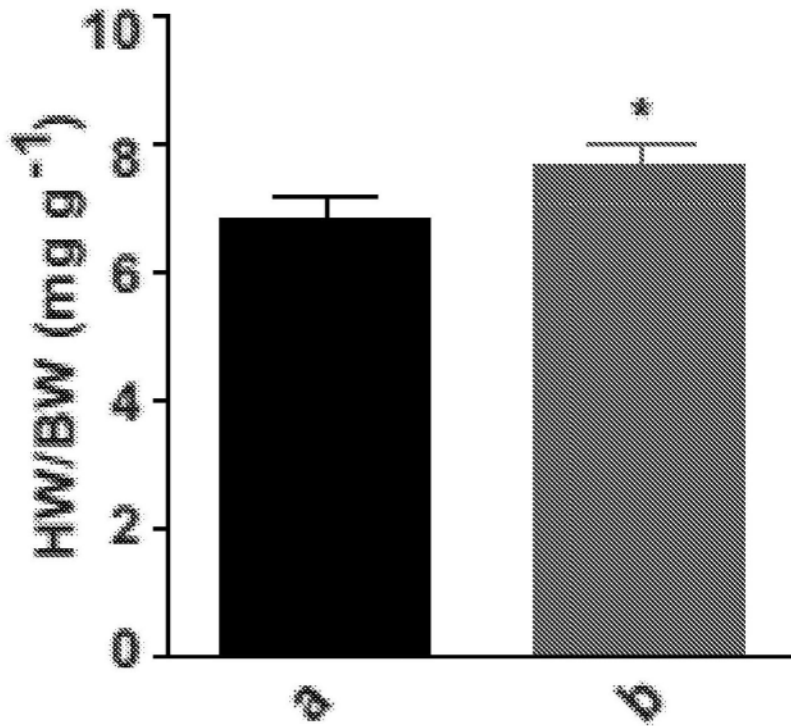


图9E

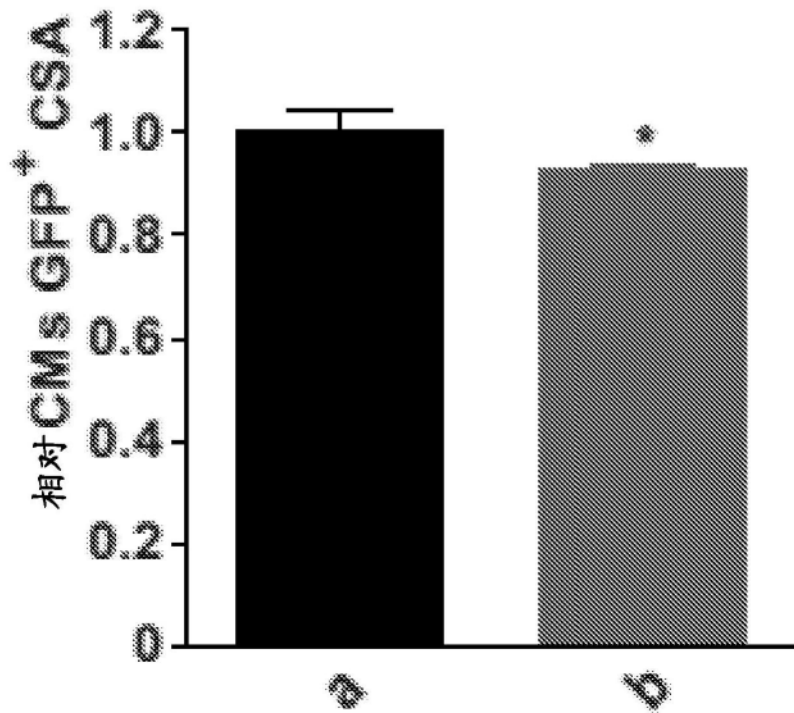


图9F

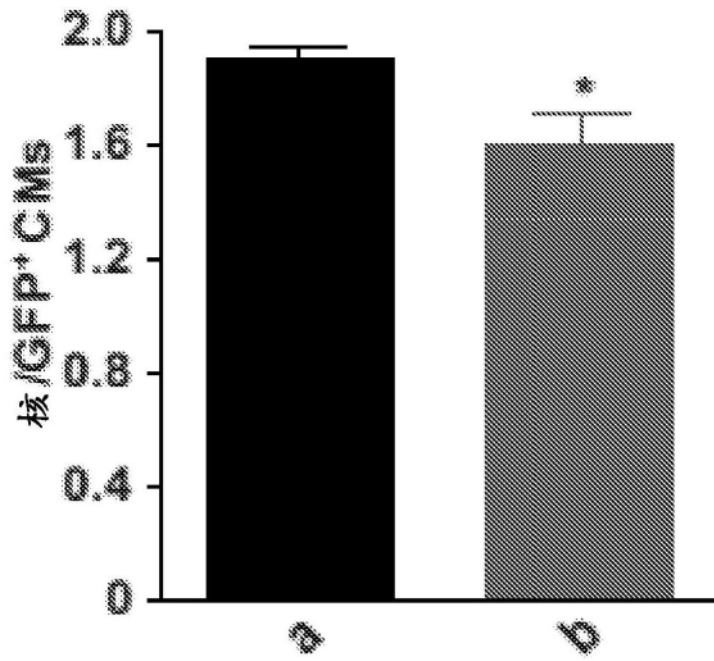


图9G

GFP / 增殖标记物 / DAPI

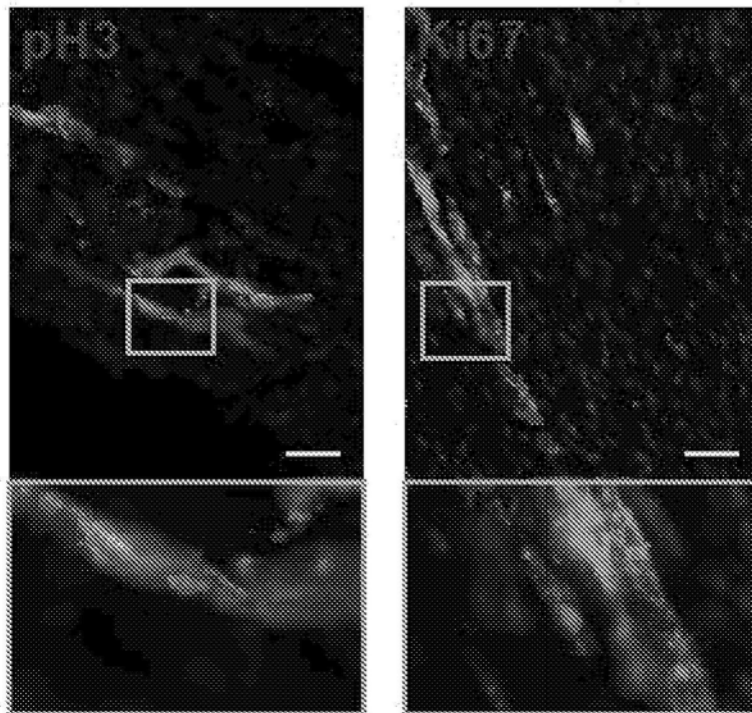


图9H

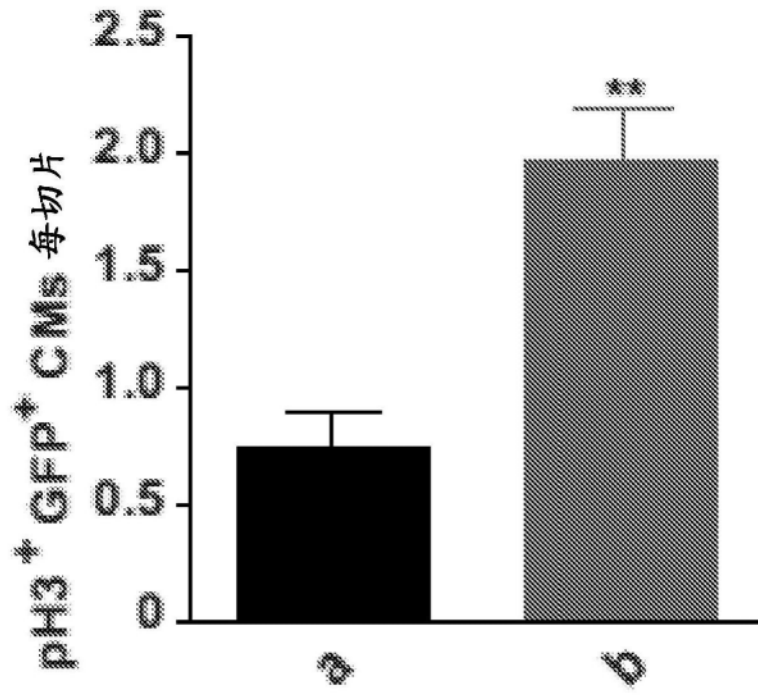


图9I

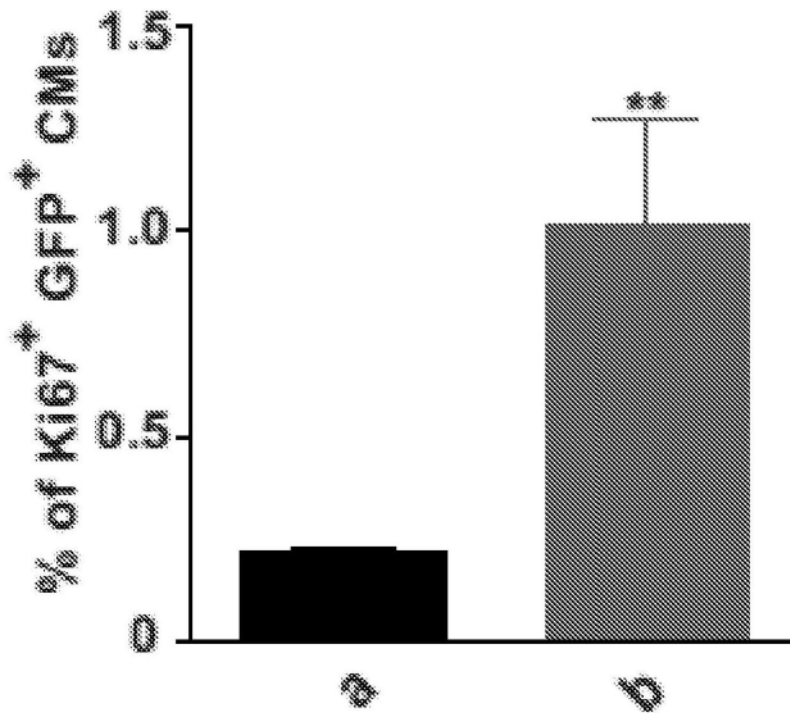


图9J

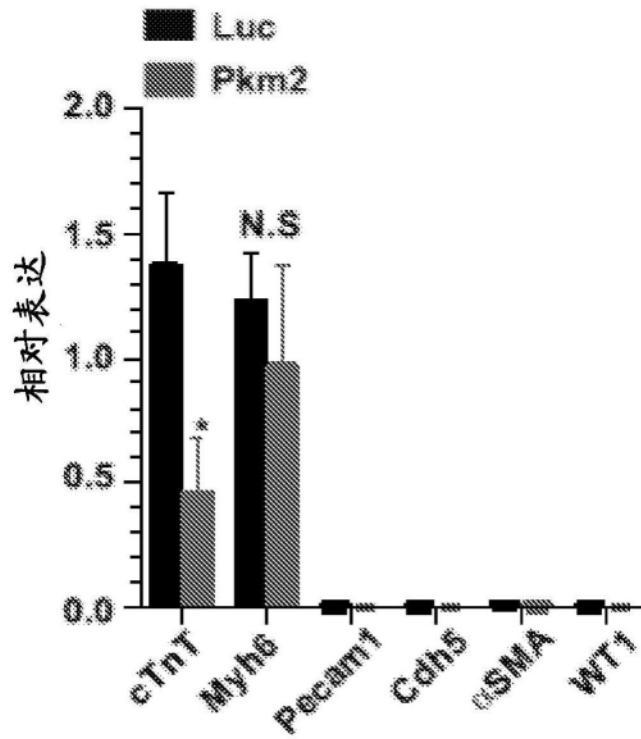


图9K

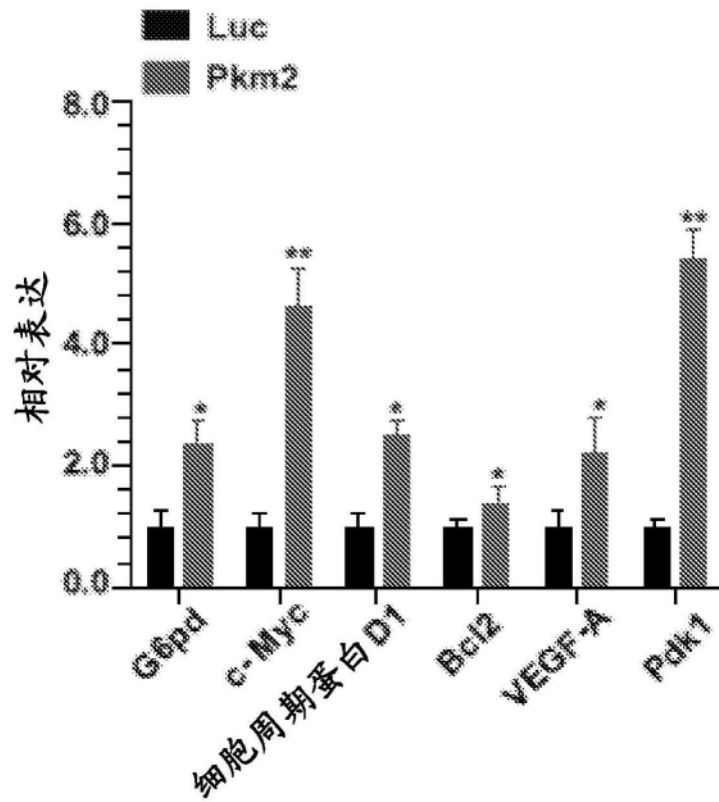


图9L

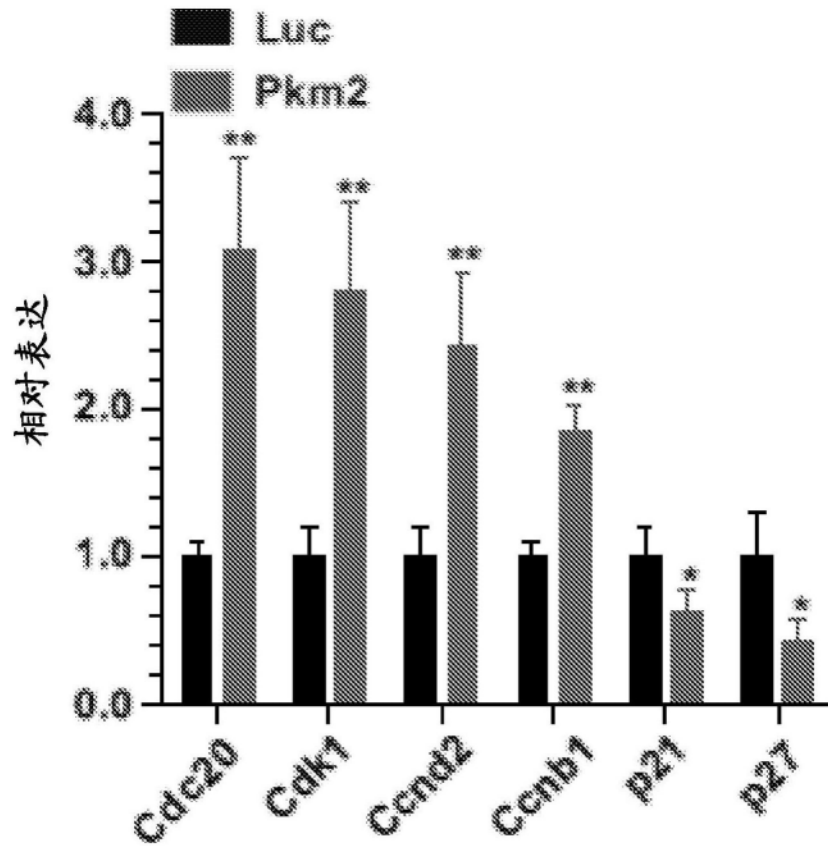


图9M

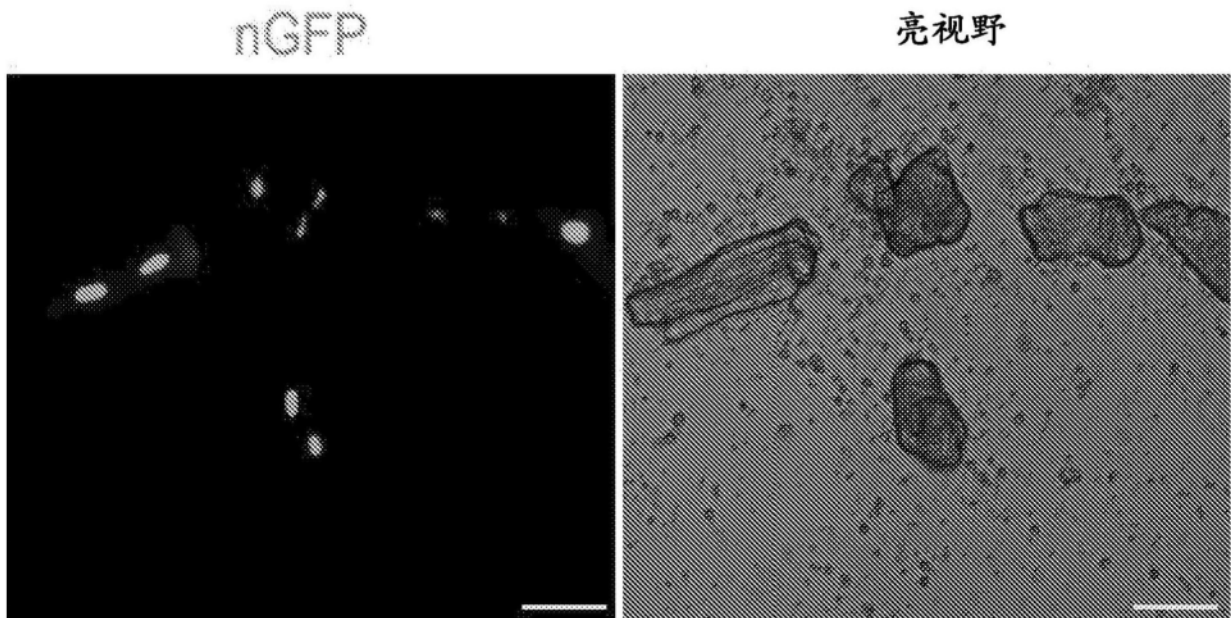


图10A

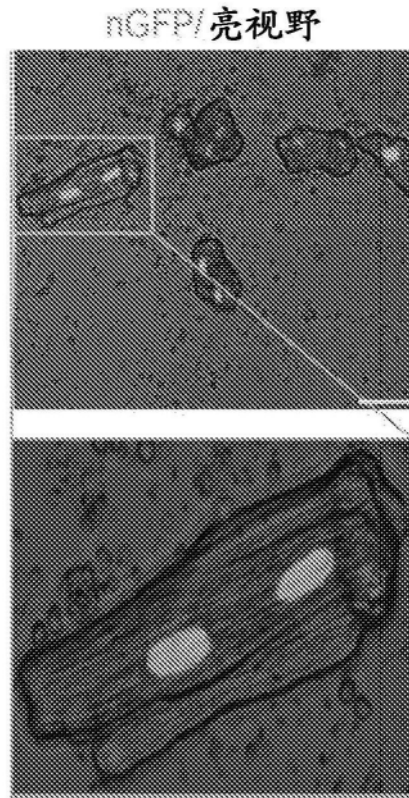


图10B

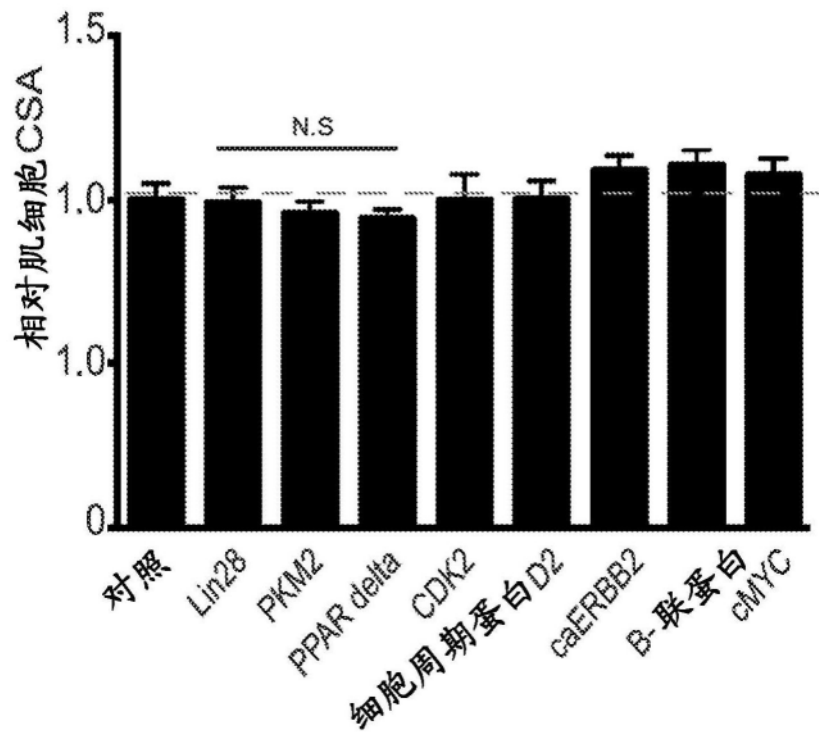


图11

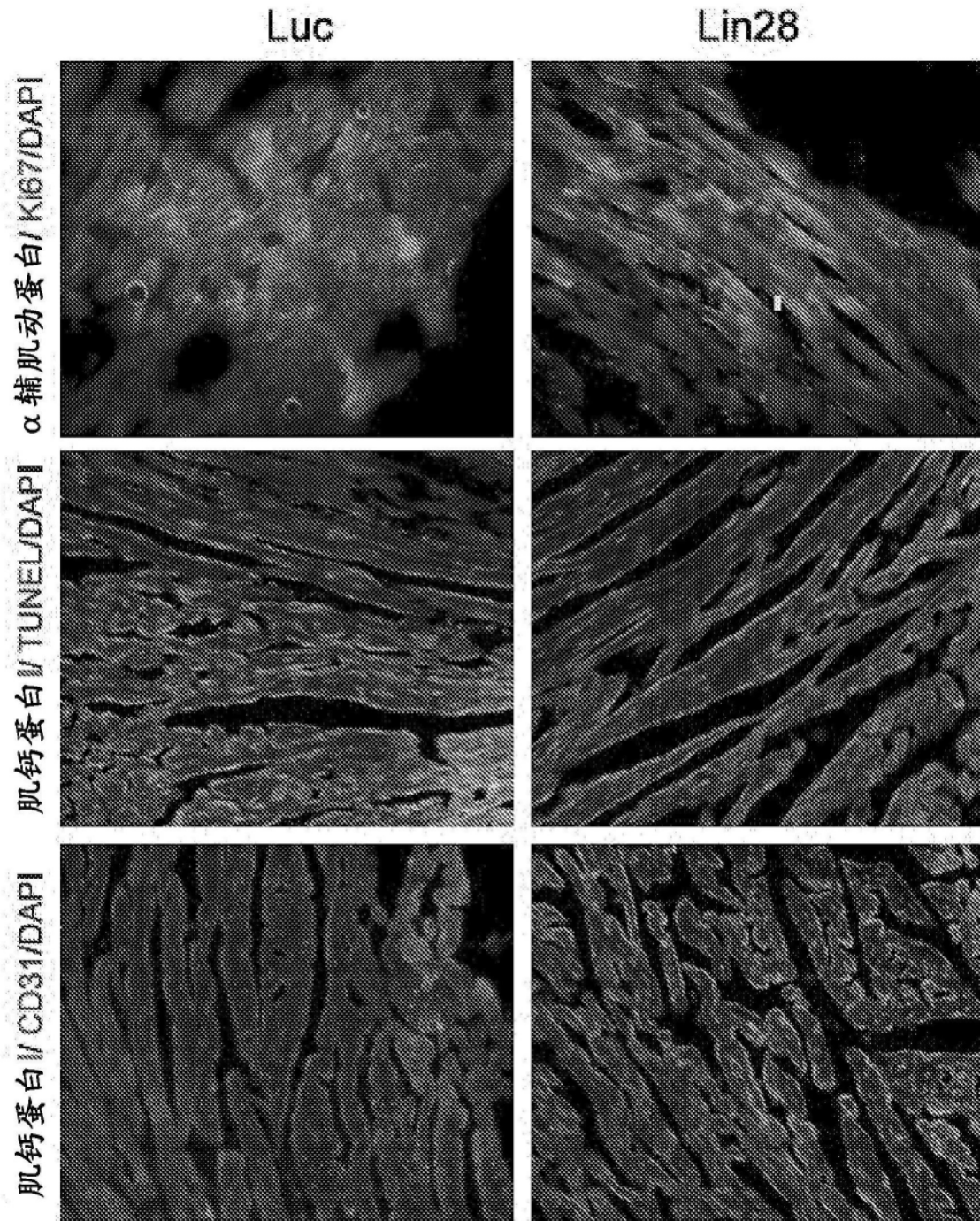


图12A

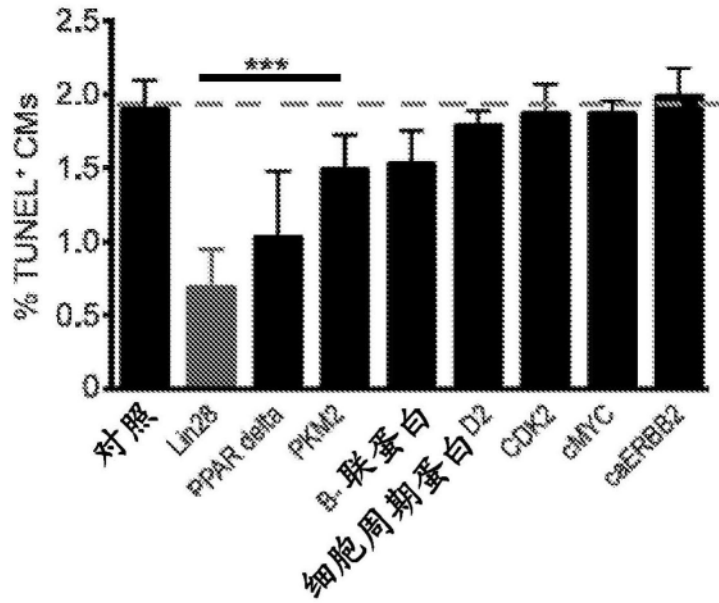


图12B

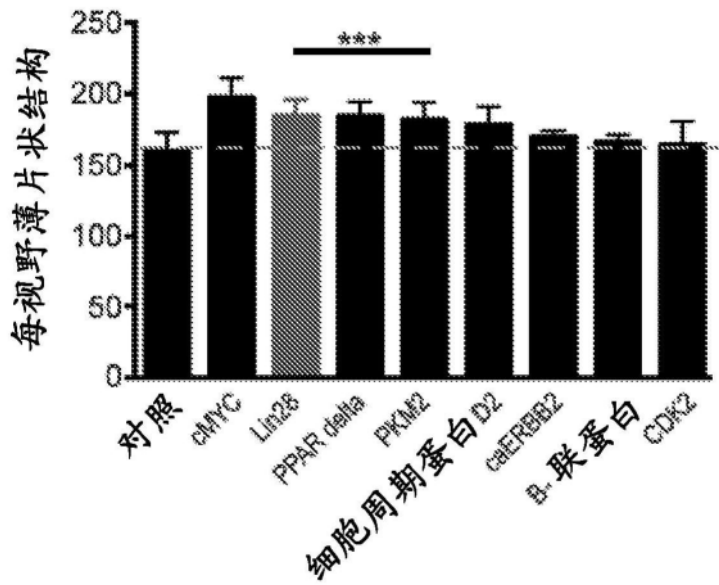


图12C



图13A

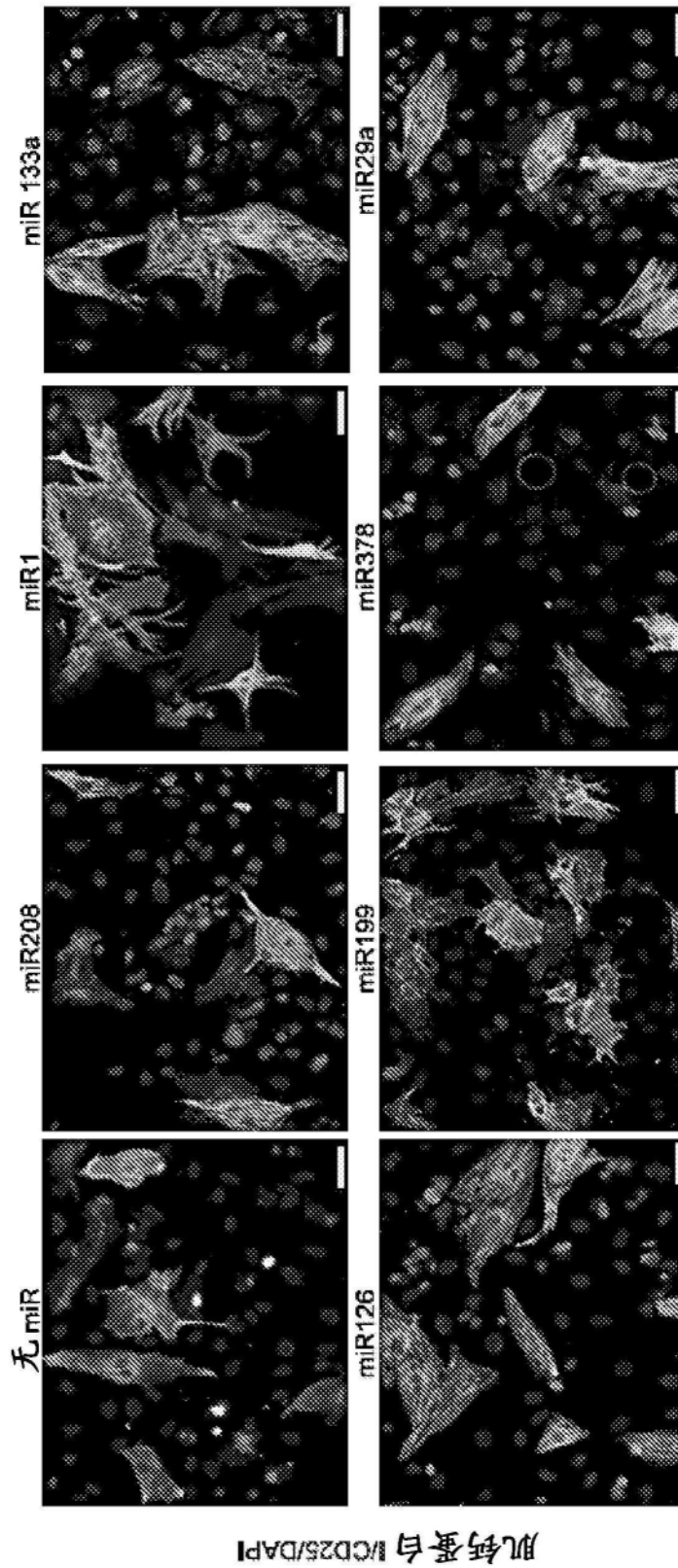


图13B

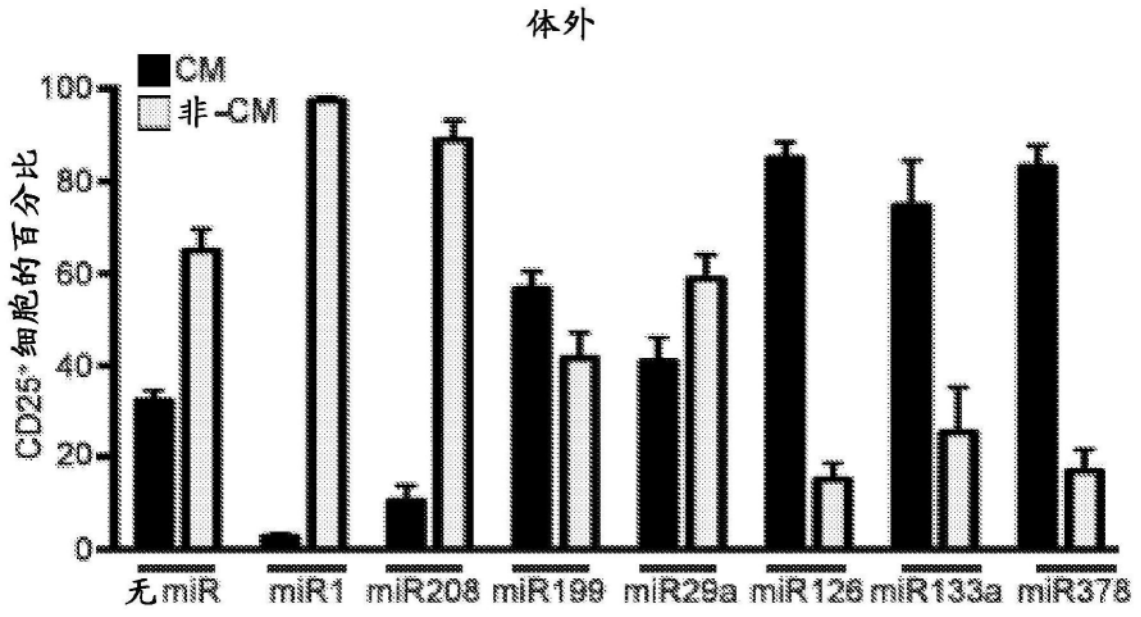


图13C

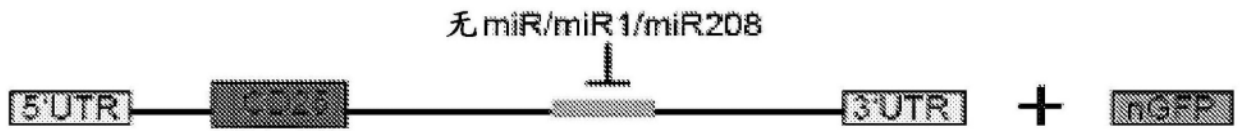


图14A

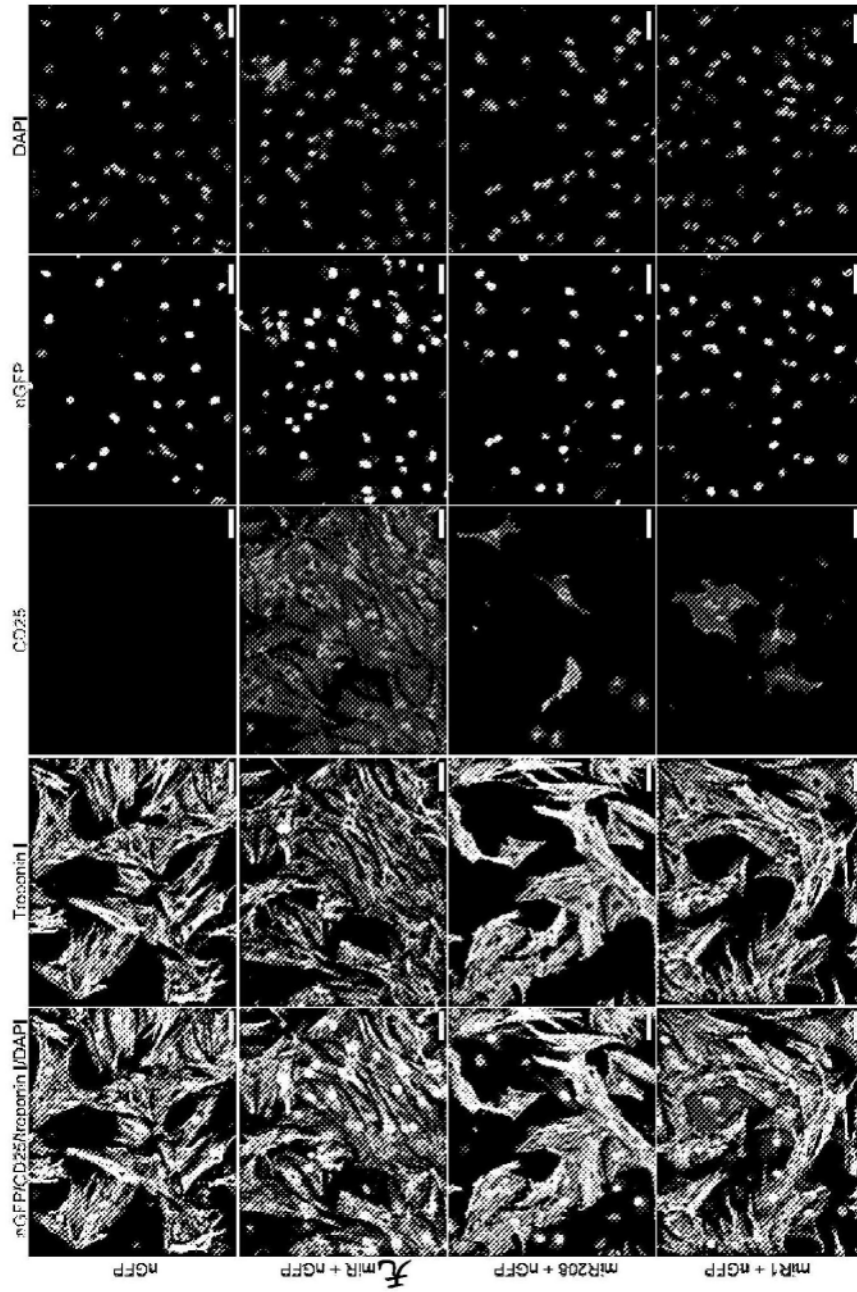


图14B

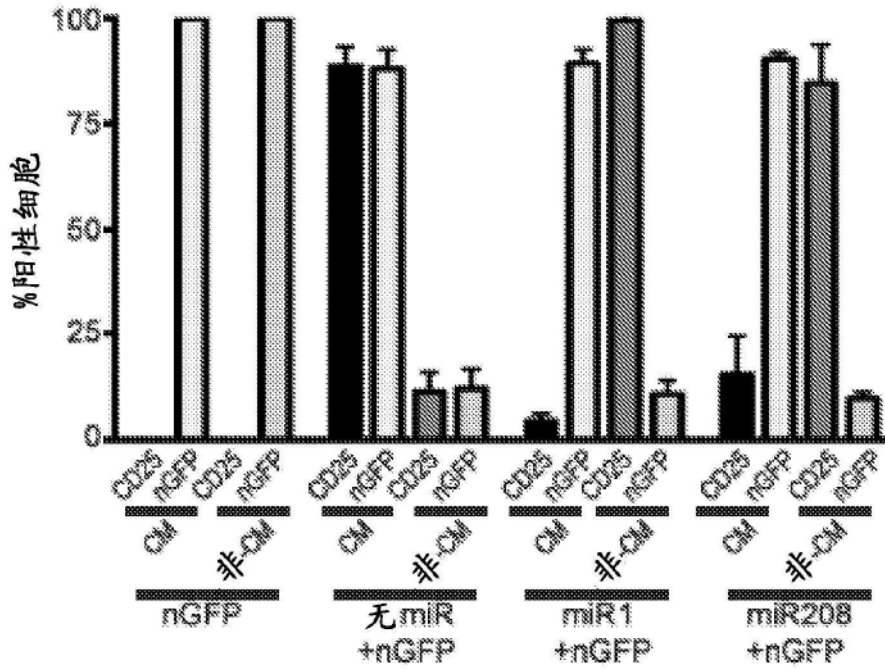


图14C

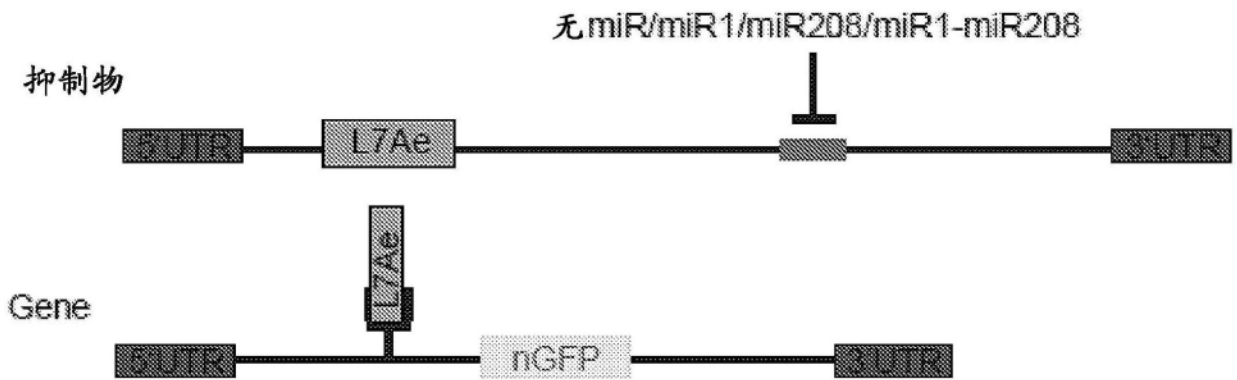


图15A

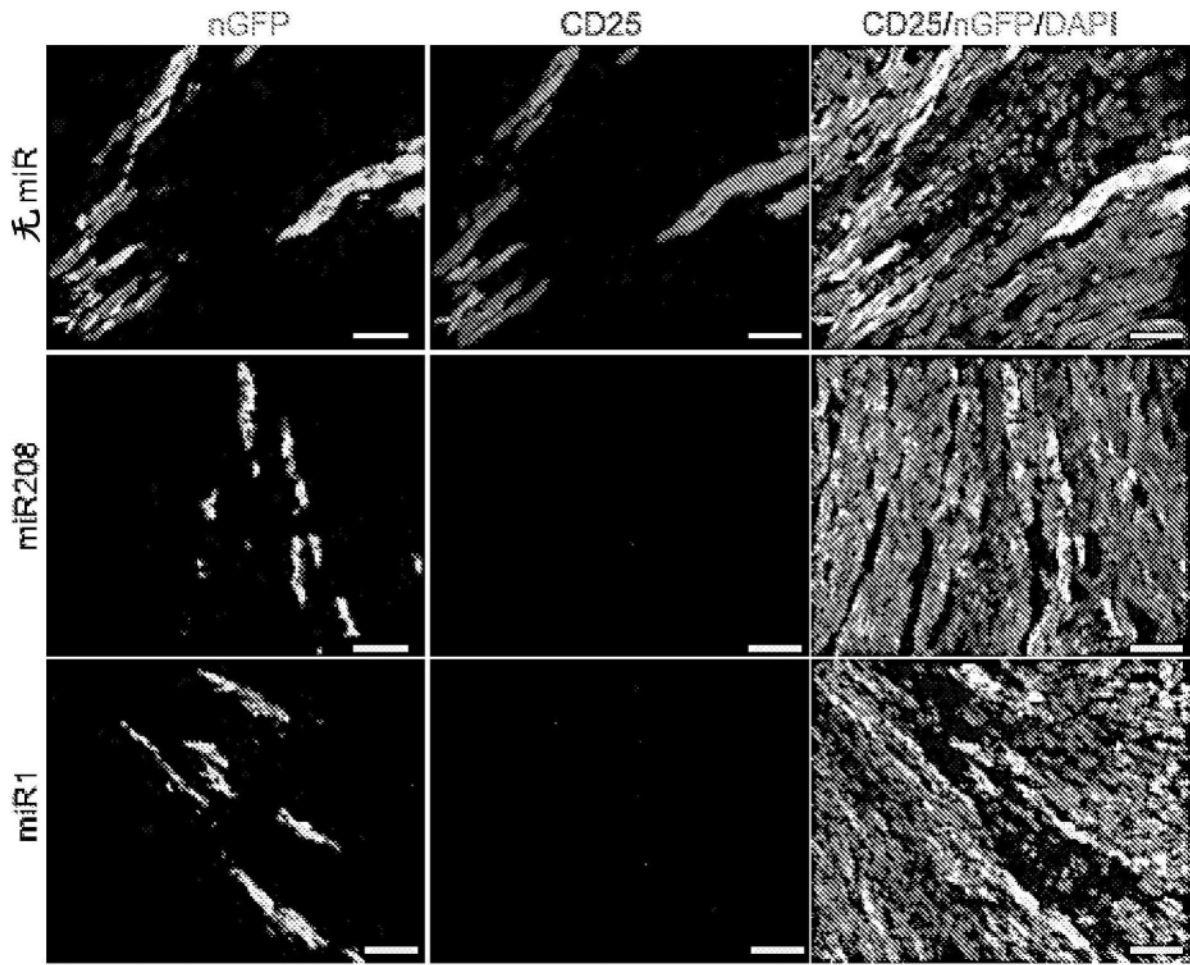


图15B

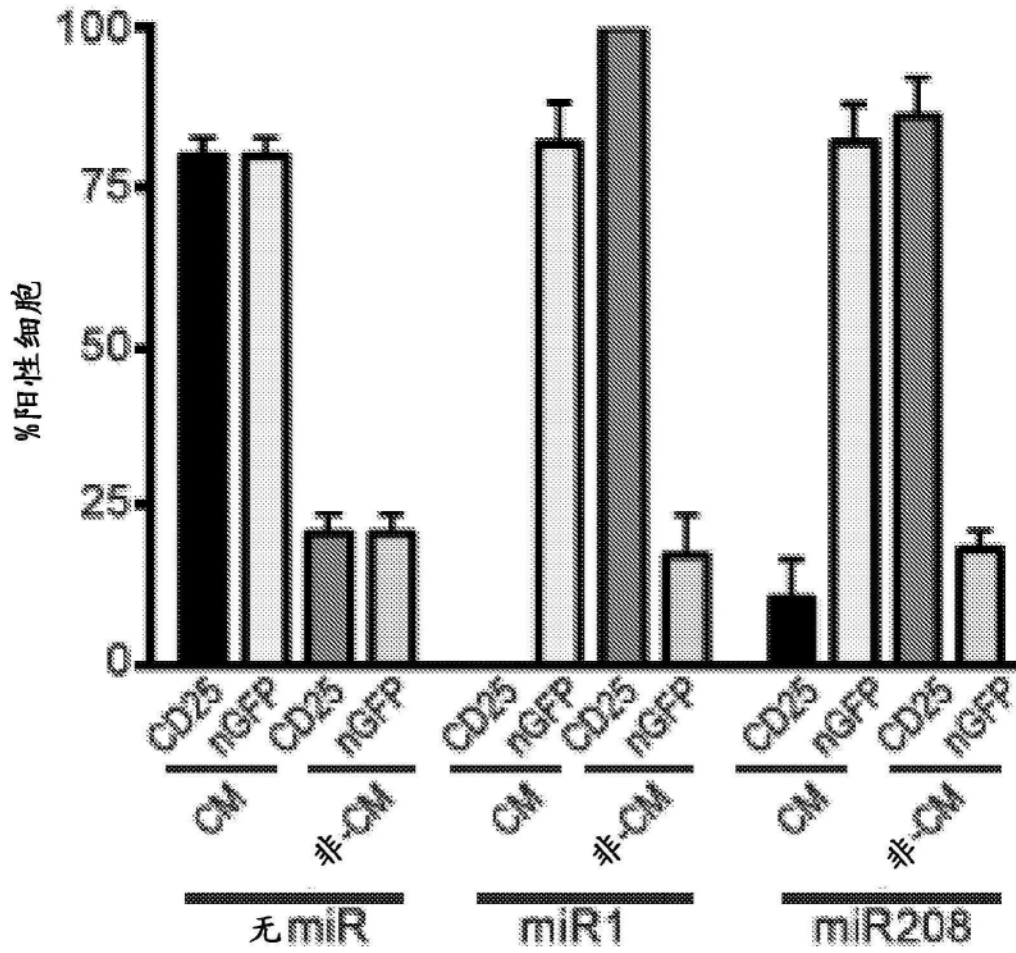


图15C

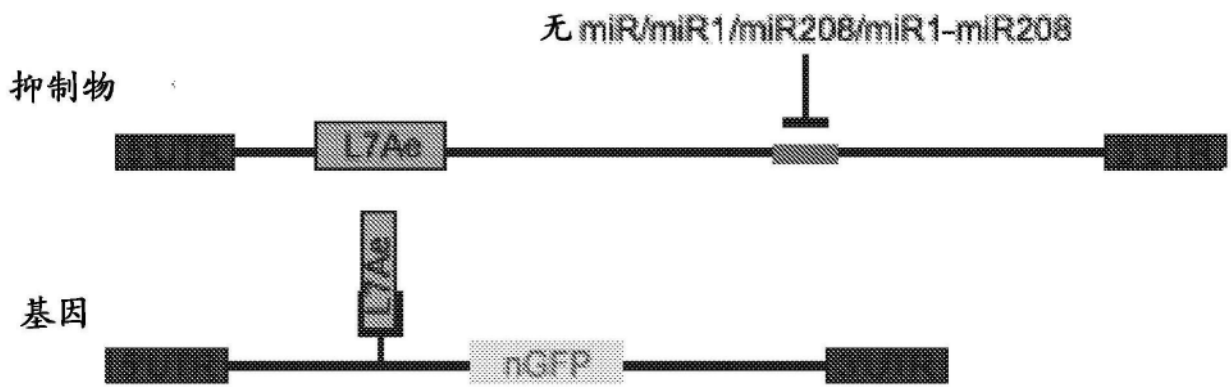


图16A

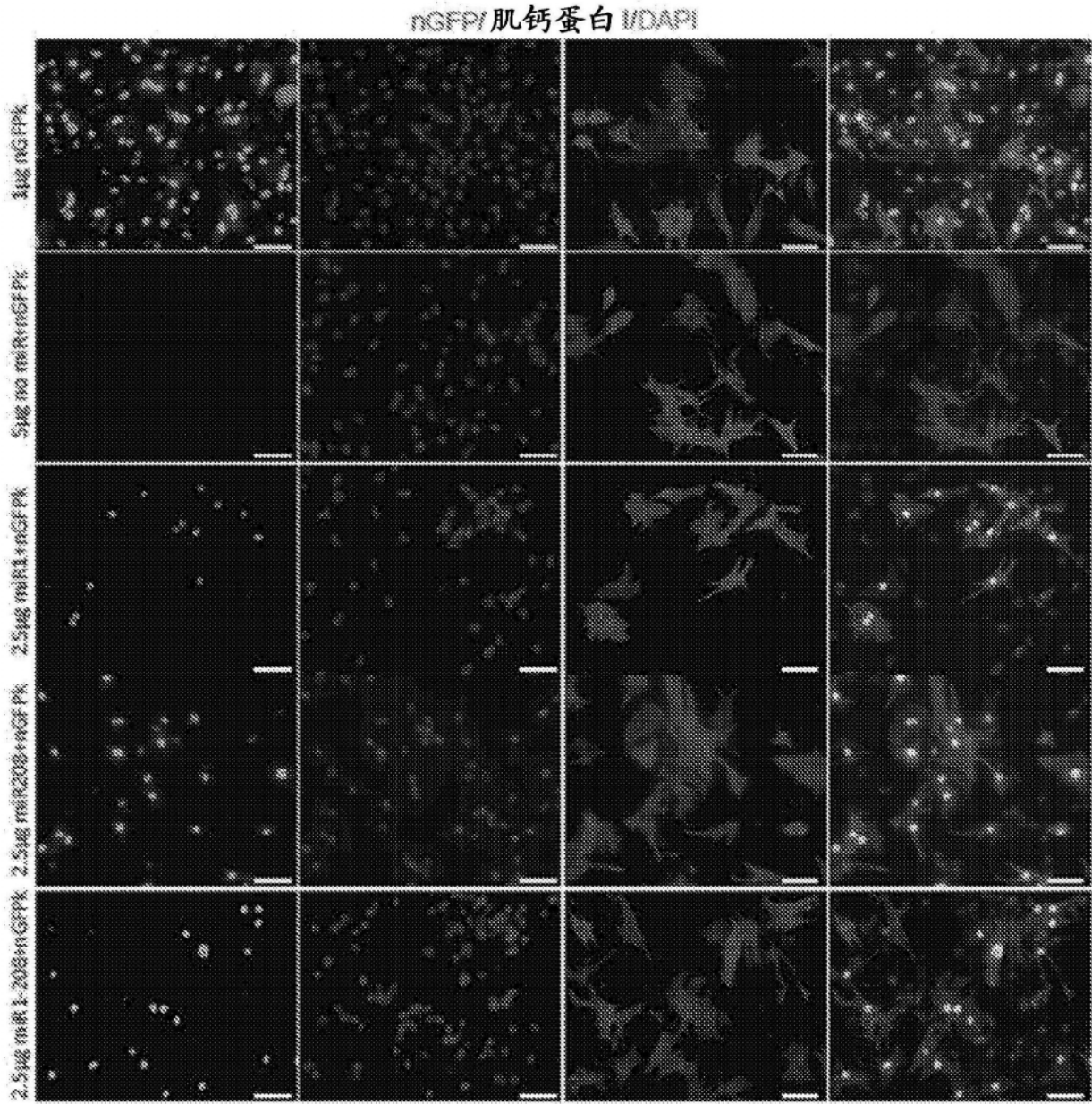


图16B

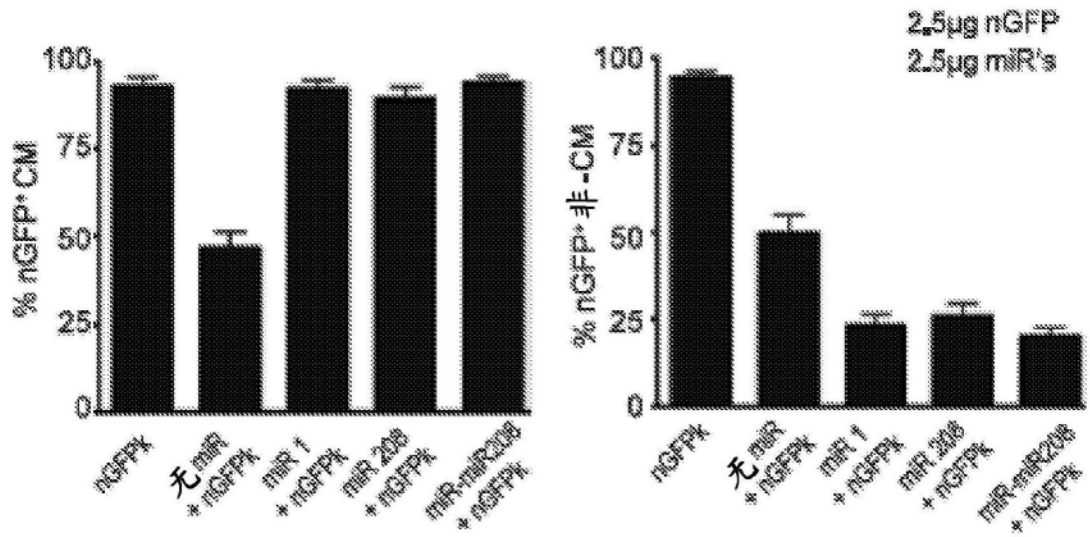


图16C

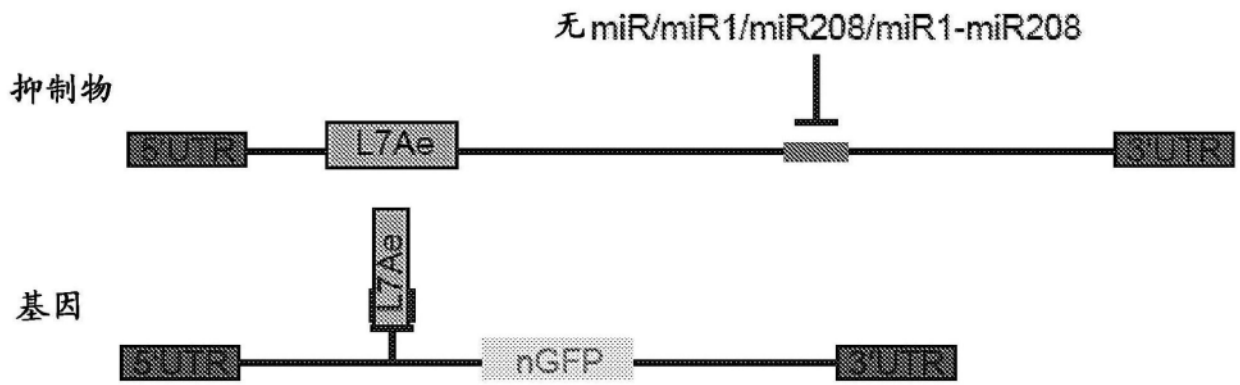


图17A

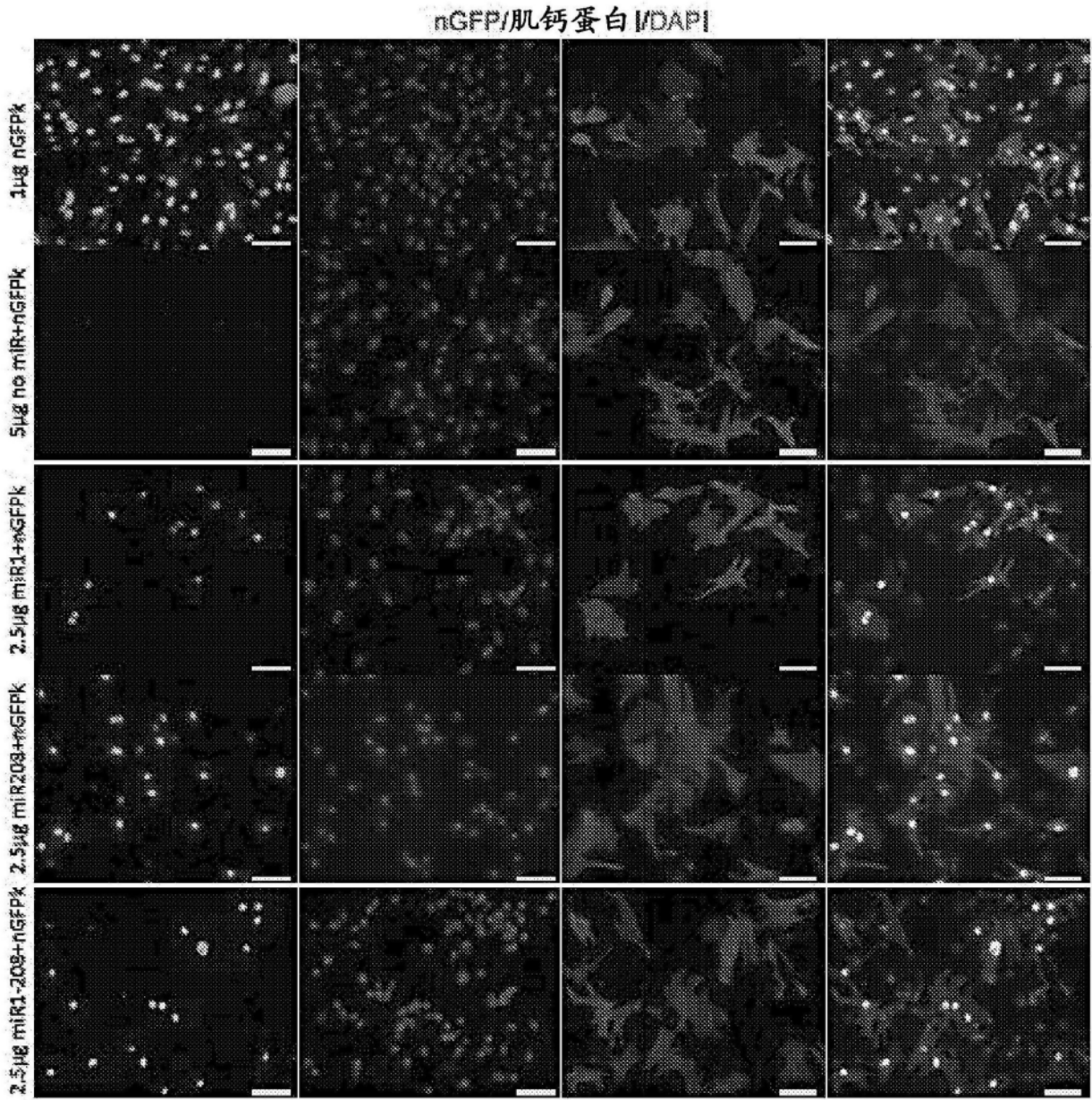


图17B

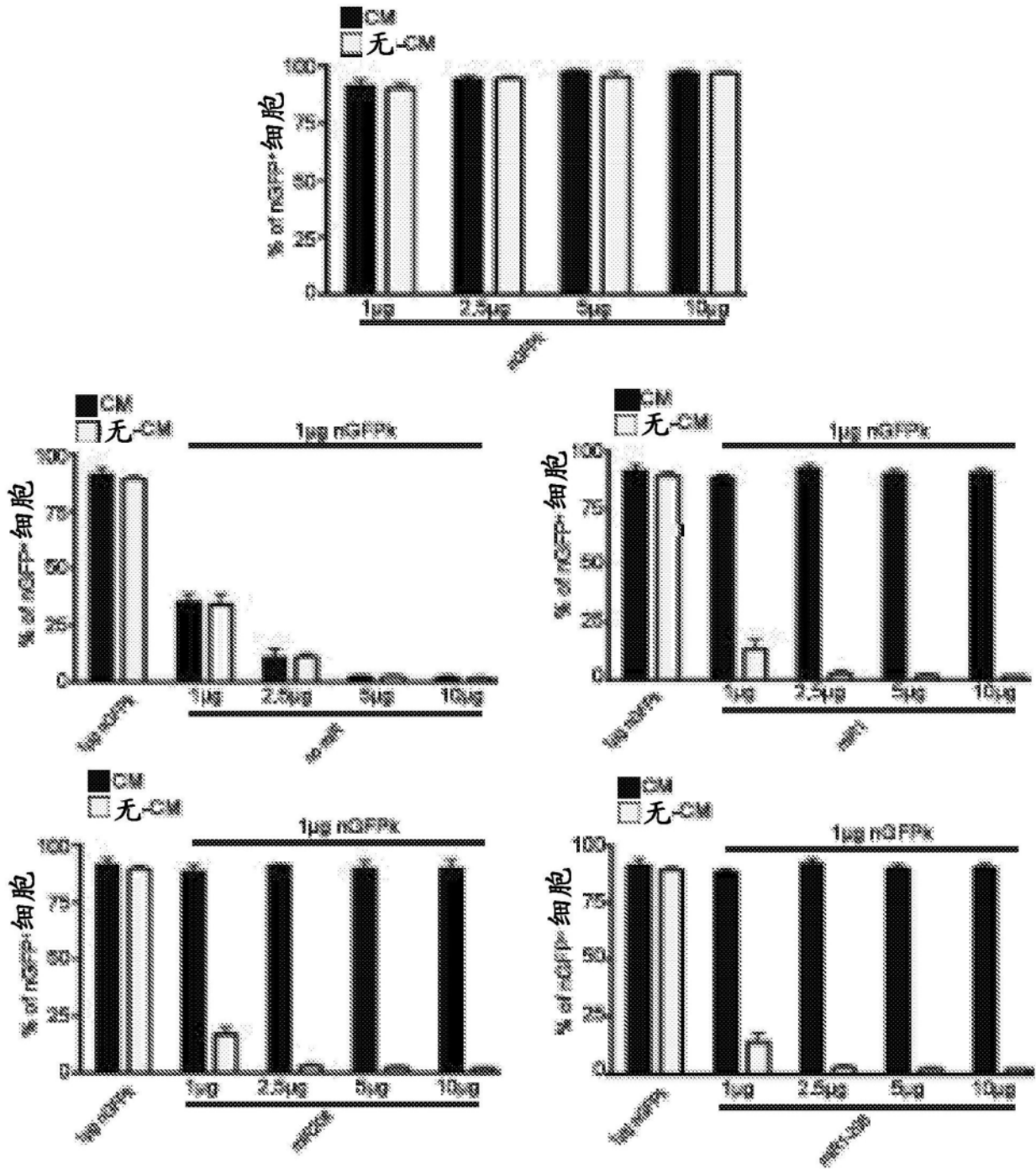


图17C

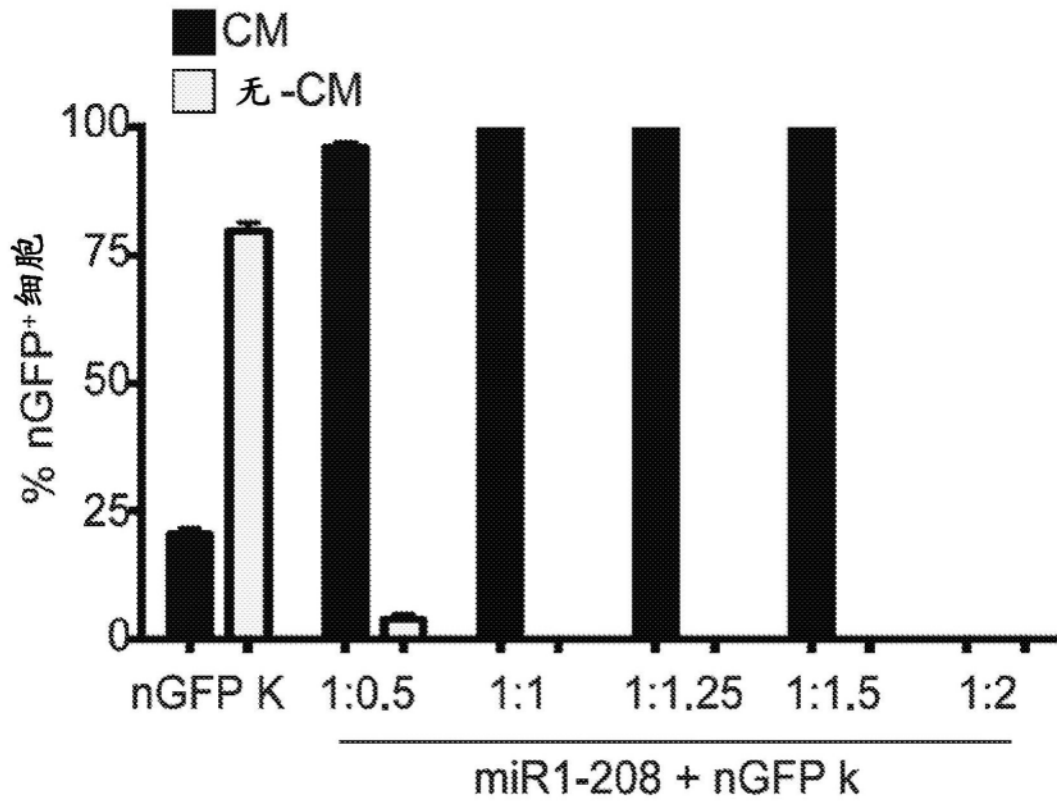


图18

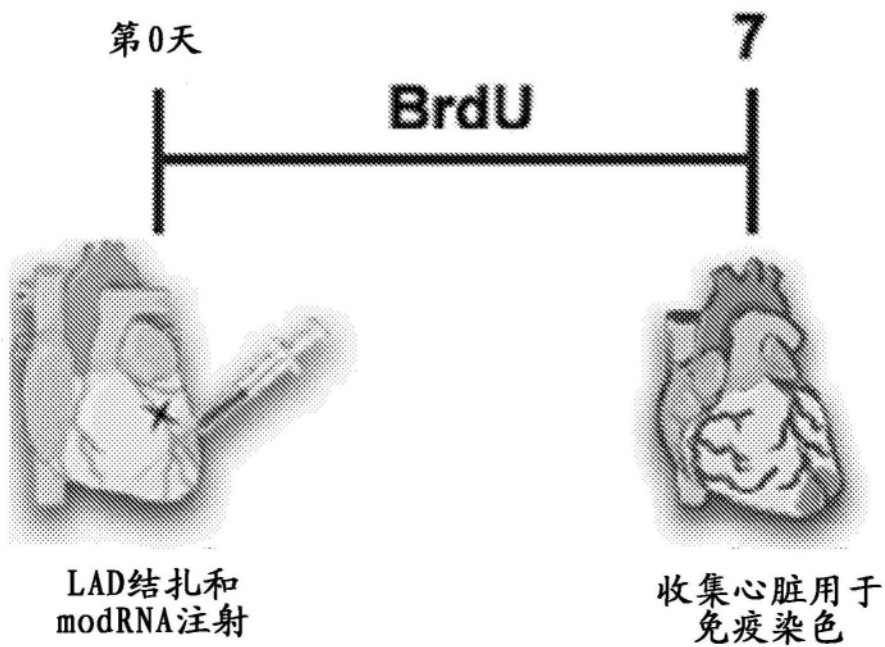


图19A

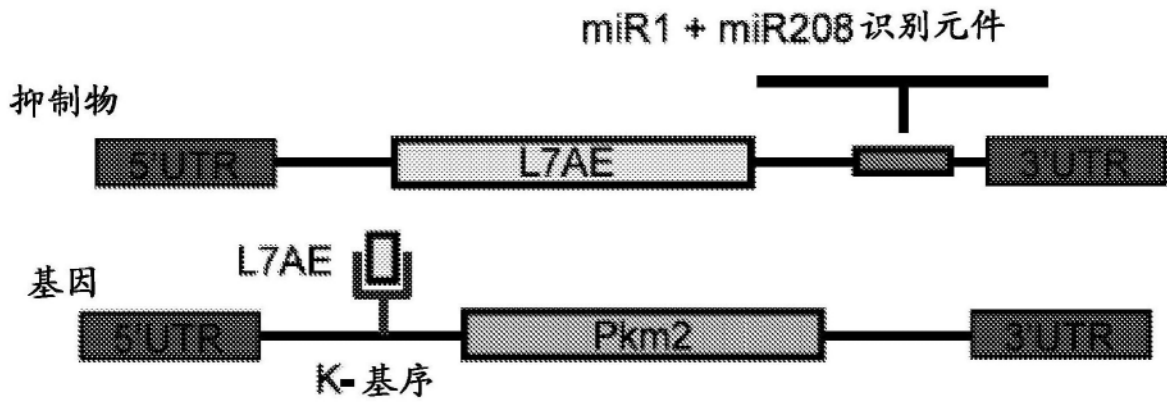


图19B

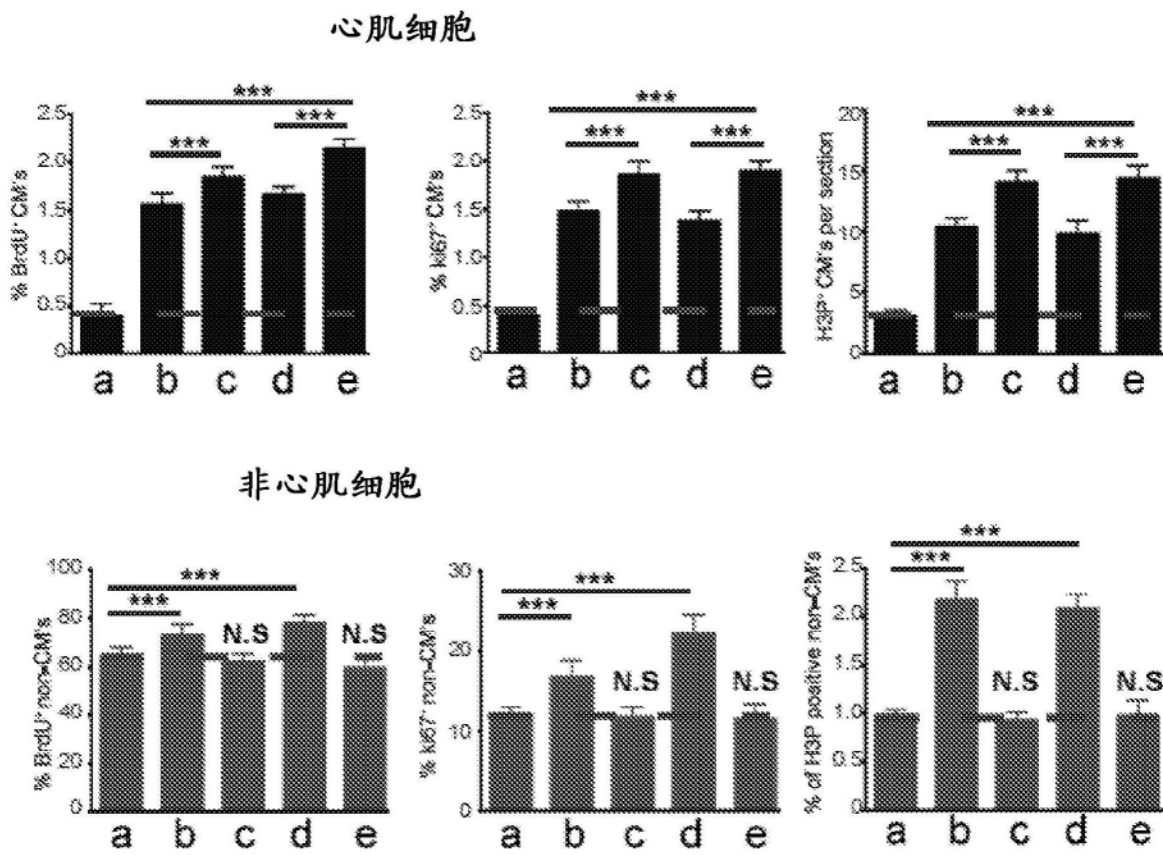


图19C

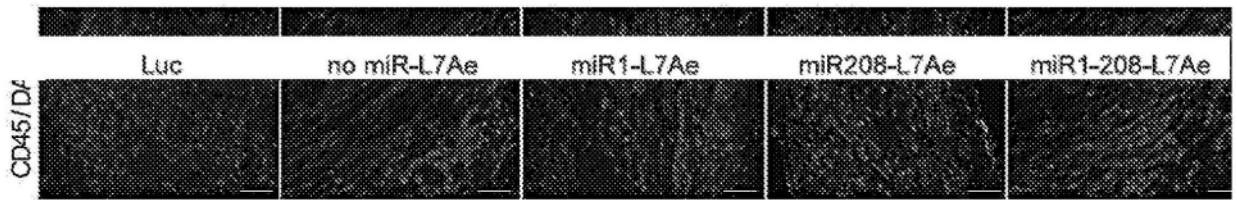


图20

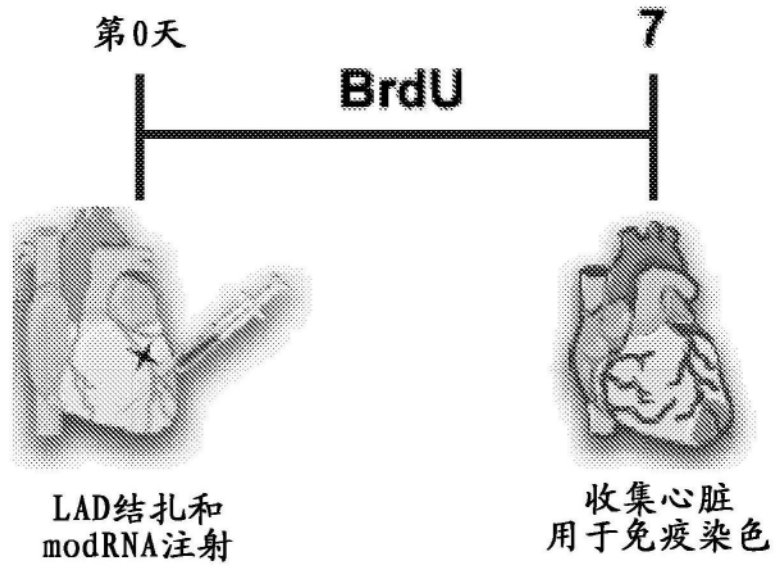


图21A

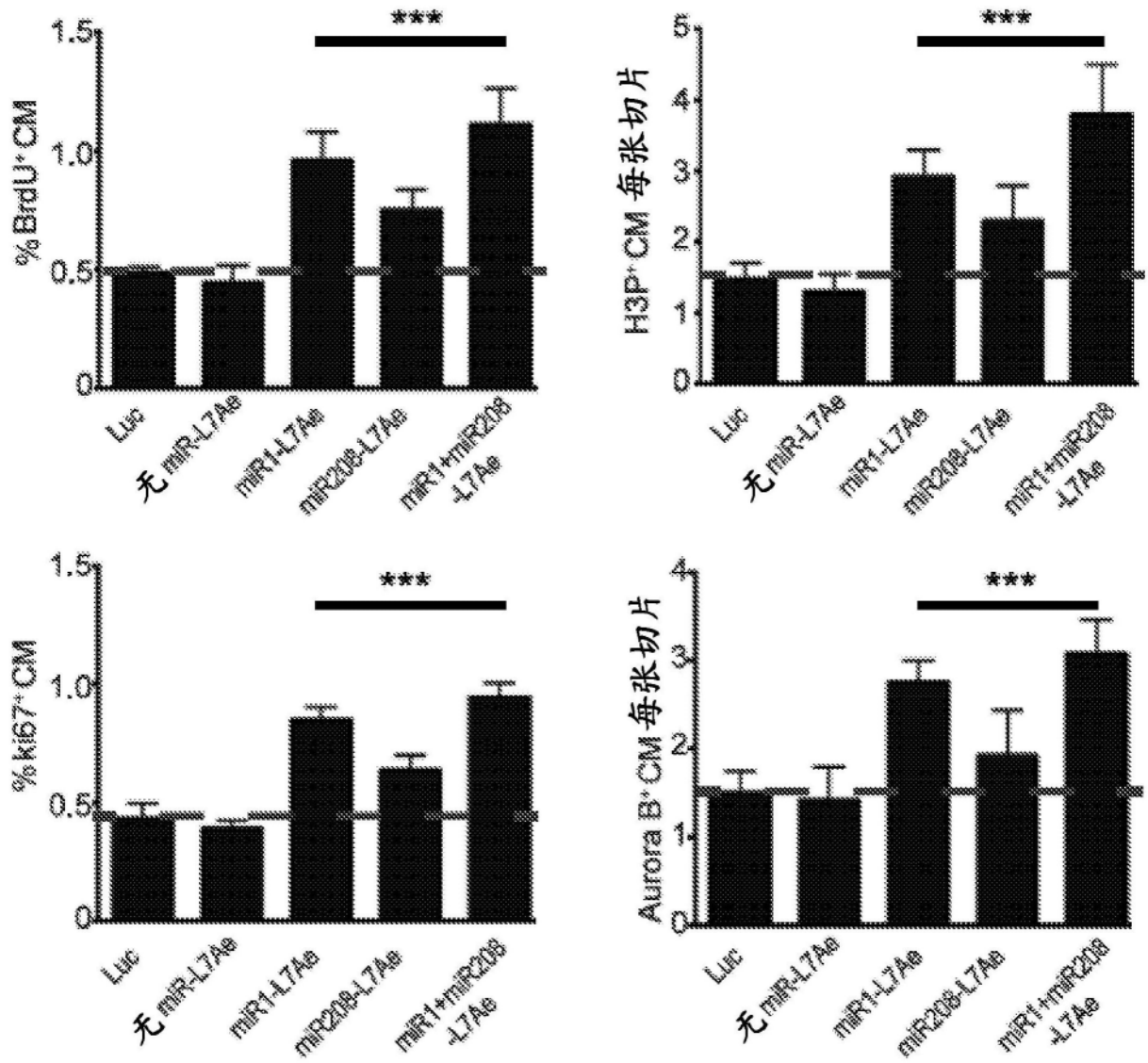


图21B

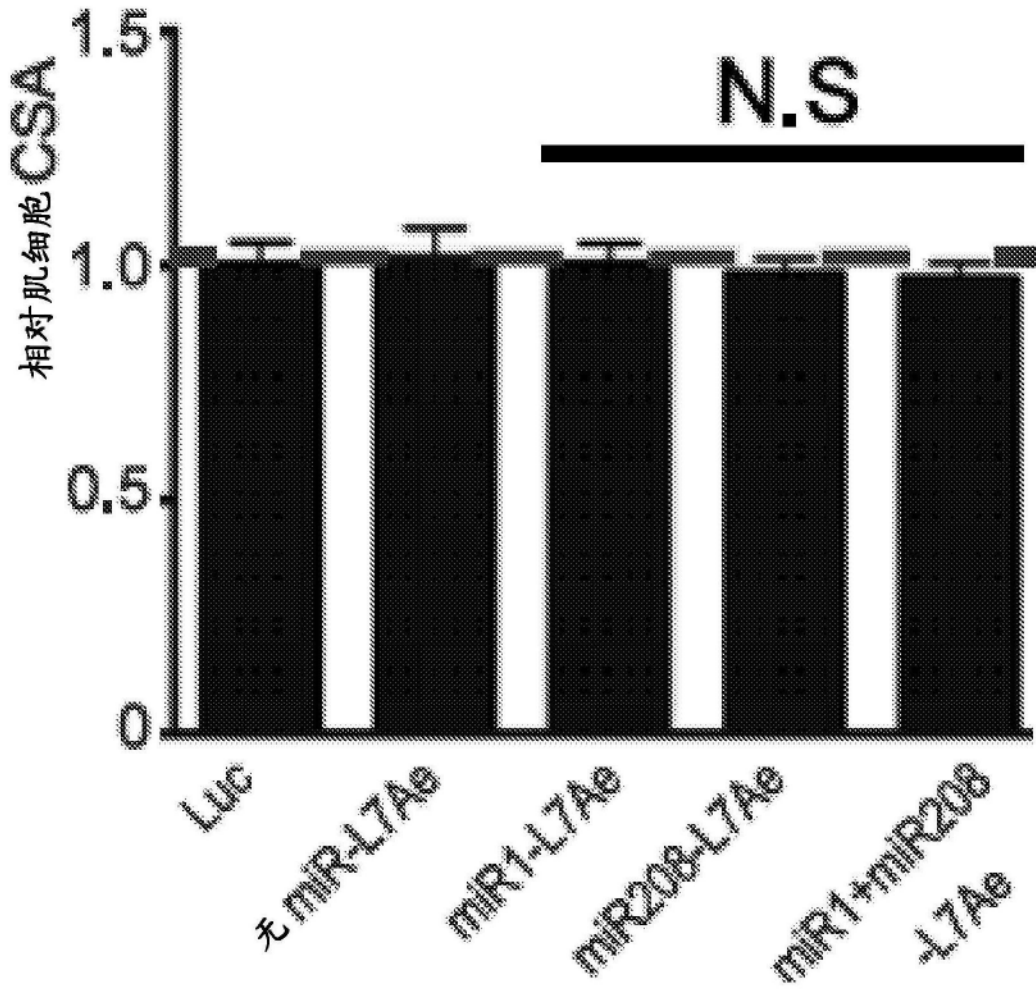


图21C

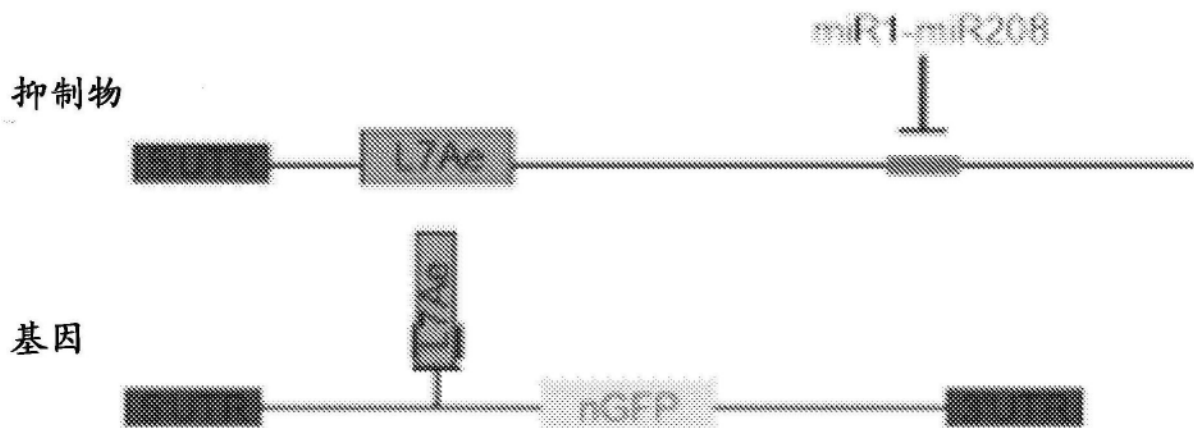


图22A

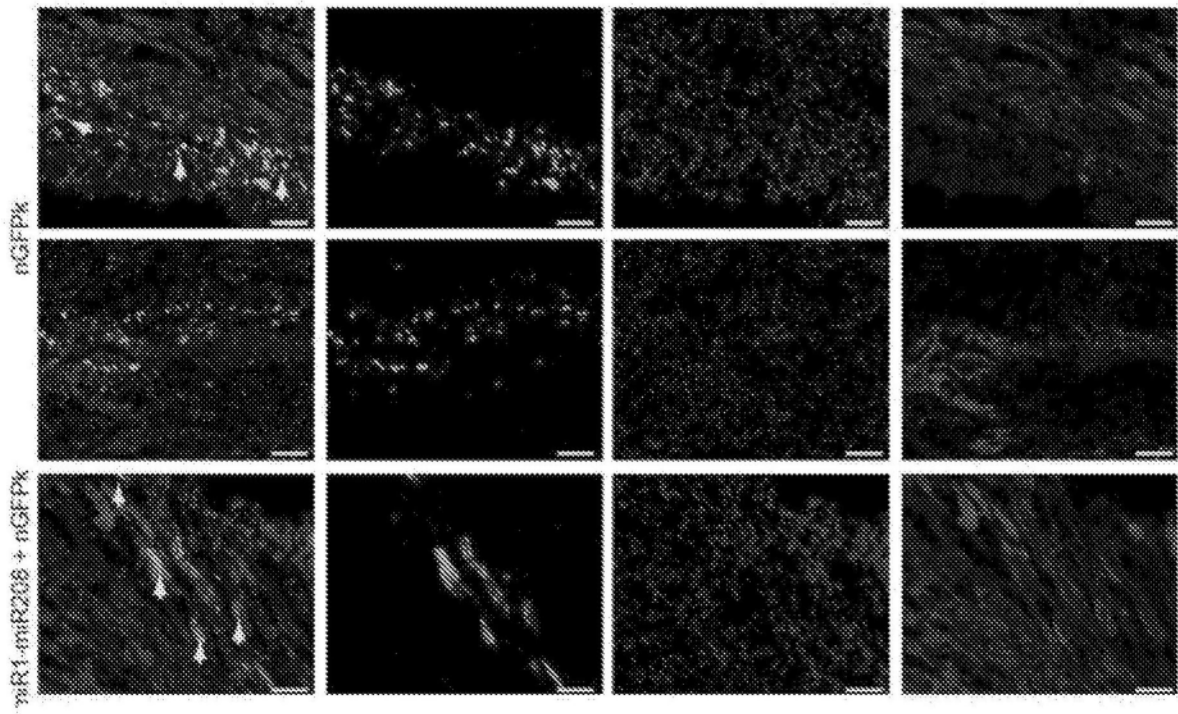


图22B

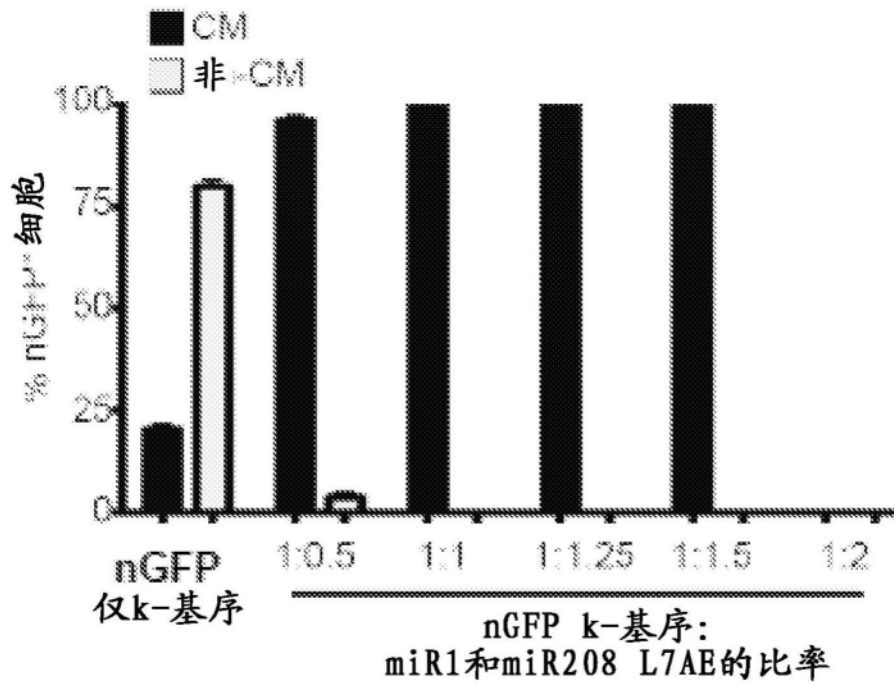


图22C

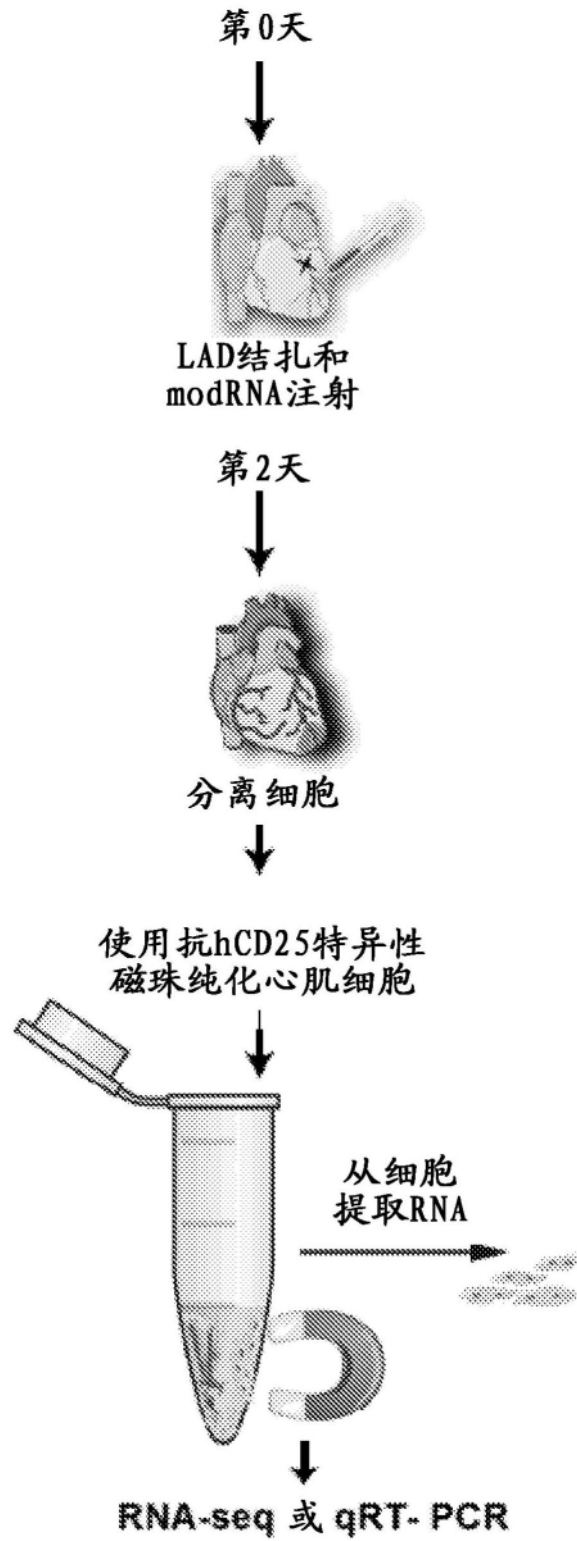


图23A

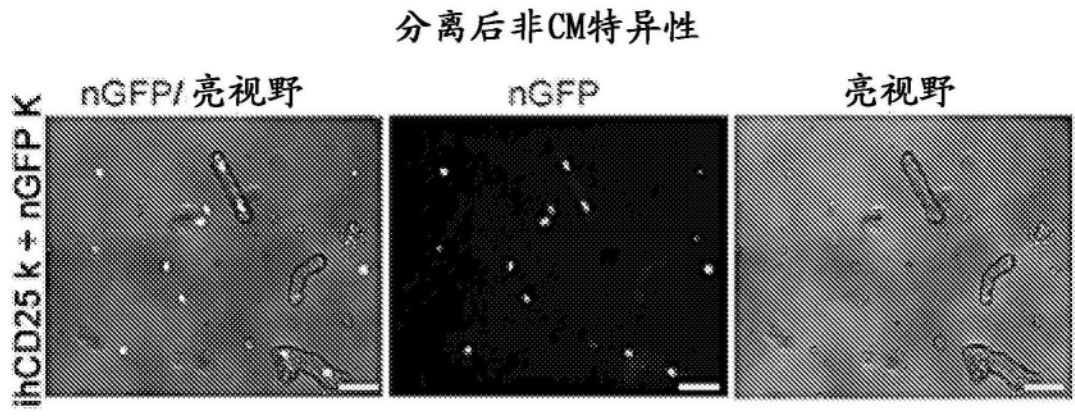


图23B

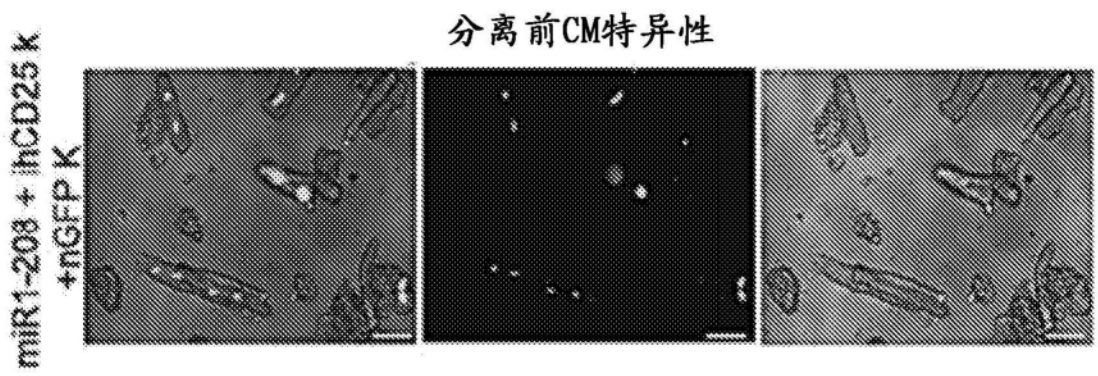


图23C

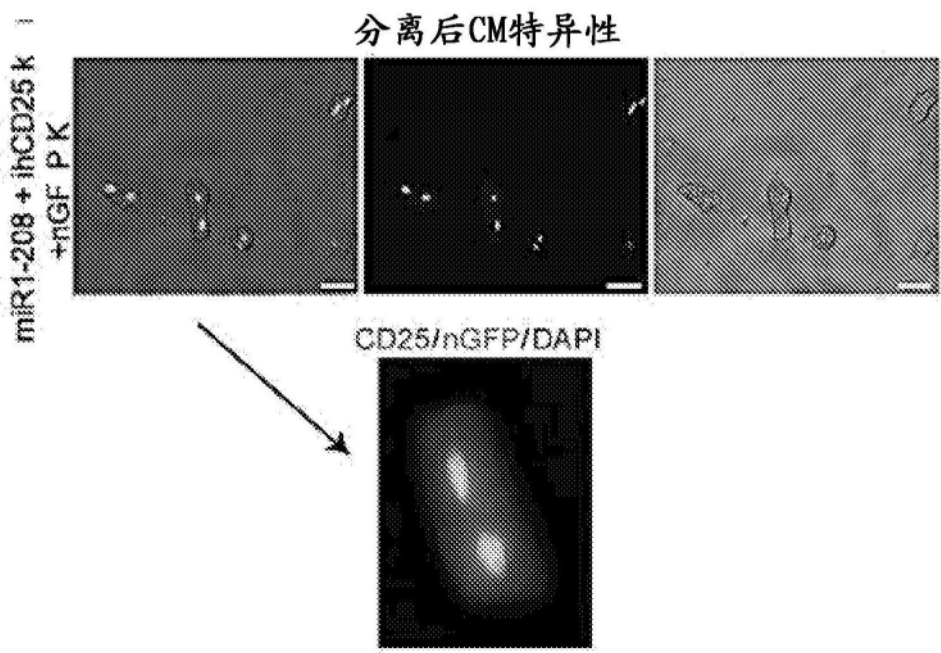


图23D

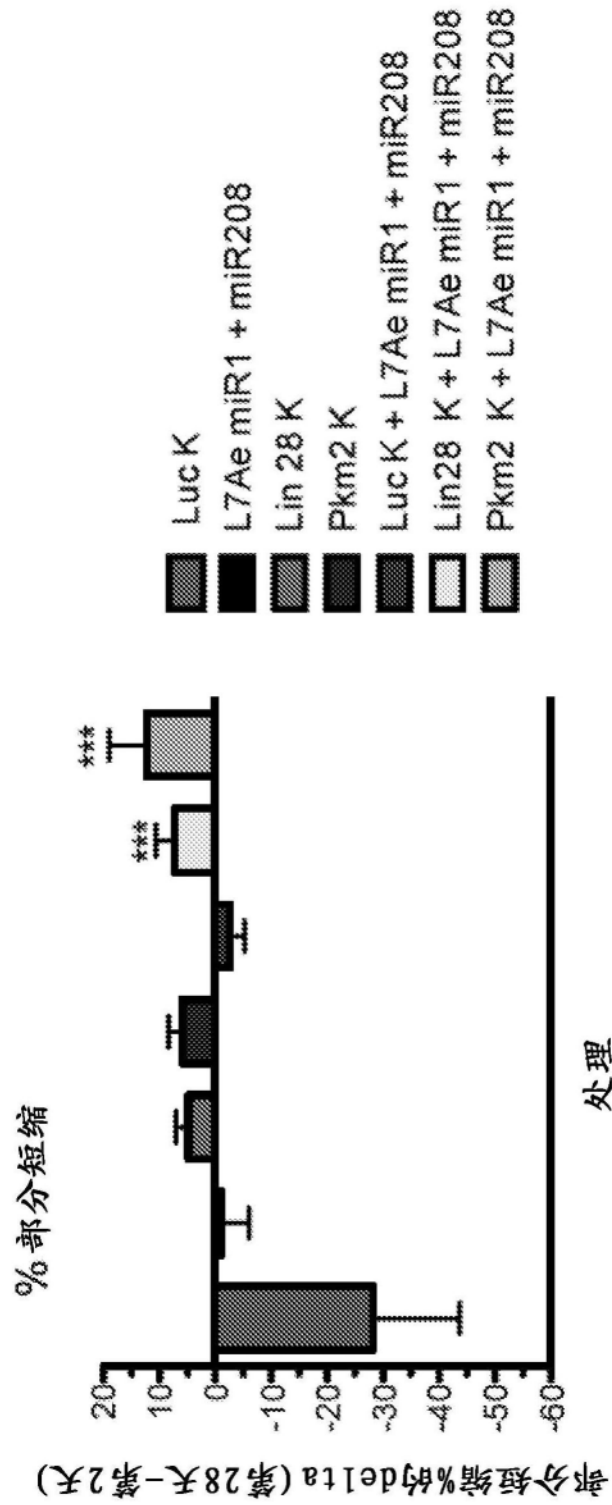


图24