



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103210085 B

(45)授权公告日 2018.09.25

(21)申请号 201180034123.1

A61K 31/7088(2006.01)

(22)申请日 2011.05.23

A61P 19/08(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103210085 A

(43)申请公布日 2013.07.17

(30)优先权数据

10163604.1 2010.05.21 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.01.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/058379 2011.05.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/144761 EN 2011.11.24

(73)专利权人 农业科学维也纳大学

地址 奥地利维也纳

(72)发明人 J·格里拉瑞 E·施拉姆尔

K·弗奇埃格 R·格里拉瑞

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

(56)对比文件

WO 2007112754 A2,2007.10.11,

Sun等.Characterization of function

and regulation of miR-24-1 and miR-31.

《Biochemical and Biophysical Research

Communications》.2009,第380卷(第3期),第661

页右栏第4段.

Scott等.A Pleiotropically Acting

MicroRNA,miR-31, Inhibits Breast Cancer

Metastasis.《CELL》.2009,第137卷(第6期),第

1035页左栏第4-5段.

Jones等.The identification of

differentially expressed microRNA in

osteoarthritic tissue that modulate the

production of TNF- α and MMP13.

《Osteoarthritis and Cartilage》.2009,第17

卷(第4期),第466页表1.

审查员 张锦广

权利要求书1页 说明书34页

序列表6页 附图20页

(54)发明名称

用于治疗或诊断骨障碍和/或心血管障碍的组合物

(57)摘要

本发明涉及用于治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍的组合物,其包含多核苷酸抑制剂,要抑制的所述多核苷酸能够降低或抑制FZD3 (Frizzled-3)或其生物学活性衍生物的表达。这些骨障碍尤其包括骨质疏松、骨量减少、骨折、骨癌以及骨稳态破坏。要由本发明的化合物治疗的心血管疾病包括梗塞、中风、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心衰竭、肾衰竭、压力相关心血管疾病、以及动脉粥样硬

化。要在这些医疗干预中使用的优选的化合物为拮抗性化合物,如针对miR-31及其衍生物的核酸分子。另外,本发明还涉及用于诊断的方法,并涉及组合物用于诊断骨障碍和/或心血管障碍的用途。要在这些诊断方法和用途用采用的组合物可为能够检测能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的那些多核苷酸的化合物(如引物和探针)。本文提供miR-31作为能够降低或抑制FZD3表达的多核苷酸。

1. 组合物在制备用于在受试者中治疗或预防骨障碍的药物中的用途, 其中所述组合物包含

miR-31或能够降低或抑制FZD3的表达的其5'或3'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂, 其中所述骨障碍选自骨质疏松、骨量减少、骨折以及骨稳态破坏。

2. 根据权利要求1的用途, 其中所述的miR-31或其5'或3'异构体或变体选自

(a) 由SEQ ID NO:1的核苷酸序列组成的多核苷酸; 和

(b) 由SEQ ID NO:2的核苷酸序列组成的多核苷酸。

3. 根据权利要求2的用途, 其中所述组合物包含(a)和(b)的多核苷酸中任何一项的一种或两种抑制剂。

4. 根据权利要求1的用途, 其中所述组合物含有1ng/kg体重至10mg/kg体重的所述拮抗剂/抑制剂。

5. 根据权利要求1的用途, 其中所述miR-31或其5'或3'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂包含在脂质组合物、外来体或脂质体内。

6. 根据权利要求1的用途, 其中所述组合物进一步包含药用可接受载体。

7. 根据权利要求1的用途, 其中所述组合物制备成经由注射、经由吸入、口服、直肠、阴道、体表和/或局部施用。

8. 根据权利要求1的用途, 其中所述拮抗剂/抑制剂能够杂交于miR-31或杂交于其5'或3'异构体或变体。

9. 根据权利要求1的用途, 其中所述拮抗剂/抑制剂选自antagomiR、miRCURY LNATM微小RNA抑制剂、体内LNATM miR抑制剂、微细LNA或miR-诱饵或miR-海绵。

10. 权利要求9的用途, 其中所述antagomiR、miRCURY LNATM微小RNA抑制剂、体内LNATM miR抑制剂、微细LNA或miR-诱饵或miR-海绵包括核酸分子或包括核酸序列, 所述核酸分子或包括核酸序列选自

(a) SEQ ID NO:5的核酸序列;

(b) SEQ ID NO:6的核酸序列;

(c) SEQ ID NO:7的核酸序列; 和

(d) SEQ ID NO:8的核酸序列。

用于治疗或诊断骨障碍和/或心血管障碍的组合物

[0001] 本发明涉及用于治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍的组合物,其包含多核苷酸拮抗剂/抑制剂,要受到抑制的所述多核苷酸能够降低或抑制FZD3(Frizzled-3)或其生物学活性衍生物的表达。这些骨障碍尤其包括,骨质疏松、骨量减少(osteopenia)、骨折、骨癌以及骨稳态破坏。要使用本发明的化合物治疗的心血管疾病可选自:梗塞、中风、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心衰竭、肾衰竭、压力相关心血管疾病、以及动脉粥样硬化。在这些医疗干预中要使用的优选的化合物为拮抗化合物如核酸分子,其针对能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸。这种需要拮抗的多核苷酸的一个实例为miR-31或其5'或3'异构体或变体。而且,本发明还涉及用于诊断骨障碍和/或心血管障碍的方法和组合物。要在这些诊断方法中使用的化合物可以为能够检测到可降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸的化合物(如引物和探针)。根据本发明,miR-31(或miR-31或其5'或3'异构体或变体)为能够降低或抑制FZD3表达的多核苷酸。

[0002] 人们已经认同的是细胞和组织中损伤的累积为老化及年龄相关疾病的主要驱动力(Kirkwood,Cell(2005),120:437-474)。成体干细胞及始祖细胞为反作用于这种功能衰退的一个组织水平上的修复系统。其自我更新及分化能力对于组织和器官的平衡至关重要。在人体的不同组织中都已经鉴别出具有高度分化潜能的成年人干细胞及始祖细胞,其代表了应维持高水平组织功能性的一群细胞。然而,其功能也随着年龄而衰退(Rando,Nature(2006),441:1080-1086)。在异种共生的小鼠模型中已经鉴别出老的系统环境包含的因子或者不能促进或者活性抑制组织成功再生(Conboy,Nature(2005),433:760-764),而年轻动物的系统环境中包含的因子促进组织成功再生(Matsumoto,Eur Heart J(2009),30:346-355)。

[0003] 内脏脂肪连生为人类老化的标志之一(Huffman,Biochem Biophys Acta(2009),1790:1117-1123),而ASC的成骨分化潜能随年龄而下降。这种下降并非由于成骨前体的丢失(Zhu,J Tissue Eng Regen Med(2009),3:290-301),这表明其中涉及了改变细胞行为的因子。进一步地,由于脂肪组织沉积物中的前脂肪细胞和内皮细胞表现出紧密的关系(Hausman,J Anim Sci(2004),82:925-934)体现出的ASC和内皮细胞在体内的联系,这一点支持了这些细胞类型之间存在旁分泌关系。

[0004] 然而,这些改变细胞行为的因子的来源迄今为止都是未知的,对于这些因子的特性罕有了解,其中似乎涉及到Wnt和TGF- β 信号转导(Carlson,Aging Cell(2009),8:676-689)。除了多种腺体外,分泌入血流的一个来源为内皮细胞自身,在更大的年龄时为衰老的内皮细胞,因为其在老化过程中在体内尤其是在动脉粥样硬化的位点发生累积(Erusalimsky,Handb Exp Pharmacol(2006),213-248;Erusalimsky,Exp Physiol(2009),94:299-304);Minamino,Circ Res(2007),100:15-26)。已经鉴别出几种蛋白质随着衰老而增加(Chang,Exp Cell Res(2005),309:121-136),其中在衰老内皮细胞的上清中发现的白介素8的水平最多50倍高(Hampel,Exp Gerontol(2006),41:474-481)。

[0005] 对血液中的一种运输基质已有描述:多种因子包装成的外来体,通过胞吐作用分泌的有膜包被的颗粒,并且通过与靶标组织的细胞融合而在细胞-细胞或器官-器官通讯中

起重要作用(Caby, Int Immunol (2005), 17:879-887)。外来体为大小为40-100nm的释放入细胞外环境的核内体来源的膜囊泡。其可通过允许蛋白质、脂类及mRNA和miRNA在细胞间进行交换而对细胞间通讯起作用(Valadi, Nat Cell Biol (2007), 9:654-659; Viaud, PLoS One (2009), 4:e4942)。然后,所包含的因子如miRNA、mRNA和蛋白质影响靶标细胞的行为。实例有内皮始祖细胞来源外来体,其在被摄取时诱导内皮细胞的血管形成(Deregibus, Blood (2007), 110:2440-2448);患有肺动脉高血压的病人中的内皮来源外来体(Bakouboula, Am J Respir Crit Care Med (2008), 177:536-543);释放外来体并将组织微环境改变为有助于肿瘤进展的卵巢癌和神经胶质母细胞瘤的细胞(Keller, Cancer Lett (2009), 278:73-81; Skog, Nat Cell Biol (2008), 10:1470-1476)。尤其是已有建议将肿瘤细胞释放的携带有被T细胞识别的抗原分子的外来体作为抗癌疫苗的无细胞抗原来源(Escudier, J Transl Med (2005), 3:10; Iero, Cell Death Differ (2008), 15:80-88; Morse, J Transl Med (2005), 3:9; Viaud, Horm Metab Res (2008), 40:82-88; Viaud, PLoS One (2009), 4:e49429)。

[0006] 然而,对组织再生或抑制组织再生中涉及的机制和因子仍然了解得太少,因此几乎不可能影响这些因子在组织再生中的作用。

[0007] 此项技术问题已经通过本文提供的实施方式及权利要求中提供的方案得到解决。

[0008] 因此,本发明提供了用于在受试者中治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍的组合物,其包含多核苷酸抑制剂,要抑制的所述多核苷酸能够降低或抑制frizzled3(FZD3)或其生物学活性衍生物的表达,这些在下文会进一步进行描述和示例性说明。而且,本发明提供了用于在患者中治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍的方法,包括施用有效量的包含了多核苷酸抑制剂的组合物,要抑制的所述多核苷酸能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达。如本文提供的,在此项医疗干预(即,本文公开的医疗/制药用途)和治疗/预防障碍的方法中要抑制的多核苷酸可以为miR-31或其5'或3'异构体或变体。进一步地,本发明提供了用于在受试者诊断骨障碍和/或心血管障碍的组合物和方法。在本发明的上下文中,这些骨障碍的实例为骨质疏松、骨量减少、骨折、骨癌、骨稳态破坏或者。这些心血管障碍的实例为心血管疾病,如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心衰竭和肾衰竭、以及动脉粥样硬化(Erusalimsky, J Appl Physiol (2009), 106:326-32)。如附随的实施例中所描述的,还意外地发现miR-31在压力诱导的衰老内皮细胞及压力诱导的早熟衰老的内皮细胞中有特异性增加。因此,miR-31的拮抗剂/抑制剂还用于本发明的上下文中用于压力相关心血管障碍的医疗干预,如由于氧化压力或缺氧/再灌注损伤造成的心血管障碍。

[0009] 根据上文及本文提供的实验数据,本发明涉及用于治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍的组合物,其包含能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸的拮抗剂/抑制剂和/或miR-31或其5'或3'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂。优选地,所述受试者为人受试者。还提供了用于在受试者中治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍的方法,所述方法包括施用有效量的包含能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸的拮抗剂/抑制剂的组合物和/或施用有效量的包含miR-31或其5'或3'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂的组合物。再次地,要使用本治疗方法治疗的最优选的受试者为需要医疗干预的人受试者。

[0010] 在本发明的上下文中,意外地发现了衰老的外来体(尤其是来源于衰老细胞的外来体)是如何影响成体干细胞从而影响组织再生的。出于此目的,本发明者研究了这些干细胞的两项主要特征:自我更新/细胞分裂以及分化潜能。选择来源于脂肪组织的干细胞(ASC)作为模型研究衰老内皮外来体对成体干细胞可能的效应。

[0011] 进一步地,在本发明的上下文中,惊人地发现衰老内皮细胞分泌的miRNA包装成为外来体,这些囊泡被靶标细胞摄取,表明其可能具有旁分泌信号转导功能,还发现在体外的年轻的和衰老的内皮细胞之间具体miRNA的量有差异。如在本发明的上下文中发现的,有一种微小RNA(miRNA)—miR-31在衰老细胞的上清中且在年纪较大的供体亚组的血液中有显著增加,其是由外来体保护和运输的。进一步地,在本发明的上下文中,发现ASC在接触衰老内皮细胞的上清或纯化的外来体时且在接触年老个体的血液来源外来体时摄取miR-31。

[0012] 在本发明的上下文中,鉴定出负责成骨抑制的miR-31的靶标为frizzled-3(FZD3),迄今对其描述只有其对神经系统发育有重要作用,因为FZD3敲除小鼠表现出轴突生长和导向的缺陷(Endo, Mol Cell Biol(2008), 28:2368-2379; Stuebner, Dev Dyn(2010), 239:246-260; Wang, J Neurosci(2006), 26:2147-2156; Wang, J Neurosci(2002), 22:8563-8573; Wang, J Neurosci(2006), 26:366-364)。进一步地,本文中发现miR-31抑制成骨分化并增加ASC的增殖。这些惊人的发现显示了降低或抑制FZD3表达的多核苷酸(例如但不限于)miR-31代表了生物学老化或年龄相关疾病(如骨质疏松、骨量减少、骨折以及骨稳态破坏,或心血管疾病,如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心衰竭和肾衰竭、或动脉粥样硬化等等)的新型标志物。进一步地,降低或抑制FZD3表达的多核苷酸的拮抗剂/抑制剂如miR-31或其5'或3'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂代表新型治疗剂。因此,尤其是miR-31和/或其5'或3'异构体或变体是所有需要骨发生和骨形成的疾病中的新型治疗靶标,所述疾病如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨癌、骨稳态破坏、骨癌等等,以及心血管疾病,如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化。miR-31的3'和5'异构体的实例显示于表3。

[0013] 在本发明的上下文中,检测了ASC的增殖和分化能力以测试miR-31递送的功能性。如在本发明上下文中发现的,在一批之内达到的细胞数量较高,而衰老的外来体或单独miR-31部分抑制成骨分化。

[0014] 进一步地,在本发明的上下文中,惊人地发现miR-31在年老供体的血清中显著上调。这表明miR-31的外来体递送在细胞衰老过程中不仅在体外,也在血液中发现。进一步地,在本发明的上下文中,描述miR-31不存在于血清来源的外来体中。使用年老血液来源的外来体也再次观察到了骨发生的抑制。就此来说,因此,在本发明的上下文中,miR-31是一种有价值的工具,为老化及年龄相关疾病(如骨质疏松、骨量减少、骨折或骨稳态破坏,或心血管疾病,如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化)的生物标志物。

[0015] 此外,在本发明的上下文中,miR-31除了在年老受试者中有上调之外,还发现miR-31在第一组实验的4个骨量缺少病人中的2个中有提高。如在所包含的实施例中所提供的,在更详细的实验中,10个在血清中发现有miR-31的骨量缺少的病人中有7个或者稳定患有骨质疏松,或者发展为骨质疏松。进一步地,如在附随的实施例中显示的,抑制miR-31增进了成骨分化,而瞬时增加miR-31导致成骨分化降低。这项发现表明抑制miR-31增进成骨细

胞形成。这在骨障碍如骨质疏松的医疗干预中非常有用。进一步地,miR-31的表达提示了患有这些骨障碍(也提示了患有心血管障碍)。因此,本文还提供了用于检测miR-31的特异性测定。这项检测测定优选地是在生物样品如血清和血浆等等上进行的。骨质疏松为一种疾病,特征在于骨质低、骨组织有结构退化,导致骨骼脆弱、对骨折易感度增加。骨质疏松为一种年龄相关的系统性病况,一般天然发生于哺乳动物中(主要是人)(Xu, *Endocr Rev* (2010), 31 (4): 447-505)。因此,本发明还提供了骨障碍如骨质疏松和/或骨量减少的良好且可靠的生物标志物。本文提供的生物标志物还可用于心血管障碍的诊断中。所附随的实施例还表明miR-31在压力诱导的衰老内皮细胞中提高。进一步地,如本文所显示的,miR-31在压力诱导的早熟衰老的内皮细胞的外来体中有所提高。因此,miR-31还提示有心血管障碍。

[0016] 一般地,根据本发明,在提到在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸时,所述多核苷酸能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达,这些在本文有详细的示例性描述。

[0017] 如在本发明中表明的,FZD3的表达可由本文描述的包含在衰老的外来体中的多核苷酸例如通过与FZD3的mRNA杂交得到降低或抑制。因此,例如,可诱导FZD3mRNA的降解或阻止其翻译,这都可导致FZD3表达的抑制或降低。因此,抑制本文描述的抑制或降低FZD3表达的多核苷酸会增加FZD3的表达。在本发明的上下文中,测试了经过成骨分化的ASC中FZD3的转录。事实上,相对于以对照培养基处理的细胞,其在4天后上调(图7A)。此外,相比于以年轻外来体及对照处理细胞,FZD3水平在以衰老外来体处理后显著下调(图7B)。miR-31转染24h后,FZD3也有所下调,但没达到显著水平,这可能是由于细胞不分化时FZD3的mRNA水平太低(图7C)。因此,FZD3不仅代表了一种标志物,还是成骨分化的一个必要的因子,并成为本发明上下文中的ASC中要抑制的多核苷酸的直接靶标。

[0018] 如本发明中描述及示例表示的,对在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的抑制对于在受试者中治疗或预防骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病,如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭、或动脉粥样硬化中尤其有用。

[0019] 在本发明的一个实施方式中,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸(即,其能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的多核苷酸)(如miR-31),可为微小RNA(也缩写为miRNA或miR)或其前体、模拟微小RNA或其前体、siRNA或其前体、长链非编码RNA或其前体、snRNA(小/短发夹RNA)或其前体、stRNA(小瞬时RNA)或其前体、frRNA(功能性RNA)或其前体、snRNA(小核RNA)或其前体、snoRNA(小核仁RNA)或其前体、piRNA(piwi相互作用RNA)或其前体、tasiRNA(反式作用小/短干扰RNA)或其前体、aRNA(反义RNA)或其前体或小非编码RNA或其前体。根据本发明,上文提到的人工多核苷酸与上文提到的生理多核苷酸可对FZD3或其生物学活性衍生物的表达具有相同的效应(即,降低或抑制所述表达),这些人工多核苷酸抑制剂可同时为这些生理多核苷酸的抑制剂。如本文所使用的,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸(即能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的多核苷酸)的“前体”可为相应多核苷酸成熟过程中的对应多核苷酸的形式。例如,在本发明的上下文中,微小RNA或模拟微小RNA的前体可为初级miRNA(pri-miRNA)或前体miRNA(pre-miRNA),其都是在miRNA成熟过程中发生的形式。二者都是单链转录物(即ssRNA),其折叠成

特征性的称为“发夹环”的分子内二级结构,其含有一串大约18-23个碱基对,其中可能被错配打断。在本发明的上下文中,siRNA的前体可为长链dsRNA分子或较短的“发夹环”ssRNA分子。这两种类型的siRNA前体可含有一串没有任何错配的碱基对。目前用于哺乳动物miRNA成熟的模型为:初级miRNA(pri-miRNA)的核裂解释放一段60-70nt的茎环中间物,称为直接miRNA前体或前miRNA。从茎环前体的一个臂上产生大约18-23nt长的成熟miRNA(Bartel, Cell (2004), 116:281-297; Lee, EMBO J (2002), 21:4663-4670; Zeng and Cullen, RNA (2003), 9:112-123)。在本发明的一个优选的实施方式中,根据本发明要抑制的多核苷酸为微小RNA或其前体或模拟微小RNA或其前体。在本发明的上下文中描述的要抑制的多核苷酸可以为任何长度。优选地,所述核苷酸的长度为约15至约100个核苷酸,更优选地为约18至约27个核苷酸,最优选地为约20至约24个核苷酸。

[0020] 在本发明的一个具体实施方式中,在本发明的上下文中要拮抗/抑制的多核苷酸(即,其能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的多核苷酸)和/或要拮抗/抑制的miR-31或其5'或3'异构体或变体可选自:

[0021] (a) 包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列的多核苷酸(即miR-31);

[0022] (b) 与(a)的多核苷酸有至少80%的同一性的多核苷酸;

[0023] (c) 包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列(即,miR-31的种子序列:GGCAAGAU)的多核苷酸;及

[0024] (d) 根据(b)的包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列(即,miR-31的种子序列:GGCAAGAU)的多核苷酸。

[0025] 根据本发明,多核苷酸的同一性水平指的是相对所参考的SEQ ID NO的核苷酸序列的全长的同一性,以碱基对的方式评估,其中每个缺口计为一个错配。例如,术语“同一性”可在本文用于本发明中要抑制的多核苷酸的情况下,其具有的核酸序列与包含或由SEQ ID NO:1(成熟miR-31)、SEQ ID NO:2(miR-31的种子序列)或SEQ ID NO:3(前体-miR-31)(也显示于本文的表1中)中任何一项的核苷酸序列组成的多核苷酸有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性,优选地是全长范围的同一性。进一步地,在本发明的上下文中,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸还可具有核酸序列,其与以下多核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性:包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的序列组成的核苷酸序列(如本文表1所示)或由其组成,其包括相应种子序列5'末端和/或3'末端的对应的成熟-或前体-miRNA序列的一个、两个或更多的核苷酸。例如,在本发明的上下文中,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸可具有核酸序列,其与以下多核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性:包含或由核苷酸序列AGGCAAGAUGC组成的多核苷酸,即,SEQ ID NO:1的种子序列,其在5'末端包括对应成熟序列的一个核苷酸并在3'末端包括对应成熟序列的一个核苷酸。如果通过序列比对的比较的两条核酸序列同一性上有差异,则术语“同一性”指的是较短序列,还指的是较长序列匹配所述较短序列的部分。因此,当比较的序列不具有相同长度时,同一性程度优选地指的是较短序列中与较长序列中包含的连续核苷酸残基相同的核苷酸残基百分比或指的是较长序列中包含的与较短序列的核苷酸序列相同的连续核苷酸的百分比。当然,如上文描述的,作为“连续核苷酸部分”的缺口被计为错配。在此上下文中,技术人员容易确定较长序列“匹配”较短序列的部分。而且,这些序列比对的定义(例如,“同一性”值的建立)将用于本文描述及公开的所有序列。

[0026] 表1:miRNA、miRBaseID(miRBase:<http://www.mirbase.org>,版本号15:公布于2010年4月),以及成熟和前体-miR序列(种子序列由下划线表示)。

[0027]

miRNA	miRBase ID	序列	SEQ ID NO.
成熟 miR-31	MI0000089	<u>AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU</u>	1
种子 miR-31	MI0000089	<u>GGCAAGAU</u>	2
前体-miR-31	MI0000089	GGAGAGGAG <u>GGCAAGAUGCUGG</u> CAUAGCUGUUGAACUGGGGAAC CUGCUAUGCCAACAUAUUGCC AUCUUUCC	3

[0028] 表2:能够杂交于上文鉴别的miRNA、种子序列等的核酸分子的实例。

[0029]

miRNA	杂交序列	SEQ ID NO.
成熟 miR-31	AGCUAUGCCAGCAUCUUGCCU	6
种子 miR-31	AUCUUGCC	7
前体-miR-31	GGAAAGAUGGCAAUAUGUUGGCAUAGCA GGUUCCCAGUUCAACAGCUAUGCCAGCAU CUUGCCUCCUCUCC	8

[0030] 如本文所使用的,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)根据对应的多核苷酸类型可互换地使用。

[0031] 这些杂交序列(或其功能性片段或异构体)可用作能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的多核苷酸的特异性拮抗剂/抑制剂或用作miR-31或其5'或3'异构体或变体的特异性拮抗剂/抑制剂。这些杂交序列(或其功能片段或异构体)可杂交于所有本文描述的要拮抗或抑制的多核苷酸,包括微小RNA、siRNA、模拟微小RNA、长链非编码RNA、snRNA、stRNA、fRNA、snRNA、snoRNA、piRNA、tasiRNA、aRNA以及这些RNA的前体。

[0032] 表3:miR-31的5'和3'异构体实例。

[0033]

5'-异构体	SEQ ID NO.	3'-异构体	SEQ ID NO.
GAGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	9	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAUC	23
AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUG	10	UGCUAUGCCAACAUAUUGGCAU	24
AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGU	11	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCA	25
AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	12	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAUCU	26
AGGCAAGAUGCUGGCAUAGC	13	GCUAUGCCAACAUAUUGCCAUC	27
AGGCAAGAUGCUGGCAUAG	14	CUAUGCCAACAUAUUGCCAUC	28
AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGUU	15		
AGGCAAGAUGCUGGCAU	16		
AGGCAAGAUGCUGGCAUA	17		
AGGCAAGAUGCUGGCA	18		
GGCAAGAUGCUGGCAUAGCUG	19		

[0034]

GGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	20		
GGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGUU	21		
GGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGU	22		

[0035] 如本文所使用的,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)根据对应的多核苷酸类型可互换地使用。

[0036] 此外,同一性指的是在对应核苷酸序列之间优选地有功能和/或结构等价性。具有与本发明中要抑制的多核苷酸的具体核酸序列有给定同一性水平的核酸序列可代表这些序列的衍生物/变体,其优选地具有相同的生物学功能。在本发明的上下文中,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的生物学功能为其降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的能力,例如通过杂交于FZD3的mRNA并由此诱导FZD3mRNA的降解或阻止其翻译。FZD3或其生物学活性衍生物的表达是否得到降低或抑制,这一点可通过本领域熟知的方法进行测试,也在本文有所描述。这些适合于确定FZD3或其生物学活性衍生物的表达是否得到降低或抑制的方法的实例为聚丙烯酰胺凝胶电泳及相关的印迹技术如蛋白质印迹,结合基于显色染料的蛋白质检测技术(如银染或考马斯亮蓝染色),或结合基于荧光和发光的检测溶液和凝胶、印迹及微阵列中蛋白质的方法,如免疫染色,以及免疫沉淀、ELISA、微阵列及质谱分析法。要确定给定多核苷酸是否杂交于FZD3的mRNA也可通过本领域熟知的方法进行测试。

试,在本文也有所描述。这些适合于确定给定多核苷酸是否杂交于另一种核酸(例如FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA)的方法的实例有报告基因测定法,其中通常使用的报告基因为荧光蛋白如GFP、eGFP、YFP、eYFP、BFP、eBFP,发光蛋白如Renilla酶或萤火虫荧光酶,以及由lacZ基因编码的 β -半乳糖苷酶(Inui, Nat Rev Mol Cell Biol (2010), 11:252-63)。FZD3的mRNA是否得到降解,或其翻译是否受到阻止,这一点也可由本领域已知方法测试,在本文也有所描述。适合用于确定mRNA是否受到降解的方法的实例为qPCR、RT-PCR、qRT-PCR、RT-qPCR、Light **Cycler**®、**TaqMan**® Platform and Assays或量化基因测定法(quantigene assay)(Zhou, Anal Biochem (2000), 282:46-53)、RNA印迹、点印迹、RNAse保护测定、微阵列、下一代测序(VanGuilder, Biotechniques (2008), 44 (5):619-26; Elvidge, Pharmacogenomics (2006), 7:123-134; Metzker, Nat Rev Genet (2010), 11:31-46; Kafatos, NAR (1979), 7:1541-1552)。

[0037] 本文描述的多核苷酸,例如要在本发明上下文中抑制的那些,可为天然发生的变体如来自其他变种、种等的序列,或为突变(所述突变可能是天然形成的或由人为诱变产生的)。进一步地,这些变体可为人工产生的序列。这些等位基因变体可为天然发生的变体,或通过本领域已知的重组DNA、RNA、PNA、GNA、TNA或LNA技术产生的变体。也产生了上文描述的核酸序列的衍生物,例如通过核苷酸的缺失、置换、添加、插入和/或通过重组而完成。术语“添加”指的是在给定序列的一端或两端添加至少一个核酸残基,而“插入”指的是在给定核苷酸序列之内插入至少一个核酸残基。术语“缺失”指的是在给定核苷酸序列中删除或移除至少一个核酸残基。术语“置换”指的是给定核苷酸序列中对至少一个核酸残基的取代。上文或下文对要抑制的多核苷酸的定义在加以适当变通之后可应用于本文提供和描述的所有核酸分子和多核苷酸,包括起拮抗剂/抑制剂作用的那些。

[0038] 本文描述的多核苷酸,例如要在本发明上下文中抑制的那些(即降低或抑制FZD3表达的多核苷酸)或起拮抗剂/抑制剂作用的那些,可为核酸类似物如DNA分子、RNA分子、寡核苷酸硫代磷酸酯、置换的核糖寡核苷酸、LNA分子、PNA分子、GNA(乙二醇核酸)分子、TNA(苏糖核酸)分子、吗啉代基多核苷酸,或antagomir(结合胆固醇,用作拮抗剂/抑制剂)多核苷酸。进一步地,在本发明的上下文中,术语“多核苷酸”以及术语“核酸分子”可指代核酸类似物如DNA分子、RNA分子、寡核苷酸硫代磷酸酯、置换的核糖寡核苷酸、LNA分子、PNA分子、GNA(乙二醇核酸)分子、TNA分子(苏糖核酸)、吗啉代基多核苷酸,或antagomir多核苷酸(结合胆固醇,用作拮抗剂/抑制剂)或本领域已知的其杂交分子或任何修饰物(见例如,US5,525,711,US4,711,955,US5,792,608或EP302175的修饰物实例)。所述多核苷酸包含的核酸残基可为天然发生的核酸残基或人工产生的核酸残基。核酸残基的实例为腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)、黄嘌呤(X),和次黄嘌呤(HX)。在本发明的上下文中,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可根据相应的多核苷酸类型可互换地使用。例如,如技术人员了解的,DNA中的胸腺嘧啶(T)对应于作为相应转录的mRNA的部分的尿嘧啶(U)。所述多核苷酸可为单链或双链、线性或环状、天然或合成的,如果没有另外的指出,对其没有大小的限制。例如,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸可为微小RNA(miRNA)或其前体、模拟微小RNA或其前体、siRNA或其前体、长链非编码RNA或其前体、snRNA(小/短发夹RNA)或其前体、stRNA(小瞬时RNA)或其前体、fRNA(功能性RNA)或其前体、snRNA的(小核RNA)或其前体、snoRNA(小核仁RNA)或其前体、piRNA(piwi相互作用RNA)或其前体、tasiRNA(反式作用小/

短干扰RNA)或其前体、aRNA(反义RNA)或其前体、或小非编码RNA或其前体、基因组DNA、cDNA、mRNA、ribozymal或编码前述RNA或chimeroplast的DNA(Gamper, Nucleic Acids Research (2000), 28, 4332-4339)。如已经描述的,如本文所使用的,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸“前体”可为其在相应多核苷酸成熟过程中发生的相应的多核苷酸形式。例如,在本发明的上下文中,微小RNA或模拟微小RNA的前体可为初级miRNA(pri-miRNA)或前体miRNA(pre-miRNA),其都是在miRNA成熟过程中发生的形式。二者都是单链转录物(即ssRNA),其折叠成特征性的称为“发夹环”的分子内二级结构,其含有一串大约18-23个碱基对,其经常被错配打断。在本发明的上下文中,siRNA的前体可为长链dsRNA分子或较短的“发夹环”ssRNA分子。这两种类型的siRNA前体可含有一串没有任何错配的碱基对。目前用于哺乳动物miRNA成熟的模型为:初级miRNA(pri-miRNA)的核裂解释放一段60-70nt的茎环中间物,称为miRNA前体或前miRNA。从茎环前体的一个臂上产生大约18-23nt长的成熟miRNA(Bartel, Cell (2004), 116:281-297; Lee, EMBO J (2002), 21:4663-4670; Zeng and Cullen, RNA (2003), 9:112-123)。所述多核苷酸可为质粒或病毒DNA或RNA的形式。优选地,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸为微小RNA或模拟微小RNA。

[0039] 在一个实施方式中,本发明的上下文中要抑制的多核苷酸包含或由SEQ ID NO:1(成熟miR-31)、SEQ ID NO:2(miR-31的种子序列)、或SEQ ID NO:3(前体-miR-31)中任何一项的核苷酸序列组成,如本文表1所示。进一步地,本发明的上下文中要抑制的多核苷酸还可具有核酸序列,其包含或由以下序列组成:由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的种子序列组成的核苷酸序列,如表1所示,其在相应种子序列的5'-末端和/或3'-末端包含相应成熟或前体-miR序列中的一个、两个、三个或更多核苷酸。例如,本发明的上下文中要抑制的多核苷酸可具有核酸序列,其包含或由以下序列组成:核苷酸序列[A]G-G-C-A-A-G-A-U[GC](即SEQ ID NO:1的种子序列在5'-末端加上对应成熟miRNA序列的一个核苷酸,并在3'-末端加上对应成熟miRNA序列的两个核苷酸)或[A]G-G-C-A-A-G-A-U[G](即SEQ ID NO:1的种子序列在5'-末端加上对应成熟序列的一个核苷酸,并在3'-末端加上对应成熟序列的一个核苷酸)。在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸(即,降低或抑制FZD3表达的多核苷酸)还可包含或由以下序列组成:显示于SEQ ID NO:1(成熟miR-31)、SEQ ID NO:2(miR-31的种子序列)或SEQ ID NO:3(前体-miR-31)中任何一项的核苷酸序列,在本文表1中也有显示,其中添加、缺失或置换了一个、两个、三个、四个、五个或更多核苷酸。进一步地,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸还可具有核酸序列,其包含或由以下序列组成:如表1所示的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的种子序列,在对应种子序列的5'-末端和/或3'-末端包含对应的成熟或前体-miR序列的一个、两个、三个或更多核苷酸,其中添加、缺失或置换了一个、两个、三个、四个、五个或更多核苷酸。例如,本发明的上下文中要抑制的多核苷酸可具有核酸序列,其包含或由以下核苷酸序列组成:[A]G-G-C-A-A-G-A-U[U](即SEQ ID NO:1的种子序列在5'-末端加上对应成熟序列的一个核苷酸,并在3'-末端加上对应成熟序列的一个核苷酸,其中3'-末端的核苷酸由U所取代)。优选地,所述一个、两个、三个、四个、五个或更多核苷酸的添加、缺失或置换不在本文表1所示的多核苷酸的种子序列中进行。而且,在本发明上下文中要抑制的多核苷酸可包含与以下多核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性的多核苷酸或由其组成:包含或由SEQ ID NO:1(成熟miR-31)、SEQ ID NO:2(miR-31的种子序列)或SEQ ID NO:3(前体-miR-31)中任何一项的核苷酸序列组成的多核

核苷酸,其在本文表1中也有显示。进一步地,在本发明上下文中要抑制的多核苷酸也可包含与以下多核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性的核酸序列或由其组成:包含或由表1所示的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的种子序列组成并在相应种子序列的5'末端和/或3'末端加上对应成熟或-前体-miR序列的一个、两个或更多核苷酸的核苷酸序列组成的多核苷酸。例如,在本发明上下文中要抑制的多核苷酸可包含与以下多核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性的核酸序列或由其组成:包含或由核苷酸序列G-G-C-A-A-G-A-U[gc](即,SEQ ID NO:1的种子序列并在其3'末端加上对应成熟序列的两个核苷酸)组成的多核苷酸。此外,在本发明上下文中要抑制的多核苷酸还可包含与以下多核苷酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性的核酸序列或由其组成且包含本文表1所示的SEQ ID NO:2(miR-31的种子序列):包含或由也示于本文表1的SEQ ID NO:1(成熟miR-31)或SEQ ID NO:3(前体-miR-31)中任何一项的核苷酸序列组成的多核苷酸。

[0040] 通常,如本文所使用的,包含本文提供的序列的核酸序列的多核苷酸还可为由所述核酸序列构成的多核苷酸。在一个实施方式中,在本发明上下文中要抑制的多核苷酸具有如SEQ ID NO:1所示的核酸序列。

[0041] 在确定给定的两个核酸分子是否能相互杂交的情况下,例如,要确定本发明上下文中要抑制的多核苷酸是否杂交于FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA,或本发明描述的并根据本发明使用的抑制剂是否杂交于本发明上下文中要抑制的多核苷酸,将在生理或人工条件下、严格或非严格条件下进行杂交并加以检测。所述杂交条件可根据常规操作流程确立,例如描述于Sambrook,Russell" *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, " *Current Protocols in Molecular Biology*", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), 或 Higgins和Hames(编者) " *Nucleic acid hybridization, a practical approach*" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985)。对条件的设置是本领域技术人员能很好地胜任的,并可根据本领域描述的操作流程而确定。因此,检测仅特异性杂交的序列通常要求严格杂交和洗涤条件,如65℃下,0.1x SSC,0.1%SDS。用于检测同源的或不精确互补的序列的非严格杂交条件可设置为65℃下,6xSSC,1%SDS。如本领域熟知的,探针长度和要确定的核酸的组成构成了杂交条件的其他参数。上述条件的变动可通过包括或置换备选的封闭试剂(用于抑制杂交实验中的背景)而完成。典型的封闭试剂包括Denhardt氏试剂、BLOTTO、肝素、变性鲑鱼精子DNA和市售的专有配方。由于兼容性的问题,包括特异性封闭试剂可能需要调整上述的杂交条件。根据本文描述的发明,用于检测同源的或不精确互补的序列的非严格杂交条件可设置为,例如,65℃下,6xSSC,1%SDS。如本领域熟知的,探针长度和要确定的核酸的组成构成了杂交条件的其他参数。在本发明上下文中要抑制的杂交于FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA的多核苷酸还包括上述本发明上下文中要抑制的多核苷酸的片段。优选地,这些片段为能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的多核苷酸。这些片段可为,例如,多核苷酸如,靶向FZD3的mRNA的siRNA或由4个siRNA组成的siRNA集合,可购自Dharmacon(on-target plus smart-pool L-005502-00-0005, NM_017412)。进一步地,杂交复合物指的是两条核酸序列之间通过互补的G和C碱基之间以及互补的A和T(或相应地为U)碱基之间形成氢键的复合物;这些氢键可通过碱基堆积相互作用而进一步稳定。杂交复合

物可在溶液中形成(例如,Cot或Rot分析),或在溶液中的一种核酸序列以及固定化于固相支持物(例如,固定了细胞的膜、滤膜、芯片、大头针或玻片)的另一种核酸序列之间形成。术语互补的或互补性指的是多核苷酸在允许的盐和温度条件下通过碱基配对的方式发生的天然结合。例如,序列“A-G-T(或相应地为U)”结合于互补序列“T(或相应地为U)-C-A”。两个单链分子之间的互补性可以为“部分的”,其中只有一些核酸碱基有结合,或可以为完全的,当单链分子之间存在完全互补性时。核酸链间互补程度对核酸链之间的杂交效率和强度有显著影响。

[0042] 为确定两个核酸分子是否相互杂交,例如,给定多核苷酸是否杂交于本文描述的FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA,并由此诱导FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA的降解或阻止其翻译,或本发明描述的并根据本发明使用的抑制剂是否杂交于本发明的上下文中要抑制的多核苷酸,可应用本领域已知并描述于本文的多种测试。在此情况下,可在生理条件或本领域已知且在本文描述的人工条件下发生杂交并进行测试。例如,确定miRNA和mRNA之间杂交的测试可为荧光酶测定,如本文及Promega(C8021(psiCHECK-2Vector),E1960(**Dual-Luciferase®**Reporter Assay System))的技术公告中描述的。在本发明的上下文中,适合于确定一种多核苷酸是否杂交于另一种核酸(例如,FZD3的mRNA的3'UTR)的方法的一般实例为报告子基因测定,其中通常使用的报告子基因有如荧光蛋白质(例如,GFP、eGFP、YFP、eYFP、BFP或eBFP)或发光蛋白质(例如,Renilla或萤火虫荧光酶,或lacZ基因编码的 β -半乳糖苷酶)。进一步地,mRNA的降解或相应翻译产物的水平(用于测试mRNA的翻译是否被降低或阻止)可容易地通过本领域已知方法检查。适合检查mRNA的降解或稳定性的方法的实例为qPCR、RT-PCR、qRT-PCR、RT-qPCR、**Light Cycler®**、**TaqMan®**Platform and Assays、RNA印迹、点印迹、微阵列、下一代测序(VanGuilder,Biotechniques(2008),44:619-26;Elvidge,Pharmacogenomics(2006),7:123-134;Metzker,Nat Rev Genet(2010),11:31-46)。适合检查mRNA的翻译是否被阻止或降低的方法的实例为聚丙烯酰胺凝胶电泳和相关印迹技术,如蛋白质印迹配合基于显色染料的蛋白质检测技术(如银染或考马斯亮蓝染色),或配合基于荧光和发光的方法,用于检测溶液和凝胶、印迹和微阵列中的蛋白质,如免疫染色,以及免疫沉淀、ELISA、微阵列以及质谱分析法(Western Blot(Burnette,Anal Biochem(1981)112:195-203)或ELISA(Crowther,JA.The ELISA Guidebook.Humana Press;Totowa,NJ:2001))。

[0043] 在本发明的上下文中,为确定给定多核苷酸是否降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达(例如,通过杂交于FZD3的mRNA并由此诱导FZD3mRNA的降解或阻止其翻译),可容易地检测所表达的FZD3的水平。在本发明的上下文中,如果检测到的接触了待测多核苷酸的测试样品中的FZD3的表达水平比未接触所述多核苷酸的对照样品中FZD3表达水平低至少1.5倍、优选地至少1.75倍、更优选地至少2.0倍、最优选地至少2.5倍时,则将多核苷酸评定为降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达。例如,可进行蛋白质印迹分析检测FZD3蛋白质。

[0044] 进一步地,在一个实施方式中,在本发明上下文中要抑制的多核苷酸可杂交于FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA的3'UTR(不翻译区)或结合于所述3'UTR的片段。可通过上文描述的方法容易地测试在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸与FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA的3'UTR之间的杂交。优选地,通过杂交于FZD3或其生物学活性衍生物的

mRNA的3'UTR或杂交于所述3'UTR的片段,本发明的上下文中要抑制的多核苷酸诱导了所述FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA的降解或阻止了其翻译。通常,在本发明的上下文中,当提到FZD3时,指的是GenBank登记号为NM_017412,版本号177(公布于2010年4月15日)。FZD3mRNA的3'UTR显示于本文的SEQ ID NO:4。在一个实施方式中,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸能够杂交于包含SEQ ID NO:4的3419-3426位核苷酸的核酸序列,优选地,其由此诱导FZD3或其生物学活性衍生物的mRNA的降解或阻止其翻译。

[0045] 本发明的上下文中要抑制的多核苷酸可包含于脂类组合物、外来体、泡囊体、脂质体、PEI(聚乙烯亚胺)或去端肽胶原。而且,根据本发明,要抑制的多核苷酸(即,其能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达)的拮抗剂/抑制剂可包含于脂类组合物、外来体或脂质体内。例如,所述拮抗剂/抑制剂可为如本文所描述的miR-31或其3'或5'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂。miR-31的3'或5'异构体的实例显示于表3。本发明还涉及这些脂类组合物、外来体和脂质体用于本文描述的医疗干预的用途,例如,用于在受试者中治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病,如中风、心肌梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭、或动脉粥样硬化。

[0046] 如本文所使用的,FZD3的生物学活性衍生物指的是与FZD3有相同生物学功能的分子,即,其能够经由PI3K-AKT途径转导信号(Kawasaki,Cell Signal(2007),19:2498-506)。在本发明的上下文中,为了证实给定化合物是否为FZD3的生物学衍生物,可测试其下游靶标AKT的磷酸化状态。用于此目的,可用待测化合物处理ASC、骨髓来源干细胞或任何其他能够进行成骨分化的细胞类型以测试不同时间和不同剂量下的FZD3-活性,或可用编码待测化合物的质粒转染细胞以测试FZD3-活性。然后,可使用本领域已知方法制备细胞裂解物。这可例如通过使用细胞裂解缓冲液(20mM Tris-HCl(pH7.5))、12mMβ-磷酸甘油、150mM NaCl、5mM EGTA、10mM氟化钠、1%Triton X-100、1%脱氧胆酸钠、1mM二硫苏糖醇(DTT)、1mM原钒酸钠、蛋白酶抑制剂混合物(Roche,Switzerland)、磷酸酶抑制剂混合物1和2(Sigma, St.Louis,MO)进行。接着,可通过本领域已知方法进行磷酸化蛋白质的分析,例如通过免疫印迹分析。进行免疫印迹分析的说明性实施例为,取30μg总蛋白质进行SDS-PAGE并印迹于聚偏二氟乙烯膜(如PVDF)上。然后,使用抗磷酸Akt(Ser473)抗体(Cell Signalling, Danvers,9271)(1:500)及抗磷酸Akt(Thr308)抗体(Cell Signalling,Danvers,9272)(1:500)进行杂交。作为阳性对照使用的是FZD3的过表达物。作为阴性对照使用了已知能阻止AKT磷酸化的特异性PI3K抑制剂如渥曼青霉素或LY294002。在本发明的上下文中,如果AKT的磷酸化可达到未处理的细胞对照的超过40%或超过50%,则所测化合物可被认为是FZD3的生物学活性衍生物。在本发明上下文中的FZD3衍生物的mRNA的3'UTR的核酸序列可与SEQ ID NO:4有至少80%、85%、90%、95%或98%的同一性。

[0047] 如已经提到的,本发明涉及包含要抑制的一种多核苷酸或多种多核苷酸(即,其能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达)的抑制剂的组合物用于在受试者中治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍的用途,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭、或动脉粥样硬化。所述组合物还可包含外来体和/或脂质体,其包含能够降低FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸拮抗剂/抑制剂和/或包含miR-31或其3'或5'异构体或

变体的拮抗剂/抑制剂。

[0048] 根据本发明,要治疗的或其中要预防骨障碍和/或心血管障碍,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭、或动脉粥样硬化的受试者可为哺乳动物。在本发明的一个优选的实施方式中,受试者为人。

[0049] 通常,本发明的上下文中要使用的组合物可包含拮抗剂/抑制剂或含有所述拮抗剂/抑制剂的外来体/脂质体,所述拮抗剂/抑制剂抑制一种、两种、三种或多种在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸。另外,所述组合物还可包含两种、三种或多种拮抗剂/抑制剂或外来体/脂质体,其中每种拮抗剂/抑制剂能够抑制一种、两种、三种或多种在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸。

[0050] 本文描述的且在本发明的上下文中要采用的组合物可包含本文描述的拮抗剂/抑制剂或外来体/脂质体,其量与要治疗的或其中要预防骨障碍和/或心血管障碍,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭、或动脉粥样硬化的受试者的体重的比例为大约1ng/kg体重-大约100mg/kg体重。在本发明的一个优选的实施方式中,所述组合物包含的抑制剂的量为大约1 μ g/kg体重-大约20mg/kg体重,更优选地为1mg/kg体重-大约10mg/kg体重。

[0051] 本文描述的且在本发明的上下文中要采用的组合物可进一步包含药用可接受载体。因此,本发明还涉及药用组合物,其包含在本发明上下文中要抑制的一种多核苷酸或多种多核苷酸的拮抗剂/抑制剂、miR-31或其3'或5'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂,和/或包含所述拮抗剂/抑制剂的外来体或脂质体,并进一步包含药用可接受载体、辅料和/或稀释剂。通常,合适的药用载体的实例在本领域已经熟知,并包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳化剂如油/水乳剂、多种类型的湿润剂、灭菌溶液等等。包含这些载体的组合物可通过熟知的常规方法制剂。可以以合适的剂量将这些药用组合物施用于受试者,即与要治疗的或其中要预防骨障碍和/或心血管障碍,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭、或动脉粥样硬化的受试者体重的大约1ng/kg体重-大约100mg/kg体重。在本发明的一个优选的实施方式中,包含在本发明的上下文中要抑制的一种多核苷酸或多种多核苷酸的抑制剂的组合物包含所述抑制剂的量为大约1 μ g/kg体重-大约20mg/kg体重、更优选地为1mg/kg体重-大约10mg/kg体重。所述组合物的施用可以不同的方式起效或施用,如肠内、口服(例如,丸剂、片剂(口腔、舌下、口服、崩解片、胶囊、薄膜、液体溶液或悬液、粉末、固态晶体或液体)、直肠内(例如,栓剂、灌肠剂)、经由注射(例如,静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内、皮内)、经由吸入(例如,支气管内)、外用、阴道内、表皮或鼻内。在本发明的上下文中,包含外来体或脂质体(含有能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸的拮抗剂/抑制剂和/或miR-31或其3'或5'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂)的组合物可局部或系统应用。当局部应用(例如直接应用于骨的受损位点时)时,包含外来体/脂质体的组合物尤其可用于治疗骨障碍如骨质疏松、骨量减少、骨折或骨平衡受损。用于将这些组合物直接应用于骨的方法在本领域已知(Takeshita, Mol Ther (2010), 18:181-187)。在系统(例如,肠道外、口服或本文描述的其他途径)应用时,所述组合物可用于治疗或预防本文描述的骨障碍和/或心

血管障碍。要理解的是,本文描述的拮抗剂/抑制剂还可通过其他方式,甚至是直接地进行局部或系统的施用。给药方案可由主治医师及临床因素确定。如医疗领域熟知的,对任何患者的剂量取决于多种因素,包括患者的形体大小、体表面积、年龄、要施用的具体化合物、性别、时间和施用途径、一般健康状况及同时施用的其他药物。本文描述的组合物可局部或系统施用。系统施用优选地为肠道外施用,例如静脉内施用。组合物还可直接施用于靶标位点,例如,通过生物弹递送至内部或外部靶标位点或通过导管递送至动脉内的位点。用于肠道外施用的制备物包括灭菌的含水或非含水溶液、悬液和乳液。非含水溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、蔬菜油如橄榄油、聚乙烯亚胺和可注射有机酯如油酸乙酯。水相载体包括水、乙醇/水溶液、乳剂或悬液,包括盐水和缓冲介质。肠道外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖氯化钠、乳酸林格液或固定油。静脉内媒介物包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于林格氏葡萄糖的那些),诸如此类。还可存在防腐剂和其他添加剂如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体,等等。进一步地,尤其是在考虑到前文提到的因素时,还包括上文描述的示例性范围之下或之上的剂量。

[0052] 如已经提到的,本文描述的组合物(其包含能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的在本发明的上下文中要抑制的一种多核苷酸或多种多核苷酸的拮抗剂/抑制剂、miR-31或其3'或5'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂和/或含有所述拮抗剂/抑制剂的外来体和/或脂质体)可用于在受试者中治疗或预防骨障碍和/或心血管障碍,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭、或动脉粥样硬化。

[0053] 在本发明的上下文中,根据本发明要抑制的一种多核苷酸或多种多核苷酸的拮抗剂/抑制剂可为核酸分子、多肽或任何其他能够拮抗/抑制在本发明上下文中要抑制的多核苷酸的化合物。例如,在本发明的上下文中要采用的拮抗剂/抑制剂为miR-31或其5'或3'异构体或变体的拮抗剂/抑制剂。在本发明的上下文中要采用的拮抗剂/抑制剂可为能够杂交于要抑制的多核苷酸的核酸分子。如本文所描述的,核酸分子包括所有种类的核苷酸分子如DNA分子、RNA分子、寡核苷酸硫代磷酸酯,置换的核糖寡核苷酸,LNA分子(Orom, Gene (2006), 10 (372), 137-141)、PNA分子、GNA(乙二醇核酸)分子,TNA(苏糖核酸)分子,吗啉代基多核苷酸,或antagomir(结合胆固醇)多核苷酸及其修饰物。所述拮抗剂/抑制剂可在如本文所描述的严格或非严格条件下(对于短序列的杂交条件见下文)杂交于要抑制的所述多核苷酸,优选地是在严格条件下杂交。用于确定和评估核酸分子之间杂交情况的方法在本领域熟知,也在上下文有所描述。优选地,根据本发明,拮抗剂/抑制剂通过杂交于在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸而阻止要抑制的所述多核苷酸(例如,通过所述多核苷酸与FZD3或其生物学衍生物的mRNA(例如其3'UTR)杂交)对FZD3或其生物学衍生物的表达的降低或抑制。用于确定和评估多核苷酸降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的能力的方法以及用于确定或评估FZD3表达水平是否有降低或抑制的方法在本文有所描述。因此,如果给定化合物能够阻止本发明的上下文中要抑制的多核苷酸与FZD3或其生物学衍生物的mRNA(例如其3'UTR)的杂交,则可将其评定为本发明的上下文中可采用的拮抗剂/抑制剂。因此,在本发明的上下文中,拮抗剂/抑制剂能够至少部分地逆转本发明的上下文中要抑制的多核苷酸对FZD3或其生物学衍生物的效应。例如,在本发明的上下文中要采用的拮抗剂/抑制剂对本发明的上下文中要抑制的多核苷酸对FZD3表达的效应的逆转可为50%或

更多、优选地为60%或更多、更优选地为70%或更多、更优选地为80%或更多、更优选地为90%或更多、更优选地为95%或更多、更优选地为98%或更多、最优选地为99%或更多。即,例如,如果在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸能够将FZD3或其生物学衍生物的量降低或抑制到相比正常(即未添加所述多核苷酸的)表达水平的50%的表达水平,而应用了如本文描述的抑制剂时表达水平有所增加,使得FZD3或其生物学衍生物的表达水平的量增加到相比于正常(即未添加所述多核苷酸的)表达水平的75%的表达水平,则所述抑制剂逆转了所述多核苷酸的效应的50%。

[0054] 在本发明的一个实施方式中,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的拮抗剂/抑制剂为能够(优选地在如本文描述的严格条件下)杂交于所述多核苷酸并由此阻止所述多核苷酸与FZD3或其生物学衍生物的mRNA(例如其3'UTR)的杂交的核酸分子。所述要用作拮抗剂/抑制剂的核酸对本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的杂交可在要抑制的所述多核苷酸的全长范围发生,也可只在要抑制的所述多核苷酸的部分序列范围内发生,例如,在要抑制的所述多核苷酸序列的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的范围内发生。在本发明的一个实施方式中,在本发明的上下文中要采用的拮抗剂/抑制剂可为互补于本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的反义寡核苷酸。优选地,根据本发明,要在本发明的上下文中采用的拮抗剂/抑制剂为一种反义寡核苷酸,其包含以下核酸分子或由其组成:具有与显示于上文表1中序列中任何一项的序列互补、如与SEQ ID NO.1-3中任何一项互补的序列的核酸分子。例如,这些反义寡核苷酸可包含SEQ ID NO.5-8中任何一项的核苷酸序列或由其组成。通常,miRNA或siRNA的拮抗剂/抑制剂在本领域已熟知,且有市售的定制miRNA-或siRNA-抑制剂。例如,在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的拮抗剂/抑制剂可为核酸分子如antagomiR(Krützfeldt, Nature (2005), 438:685-689)或任何其他具有硫代磷酸键和胆固醇尾的2'-O-甲基-RNA寡核苷酸、miRCURY LNA™微小RNA抑制剂(Exiqon)、体内LNA™miR抑制剂(Exiqon)、微细LNA(Obad, Nat Genet (2011), 43(4):371-378)、miR-诱饵或miR-海绵(Ebert, Nat Methods (2007), 4:721-726; Bonci, Nat Med (2008), 14:1271-1277)或类似的能够例如通过杂交于上文描述的本发明的上下文中要抑制的多核苷酸而拮抗/抑制所述多核苷酸的物质。拮抗剂/抑制剂还可为降解miRNA的酶或来源于所述酶类(描述于Chatterjee, Nature (2009), 461:546-9)、锤头核酶(描述于Tedeschi, Drug Discov Today (2009), 14:776-783)、或antogomirzyme(描述于Jadhav, Angew Chem Int Ed Engl (2009), 48(14):2557-2560)。在本发明的上下文中,miRCURY LNA™微小RNA抑制剂的一个实例为抗-miR-31LNA,如SEQ ID NO:5中所示。在本发明的上下文中,antagomiR、miRCURY LNA™微小RNA抑制剂、体内LNA™miR抑制剂、微细LNA、miR诱饵或miR海绵可包含核酸分子或包括选自以下的核酸序列

[0055] (a) SEQ ID NO:5或包含其的核酸序列;

[0056] (b) SEQ ID NO:6或包含其的核酸序列;

[0057] (c) SEQ ID NO:7或包含其的核酸序列;

[0058] (d) SEQ ID NO:8或包含其的核酸序列;和

[0059] (e) 与(a)-(d)中任何一项的核酸序列有至少90%或至少95%的同一性的核酸序列。

[0060] 如所提到的,这些拮抗剂/抑制剂可杂交于或结合于本文描述的要抑制的所有类型的多核苷酸,包括微小RNA、siRNA、模拟微小RNA、长链非编码RNA、snRNA、stRNA、fRNA、

snRNA、snoRNA、piRNA、tasiRNA、aRNA及这些多核苷酸的前体。

[0061] 本发明涉及一种用于在人受试者中治疗或预防骨障碍如骨质疏松或心血管疾病如动脉粥样硬化的组合物,其包含核酸分子,所述核酸分子在严格条件下杂交于由SEQ ID NO:1所示序列组成的多核苷酸,由此阻止所述多核苷酸与FZD3的mRNA的杂交。

[0062] 本发明涉及一种用于在人受试者中治疗或预防骨障碍骨质疏松或动脉粥样硬化的组合物,其包含核酸分子,所述核酸分子在严格条件下杂交于miR-31或其3'或5'异构体或变体,由此阻止miR-31或其3'或5'异构体或变体与FZD3的mRNA的杂交。所述核酸分子可为如本文所描述的antagomiR、miCURY LNATM微小RNA抑制剂、体内LNATM miR抑制剂、miR诱饵或miR海绵。

[0063] 本发明涉及一种用于在人受试者中治疗或预防骨障碍骨质疏松或心血管疾病如动脉粥样硬化的组合物,其包含核酸分子,所述核酸分子在严格条件下杂交于由SEQ ID NO:2所示序列组成的多核苷酸,由此阻止所述多核苷酸与FZD3的mRNA的杂交。

[0064] 本发明涉及一种用于在人受试者中治疗或预防骨障碍骨质疏松或心血管疾病如动脉粥样硬化的组合物,其包含核酸分子,所述核酸分子在严格条件下杂交于由SEQ ID NO:3所示序列组成的多核苷酸,由此阻止所述多核苷酸与FZD3的mRNA的杂交。

[0065] 在前文段落的组合物的上下文中,在严格条件下与由SEQ ID NO:1-3中任何一项所示的核酸序列组成的多核苷酸杂交的核酸分子为antagomiR。

[0066] 在前文段落的组合物的上下文中,在严格条件下与由SEQ ID NO:1-3中任何一项所示的核酸序列组成的多核苷酸杂交的核酸分子为具有硫代磷酸键和胆固醇尾的2'-O-甲基-RNA寡核苷酸。

[0067] 在前文段落的组合物的上下文中,在严格条件下与由SEQ ID NO:1-3中任何一项所示的核酸序列组成的多核苷酸杂交的核酸分子为miRCURY LNATM微小RNA抑制剂(Exiqon)。

[0068] 在前文段落的组合物的上下文中,在严格条件下与由SEQ ID NO:1-3中任何一项所示的核酸序列组成的多核苷酸杂交的核酸分子为体内LNATMmiR抑制剂(Exiqon)。

[0069] 在前文段落的组合物的上下文中,在严格条件下与由SEQ ID NO:1-3中任何一项所示的核酸序列组成的多核苷酸杂交的核酸分子为miR-诱饵或海绵。

[0070] 进一步地,根据本发明,可将在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的所述拮抗剂/抑制剂(即,在核酸拮抗剂/抑制剂的情况下)克隆入载体。如本文所使用的,术语“载体”具体而言指的是质粒、粘粒、病毒、噬菌体和基因工程技术中常用的其它载体。在一个优选的实施方式中,这些载体适合于转化细胞,如真菌细胞,微生物如酵母的细胞或原核细胞。在一个具体的优选的实施方式中,这些载体适合用于稳定转化细菌细胞而,例如,转录本发明的多核苷酸。

[0071] 因此,在本发明的一方面,所提供的载体为表达载体。通常,表达载体已经在文献中有广泛描述。一般地,其可能不止含有选择标志物基因和确保在所选定的宿主中复制的复制起点,还包括一个启动子,且在大多数情况下包括转录的终止信号。在启动子和终止信号之间优选地有至少一个限制性位点或多接头,其使得需要表达的核酸序列/分子能够插入。

[0072] 要理解的是,当本文提供的载体是利用现有技术已知的已经包含了适合在本发明

的上下文中采用的启动子的表达载体产生并例如用于表达如上文所描述的多核苷酸的抑制剂时(即为核酸抑制剂的情况),核酸构建体是以所得载体只含有一个适合于在本发明上下文中采用的启动子的方式插入的。技术人员了解如何实际进行这种插入。例如,可在连接前将启动子从核酸构建体或从表达载体上切除。

[0073] 作为一个非限制性实例,其中克隆有本发明的上下文中要抑制(即降低或抑制FZD3表达)的多核苷酸的拮抗剂/抑制剂(即为核酸拮抗剂/抑制剂的情况)的载体为腺病毒、腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒或非病毒微环载体。适合于包含所述本发明的上下文中要抑制的多核苷酸抑制剂(即为核酸拮抗剂/抑制剂的情况)而形成本文描述的载体的其他实例在本领域已知。例如,已经克隆有本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的抑制剂(即为核酸抑制剂的情况)的载体可为miR-Vec——一种逆转录病毒表达载体(Voorhoeve, Cell (2006), 124:1169-1181)。

[0074] 在一个另外的实施方式中,本发明的上下文中要抑制的多核苷酸抑制剂(核酸抑制剂或肽抑制剂的编码核酸序列的情况)和/或克隆有本文描述的多核苷酸的载体可转导、转化或转染或以其他方式导入宿主细胞。例如,宿主细胞为真核或原核细胞(如细菌细胞)。作为一个非限制性实例,宿主细胞优选地为哺乳动物细胞。本文描述的宿主细胞预期具体用于生成在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的抑制剂。

[0075] 通常,上文描述的宿主细胞可为原核或真核细胞(其包含在本发明上下文中要抑制的多核苷酸的抑制剂或本文描述的载体)或来源于所述细胞并含有本文描述的核酸构建体或载体的细胞。在一个优选的实施方式中,宿主细胞以在本发明上下文中要抑制的多核苷酸的抑制剂的核酸序列整合入基因组的方式包含在本发明上下文中要抑制的多核苷酸的抑制剂的核酸序列或本文描述的载体(即,细胞受到其的遗传修饰)。例如,本文描述的这些宿主细胞可为细菌、酵母或真菌细胞。在一个具体的方面,宿主细胞能够转录在本发明的上下文中降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的多核苷酸的抑制剂的核酸序列。在例如Methods in Enzymology 153 (1987), 385-516、Bitter (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544)、Sawers (Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9)、Billman-Jacobe (Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4)、Hockney (Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463)以及Griffiths, (Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440)中包括有对用于生成本文描述的宿主细胞的不同对应表达系统的实例的概述。用在本发明上下文中要抑制的多核苷酸的抑制剂的核酸序列或本文描述的载体对宿主细胞的转化或遗传工程改造可通过标准方法进行,在Sambrook and Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990中有所描述。

[0076] 进一步地,如已经提到并在本发明的上下文中的,已经意外地发现miR-31是作为老化或年龄相关疾病如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化的生物标志物的一种有价值的工具。也就是,在本发明上下文中要抑制的多核苷酸自身也可作为诊断或预后标志物,而(例如通过使用化合物与其结合)对所述多核苷酸的检测可用于诊断或预测受试者中疾病或障碍的进展如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心

血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化。因此，本发明涉及一种化合物，其用于在受试者中诊断或预测骨障碍和/或心血管障碍的进展如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏，或心血管障碍如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化，所述化合物结合于在本发明上下文中要抑制的多核苷酸，即，结合于如本文描述的能够降低或抑制FZD3或其生物学衍生物的表达的多核苷酸。

[0077] 因此，本发明进一步涉及用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍，如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏，或心血管障碍如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化的组合物，其包含

[0078] (a) 如上文描述的能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸，和/或

[0079] (b) 杂交于如上文描述的能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸的核酸分子，和/或

[0080] (c) 结合于如上文描述的能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的试剂。

[0081] 本发明还涉及一种用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍或用于体外监测如本文描述的骨障碍和/或心血管障碍治疗成功情况的组合物，其包含

[0082] (a) 能够与能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸特异性相互作用(例如结合)的试剂，和/或

[0083] (b) (优选地在严格条件下)杂交于能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸的核酸分子。

[0084] 如本文所使用的，具体而言在“能够与能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸相互作用的试剂”或“能够与能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸结合的试剂”的上下文中，术语“试剂”包括特异蛋白质或蛋白质片段。这些蛋白质或蛋白质片段可为例如，抗体或其片段、小分子抑制剂或转录因子或修饰的转录因子。这些(修饰的)转录因子的实例为(修饰的)锌指蛋白。用于生成多核苷酸小分子抑制剂的方法在本领域已知(Davis, Antivir Chem Chemother (2011), 21 (3):117-128)。在本文中，术语“抗体”和“抗体片段”是以其最广泛的意义使用的，包括但不限于，单克隆和多克隆抗体、多特异性抗体(如双特异性抗体)、嵌合抗体、CDR植入抗体、人源化抗体、骆驼化抗体、单链抗体和抗体片段及片段构建体，例如，F(ab')₂片段、Fab-片段、Fv-片段、单链Fv-片段(scFv)、双特异性的scFv、双抗体、单域抗体(dAb)和小分子抗体，其能够特异性地与如本文所述的要抑制的多核苷酸相互作用或结合。用于生产针对多核苷酸的抗体的方法在本领域熟知(见例如Ye, Proc Nat Acad Sci USA (2008), 105:82-87)。

[0085] 进一步地，本发明涉及用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍，如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏，或心血管障碍如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化的药用组合物，其包含结合于在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的化合物，如核酸分子或抗体。在本发明的一个实施方式中，结合于在本发明的上下文中要抑制的多核苷酸的化合物一种核酸分子，如在能够杂交于如上文描述的所述多核苷酸的抑制剂的上下文中所描述的。所述结合核酸分子与本

发明的上下文中要抑制的所述多核苷酸的杂交可由技术人员使用本领域熟知方法(在本文也有描述)容易地检测到。在一个实施方式中,所述结合化合物为结合试剂如特异性结合于本发明的上下文中要抑制的(即,其能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的)所述多核苷酸的抗体或其片段(如F(ab)或F(ab)₂片段)。抗体或其片段对多核苷酸的结合可由技术人员使用本领域熟知方法容易地检测,如ELISA、EIA或类似方法。

[0086] 本文描述的是用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化的方法,所述方法包括步骤:

[0087] (a)从所述受试者中获取生物样品,其包含如上文描述的能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物的表达的多核苷酸;

[0088] (b)将所述样品于杂交于(a)的多核苷酸的核酸分子相接触,或与结合于(a)的多核苷酸的试剂相接触;

[0089] (c)检测并评估(b)的核酸分子或(b)的试剂与(a)的多核苷酸的杂交或结合信号;以及

[0090] (d)将所检测和评估的(c)的杂交或结合信号与在对照样品中相应地检测并评估的杂交或结合信号相比较,

[0091] 其中在受试者样品中的杂交信号或结合信号比所述对照样品中的信号更强提示有发展或患有骨障碍和/或心血管障碍的风险。

[0092] 本发明涉及用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化的方法,所述方法包括步骤:

[0093] (a)(i)将来自所述受试者的生物样品与(优选地在严格条件下)杂交于能够降低或抑制FZD3表达的多核苷酸和/或(优选地在严格条件下)杂交于miR-31或其5'或3'异构体或变体的核酸分子相接触,或

[0094] (ii)将所述生物样品与结合于所述能够降低或抑制FZD3表达并/或结合于miR-31或其5'或3'异构体或变体的多核苷酸的试剂相接触;

[0095] (b)检测并评估(a)(i)的核酸分子与所述多核苷酸和/或所述miR-31或其5'或3'异构体或变体的杂交信号,或者检测并评估(a)(ii)的试剂与所述多核苷酸和/或所述miR-31或其5'或3'异构体或变体的结合信号;以及

[0096] (c)将所检测并评估的(b)(a)(i)的杂交信号或所检测并评估的(b)(a)(ii)的结合信号与对照样品中对应地检测并评估的杂交或结合信号相比较,

[0097] 其中在受试者样品中的杂交信号或结合信号比所述对照样品中的信号更强提示有发展或患有骨障碍和/或心血管障碍的风险。

[0098] 在一个实施方式中,涉及用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍,如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化的方法,所述方法包括步骤:

[0099] (a)将来自所述受试者的生物样品与(优选地在严格条件下)杂交于能够降低或抑制FZD3表达和/或(优选地在严格条件下)杂交于miR-31或其5'或3'异构体或变体的多核苷酸相接触;

[0100] (b)检测并评估(a)的核酸分子与所述多核苷酸和/或所述miR-31或其5'或3'异构体或变体的杂交信号;以及

[0101] (c)将所检测并评估的(b)的杂交信号与对照样品中对应地检测并评估的杂交信号相比较,

[0102] 其中在受试者样品中的杂交信号比所述对照样品中的杂交信号更强提示有发展或患有骨障碍和/或心血管障碍的风险。

[0103] 要在本发明的诊断方法中采用(即,杂交于能够降低或抑制FZD3表达的多核苷酸)的核酸分子可为本文描述的任何种类的核酸分子。例如,这些核酸分子可为引物(例如用于PCR技术)或探针(例如,用于微阵列或印迹测定如点印迹、DNA印迹或RNA印迹)。具体而言,引物可用于如本文描述和示例说明的PCR技术中。优选地,如本领域已知的,一条引物与要检测的多核苷酸的5'末端的序列互补(“正向引物”),而另一条引物与要检测的多核苷酸的3'末端的序列互补(“反向引物”)。用于PCR技术等的引物通常应具有的长度为大约12-30个核苷酸,但在适当时其还可包括更多或更少的核苷酸。引物可与要检测的多核苷酸的相应的序列不是100%互补,只要其还能够与此多核苷酸(优选地在严格条件下或在下文描述的对给定引物适当的条件下)杂交即可。进一步地,引物可缀合于本文描述的标志物分子或标签分子,如在UV/VIS或红外波长下激发和发射的荧光染料如FITC、TRITC、Texas Red、Cy-染料、alexa染料(Bioprobe),等等。探针可如本领域已知的方法生产,通常包括与要检测的多核苷酸的序列互补的核苷酸序列。探针在测定法如微阵列或印迹测定(如点印迹、DNA印迹或RNA印迹)中尤其有用,这些在本文有描述及示例性说明。探针的序列不必与要检测的多核苷酸的相应的序列100%互补,只要其还能够与此多核苷酸(优选地在严格条件下)相杂交即可。进一步地,探针可缀合于本文描述的标志物分子或标签分子,如在UV/VIS或红外波长下激发和发射的荧光染料如FITC、TRITC、Texas Red、Cy-染料、alexa染料(Bioprobe),等等。

[0104] 在本文提供的诊断方法的上下文中的杂交条件,尤其是用于上文描述的PCR技术的条件可为如下:SSC为3M NaCl和300mM柠檬酸三钠,以HCl调整至pH7.0。对于严格条件,使用了65℃的0.1或0.2x SSC,优选地加入1%的SDS。对于中等条件,使用了1x或2x SSC,而对于非严格条件,使用的是4x或6x SSC,优选地加入1%的SDS。温度通常为65℃或更低,这取决于探针-靶标复合物的解链温度。如所提到的,在本文提供的诊断方法的上下文中,核酸分子可在严格条件下杂交于要检测的多核苷酸(即,杂交于能够降低或抑制FZD3表达的多核苷酸)。

[0105] 根据本发明,确定核酸双链体的解链温度(T_m)通常可用于许多应用如PCR、结合测定、杂交等等。可将 T_m 规定为50%的给定核苷酸(如微小RNA)与其反向互补(即精确匹配形成双螺旋的)序列形成双链体的温度。 T_m 受到本领域普通技术人员熟知的大量因素的影响,如多核苷酸的长度、碱基组成、形成二级结构的可能性(如对于微小RNA前体分子常见的发夹结构),以及环境条件如盐(通常为单价阳离子)浓度、二价阳离子(Mg^{2+})浓度、pH及变性物质如甲酰胺的存在情况。

[0106] 为在PCR或任何其他要求核苷酸与其靶标形成双螺旋的测试中进行杂交,可确定所述核苷酸的 T_m 。本领域普通技术人员已知的有大量用于确定 T_m 的方法。例如,可通过在缓冲液中包括待测核苷酸及其精确反向互补物,并将温度从可完美退火的低温(如室温或更

低)提高到不可能再发生退火且大多数核苷酸变成单链并不会退火的高温(如95℃或更高)而进行经验性的确定。核苷酸从单链向双螺旋形式的变化可通过UV分光光度计而监测。例如,核苷酸及其精确匹配反向互补物可溶解于缓冲液如0.1x SSC(15mM NaCl,1.5mM柠檬酸三钠,pH7.0)中。可在从低温向高温逐步变化的温度(t)下于260nm处测量UV吸收值(Abs)以观察变性情况,而反之观察复性情况。当将所得温度相对吸收值作图时,可观察到S-状曲线,具有两个吸收值平台。然后可将T_m确定为上平台和下平台的温度的中点,或确定为一阶导数dAbs/dt的最大值(见例如,Thermal Analysis of DNA by UV/Visible Spectrometry,Moore,GBC application note,GBC Scientific Equipment Pty,Ltd,Braeside,Australia,http://www.gbcscientific.com/appnotes/uv_app_note_002.pdf),另见Sigma-Aldrich,St.Loiz,MO,USA“Oligo melting temperature”(http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna/learning-center/oligos-melting-temp.html)。

[0107] 当然,如本领域技术人员熟知的,对于非完美匹配的核苷酸、对于RNA/DNA双链体、对于并入了修饰或非典型碱基(如次黄嘌呤核苷,通常用作意于与四种典型核苷酸碱基A、C、G、T或U中任何一种的结合几乎相同的核苷酸)的核苷酸或具有改变的骨架的核苷酸分子(例如,锁定核酸-LNA或磷二酰胺吗啉核苷酸(见例如Summerton,Antisense Nucleic Acid Drug Dev(1997),7(3):187-195),其T_m可由相同方法进行实验确定。

[0108] 实验确定的T_m只可用于其测量时的条件。对于其他条件(例如,盐(单价阳离子)浓度、二价阳离子浓度)可使用公式估算不同条件下的T_m(见下文)。

[0109] 备选地,可计算给定核苷酸序列的近似T_m。本领域普通技术人员已知的有大量方法,如GC含量法、最近邻法和其他方法。通常,最近邻法产生更精确的估算,但是这些方法中任何一种对给定核苷酸序列的T_m的预测都没有绝对的精确性,因此必须考虑到有几℃(通常认为是5-10℃)的偏差。因此,在大多数杂交、退火、引物延伸或其他依赖于核苷酸双链体形成的方法中,将实验进行的温度选定为比理论计算的T_m低约5-10℃以确保完美的双链体形成。当然,如分子生物学领域中熟知的,可以如下方式优化杂交条件,例如可通过在多种温度及其他条件下测试杂交/引物退火/PCR或进行其他依赖于核苷酸双链体形成的实验并确定获得最佳结果的条件。

[0110] 计算T_m估值的一种简单的方式是基于核苷酸序列的GC含量(例如对于短核苷酸序列,见“华莱士规则”,Wallace,Nucleic Acids Res(1979),6:3543;对于较长核苷酸,见下文)。简言之,对含有DNA和RNA的双链体的T_m估值的计算使用了不同的公式,因为RNA碱基倾向于更强地配对,对于相同序列比DNA-DNA双链体产生更高的T_m值(通常,对于相同核苷酸序列,RNA-RNA双链体最稳定,RNA-DNA杂合体有中等稳定性,而DNA-DNA双链体最不稳定)。一个简单的公式为“华莱士法则”,其中将解链温度确定为序列中每对A/T为2℃,而每对G/C为4℃($T_d = 2(\#A/T) + 4(\#G/C)$)。此公式获得了核苷酸在盐浓度为0.9M时为膜结合的条件下对解链温度的估算。当形成双链体的两种核苷酸都在溶液中时,T_m比由此公式计算的略低(低大约7-8℃)。对于比大约14-20个碱基更长的核苷酸,可使用描述于Howley,J Biol Chem(1979),254:4876的方法。简言之,对于DNA-DNA双链体,可将T_m计算为, $T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 41(GC\%) - 500/L - 0.62F$,其中Na⁺为单价阳离子的摩尔浓度,GC%为GC核苷酸相对核苷酸总数的比例(为0-1之间的值),L为核苷酸长度,而F为溶液中如果有甲酰胺时其百

分比(为0-100之间的值)。当计算RNA-DNA杂合体或RNA-RNA双链体的估值时,使用了略微不同的公式($T_m = 79.8 + 18.5 \log [Na^+] + 58.4 (\%GC) + 11.8 (\%GC)^2 - 820/L - 0.35F$),而对于DNA-RNA杂合体(RNA为溶液中的分子)公式为 $T_m = 79.8 + 18.5 \log [Na^+] + 58.4 (\%GC) + 11.8 (\%GC)^2 - 820/L - 0.50F$ 。

[0111] 估算 T_m 值的一种改进方法为最近邻法,这样命名是因为其不仅考虑了双链体中的G/C相互作用的百分比,还考虑到了每个核苷酸的最近邻,其有效地增加了序列中每两个核苷酸的结合能。该方法对具有相同G含量的不同核苷酸序列产生了不同的 T_m 估值,产生了比上文提到的GC含量法更确切的 T_m 估算(概述见例如,SantaLucia,Proc Natl Acad Sci USA (1998),95:1460-1465;对于DNA见例如Breslauer,Proc Natl Acad Sci USA (1986),83,3746-3750;对于RNA见例如,Freier,Proc Natl Acad Sci (1986),83,9373-9377)。作为一个实例,可使用公式 $T_m = (1000 \Delta H/A + \Delta S + R \ln(C/4)) - 273.15 + 16.61 \log [Na^+]$,其中 ΔH (Kcal/mol)为杂合体中最近邻焓变总和,A为含有用于螺旋启动的修正的小常数, ΔS 为最近邻熵变的总和,R为气体常数(1.99cal/(K*mol)),C为核苷酸浓度,而 Na^+ 为溶液中单价阳离子浓度。本计算式中要使用的DNA和RNA双链体的 ΔH 和 ΔS 的值显示于下表(公式实例和各值摘自Sigma-Aldrich,见上文的参考)。

[0112] 用于最邻近解链温度公式的热力学参数。

[0113]	相互作用	DNA		RNA	
		ΔH	ΔS	ΔH	ΔS
	AA/TT	-9.1	-24.0	-6.6	-18.4
	AT/TA	-8.6	-23.9	-5.7	-15.5
	TA/AT	-6.0	-16.9	-8.1	-22.6
	CA/GT	-5.8	-12.9	-10.5	-27.8
	GT/CA	-6.5	-17.3	-10.2	-26.2
[0114]	CT/GA	-7.8	-20.8	-7.6	-19.2
	GA/CT	-5.6	-13.5	-13.3	-35.5
	CG/GC	-11.9	-27.8	-8.0	-19.4
	GC/CG	-11.1	-26.7	-14.2	-34.9
	GG/CC	-11.0	-26.6	-12.2	-29.7
	启动	0.0	-10.8	0.0	-10.8

[0115] 通常,这些方法获得了估算值而不是绝对精确的值。此外,固定化情况(见上文)、杂质和核酸修饰等条件都可影响给定双链体或杂合体的实际 T_m 值。

[0116] 在一些情况下,必须使用经验方法,而在其他方法中经验确定法可用于改进计算式所获得的估算值。通常,修饰如生物素、荧光染料等可能导致 T_m 降低,而一些修饰(如LNA中使用的骨架修饰)可导致 T_m 升高。对于LNA骨架,可将含有这些骨架的核苷酸假定为RNA分子以作为近似(产生更稳定的结合并由此产生较高 T_m 值)。因此,LNA-RNA杂合体可像对应的RNA-RNA杂合体一样计算,而含有一些LNA核苷酸和一些DNA核苷酸的核苷酸可基于混合能量值计算(对于LNA核苷酸使用RNA值,而对于DNA核苷酸使用的是DNA值)。

[0117] 为了在分子生物学中使用简便,上述方法包含在大量服务器中以便公众使用,例如<http://biophysics.idtdna.com/>或http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php。

[0118] 因此,普通技术人员能够容易地确定给定核苷酸序列解链温度的估算值。例如,对于SEQ ID NO:1,可获得的 T_m 为50-54.4℃,而对于SEQ ID NO:3(miRNA31前体序列),可获得

67.4–76.2℃。这些值是在15mM单价阳离子(盐)浓度下计算的,这近似对应着0.1x SSC缓冲液,即对应着严格杂交条件(见上文进一步描述),前提是温度必须作出相应的调整(对于前体,在此情况下可测试65℃的温度条件),而对于较短的成熟miRNA,温度必须降低至大约45℃,这取决于其他因素如pH、二价阳离子、靶标浓度等等。对应地,(如果靶标在序列中是匹配的)可获得对给定序列变体的估算。

[0119] 对miRNA的检测可通过多种方法达到。例如,miRNA可通过深度测序方法检测和定量,这依据的是从较丰富地存在的miRNA分子获得更多的序列读数的事实。这些方法对技术人员熟知,并尤其由**Friedländer.**, *Nat Biotechnol* (2008), 26 (4) : 407–415; Koh, *BMC Genomics* (2010), 10 (11) Suppl1: S6; Creighton, *Brief Bioinform* (2009), 10 (5) : 490–497 描述。miRNA丰度可进一步由阵列技术确定。例如, Ncode 人miRNA阵列(可获自Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)可用于确定样品中大量人miRNA的相对丰度。还有用于检测和确定miRNA相对丰度的芯片阵列,可获自Affymetrix, Santa Clara, CA, USA, 例如U133Plus2.0.Affymetrix表达阵列(见例如, Ivanov, *J Biol Chem* (2010), 285: 22809–22817)。基于LNA骨架探针的阵列(miRCURY LNA™阵列)可获自例如Exiqon, Vedbaek Denmark。

[0120] 进一步地,样品中miRNA的存在情况及相对丰度可通过原位检测测定。尽管由于其长度短使得原位检测微小RNA(miRNA)呈现有数种技术挑战,然而这是可以克服的,例如通过使用异羟基洋地黄毒苷标记的锁核酸(LNA)寡核苷酸探针进行检测(见例如Sweetman, *Methods Mol Biol* (2011), 732: 1–8)。使用该方法可检测到miRNA的亚细胞分布。原位方法还可用于解决miRNA在组织和器官水平上的分布问题(见例如Diez-Roux, *PLoS Biol* (2011), 18; 9 (1) : e1000582)。其他人员的进一步的工作表明了原位杂交和基于荧光的检测用于miRNA检测及相对丰度确定的可用性(Lu J, *Methods Mol Biol* (2011), 680: 77–88; Mansfield, *Methods*. (2010), 52 (4) : 271–280; Gupta, *Methods Mol Biol* (2011), 676: 73–83; Debernardi, *Methods Mol Biol* (2010), 667: 33–45; Silahtaroglu, *Methods Mol Biol* (2010), 659: 165–171, 也以LNA核苷酸作为探针使用; 以及Nuovo, *Methods* (2010), 52 (4) : 307–315, 表明此方法还可用于石蜡包埋样品)。

[0121] 如所提到的,本发明提供的诊断方法的上下文中可采用的miRNA检测和定量的方法的另一个实例为定量PCR(qPCR)。因为miRNA是相对短的分子,所以可以通过在逆转录和扩增之前向链上添加腺苷单体(此项技术称为多腺苷酸化)延长其长度。简言之,可由合适的反应剂(例如,可获自上文提到的Invitrogen的Trizol反应剂)从样品中提取RNA,在ATP和多聚(A)聚合酶的存在下对其进行多腺苷酸化、使用多聚(T)衔接子及5'RACE序列将其逆转录为DNA,然后使用来源自所述miRNA的3'末端的正向引物及反向RACE引物进行扩增(关于引物设计、RACE序列等的详细情况见例如Shi, *BioTechniques* (2005), 39: 519–525。对此项技术的改进包括将RACE引物设计为在其3'末端带有一个核苷酸(构成A、C或G但不是T),以排除在多聚A序列上任何位置起始,并强制其在miRNA序列上起始;另见Reichenstein., *J Virol Methods* (2010), 163 (2) : 323–328)。

[0122] 作为一个实例,以下引物可用于miR-31 (SEQ ID NO: 1)的检测和定量: 正向引物5'-ACGCGCAAGATGCTGGCA-3' (SEQ ID NO: 29), 反向引物5'-CAGTGCTGGGTCCGAGTGA-3' (SEQ ID NO: 30) (见Wang., *Dis Markers* (2009), 26 (1) : 27–34)。对miRNA31进行PCR定量的其他实

例包括Liu, J Clin Invest(2010), 120(4):1298-1309(其还详述了对miRNA31的微阵列测定)。进一步地, 使用Taqman系统进行的miRNA检测和定量可容易地获自Applied Biosystems/Life technologies, Carlsbad, CA, USA(见例如, http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042142.pdf), 其也在本文附随的实施例中有描述及实例说明。对miR-31进行定量PCR测定的另一个实例使用茎环引物进行逆转录, 使用正向和反向引物进行miR-31 cDNA的PCR扩增。这些引物的实例包括茎环引物: gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgacagctatgcctg(SEQ ID NO:31); 正向引物: tgaccgaggcaagatgc(SEQ ID NO:32); 以及反向引物: gtgcagggtccgaggt(SEQ ID NO:33)。正向和反向引物在miR-31序列上重叠了一个核苷酸, 然而这不足以产生引物二聚体(PCR条件和进一步的细节见Ivanov, J Biol Chem(2010), 285:22809-22817)。

[0123] 在另一个实施方式中, 涉及用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍, 如骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏, 或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化的方法, 所述方法包括步骤:

[0124] (a) 将来自所述受试者的生物学样品与结合于能够降低或抑制FZD3表达的所述多核苷酸和/或结合于miR-31或其5'或3'异构体或变体的试剂相接触;

[0125] (b) 检测并评估(a)的试剂与所述多核苷酸和/或所述miR-31或其5'或3'异构体或变体的结合信号; 以及

[0126] (c) 将所检测并评估的(b)的结合信号与对应地在对照样品中检测并评估的结合信号相比较,

[0127] 其中在受试者样品中的结合信号比所述对照样品中的结合信号更强提示有发展或患有骨障碍和/或心血管障碍的风险。

[0128] 在本文提供的诊断方法的一个实施方式中, 提供了用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍的方法, 所述方法包括步骤:

[0129] (a) 通过PCR方法检测生物学测试样品中的miR-31(及如本文定义的其异构体和变体)的表达水平和/或量; 以及

[0130] (b) 将在所述生物学样品中所检测到的所述miR-31(及如本文定义的其异构体和变体)的表达水平和/或量与在对照样品中的对应的所述miR-31的表达水平和/或量相比较。

[0131] 再一次地, 对照样品可为来源自疾病阴性(或健康)对照病人的样品。这是“阴性对照”。然而还考虑包括例如第二种或另外的对照, 这样的对照样品是来源自患有所述骨障碍和/或所述心血管障碍的病人的样品。这是阳性对照。样品可为血液、血清、血浆或其他生物学液体。如所附随的实施例中所显示的, 血浆和血清非常有用。用于评估核酸分子(还可用于评估微小RNA)的方法在本领域熟知。这些方法包括例如PCR, 尤其还包括定量PCR以及实时qPCR, 见例如Chen(2011)Methods Mol.Biol.687, 113-134, 或Mestdagh(2008)Nuc.Acid Res.36(21):e143。

[0132] 在一个实施方式中(如实施例中所说明的), 根据本发明要评估或诊断的障碍为骨障碍, 即, 骨量减少或骨质疏松等等。

[0133] 本发明还提供了用于检测能够降低或抑制FZD3表达和/或杂交于miR-31或其5'或

3'异构体或变体的多核苷酸的方法。一种方便的方法是基于聚合酶链式反应(PCR),因为该方法迅速、特异且灵敏。对于PCR,需要特异性杂交于靶标核酸的引物。此外,还需要第二条引物以通过引物退火、引物延伸和变性的重复循环而产生PCR产物。选择引物以最大化其与靶标核酸的杂交同时最小化其与样品中存在的其他核酸的交叉杂交。引物序列及对任何选定引物计算最佳杂交温度及其他条件的实例在下文给出。

[0134] 因此,本发明提供了用于在受试者中诊断骨障碍和/或心血管障碍的方法,所述方法包括步骤:

[0135] (a)将来自所述受试者的生物样品与杂交于能够降低或抑制FZD3表达的多核苷酸和/或杂交于miR-31或其5'或3'异构体或变体的第一引物分子相接触,形成杂交复合物;

[0136] (b)将步骤(a)的杂交复合物与第二引物及能够延伸引物的聚合酶相接触;

[0137] (c)重复引起聚合酶对引物的延伸、产物变性以及引物对变性的聚合酶延伸的产物进行杂交,

[0138] (d)检测并评估步骤(c)的产物,得到值,该值反映第一引物核酸杂交与之的、能够降低或抑制FZD3表达和/或杂交于miR-31或其5'或3'异构体或变体的多核苷酸的量;

[0139] (e)将检测并评估的(d)的值与在对照样品中对应检测并评估的值进行比较,

[0140] 其中自受试者样品得到的值高于自所述对照样品得到的值提示发展或患有骨障碍和/或心血管障碍的风险。

[0141] 当能够降低或抑制FZD3表达且/或杂交于miR-31或其5'或3'异构体或变体(靶标核苷酸)的多核苷酸为RNA分子时,该方法优选地包括逆转录靶标核苷酸的步骤。可使用在靶标分子上重叠了足够部分(优选地在其3'末端)的引物进行逆转录。靶标分子的长度可通过在逆转录之前进行多腺苷酸化的步骤得到延伸。在此情况下,逆转录引物包括多(t)序列以及至少一个互补于靶标序列的核苷酸。优选地,所述核苷酸不是T。更优选地,引物包括靶标序列的两个核苷酸的互补物,其中第一个(引物3'末端的倒数第二个核苷酸)不为T。

[0142] 在另一个优选的实施方式中,反向引物为茎环引物,其包含了在靶标序列(的互补物)上的短重叠以及一个茎环结构,如下文描述及示例性说明的。

[0143] 原则上,本文描述的诊断方法可采用PCR技术(例如,qPCR、RT-PCR、qRT-PCR、RT-qPCR或LightCycler®)或其他适合于检测多核苷酸存在情况和/或量的方法。在本发明的诊断方法中,评估受试者样品中能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸和/或杂交于miR-31或其5'或3'异构体或变体的存在情况和/或量。PCR技术和其他适合于此目的的方法在本领域熟知并在本文有描述和示例性说明。如果所述多核苷酸和/或miR-31或其5'或3'异构体或变体的量与对照样品相比有所升高,则发展或患有骨障碍和/或心血管障碍的风险增加。例如,对于采用了qPCR技术的情况,可将受试者生物学样品的总RNA转录为cDNA。然后,可使用杂交于所述多核苷酸和/或miR-31或其5'或3'异构体或变体的特异引物进行检测。然后可将在受试者样品中检测到的多核苷酸和/或miR-31或其5'或3'异构体或变体的量与对照样品中检测到的多核苷酸和/或miR-31或其5'或3'异构体或变体的量相比较。受试者样品中的量比对照样品中高越多,则发展或患有骨障碍和/或心血管障碍的风险越高。

[0144] 在本文描述的诊断方法的上下文中,(a)的受试者样品的杂交或结合信号比对照样品中的高至少50%、60%、70%或75%可提示有风险发展或患有骨障碍和/或心血管障碍,如

骨质疏松、骨量减少、骨折、骨稳态破坏,或心血管疾病如中风、梗塞、高血压、血栓形成、血管腔狭窄、冠脉综合征、血管性痴呆、心和肾衰竭或动脉粥样硬化。能够降低或抑制FZD3或其生物学活性衍生物表达的多核苷酸优选地为要在本发明上下文中抑制的多核苷酸。在本发明上下文中的生物学样品的实例为血液、血清、血浆、其他血液来源制品、唾液、精液、阴道液、尿液、脑脊液等等。在一个实施方式中,该方法为体外方法。在本发明的上下文中,杂交于要在本发明的上下文中抑制的多核苷酸的核酸分子或结合于上文描述的多核苷酸的试剂(如抗体)可进一步缀合于标志物或标签分子。用于核酸的这些标志物分子的实例为在UV/VIS或红外波长下激发和发射的荧光染料如FITC、TRITC、Texas Red、Cy-染料、alexa染料(Bioprobe),等等。用于抗体的这些标志物/标签分子的实例为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或进一步地,探针可结合于本文描述的标志物分子或标签分子,如在UV/VIS或红外波长下激发和发射的荧光染料如FITC、TRITC、Texas Red、Cy-染料、alexa染料等等。

[0145] 附随的序列表为本说明书的一部分。

[0146] 附图显示:

[0147] 图1:此项研究中使用的细胞和SN的鉴定。

[0148] (A) 对前-衰老(PD13)和衰老(PD53)内皮细胞进行染色检测衰老相关 β 半乳糖苷酶的活性。(B) 在分泌入ASC或HUVEC培养基后48h,使用Annexin V-FITC和PI染色(N=3)测量HUVEC的凋亡细胞死亡情况。(C) 两种不同ASC系的代表性显微照片。(D) 使用流式细胞术对ASC进行染色检测细胞表面标志物的表达情况。缩写:ASC,脂肪源干细胞。

[0149] 图2:HUVEC上清对ASC增殖及分化能力的效应。

[0150] (A) 在来自前衰老(PD13)和衰老(PD53)细胞的条件下以及在对照培养基中培养ASC。使用血细胞计数器及台盼蓝染色分析活细胞数量。误差线表示3次独立测量的标准偏差。(B) 将处理过的细胞分化为成骨细胞系,用茜素红进行染色。显示了3次独立实验的代表性照片。缩写:Undiff.ctrl,未分化对照;S,衰老;Y,年轻;C,对照。

[0151] 图3:衰老HUVEC的外来体提高ASC的增殖能力并降低其分化能力。

[0152] (A) HUVEC来源外来体的电子显微术。图像显示了直径为~50-100nm的典型的杯状小泡。(B) 蛋白质印迹分析显示了外来体标志物蛋白质CD63。(C) 用抗-CD63抗体标记外来体并用电子显微术进行呈现。(D) 在前衰老(PD13)和衰老(PD53)细胞来源的外来体存在下以及在对照培养基中培养ASC。使用血细胞计数器及台盼蓝染色检测细胞数量。误差线表示3次独立测量的标准偏差。(E) 将处理过的细胞分化为成骨细胞系。用茜素红进行染色检测成骨生成标志物,钙沉淀物。显示了3次独立实验的代表性照片。缩写:Undiff.ctrl,未分化对照;S,衰老;Y,年轻;C,对照。

[0153] 图4:衰老的内皮细胞分泌的MiR-31增多。

[0154] MiR-31在衰老HUVEC(A)和SN(B)以及来源自衰老HUVEC的外来体(C)中上调。(D) 电子显微术原位杂交(EM-ISH)定位外来体中的miR-31。缩写:S,衰老;Y,年轻;SN,上清。

[0155] 图5:ASC摄取来源自HUVEC的外来体。

[0156] (A) 在以来源自前衰老和衰老HUVEC的SN或外来体处理后的ASC中miR-31的细胞内水平。(B) 稳定转染的表达GFP的衰老内皮细胞的代表性图像。(C) 温育后48h摄取了GFP阳性外来体后的ASC的代表性图像(D) 以阴性显性发动蛋白(dynamin)构建体(K44A)转染并以外来体处理后的ASC显示了降低水平的细胞内miR-31。缩写:SN,上清;S,衰老;Y,年轻;C,对

照;WT,野生型。

[0157] 图6:单独的miR-31减少ASC的成骨分化。

[0158] (A)使用TaqMan测定确认了瞬时转染后miR-31水平的提高。(B)将miR-31转染的细胞分化为成骨细胞系(N=3)。使用茜素红染色检测分化情况。显示了3次独立实验的代表性图像。缩写:Undiff.ctrl,未分化对照;ctrl,对照。

[0159] 图7:FDZ3是ASC中miR-31的一个靶标。

[0160] (A)成骨分化开始后4天发生FDZ3mRNA的显著上调。(B)用年老外来体处理比用年轻外来体处理的ASC细胞中FDZ3mRNA中有显著下调。(C)用10nM miR-31前体对ASC进行瞬时转染后FDZ3mRNA下调。缩写:OD,成骨分化;S,年老;Y,年轻;C,对照;ctrl,对照。

[0161] 图8:来源于年老血浆的外来体减少ASC的成骨分化。

[0162] (A)血清来源外来体的电子显微术。该图像显示了直径为~50至100nm典型杯状小泡。(B)与年轻健康对照(N=21)相比,来源于健康年老供体(N=27)的血清样品中miR-31水平有显著上调。(C)用来源于年老和年轻供体的外来体处理ASC并将其分化为成骨细胞系。使用茜素红染色检测分化情况。显示了2次独立实验的代表性图片。(D)来源于骨量减少患者的血浆中MiR-31水平比健康的年龄匹配对照显著增加。

[0163] 图9:总结这些结果的建议模型。

[0164] 来源于衰老内皮细胞的上清/外来体通过miRNA递送影响ASC的增殖和分化潜能。因此,“衰老”环境阻碍组织再生并促进细胞生长,这是癌症进展中的风险因子之一。

[0165] 图10:相对未处理的HUVEC,miR-31也受来源于衰老HUVEC的外来体中H₂O₂的诱导。

[0166] 以H₂O₂脉冲处理内皮细胞14天后从其中收获外来体,此时以75μM tBHP处理的细胞中未观察到另外的细胞增殖。相反,在暴露于35μM tBHP后,细胞完全恢复并继续生长。

[0167] 图11:以miR-31、反义-miR-31、非靶向对照miRNA转染后的ASC及未转染细胞的成骨分化水平。

[0168] 由茜素红染色分析所示miR-31显著抑制骨发生,而抗-miR-31显著增加骨发生。

[0169] 图12:miR-31的血浆水平。

[0170] 将诊断患有骨量减少的10名男性患者中的miR-31血浆水平与年龄匹配的健康对照相比较。10名患者中有7名显示了较高水平的miR-31(标准化为U6B snRNA),由斯式t检验计算得到高度显著的差异性。

[0171] 实施例阐明本发明。

[0172] 实施例1:细胞培养

[0173] 人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell,HUVEC)

[0174] 按所述方法从人脐静脉分离内皮细胞(Chang,Exp Cell Res(2005),309:121-136;Jaffe,J Clin Invest(1973),52:2745-2756)。将HUVEC在预包被有明胶的培养瓶中用加Earle's盐、补充有4mM谷氨酰胺、15%胎牛血清(FCS)和含有170U/ml肝素的10%内皮细胞生长补充物(EGCS)的M199于37℃、含5%CO₂的潮湿环境下进行培养。根据生长速率,以1:2至1:4的分传比每周对细胞进行一次或两次的传代。将HUVEC培养到衰老并如先前所述的方法(Chang,见上述引文)染色观察衰老相关的β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)活性。为收集上清,使接触抑制(静止,PD19)和衰老(PD53/95%SA-β-gal阳性)细胞向ASC或HUVEC培养基(取决于实验情况)中进行48h的分泌。然后收集上清,在4℃下以1900g离心,并新鲜使用进行外来体

制备或储存于-80℃。将上清体积标准化为上清收获时一个培养瓶中分泌HUVEC的数量。将在37℃下温育48h的细胞培养基用作另外的对照。

[0175] 人脂肪源干细胞(ASC)

[0176] 在局部麻醉下进行门诊肿胀吸脂获得皮下脂肪组织。如前所述的方法分离ASC(Wolbank, Tissue Eng (2007), 13:1173-1183; Wolbank, Tissue Eng Part A (2009))并在补充有4mM L-谷氨酰胺、10%胎牛血清(FCS, PAA)和1ng/mL重组人碱性成纤维生长因子(rhFGF, R&D Systems)DMEM-低糖/HAM氏F-12中于37℃、5%CO₂及空气湿度为95%的条件下进行培养。根据生长速率,以1:2的分传比每周对细胞进行一次或两次的传代。使用标准步骤进行流式细胞术(FACS Calibur, Beckton Dickinson),根据特异性表面标志物(CD13、CD14、CD34、CD45、CD73、CD90、HLA ABC、HLA DR)的表达情况鉴定ASC。

[0177] 分化为成骨细胞系

[0178] 所有的分化操作流程都在24孔细胞培养板中进行。为进行成骨分化,以每孔 2×10^3 细胞的密度接种ASC。接种后72h,将细胞以成骨分化培养基(DMEM-低糖, 10%FCS, 4mM L-谷氨酰胺, 10nM地塞米松, 150μM抗坏血酸-2-磷酸酯, 10mMβ-磷酸甘油及10nM维生素-D3)温育最多4周。

[0179] 茜素红染色

[0180] 为进行钙化结构的茜素红染色,将细胞在70%的乙醇中于-20℃下固定1h。在简单冲洗后,用40mM茜素红溶液(Sigma)对细胞进行20min的染色并以PBS洗涤。为进行定量,使用200μl 0.1M HCl/0.5%SDS溶液对茜素红进行30min的提取。于425nm处测量提取的染料。

[0181] 实施例2:转染

[0182] 使用siPORT™ NeoFX™转染试剂(Applied Biosystems)对ASC进行转染。根据制造商的操作流程,用10nM前体hsa-miR-31, 100nM抗-miR-31或10nM阴性对照2#(Ambion)转染细胞。24或48h后收获细胞或在转染后三天按前述方法开始分化。

[0183] 此外,根据制造商操作流程使用Metafectene Pro(Biontex Laboratories GmbH)以0.5μg显性阴性启动蛋白构建体(K44A)或启动蛋白野生型构建体(由Mark A. McNiven提供, Department of Biochemistry and Molecular Biology & Center for Basic Research in Digestive Diseases, Mayo Clinic and Graduate School, Rochester, Minnesota 55905, USA)转染ASC。

[0184] 实施例3:对凋亡细胞死亡的评估

[0185] 将HUVEC接种于12孔细胞培养板并使之向ASC培养基中分泌48h。此后,使用50mM EDTA分离细胞并根据制造商说明书用Annexin V-FITC和PI(Roche)进行染色。使用FACS-Calibur及CellQuest软件(Beckton Dickinson)分析凋亡及坏死/晚期凋亡细胞的百分比。

[0186] 实施例4:定量实时PCR

[0187] 使用不同的成骨分化标志物基因确定茜素红染色结果。因此,在骨发生前和骨发生期间不同时间点使用Trizol(Invitrogen)分离ASC的总RNA。使用DyNAmo cDNA Synthesis Kit(Biozym)进行逆转录,用RotorGene2000(Corbett)进行qPCR。为进行miRNA分析,根据制造商操作流程使用特异TaqMan测定(Applied Biosystems)。

[0188] 为从血液样品中分离RNA,使用Trizol LS试剂(Invitrogen)从250-500μl血清中分离总RNA。为标准化RNA分离中样品-样品之间的变化,在分离前加入25fmol合成的线虫

miRNA cel-miR-39。血清样品(27名健康年老供体及21名健康年轻供体)获自R.Westendorp, Department of Gerontology & Geriatrics C2-R, Leiden University Medical Center, The Netherlands。此外, 4个骨量减少血清样品获自P.Pietschmann, Department of Pathophysiology, General hospital, Vienna。机构伦理委员会批准了此项研究, 从每个受试者都获得了书面的知情同意书。

[0189] 实施例5: 慢病毒转导

[0190] 用包含GFP蛋白质的慢病毒载体(由Pidder Jansen-Dürr惠赠, Institute for Biomedical Aging Research, Innsbruck, Austria (Muck, Rejuvenation Res(2008), 11: 449-453)转导衰老HUVEC。简言之, 使用衰老和前衰老HUVEC进行慢病毒转导。通常, 将100000-150000个衰老的以及50000个前衰老的HUVEC铺于6孔板中并温育过夜。以感染复数(MOI) 2-8, 添加8 μ g/ml增加感染效率的1, 5-二甲基-1, 5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物(Polybrene), 用来产生稳定转导的细胞。向培养基中添加10 μ g/ml杀稻瘟素作为筛选压力。6-8天后, 克隆稳定, 将HeLa与SN温育4天测试慢病毒颗粒的污染情况。此后, 收获SN并用于进行前述的外来体纯化。

[0191] 实施例6: 外来体纯化

[0192] 按前述方法通过过滤和差异离心纯化外来体(Lehmann, Cancer Res(2008), 68: 7864-7871)。简言之, 温育48h后收集上清。将此条件培养基以500g离心10min以沉淀细胞, 以14000g离心15min以去除细胞碎片, 并通过0.22 μ m滤器过滤以排除一部分凋亡体。然后以100000g进行60min的超滤以沉淀外来体, 将所得的沉淀以PBS进行洗涤。这些外来体可用作用于电子显微术的新鲜制备物, 或保存在-80℃用于进一步的分析。对于分化研究, 将悬于50 μ l PBS的来源于2x10⁴HUVEC的外来体加入每孔ASC。

[0193] 实施例7: 电子显微术

[0194] 将纯化的外来体置于镍盖玻片上沉淀(200目, 六边形, 聚乙烯醇缩醛包被的Athene铜网格)。在用4%多聚甲醛固定后, 用2%乙酸双氧铀对外来体进行30sec的染色, 使盖玻片干燥并用透射电子显微术(TEM)、Philips CM12型电子显微镜(Philips, Eindhoven, NL)呈现。

[0195] 为进行电镜成像, 将原位杂交的(EM-ISH)外来体沉淀用0.1%Triton-X在室温下进行5min的透化。用PBS进行洗涤, 之后将外来体与杂交缓冲液温育至少4h, 如先前所述(Obernosterer, Nat Protoc(2007), 2: 1508-1514)。对每个样品, 将1pM的LNA DIG-标记的单链探针(Exiqon, Denmark)在变性杂交缓冲液(含有50%甲酰胺、5x SSC、5x Denhardt氏溶液、0.1%Tween、0.25%CHAPS、200 μ g/ml酵母RNA、500 μ g/ml鲑鱼精DNA)中于80℃下温育5min以进行变性。迅速将探针置于冰上。将外来体与探针混合并于50℃杂交过夜。杂交后, 用0.2x SSC在60℃下对样品进行1h的严格洗涤。此后, 将外来体与抗-DIG抗体(Roche)温育30min并与第二种标记有5nm金颗粒的抗体(Sigma)再温育1小时。在以PBS洗涤后, 将外来体包埋于环氧树脂(Epon)中, 用Ultramicrotom切割为平均大约80nm的切片, 然后使用透射电子显微术(TEM)、Philips CM12型电子显微镜(Philips, Eindhoven, NL)进行分析。

[0196] 实施例8: 蛋白质印迹

[0197] 提取总蛋白质并在聚丙烯酰胺凝胶上分离, 随后转移至PVDF膜(Roth, Germany)。将膜在5%脱脂牛奶中封闭, 以CD63抗体(H-193, Santa Cruz)温育, 随后以辣根过氧化物酶

偶联的二级抗体温育,并在Chemidoc(Biorad)上使用ECL蛋白质印迹底物(Pierce)进行增强化学发光。

[0198] 实施例9:HUVEC上清对ASC增殖和分化能力的效应

[0199] 为了测试衰老内皮细胞是否有助于干细胞抑制性系统环境(Conboy, Nature (2005), 433:760-764),使用了明确性的前衰老和衰老HUVEC(PD13和PD53之间的PDL),如较早所确认的(Chang, Exp Cell Res (2005), 309:121-136)。衰老细胞显示了大的扁平的形态,SA- β -gal活性染色为阳性(图1A)。为在ASC培养基中产生内皮分泌因子,将内皮细胞暴露于ASC培养基48h。为排除多余的细胞死亡影响“分泌体”,使用Annexin V和PI染色测试了内皮细胞在进行“收获”时的本底细胞死亡水平。在前衰老和衰老HUVEC之间没有显著的可见差异(图1B)。

[0200] 进一步地,使用了来自6个不同供体的显示有典型形态的ASC(图1C)并通过鉴定其表面标志物谱确认其特性(图1D),如较早所述(Wolbank, 2009, 见上述引文; **Yañez**, Stem Cells (2006), 24:2582-2591)。

[0201] 为测试和比较来自前衰老和衰老HUVEC的条件培养基对ASC生长特征的影响,将细胞与相应的上清一同温育5d的时间段。尽管在整个实验的各个测试设置中细胞活力保持不变(数据未显示),但在衰老上清存在下培养的ASC比在前衰老或对照培养基中培养的细胞达到显著更高的细胞数(图2A)。此外,如在ASC以分化培养基温育21d后进行的茜素红染色所示,来源自衰老细胞的上清显著降低了ASC的成骨分化潜能(图2B)。

[0202] 实施例10:衰老HUVEC的外来体增加ASC的增殖能力并降低其分化能力

[0203] 外来体为膜包被的小泡,其直径为40-100nm之间,起源于细胞内的多泡体(Pap, Inflamm Res (2009), 58:1-8)。由于最近有人将外来体描述为多种情况下的旁分泌信号转导分子(Deregibus, Blood (2007), 110:2440-2448; Hunter, PLoS ONE (2008), 3:e3694; Lehmann, 见上述引文; Pap, 见上述引文),因此测试了外来体是否可能有助于ASC行为的变化。因此,通过顺序离心步骤(Deregibus, 见上述引文)从HUVEC上清中分离外来体。为确认外来体的特性,进行电子显微术。大小的分布强烈提示在我们的外来体制备物中没有可见的凋亡小泡,因为凋亡体的大小>500nm(Reich, Exp Cell Res (2009), 315:760-768)(图3A)。进一步地,使用针对CD63表面蛋白质(一种外来体的常用标志物(Valadi, Nat Cell Biol (2007), 9:654-9))进行蛋白质印迹分析(图3B)及免疫金标记(图3C)。(图3A-C)表示外来体的分离是成功的。

[0204] 当用来源自衰老HUVEC的外来体处理ASC时,相比于用来源自前衰老内皮细胞的外来体处理的干细胞,其增殖速率再次有显著增加(图3D)。此外,当以衰老外来体处理细胞时,其成骨分化能力有~50%的显著降低(图3E),而成脂分化未受影响(数据未显示)。

[0205] 实施例11:miR-31由内皮细胞分泌

[0206] 显示除了不同的蛋白质,miRNA也会被包装入外来体(Valadi, 见上述引文)。miR-31显示为在衰老HUVEC中被上调(图4A)。进一步地,还测试了其是否还存在于HUVEC培养物上清(图4B)以及其在来源自衰老内皮细胞相对来源自前衰老内皮细胞的外来体中的存在与否(图4C)。由于qPCR检测到了高达12-倍的变化,通过电子显微术原位杂交(EM-ISH)确认了miRNA在外来体中的定位。迄今只有生物化学测定提示miRNA在外来体内部,然而在本发明的上下文中,第一次提供了miRNA实际上是被包装入外来体的显微证据(图4D)。

[0207] 实施例12:ASC摄取来源自HUVEC的外来体

[0208] 为测试内皮来源的miR-31是否由ASC摄取,将ASC与来自HUVEC的SN和外来体一同温育。事实上,48h后观察到ASC内部的miR-31有4-5倍的增加(图5A)。从这些数据并不清楚外来体是否由ASC摄取或所述外来体制备物内含的其他组分是否会诱导ASC内部的miR-31的从头转录。因此,制备了表达GFP的稳定转染的衰老内皮细胞(图5B),因为最近发表GFP包装入外来体(Deregibus,见上述引文)。在与GFP阳性外来体一同温育两天后,ASC在细胞质内以散点的形式显示出GFP信号,而用去除GFP外来体的上清处理的ASC未显示出信号(图5C)。为进一步确认外来体的摄取情况,以显性阴性发动蛋白构建体(K44A)和作为对照的发动蛋白野生型构建体(Cao, Mol Biol Cell (1998), 9:2595-2609; Cao, J Cell Sci (2000), 113(Pt11):1993-2002)转染ASC。显示发动蛋白参与真核细胞的胞吞作用(Cao, 1998, 见上述引文; Cao, 2000, 见上述引文),而胞吞作用负责外来体的摄取(Valadi, loc cit)。确如图5D所示,miR-31水平在以显性阴性发动蛋白构建体(K44A)转染的ASC中有所降低。

[0209] 这些结果显示了miR-31其实是通过外来体摄取的,而不是通过穿膜的信号转导诱导的结果,该摄取似乎类似于体外的转染,这里是含有DNA或RNA的脂质将其运输物递送到细胞。

[0210] 实施例13:miR-31单独减少了ASC的成骨分化

[0211] 为研究miR-31自身对分化的效应,用miR-31瞬时转染ASC。使用TaqMan测定确认了miR-31水平的升高(图6A)。研究了miR-31对ASC的分化能力的影响,当用miR31瞬时转染ASC时,成骨分化受到了大约2倍的显著抑制(图6B),单独使用外来体时也可见相似的抑制范围。这些数据提示miR-31为成骨分化的抑制剂,可能尤其由内皮细胞在衰老时分泌。

[0212] 实施例14:miR-31靶标

[0213] 在骨发生条件下,有显示MSC中的FZD3 mRNA水平有所增加(Baksh, J Cell Biochem (2007), 101:1109-1124)。在本发明的上下文中,相比于以对照培养基处理的细胞,其在4天后有上调(图7A)。此外,在以衰老的外来体处理后,相比于以年轻外来体处理及对照处理细胞,FZD3水平显著下调(图7B)。miR-31转染24h后,FZD3也有所下调,但未达到显著水平,这可解释为由于细胞不分化时FZD3的mRNA水平太低(图7C)。因此,FZD3只代表了一种标志物,但不是成骨分化的必要因素,可能为miR-31的直接靶标,在ASC中也是如此。

[0214] 实施例15:来源自血浆的外来体对ASC的效应

[0215] 使用电子显微术确认外来体存在于血液血浆中(图8A)。然后,从来自21名健康年轻(19-47岁)及27名老年供体(50-91岁)的血浆中分离RNA并分析miR-31水平。如在本文的上下文发现的,相比于年轻供体,其在年老人群中显著增加,并显示出更大的变化(图8B)。进一步地,将细胞以来源自1ml血浆/1ml培养基的外来体处理72h,随后开始分化。使用4名不同的供体,发现在以“年老”外来体处理的ASC中成骨分化有大约3倍的显著下降(图8C)。在对照样品中分化极低可由以来源自血浆的外来体处理的细胞分化极快得到解释。此外,本文显示来源自骨量减少患者的血浆中miR-31水平比健康的年龄匹配对照有所升高(图8D)。

[0216] 实施例16:氧化压力诱导衰老

[0217] 已知氧化压力与内皮衰老和功能失调相关(Seals, Clin Sci (Lond) (2011), 120(9):357-375)。为测试氧化压力是否诱导了miR-31的分泌,用tBHP对HUVEC进行连续5天的

处理(通过在培养基中将tBHP加至终浓度为75 μ M、50 μ M或35 μ M),每天处理1h,以诱导SIPS(压力诱导的早熟衰老)。根据Unterluggauer,Exp Gerontol(2003),38:1149-1160的方法进行14d的显微追踪评估可见75 μ M tBHP诱导持久的生长停滞。

[0218] 这样,发现miR-31在压力诱导的早熟衰老内皮细胞的外来体中升高。使用不断增加的剂量的H₂O₂(35 μ M、50 μ M和75 μ M叔丁基过氧化氢(tBHP)),相对于无压力对照,在压力诱导的衰老HUVEC中观察到最高5倍的miR-31的诱导,这与重复地衰老HUVEC中水平类似(图10)。

[0219] 进一步地,在衰老内皮细胞的上清中miR-31的增加并不限于来源自人脐静脉内皮细胞的HUVEC,相对于早期传代的对照细胞,其还可见于人视网膜内皮细胞的衰老过程以及衰老的人肝脏来源内皮细胞中(数据未显示)。

[0220] 实施例17:miR-31拮抗剂抑制成骨分化

[0221] 为测试miR-31是否提高成骨分化,分析了针对miR-31的拮抗锁定核酸(LNA)(Ambion,product ID:AM11465;P/N AM17000)。类似上文实施例2进行ASC转染的实验步骤。

[0222] 如可见的,通过茜素红染色分析观察到钙沉淀有显著增加,而miR-31的瞬时增加导致成骨分化降低(图11)。这些数据显示了系统或局部地抑制或移除miR-31可在例如骨质疏松中及骨折后提高成骨细胞形成。

[0223] 实施例18:miR-31抑制小鼠模型系统中骨发生

[0224] 为确认miR-31是一种骨发生的普遍调节子,而不仅是在人类系统中,使用C3Ht101/2细胞系(一种小鼠间充质多能细胞系,可通过添加BMP2诱导发生成骨分化(Richard,PLoS Genetic(2005),1(6):e74))。将在骨钙蛋白启动子调控下编码荧光素酶的报告构建体共转染细胞作为读数(Feichtinger,Tissue Eng Part C Methods(2010),17(4):401-410)。

[0225] 进一步使用(C2C12)C3Ht101/2细胞系结合骨钙蛋白特异性报告基因测定(Feichtinger,Tissue Eng Part C Methods(2010),17(4):401-410)分析miRNA-31转染对成骨分化的影响。(C2C12)C3Ht101/2细胞能在以重组BMP处理时分化为成骨细胞系,这可由碱性磷酸酶、骨钙蛋白和其他成骨细胞特异性基因的诱导而观察到。接种于T175培养瓶中的细胞首先使用99 μ g的骨钙蛋白报告系统转染,然后在24h后以30nM miRNA-31或作为对照的合成miRNA ctrl#2进行负向转染,使用Ambions siPORT NeoFX进行。使用300ng/ml的重组BMP2(InductOS,Pfizer)诱导成骨分化,对照不使用生长因子诱导。在分化6d后使用Clontech Ready-To-Glow Secreted Luciferase System Kit确定细胞培养物上清中的metridia荧光素酶活性对骨钙蛋白报告分子的活性进行评估。

[0226] 结果为,在小鼠模型中也确认了瞬时miR-31过表达对骨发生的抑制。进一步地,类似于年轻相对于年老健康人类的结果,发现年老小鼠的血清比作为对照的同基因型年轻小鼠的血清中含有的miR-31的浓度高3-10倍(数据未显示)。

[0227] 实施例19:对骨量减少患者血浆中miR-31的分析

[0228] 将诊断患有骨量减少的10名男性患者的血浆与由P.Pietschmann(Department of Pathophysiology,General hospital,Vienna)提供的年龄匹配对照相比较。机构伦理委员会批准了此项研究,从每个受试者都获得了书面的知情同意书。

[0229] 根据推荐用于miRNA分析的临床标准步骤制备血清(Taylor,Methods Mol Biol

(2011), 728:235-246; Kroh, Methods (2010), 50:298-301)。使用Trizol LS提取总RNA。然后使用**Taqman®**操作流程进行qPCR, 其中第一步中进行特异性逆转录, 然后进行扩增。通过扩增取代荧光标记探针来监测特异性miR-31扩增子的扩增。这些测定都运行了三个复样, 并将miR-31的差异化表达标准化为小的U6snRNA。此外, 进行线虫特异性miRNA控制下的峰值(spike), 以标准化在全部RNA分离过程中的miRNA的回收——量化步骤。PCR的进行详见下文。

[0230] TaqMan操作流程(hsa-miR-31)

[0231] Applied Biosystems

[0232] cDNA合成:

[0233]	2 x mastermix:含有 miR-31 和 U6 引物	
	体积[μl]:	
	反应#:	
	100mM dNTPs	0.10
	MultiScribe RT	0.60

[0234]	10 x 缓冲液	1.00
	RNase 抑制剂	0.12
	无核酸酶水 + RNA	5.18
	RT-引物	2.00
	总计	9.00
	RNA (10 ng/μl)	1.00
	总计	10.00

[0235] 程序:

[0236] 16°C:30min

[0237] 42°C:60min

[0238] 85°C:5min

[0239] 4°C:暂停

[0240] TaqMan引物:

[0241] Applied Biosystems

[0242]

测定名称	hsa-miR-31
部分号码	4427975
AB测定ID	001100
测定类型	成熟miRNA
可用性	Inventoried

[0243]

成熟微小 RNA 详情	
成熟 miRNA 序列	GGCAAGAUGCUGGCAUAGCUG (SEQ ID NO: 19)
靶标物种	大猩猩(<i>Gorilla gorilla</i>)、猕猴(<i>Macaca mulatta</i>)、豚尾猴(<i>Macaca nemestrina</i>)、倭黑猩猩(<i>Pan paniscus</i>)、婆罗洲猩猩(<i>Pongo pygmaeus</i>)、黑猩猩(<i>Pan troglodytes</i>)
miRBase ID	ggo-miR-31、mml-miR-31、mne-miR-31、ppa-miR-31、ppy-miR-31、ptr-miR-31
miRBase 登记号	MIMAT0002381 、 MIMAT0002379 、 MIMAT0002383 、 MIMAT0002384、MIMAT0002382、MIMAT0002380
miRBase 别名	hsa-miR-31 v9.2
基因家族 ID	MIPF0000064、mir-31

[0244] 设备及软件:

[0245] Rotor-Gene6000;Rotor-Gene Software6000, Series Software1.7

序列表

<110> Universität für Bodenkultur Wien

<120> 用于治疗或诊断骨障碍和/或心血管障碍的组合物

<130> S1391 PCT S3

<150> EP 10 16 3604.1

<151> 2010-05-21

<160> 33

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> 智人

<400> 1

aggcaagang cuggcuuagc u

21

<210> 2

<211> 8

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述:miR-31的种子序列"

<400> 2

ggcaagau

8

[0001]

<210> 3

<211> 71

<212> RNA

<213> 智人

<400> 3

ggagaggagg caagauagcug gcuuagcugu ugaacuggga accugcuang ccaacauaum

60

gccaucuumc c

71

<210> 4

<211> 1454

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4

tttgttttgt ctaagggtgga aatctttgtgc tgtttaaaaa gcagatttta ttctttgcct

60

tttgcattgac tgatagctgt aactcacagt taacatgctt tcagtcaggt acagattgtg

120

tcacttggaagggtaaatga ttgttttttt atattgcate aaacttggaa catcaaggca

180

tcacaaacac taagaattct atcatcaca aaataatttg tcttctagg ttatgaagag

240

ataattattt gtctggttaag catttttata aaccacaca ttttatattt agaaaaatcc

300

taaatgtgtg gtgactgctt ttagtggaac ttcatataac tataaactag ttgtgagata

360

acattctggt agctcagtta ataaaacaat ttcagaatta aagaatttt ctatgcaagg

420

tttactcttc agatgaacag taggaatttg tagttttatt tccactaagt gaaaaagaa

480

cgtgtttttt aaactgtagg agaatttaai aaatcagcaa gggtatttta gctaatagaa

540

taaaagtgcac acagaagaat ttgattagtc taigaaaggt tctcttaaaa ttctatcgaa

600

ataatcttca tgcagagata ttccagggttt ggattagcag tggaataaag agatgggcac

660

	tgtttceect ataattgige tgttttata acctttgtaa atattacitt ttetggctgt	720
	gtttttataa cttatccata tgeatgatgg aaaaatttta attttagtgc atcttttccc	780
	atgtaatagt attgattcat agagaactta atgttcaaaa ttgctttgt ggaggcaigt	840
	aataagataa acaacataca ttataaggta accacaatta caaatggca aascatttcc	900
	tcgtatcca ttgttgat ttctacagt gagatgigat ctgccaag ccaccagacc	960
	ttggcttcca ggccctcctg tagtgagttg attgtctgca ctggccttgc ccaatagcca	1020
	gtaggtaca gcttttgc cacaacctta ttttcagatt ctggatcatt cttgtttaca	1080
	acigaaatat atataacctc agtccaaagt ggtgattgat ttgagtattt gaaaattgtt	1140
	gtagctaaat gaagcatgat tagtcttagt atgaatatca tttaactttt aaaaaatcaa	1200
	gtaaaaatgt ttatctgata atgtttaaatt aatttacaat ataaactgta aaacttatta	1260
	ggcatgaaat caatcagaag agaaagaaaa atgctggaac atgcttgatg tattatgtaa	1320
	aaagcatatt taacaaggc tctcaacctc tgactgcaga taagaatcac ttgggttact	1380
	tcagatgctt aacaccttcc tctcatataa ataagaattg gtagctttct taaaaaaaaa	1440
	aaaaaaaaa aaaa	1454
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /note="人工序列的描述: anti-miR-31 (人工RNA序列)"	
[0002]	<400> 5	
	getatgccag catcttgc	19
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /note="人工序列的描述: 互补序列"	
	<400> 6	
	agcuauGCCa gcuaauGCC u	21
	<210> 7	
	<211> 8	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /note="人工序列的描述: 互补序列"	
	<400> 7	
	aucuugcc	8
	<210> 8	
	<211> 71	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /note="人工序列的描述: 互补序列"	

[0003]

<400> 8	
ggaaagauagg caauauguug gcauagcagg uuuccaguuu aacagcuau gcaucaucuu	60
gcucucucuc c	71
<210> 9	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 9	
gaggcaagau gcuggcuuag cu	22
<210> 10	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 10	
aggcaagau ggcgcuuagc ug	22
<210> 11	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 11	
aggcaagau ggcgcuuagc ugu	23
<210> 12	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 12	
aggcaagau ggcgcuuagc u	21
<210> 13	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 13	
aggcaagau ggcgcuuagc	20
<210> 14	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 14	
aggcaagau ggcgcuuag	19
<210> 15	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 15	
aggcaagau ggcgcuuagc uguu	24
<210> 16	
<211> 17	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 16	

	aggaagaug cugcau	17
	<210> 17	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 17	
	aggaagaug cugcau	18
	<210> 18	
	<211> 16	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 18	
	aggaagaug cugca	16
	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 19	
	ggcaagaugc uggaugcu g	21
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 20	
	ggcaagaugc uggaugcu	20
[0004]	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 21	
	ggcaagaugc uggaugcu gaa	23
	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 22	
	ggcaagaugc uggaugcu gu	22
	<210> 23	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 23	
	ugcaugca acuaugcc auc	23
	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 24	
	ugcaugca acuaugcc au	22
	<210> 25	

[0005]	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 智人		
	<400> 25		
	ugcuauugcca acauauugcc a	21	
	<210> 26		
	<211> 24		
	<212> RNA		
	<213> 智人		
	<400> 26		
	ugcuauugcca acauauugcc aucc	24	
	<210> 27		
	<211> 22		
	<212> RNA		
	<213> 智人		
	<400> 27		
	gcuaugccaa cauaauugcca uc	22	
	<210> 28		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 智人		
	<400> 28		
	cuaugccaaac auauugccau c	21	
	<210> 29		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /note="人工序列的描述: 正向引物"		
	<400> 29		
	acgcggccaag atgctggca	19	
	<210> 30		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /note="人工序列的描述: 反向引物"		
	<400> 30		
	cagtgtctggg tccgagtga	19	
	<210> 31		
	<211> 55		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /note="人工序列的描述: 引物"		
	<400> 31		
	gtcgatacca gtgcagggtc cgagggtattc gcactggata cgacagctat gccig	55	
	<210> 32		
	<211> 17		

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /note="人工序列的描述: 正向引物"	
	<400> 32	
	tgaccgaggc aagatgc	17
[0006]	<210> 33	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /note="人工序列的描述: 反向引物"	
	<400> 33	
	gtgcagggtc cgaggt	16

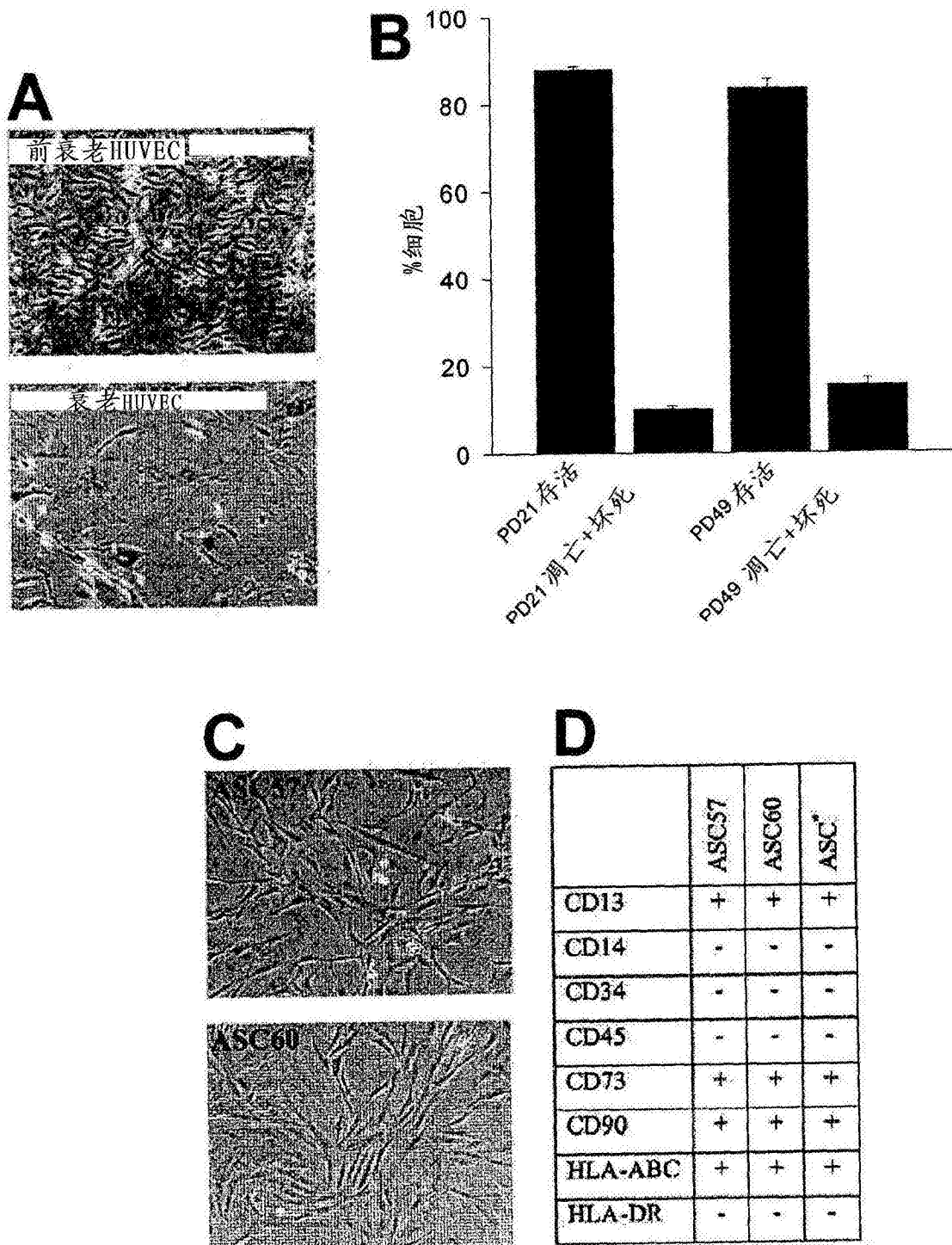


图1

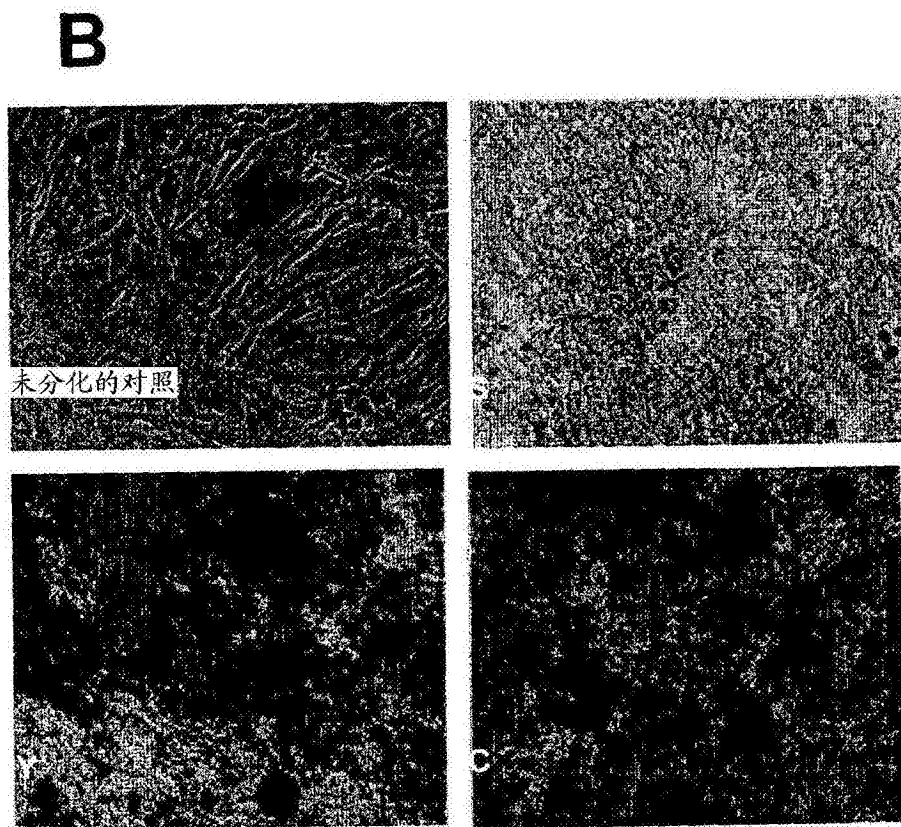
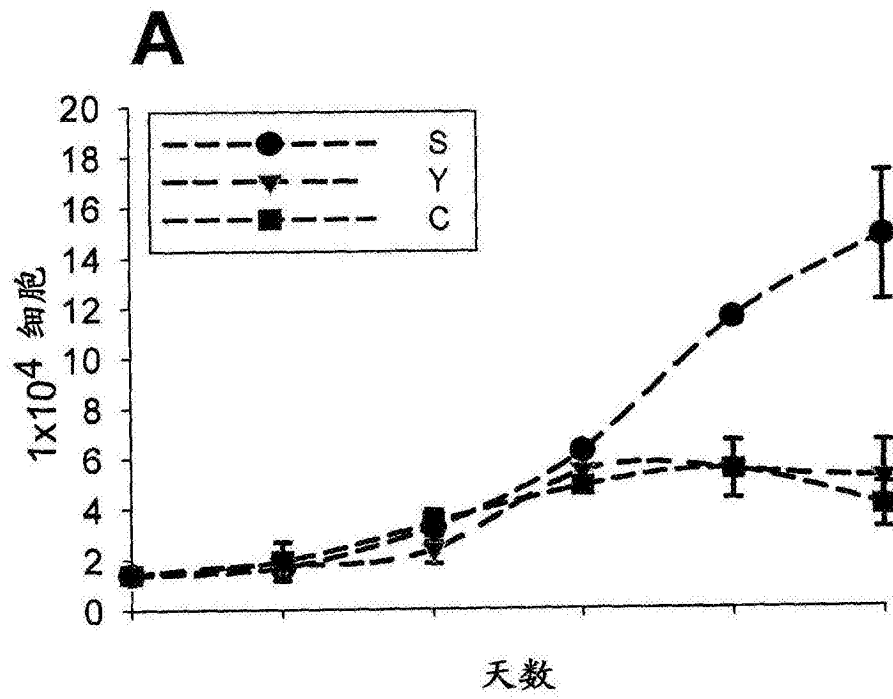


图2

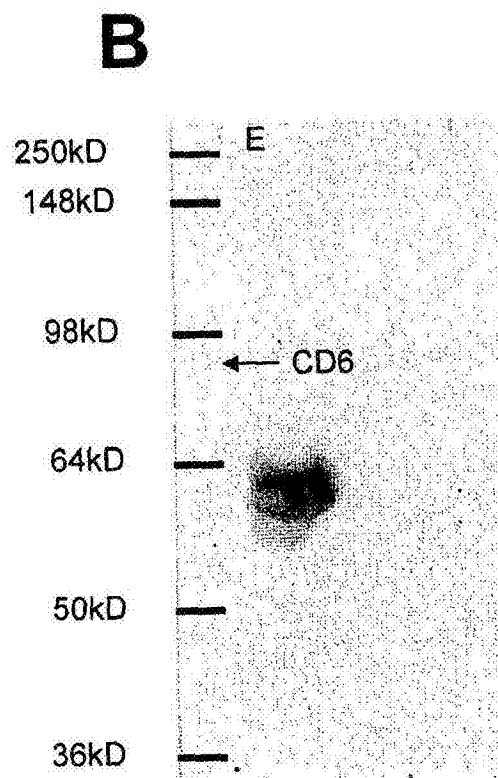
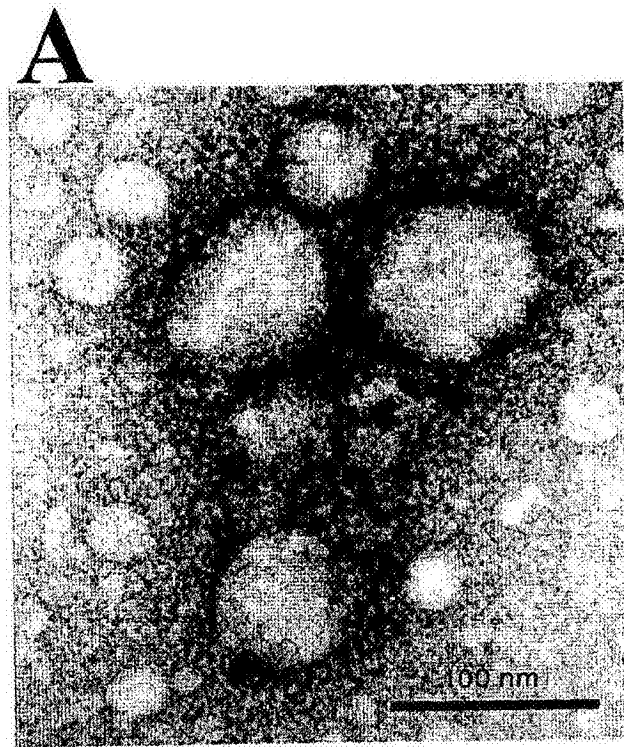


图3

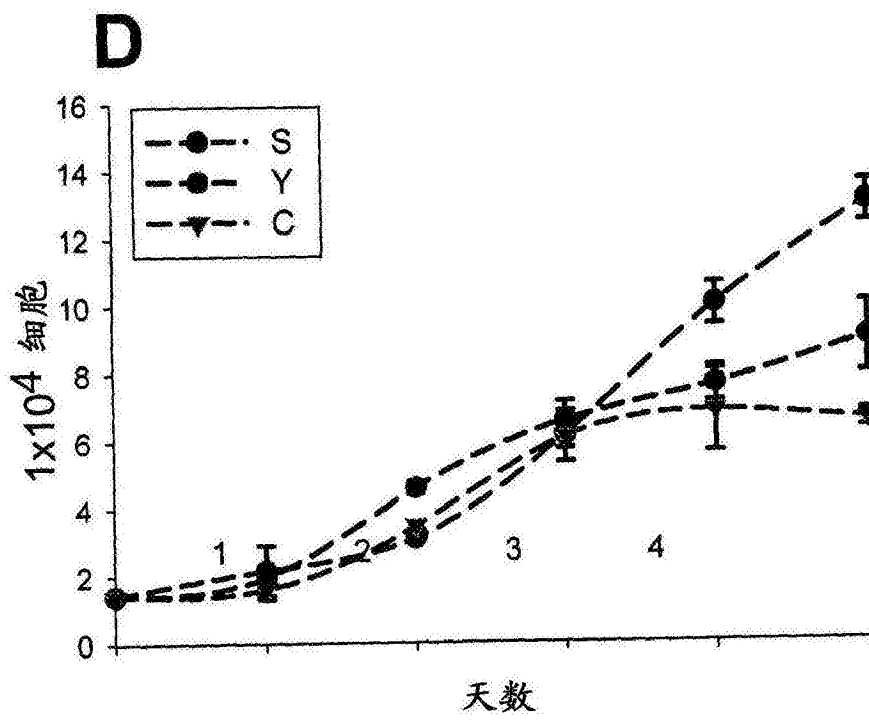
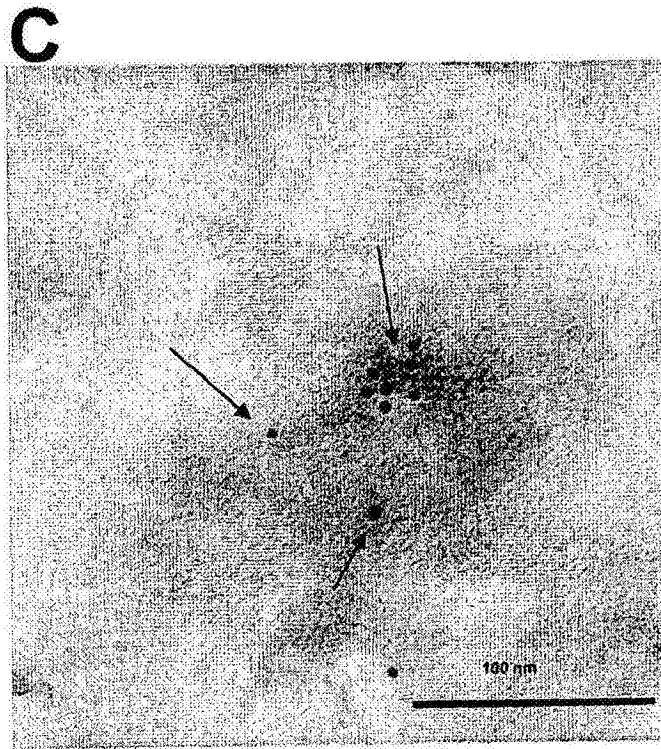


图3续

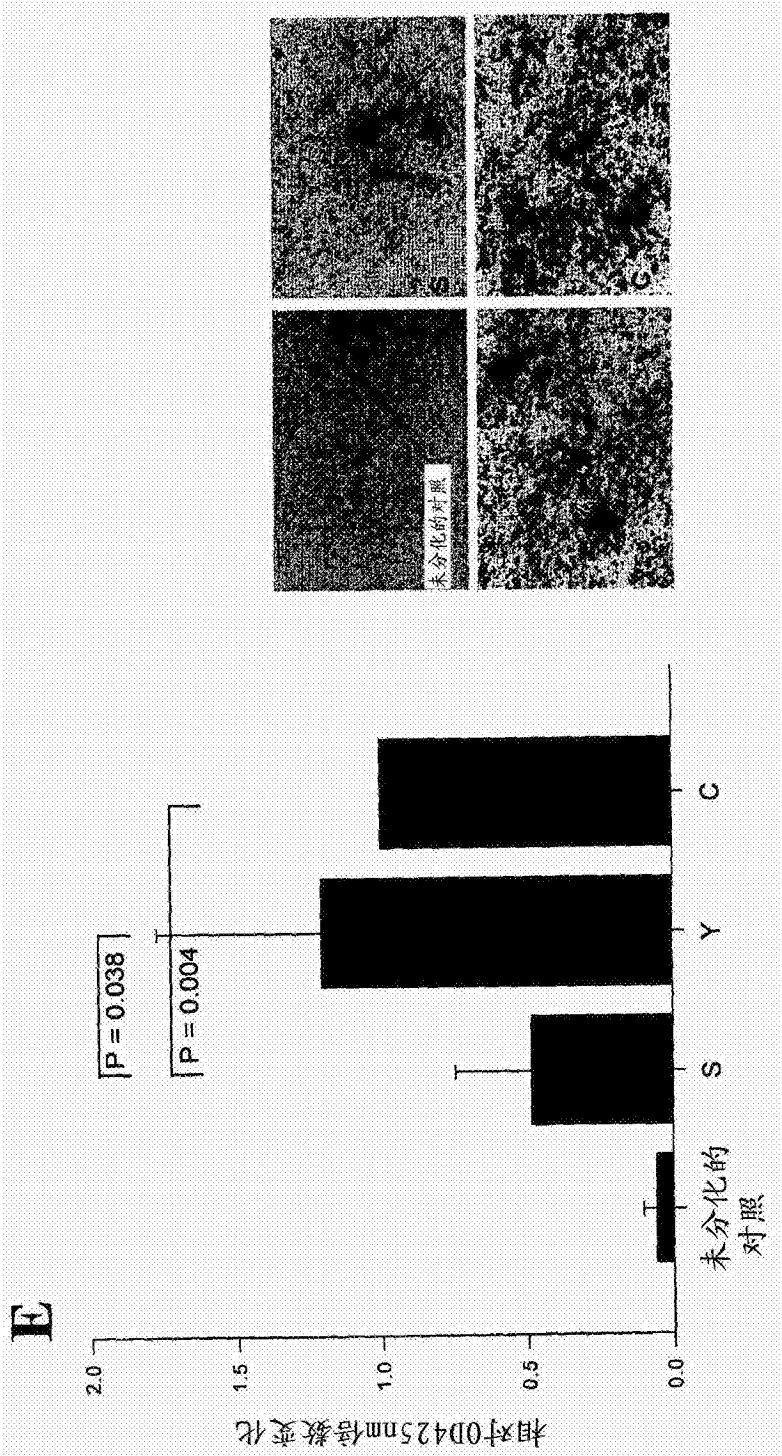


图3续

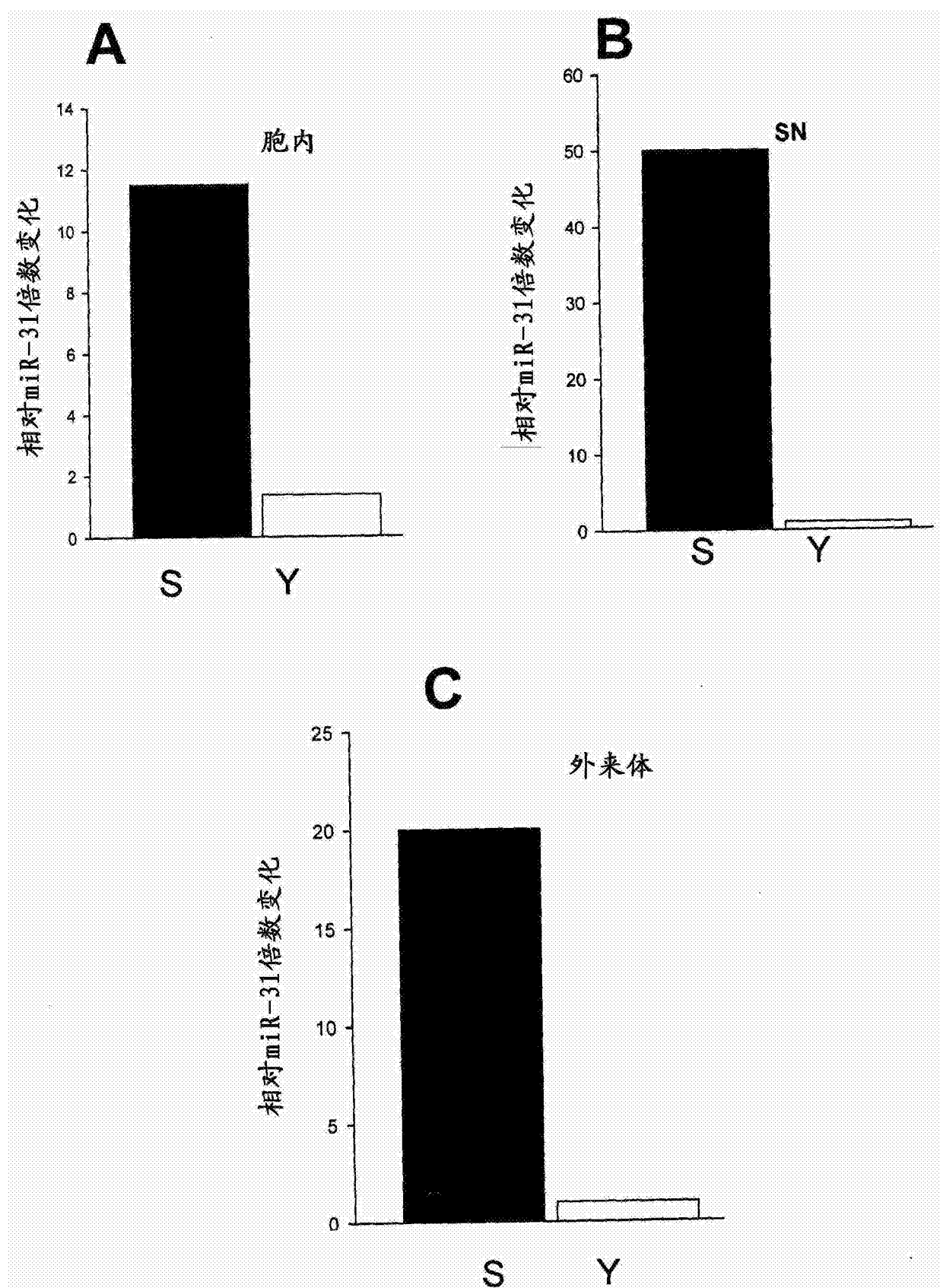


图4

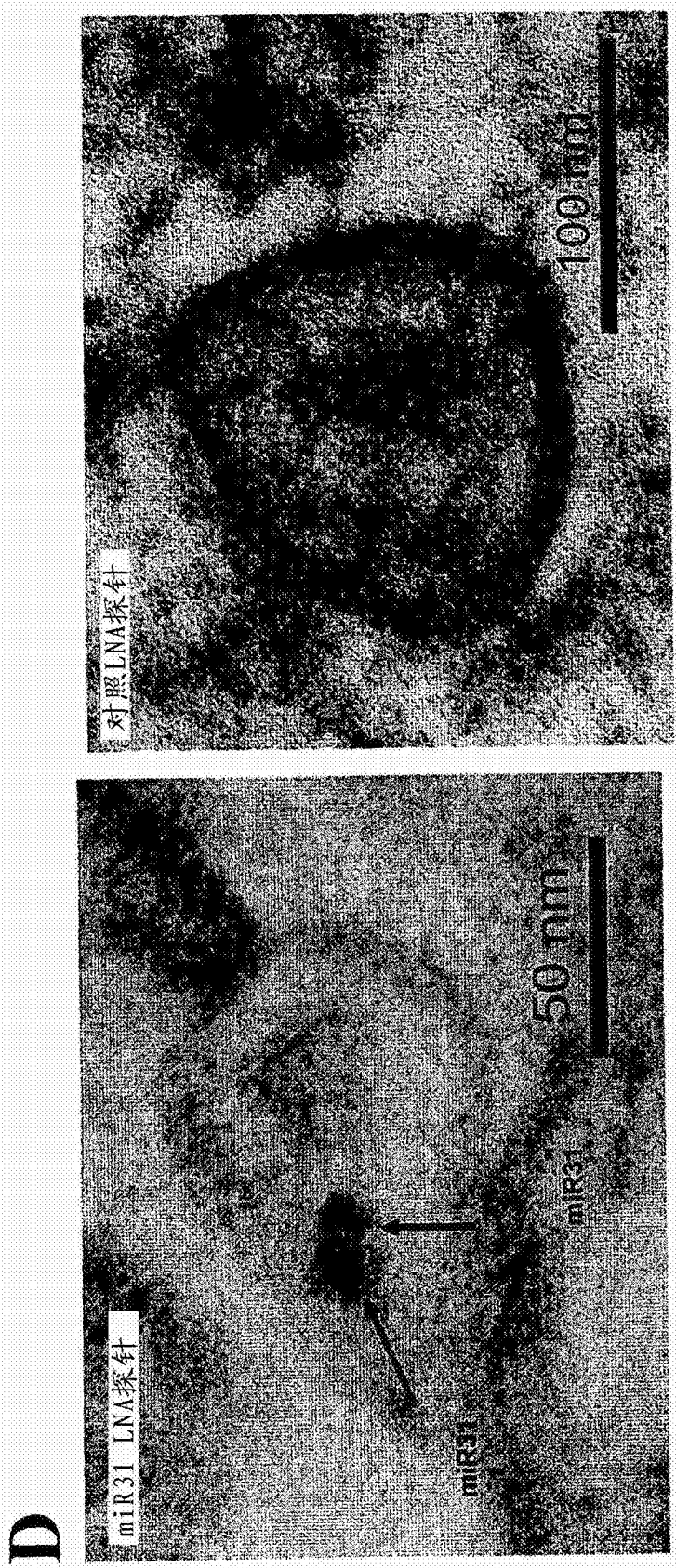


图4续

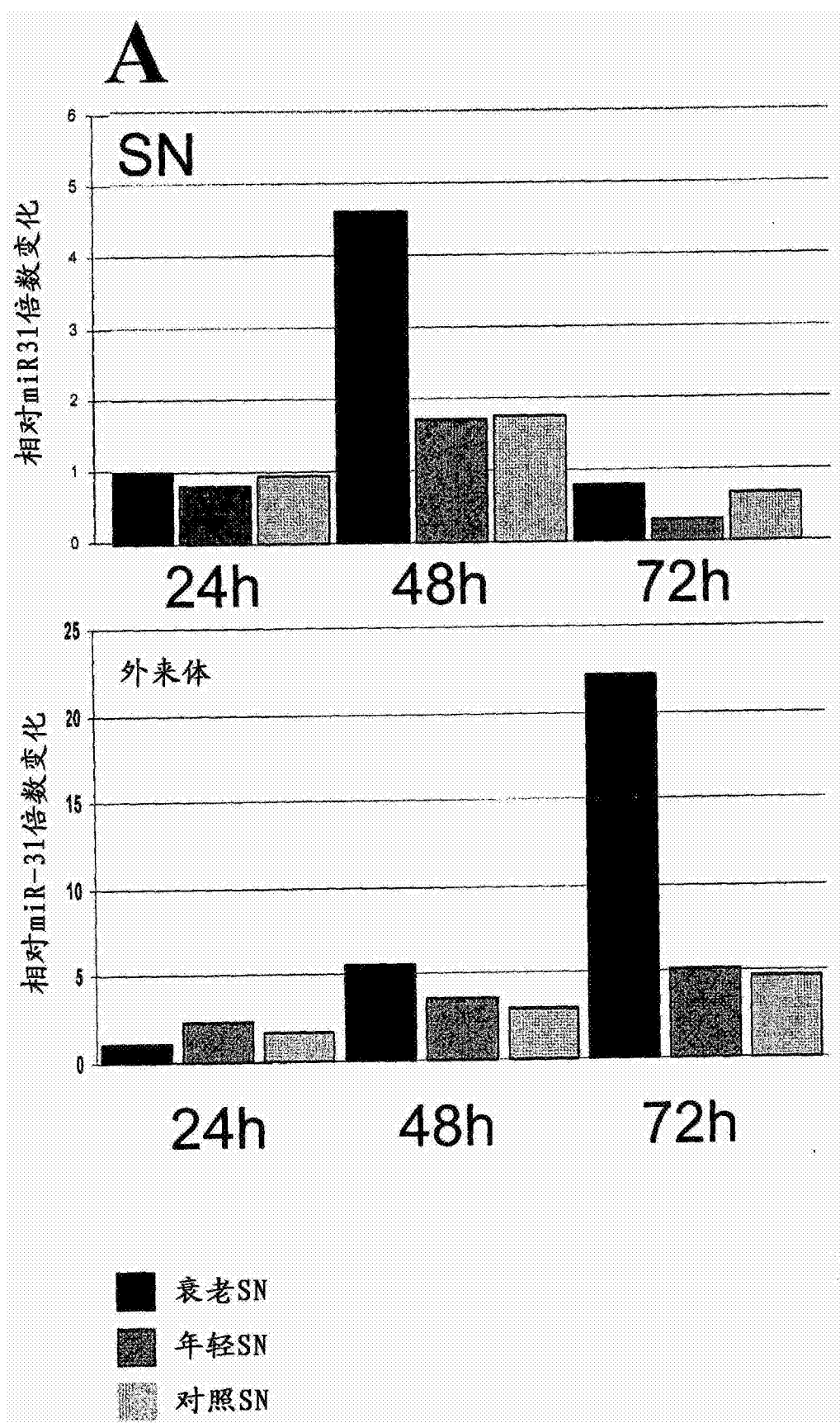


图5

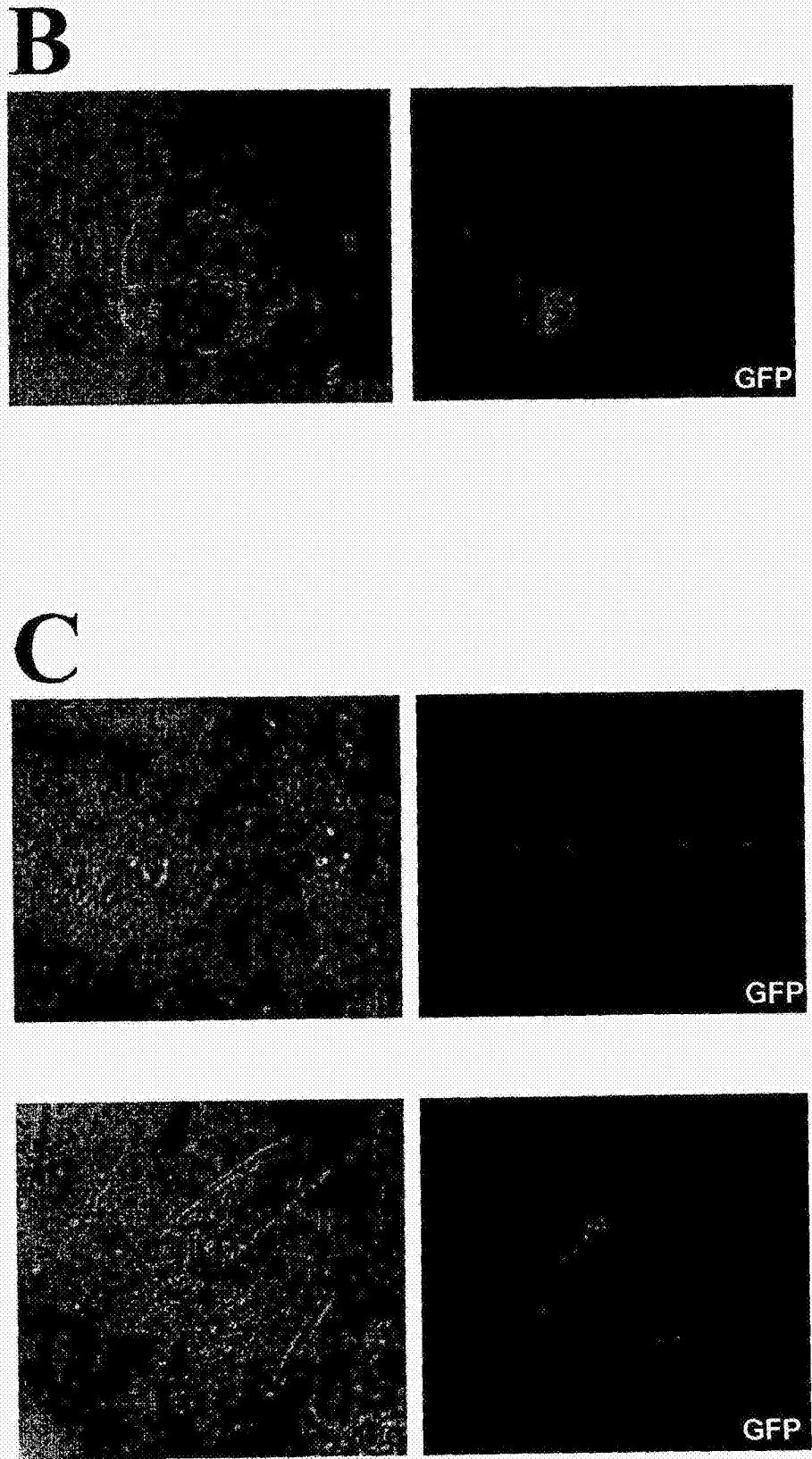


图5续

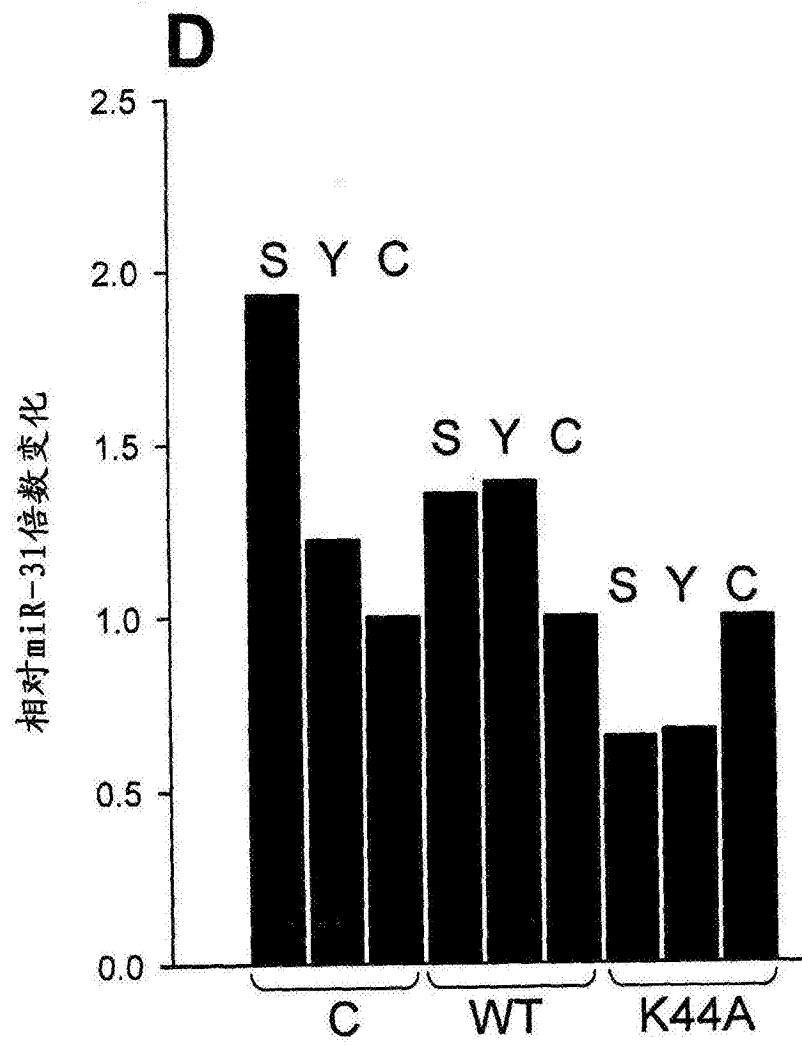


图5续

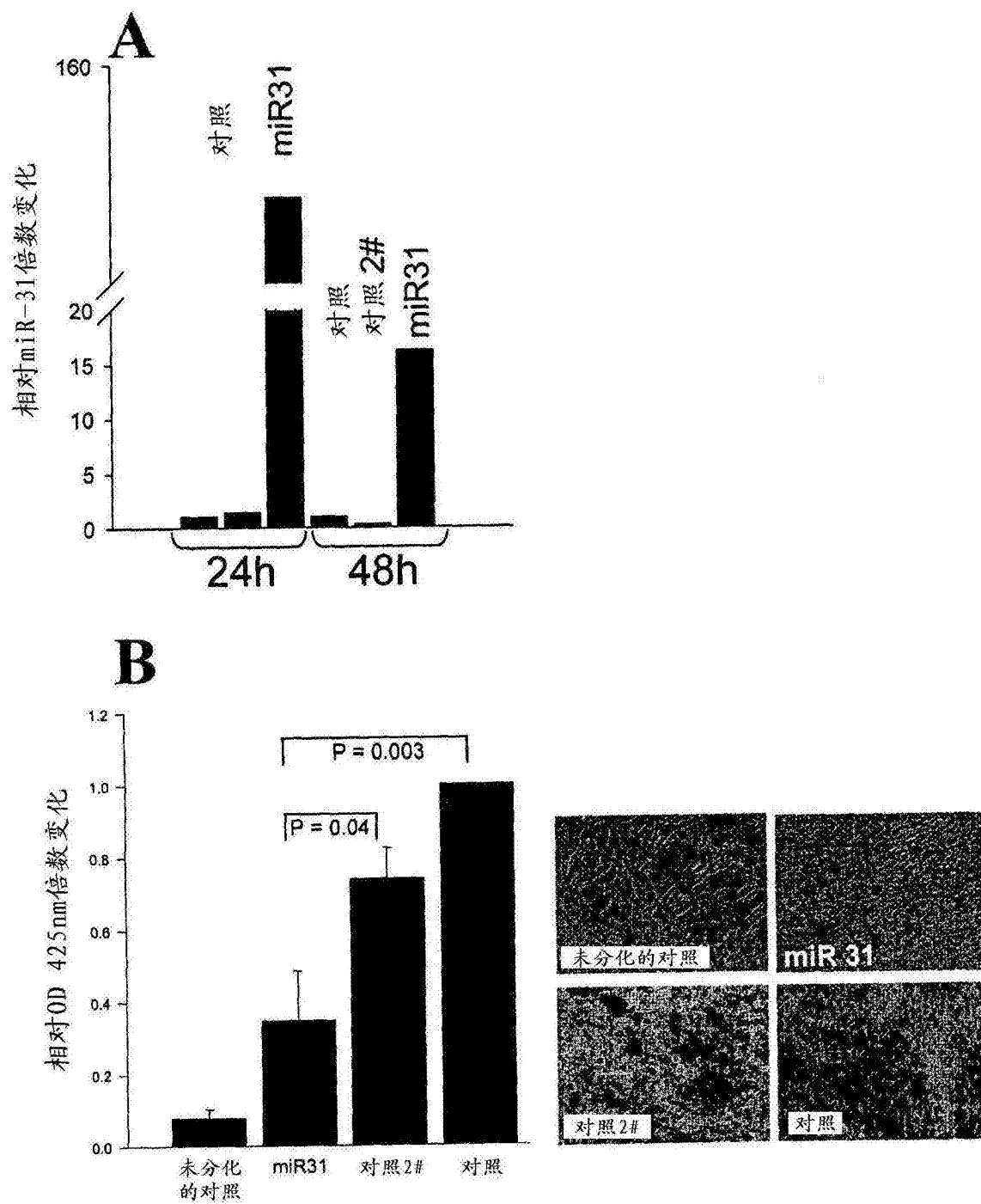


图6

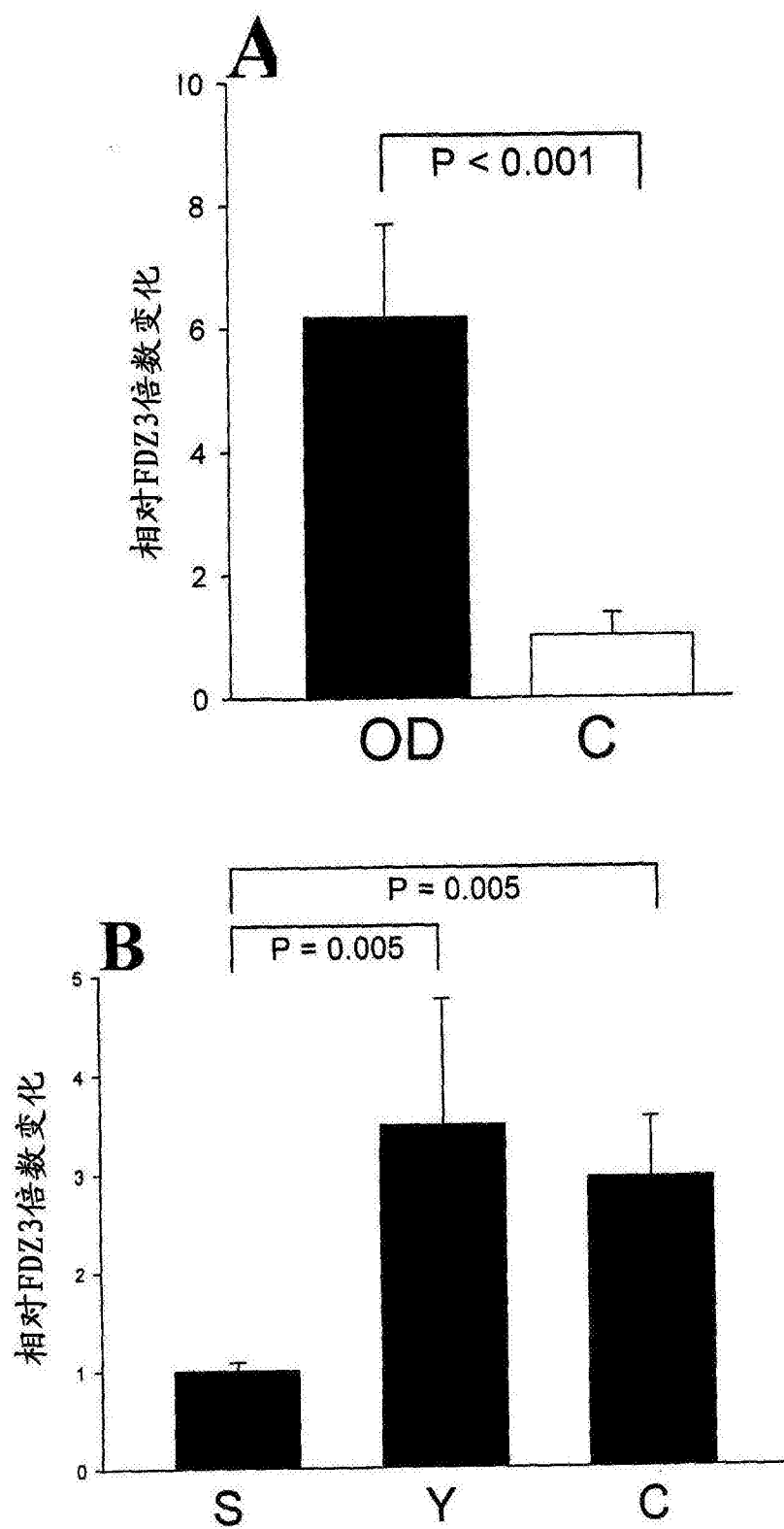


图7

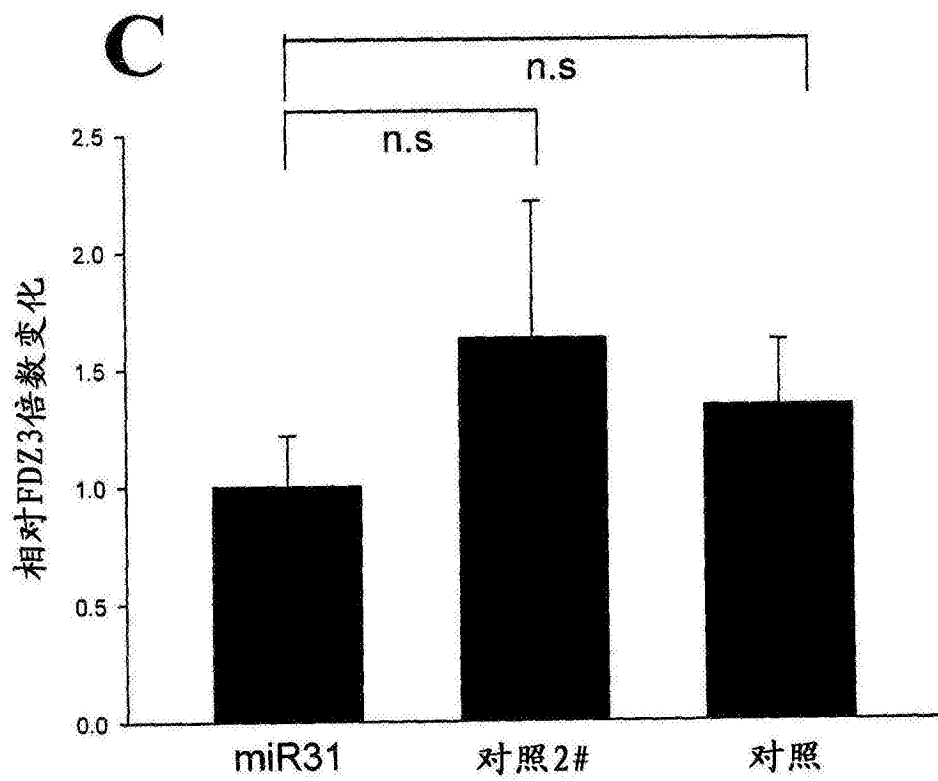


图7续

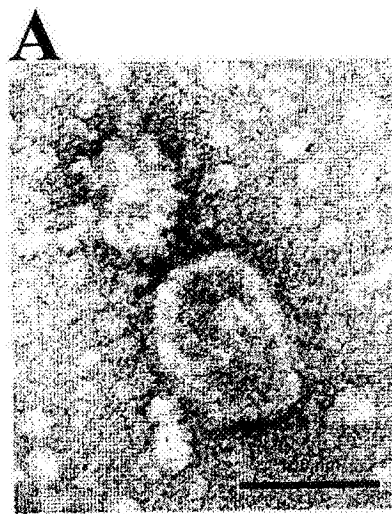


图8

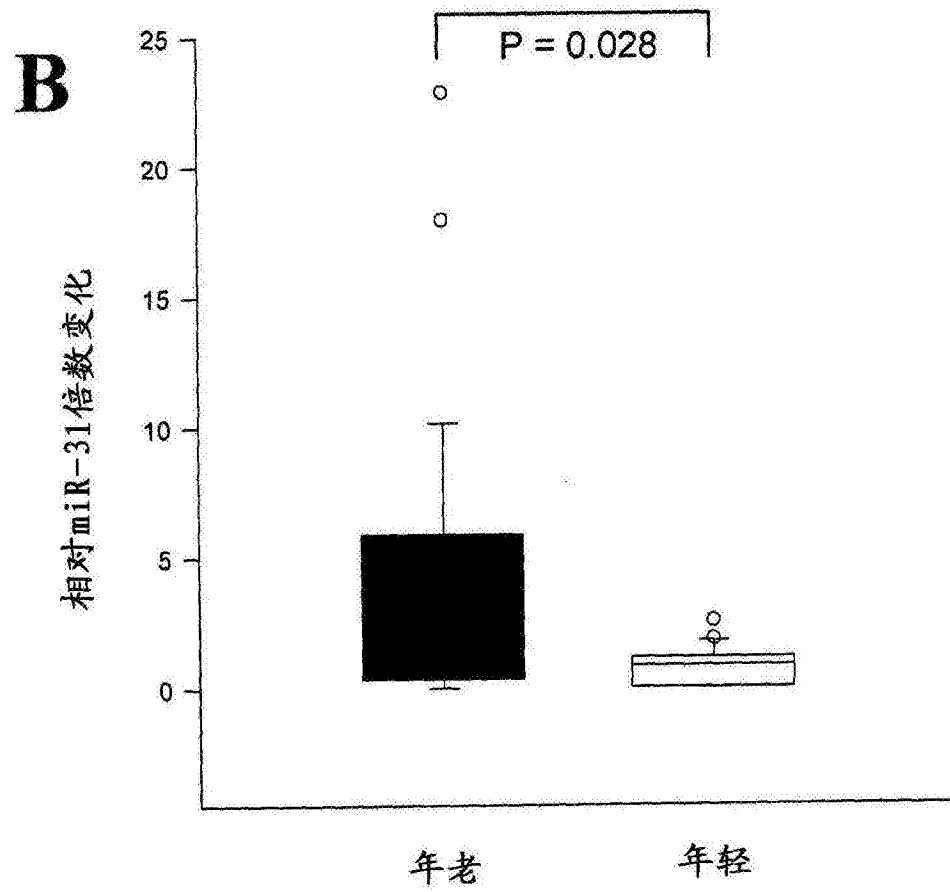


图8续

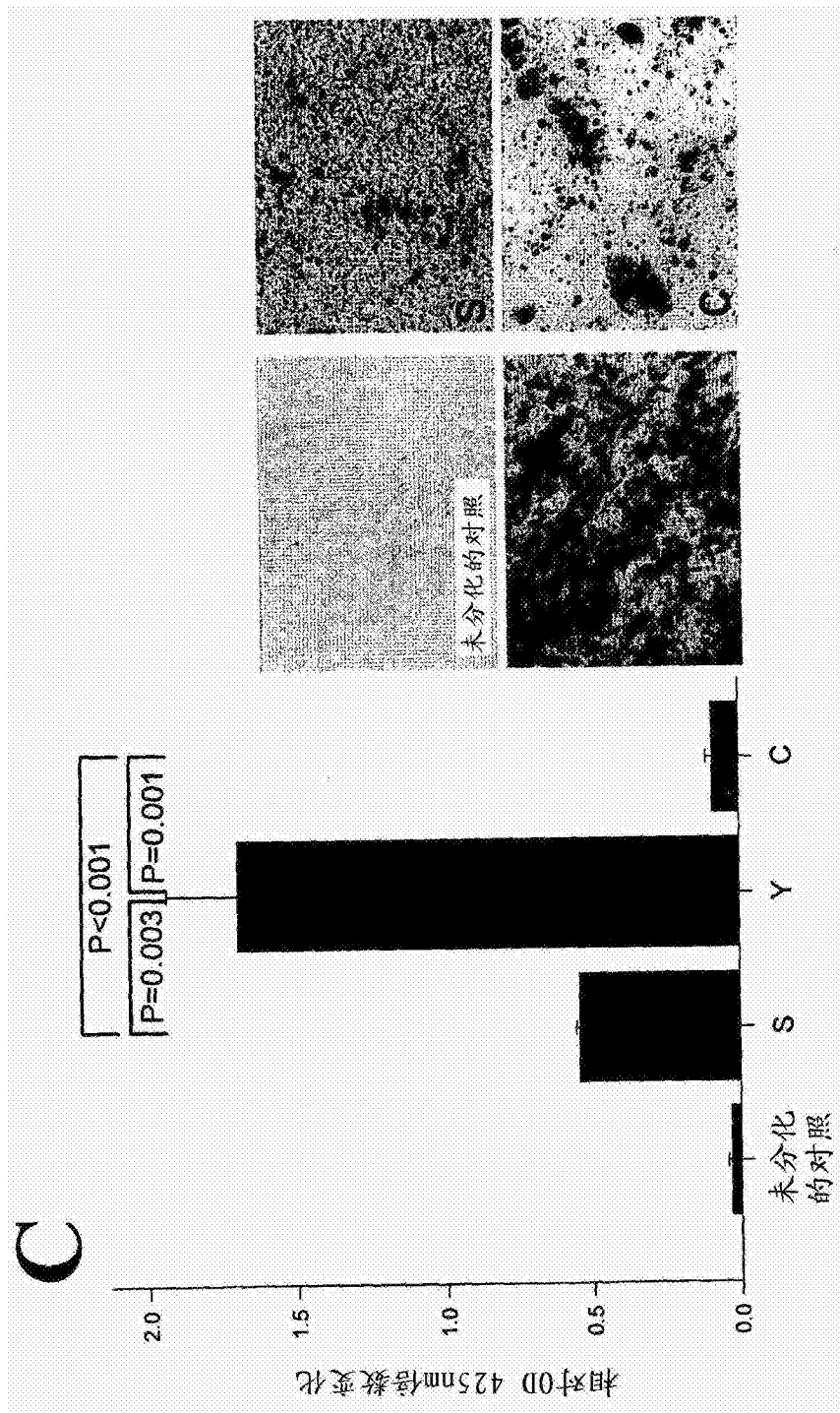


图8续

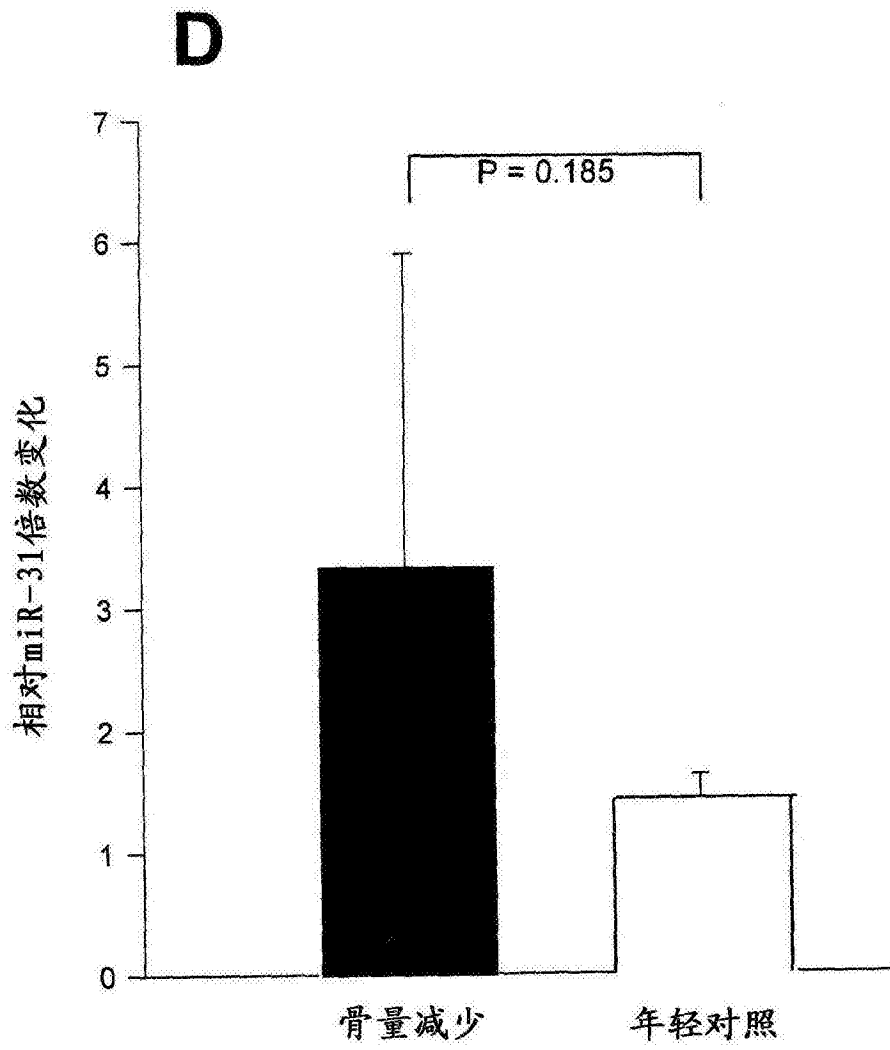


图8续

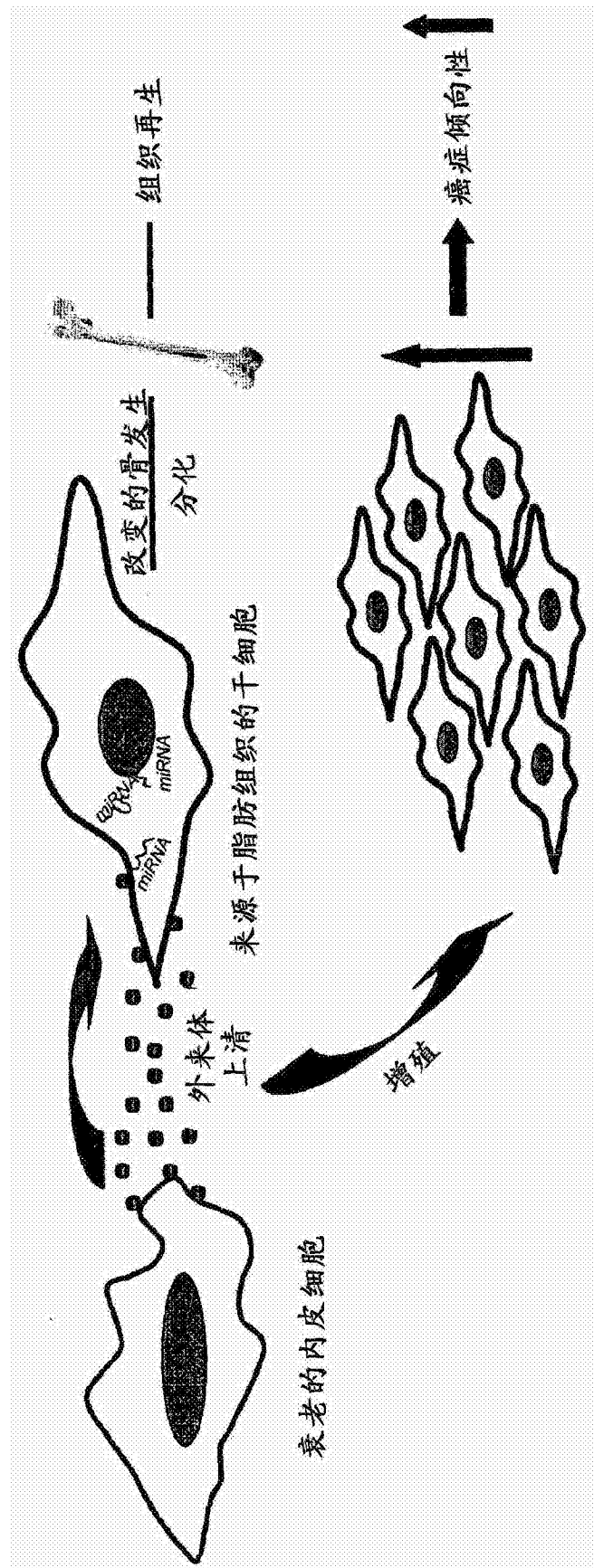


图9

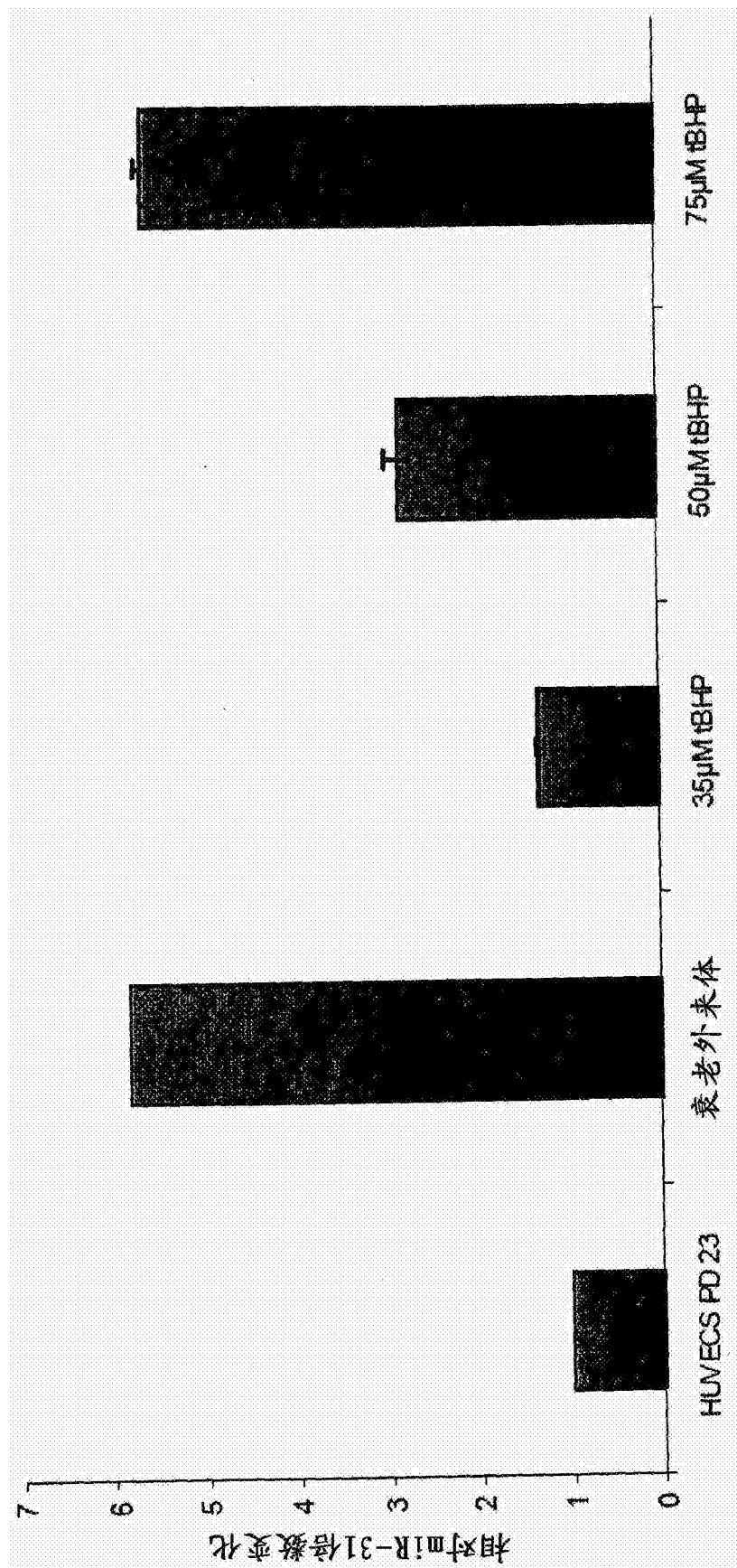


图10

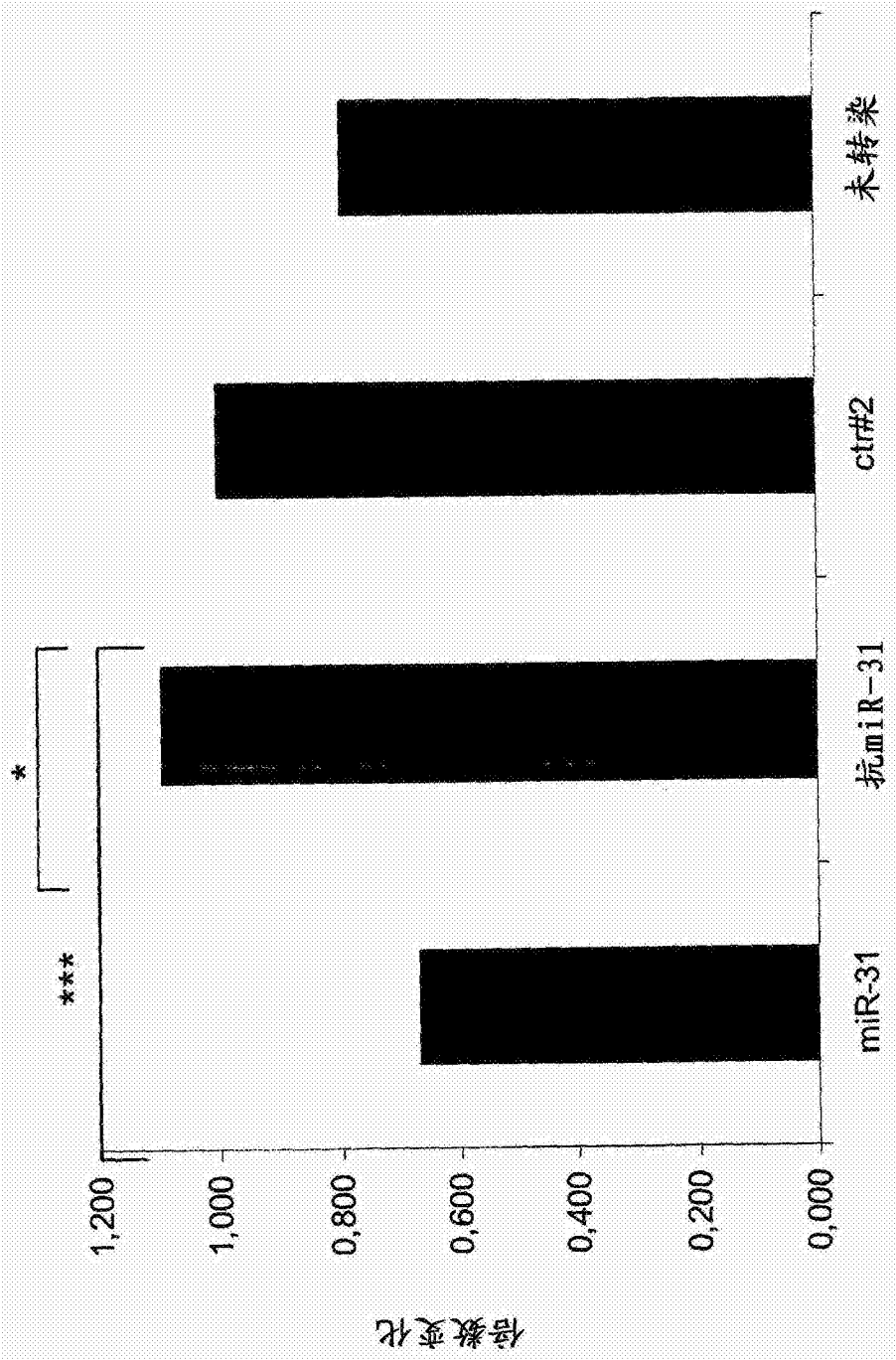


图11

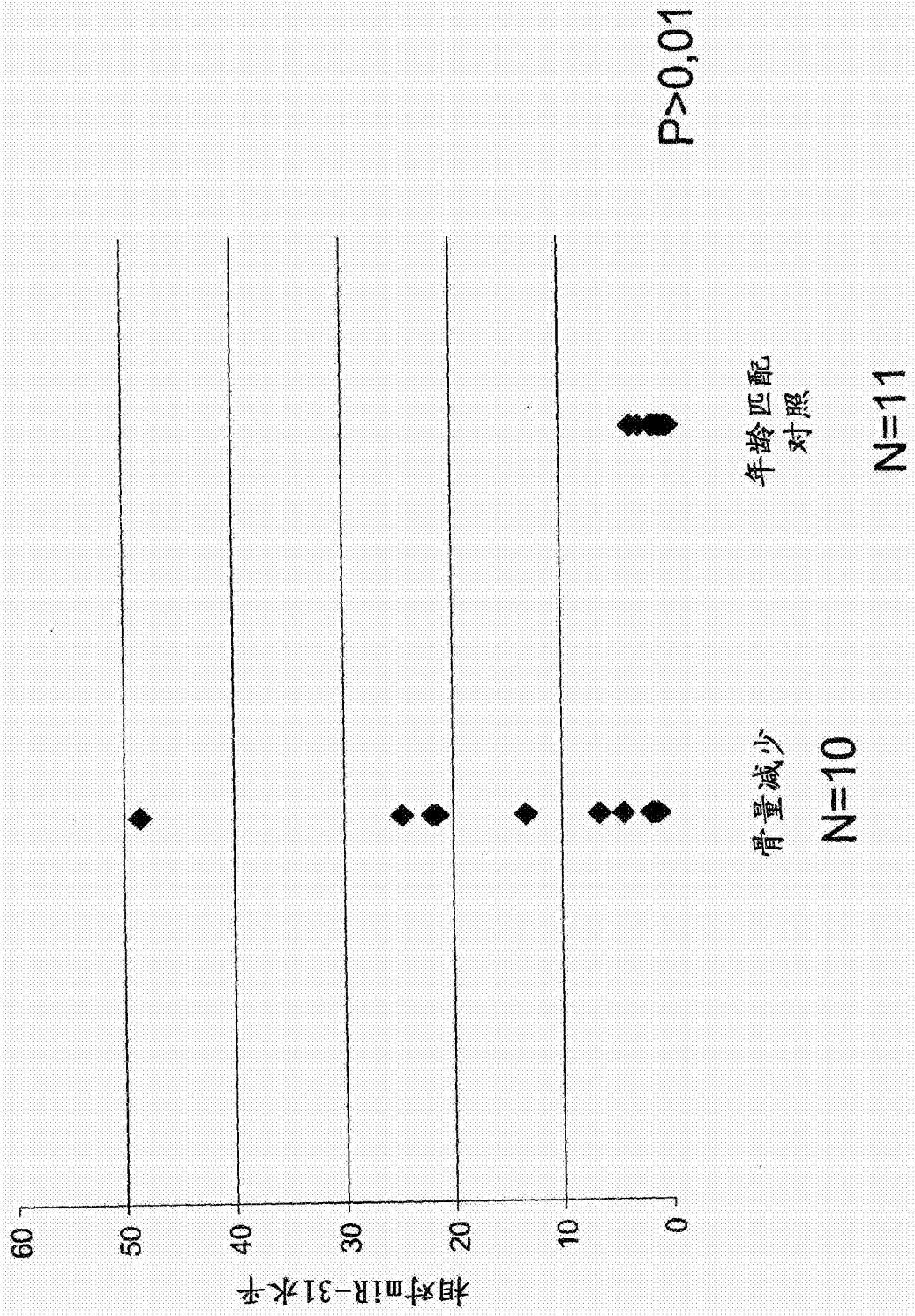


图12