(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117897162 A
(43)申请公布日 2024.04.16

(21)申请号 202280059718.0
(22)申请日 2022.06.30
(30)优先权数据
63/202,970 2021.07.01 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.03.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/035866 2022.06.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/278799 EN 2023.01.05
(71)申请人 西达-赛奈医疗中心
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 爱德华多·马尔万
艾哈迈德·G·易卜拉欣
(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444
专利代理师 韩飞 葛强
(51)Int.Cl.
A61K 31/712(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
C12Q 1/6876(2006.01)

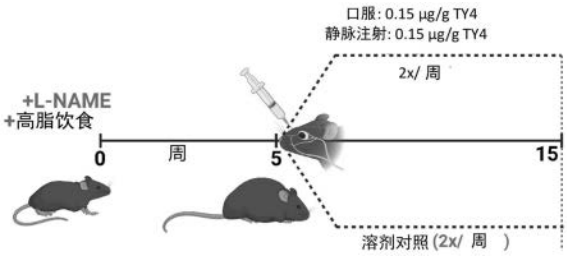
权利要求书5页 说明书52页
序列表（电子公布） 附图83页

(54)发明名称

治疗性核酸及其使用方法

(57)摘要

一种包含核苷酸序列的分离的核酸:提供CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)。在一些实施方式中,所述核酸包含至少一个化学修饰的核苷酸。所述核酸和组合物包含同样的用途用于治疗与炎症和/或纤维化相关的分症,例如但不限于,心脏病症,例如肥厚性心肌病、心肌梗塞和射血分数保留型心力衰竭;肌肉病症,例如肌营养不良;皮肤病症,例如硬皮病;和炎性病症,例如自身免疫病症或与病毒感染相关的炎性病症。



CN 117897162 A

1.一种分离的核酸,包含CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA,其中所述核酸的长度至多30nt。

2.一种分离的核酸,包含与CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)至少95%相同的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA,其中所述核酸的长度至多30nt。

3.根据权利要求1或2所述的分离的核酸,其中,所述核酸包含至少一个化学修饰的核苷酸。

4.根据权利要求3所述的分离的核酸,其中,所述核酸包含1至10个化学修饰的核苷酸。

5.根据权利要求3所述的分离的核酸,其中,所述核酸包含所述核苷酸序列的第1至12位上的至少一个化学修饰的核苷酸和/或第13至24位上的至少一个化学修饰的核苷酸。

6.根据权利要求3所述的分离的核酸,其中,所述化学修饰的核苷酸包含主链修饰。

7.根据权利要求6所述的分离的核酸,其中,所述主链修饰包含主链糖修饰。

8.根据权利要求3所述的分离的核酸,其中,所述核酸在所述核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位中的一个或多个位置上包含至少一个化学修饰的核苷酸。

9.根据权利要求6所述的分离的核酸,其中,所述化学修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)。

10.根据权利要求9所述的分离的核酸,其中,所述核苷酸序列包含在所述核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的LNA。

11.根据权利要求3所述的分离的核酸,其中,所述核酸为24个核苷酸长。

12.一种分离的核酸,包含与CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)至少95%相同的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA。

13.根据权利要求12所述的分离的核酸,其中,所述核苷酸序列是CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)。

14.根据权利要求12或13所述的分离的核酸,其中,所述核酸包含至少一个化学修饰的核苷酸。

15.根据权利要求14所述的分离的核酸,其中,所述核酸包含1至10个化学修饰的核苷酸。

16.根据权利要求14所述的分离的核酸,其中,所述核酸包含所述核苷酸序列的第1至12位上的至少一个化学修饰的核苷酸和/或第13至24位上的至少一个化学修饰的核苷酸。

17.根据权利要求14所述的分离的核酸,其中,所述化学修饰的核苷酸包含主链修饰。

18.根据权利要求17所述的分离的核酸,其中,所述主链修饰是主链糖修饰。

19.根据权利要求14所述的分离的核酸,其中,所述核酸进一步在所述核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位中的一个或多个位置上包含至少一个化学修饰的核苷酸。

20.根据权利要求17所述的分离的核酸,其中,所述化学修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)。

21.根据权利要求20所述的分离的核酸,其中,所述核苷酸序列包含在所述核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的LNA。

22.根据权利要求12至21中任一项所述的分离的核酸,其中,所述核酸长度至多30nt。

23.根据权利要求1或2所述的分离的核酸,其中,所述核酸由以下核苷酸序列组成或基本上由以下核苷酸序列组成:CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)。

24.一种由以下核苷酸序列组成的核酸:CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:2),其中,所述核酸是RNA,其中所述核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的每个是LNA。

25.一种组合物,包含:

前述权利要求中任一项所述的分离的核酸;和

药学上可接受的赋形剂。

26.根据权利要求25所述的组合物,进一步包含转染试剂。

27.根据权利要求26所述的组合物,其中,所述转染试剂包含脂质体、细胞外囊泡(EV)和聚乙二醇(PEG)-阳离子脂质复合物(PCLC)中的一种或多种。

28.根据权利要求26或27所述的组合物,其中,所述转染试剂包含来源于心球衍生细胞(CDC)的EV。

29.根据权利要求26至28中任一项所述的组合物,进一步包含酪蛋白磷酸蛋白。

30.根据权利要求29所述的组合物,包含壳聚糖。

31.根据权利要求30所述的组合物,其中,所述分离的核酸被包封在酪蛋白-壳聚糖复合物中。

32.根据权利要求29至31中任一项所述的组合物,包含酪蛋白胶束。

33.根据权利要求29至31中任一项所述的组合物,包含酪蛋白-壳聚糖胶束。

34.一种用于口服递送核酸的制剂,包含:

根据权利要求24所述的分离的核酸;

阳离子脂质;

至少一种酪蛋白;和

壳聚糖。

35.根据权利要求34所述的制剂,其中,

所述核酸包含核糖核酸(RNA),并且其中所述RNA以所述制剂的约0.0001%至0.01%重量/体积的量存在;

其中,所述至少一种酪蛋白包含至少一种α-s1酪蛋白亚单元,并且其中所述至少一种酪蛋白以所述制剂的约0.5%至5%重量/体积的量存在;并且

其中,所述壳聚糖以所述制剂的约0.001%至1%重量/体积的量存在。

36.一种巨噬细胞,包含根据权利要求1至24中任一项所述的核酸,其中,与不含所述核酸的巨噬细胞相比,所述巨噬细胞的抗炎活性增加。

37.根据权利要求36所述的巨噬细胞,其中,所述巨噬细胞在受试者体内。

38.根据权利要求36所述的巨噬细胞,其中,所述巨噬细胞在培养物中。

39.一种试剂盒,包含:

根据权利要求1所述的核酸;和

转染试剂。

40.根据权利要求39所述的试剂盒,其中,所述转染试剂包含脂质、聚乙二醇化脂质和细胞外囊泡(EV)中的一种或多种。

41.根据权利要求39或40所述的试剂盒,进一步包含药学上可接受的赋形剂。

42.根据权利要求39所述的试剂盒,进一步包含酪蛋白磷酸蛋白。

43.根据权利要求42所述的试剂盒,进一步包含壳聚糖。

44.一种用于治疗与炎症和/或纤维化相关的病症的方法,包含向需要治疗与炎症和/或纤维化相关的病症的受试者给予治疗有效量的权利要求1所述核酸,从而治疗与炎症和/

或纤维化相关的病症。

45.根据权利要求44所述的方法,其中,所述与炎症和/或纤维化相关的病症包含心脏、骨骼肌或皮肤的炎症和/或纤维化。

46.根据权利要求45所述的方法,其中,所述与炎症和/或纤维化相关的病症包含心力衰竭、肥厚性心肌病、射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)、裘馨氏肌肉萎缩症或硬皮病的症状和/或后遗症。

47.根据权利要求44所述的方法,其中,口服给予治疗有效量的所述核酸或组合物。

48.一种用于治疗心脏病症或其症状的方法,包含向需要治疗心脏病症或其症状的受试者给予治疗有效量的权利要求1所述的核酸,从而治疗心脏病症或其症状。

49.根据权利要求48所述的方法,其中,所述心脏病症包含心力衰竭的症状和/或后遗症

50.根据权利要求48所述的方法,其中,所述心脏病症包含肥厚性心肌病。

51.根据权利要求48所述的方法,其中,所述心脏病症包含射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)。

52.根据权利要求48所述的方法,其中,所述心脏病症包含感染性疾病的症状或后遗症。

53.根据权利要求52所述的方法,其中,所述感染性疾病包含病毒感染。

54.根据权利要求48至53中任一项所述的方法,其中,所述受试者患有所述心脏病症。

55.根据权利要求48至53中任一项所述的方法,其中,所述受试者有发展所述心脏病症的风险。

56.根据权利要求48至55中任一项所述的方法,其中,所述受试者在给药之前表现出以下中的一种或多种:高血压、升高的E/e'比率、心脏肥大、心肌纤维化、肥胖、消瘦、耐力下降和系统性炎症标志物升高。

57.一种用于治疗肌肉紊乱或其症状的方法,包含向需要治疗肌肉紊乱或其症状的受试者给予治疗有效量的权利要求1所述核酸,从而治疗肌肉紊乱或其症状。

58.根据权利要求57所述的方法,其中,所述肌肉紊乱包含肌营养不良或心脏病症。

59.根据权利要求57所述的方法,其中,所述肌肉障碍包含裘馨氏肌肉萎缩症。

60.根据权利要求57至59中任一项所述的方法,其中,所述受试者患有肌肉紊乱。

61.根据权利要求57至60中任一项所述的方法,其中,所述受试者有发展所述肌肉紊乱的风险。

62.根据权利要求61所述的方法,其中,所述受试者在遗传上倾向于发展肌肉紊乱。

63.根据权利要求57至62中任一项所述的方法,其中,所述受试者在给药之前表现出以下中的一种或多种:耐力下降和骨骼肌功能下降。

64.一种用于治疗炎症病症的方法,包含向需要治疗炎症病症的受试者给予治疗有效量的权利要求1所述的核酸,从而治疗炎症病症。

65.根据权利要求64所述的方法,其中,所述炎症病症包含感染性疾病的症状或后遗症或与免疫治疗相关。

66.根据权利要求65所述的方法,其中,所述感染性疾病包含病毒感染。

67.根据权利要求64至66所述的方法,其中,所述炎症病症包含细胞因子风暴。

68.根据权利要求64所述的方法,其中,所述炎症病症包含自身免疫性疾病。

69.根据权利要求68所述的方法,其中,所述自身免疫性疾病包含硬皮病或系统性硬化。

70.一种治疗纤维化病症的方法,包含向需要治疗纤维化病症的受试者给予治疗有效量的权利要求1所述的核酸,从而治疗纤维化病症。

71.根据权利要求70所述的方法,其中,所述纤维化病症包含感染性疾病、特发性肺纤维化或肝硬化的症状或后遗症。

72.根据权利要求44、45至71中任一项所述的方法,其中,所述治疗有效量的核酸包含约0.001μg/g至约100μg/g。

73.根据权利要求44至72中任一项所述的方法,包含给予所述治疗有效量的核酸或组合物不超过每周两次。

74.根据权利要求44至73中任一项所述的方法,包含静脉内、肌肉内、心内或口服给予所述治疗有效量的核酸或组合物。

75.根据权利要求74所述的方法,其中,口服给予所述治疗有效量的核酸或组合物。

76.一种提升巨噬细胞的抗炎活性的方法,包含使根据权利要求1至24中任一项所述的核酸或根据权利要求25至32中任一项所述的组合物与巨噬细胞群接触,从而提升所述巨噬细胞群的抗炎活性。

77.根据权利要求76所述的方法,其中,所述接触包含向需要治疗以炎症和/或纤维化为特征的病症的受试者给予有效量的所述核酸或组合物,从而提升受试者中巨噬细胞的抗炎活性。

78.根据权利要求76或77所述的方法,其中,所述巨噬细胞是人巨噬细胞。

79.根据权利要求1至24中任一项所述的核酸或根据权利要求25至33中任一项所述的组合物或根据权利要求34至35中任一项所述的制剂用于治疗有需要的受试者的心脏病症的用途。

80.根据权利要求1至24中任一项所述的核酸或根据权利要求25至33中任一项所述的组合物或根据权利要求34至35中任一项所述的制剂在制备用于治疗有需要的受试者的心脏病症的药物中的用途。

81.根据权利要求75或76所述的核酸的用途,其中,所述心脏病症包含心力衰竭、肥厚性心肌病或HFpEF。

82.根据权利要求1至24中任一项所述的核酸或根据权利要求25至33中任一项所述的组合物或根据权利要求34至35中任一项所述的制剂用于治疗有需要的受试者的肌肉紊乱的用途。

83.根据权利要求1至24中任一项所述的核酸或根据权利要求25至33中任一项所述的组合物或根据权利要求34至35中任一项所述的制剂在制备用于治疗有需要的受试者的肌肉紊乱的药物中的用途。

84.根据权利要求78或79所述的核酸的用途,其中,所述肌肉紊乱包含肌营养不良症。

85.根据权利要求78至79中任一项所述的核酸的用途,其中,所述肌肉紊乱包含裘馨氏肌肉萎缩症。

86.根据权利要求1至24中任一项所述的核酸或根据权利要求25至33中任一项所述的

组合物或根据权利要求34至35中任一项所述的制剂用于治疗有需要的受试者的炎性疾病的用途。

87.根据权利要求1至24中任一项所述的核酸或根据权利要求25至33中任一项所述的组合物或根据权利要求34至35中任一项所述的制剂在制备用于治疗有需要的受试者的炎性疾病的药物中的用途。

88.一种治疗与炎症和/或纤维化相关的病症的方法,包含向需要治疗与炎症和/或纤维化相关的病症的受试者给予治疗有效量的特异性结合易位启动子区(TPR)的核酸,从而治疗与炎症和/或纤维化相关的病症。

89.根据权利要求88所述的方法,其中,所述与炎症和/或纤维化相关的病症包含心脏、骨骼肌或皮肤的炎症和/或纤维化。

90.根据权利要求89所述的方法,其中,所述与炎症和/或纤维化相关的病症包含心力衰竭、肥厚性心肌病、射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)、裘馨氏肌肉萎缩症或硬皮病的症状和/或后遗症。

91.根据权利要求88所述的方法,其中,所述特异性结合TPR的核酸抑制TPR。

92.根据权利要求88所述的方法,其中,所述特异性结合TPR的核酸降低TPR的表达。

93.根据权利要求88所述的方法,其中,所述特异性结合TPR的核酸包含根据权利要求1至24中任一项所述的核酸。

治疗性核酸及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年7月1日提交的美国临时申请号63/202970的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 联邦资助的研发活动的声明

[0004] 本发明是在政府支持下根据美国国立卫生研究院授予Dr.Eduardo Marbán的授权号R01 HL124074进行的。政府具有本发明的某些权利。

[0005] 序列表的引用

[0006] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表为在2022年6月30日创建的名称为CSMC018WO_SEQLIST.txt的文件,其大小为35,492字节。序列表的电子格式的信息通过引用整体并入本文。

背景技术

技术领域

[0007] 本发明涉及治疗性RNA、其变体,以及使用其对肌肉和/或心脏和/或炎性疾病的治疗。

[0008] 炎症和组织损伤是某些心脏损伤和其他疾病的病理的主要驱动因素。作为先天免疫中的关键参与者,巨噬细胞分泌炎症介质、清除细胞碎片(通过胞葬作用)和重塑损伤后组织。巨噬细胞是由源自心肌球衍生细胞(CDC)的细胞外囊泡(EV)诱导的心肌梗塞后(MI)心脏保护的关键效应物,并且涉及增强的胞葬作用。与此一致的是,巨噬细胞的损耗削弱了心脏保护。

发明内容

[0009] 提供了一种分离的核酸,所述核酸包含CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA,其中所述核酸的长度至多为30nt。还提供了一种分离的核酸,所述核酸包含与CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)至少95%相同的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA,其中所述核酸的长度至多为30nt。任选地,所述核酸包含至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含1-10个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含核苷酸序列1-12位上的至少一个化学修饰的核苷酸和/或13-24位上的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸包含主链修饰。在一些实施方式中,所述主链修饰包含主链糖修饰。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)。在一些实施方式中,所述核苷酸序列包含核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的LNA。在一些实施方式中,所述核酸的长度为24个核苷酸。

[0010] 提供了一种分离的核酸,所述核酸包含与CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID

NO:12)至少95％相同的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA。任选地,所述核苷酸序列为CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)。在一些实施方式中,所述核酸包含至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含1-10个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含核苷酸序列1-12位上的至少一个化学修饰的核苷酸和/或13-24位上的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸包含主链修饰。在一些实施方式中,所述主链修饰是主链糖修饰。在一些实施方式中,所述核酸还包含在核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)。在一些实施方式中,所述核苷酸序列包含核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的LNA。在一些实施方式中,所述核酸的长度至多为30nt。

[0011] 在一些实施方式中,核酸由以下核苷酸序列组成或基本上由以下核苷酸序列组成:CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)

[0012] 一种由以下核苷酸序列组成的核酸:CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:2),其中所述核酸是RNA,其中所述核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的每个是LNA。

[0013] 还提供了一种组合物,所述组合物包含:本发明的任意一种分离的核酸;和药学上可接受的赋形剂。任选地,所述组合物还包含转染试剂。任选地,所述转染试剂包含脂质体、细胞外囊泡(EV)和聚乙二醇(PEG)-阳离子脂质复合物(PCLC)中的一种或多种。在一些实施方式中,所述转染试剂包含来源于心肌球衍生细胞(CDC)的细胞外囊泡(EV)。在一些实施方式中,所述组合物还包含酪蛋白磷酸蛋白。任选地,所述组合物还包含壳聚糖。任选地,所述分离的核酸包封在酪蛋白-壳聚糖复合物中。在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白胶束。在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白-壳聚糖胶束。

[0014] 本发明提供了包含本发明的任意一种核酸的巨噬细胞,其中与不含所述核酸的巨噬细胞相比,所述巨噬细胞的抗炎活性增加。还提供了一种暴露于或转染有本发明的任意一种核酸的巨噬细胞,其中与不含所述核酸的巨噬细胞相比,所述巨噬细胞的抗炎活性增加。任选地,所述巨噬细胞在受试者体内。任选地,所述巨噬细胞在培养物中。

[0015] 还提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含:本发明的任意一种核酸;和转染试剂。任选地,所述转染试剂包含脂质(例如,形成脂质体的脂质)、聚乙二醇化脂质和细胞外囊泡(EV)中的一种或多种。在一些实施方式中,所述试剂盒还包含药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,所述试剂盒还包含酪蛋白磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述试剂盒还包含壳聚糖。

[0016] 还提供了一种用于治疗心脏病症或其症状的方法,所述方法包含向需要治疗心脏病症或其症状的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种,从而治疗心脏病症或其症状。任选地,所述心脏病症包含心力衰竭的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述心脏病症包含肥厚性心肌病。在一些实施方式中,所述心脏病症包含射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)。在一些实施方式中,所述心脏病症包含感染性疾病的症状或后遗症。在一些实施方式中,所述感染性疾病包含病毒感染。在一些实施方式中,所述受试者患有心脏病症。在一些实施方式中,所述受试者有发展心脏病症的风险。在一些实施方式中,所述受试者在给药之前表现出以下中的一种或多种:高血压、通过超声心动描记术检测的升高的E/e'比率、心脏肥大、心肌纤维化、肥胖、消瘦、耐力下降和系统性炎症标志物升高。

[0017] 还提供了一种用于治疗肌肉紊乱或其症状的方法,所述方法包含向需要治疗肌肉紊乱或其症状的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种,从而治疗肌肉紊乱或其症状。任选地,所述肌肉紊乱包含肌营养不良或心脏病症。在一些实施方式中,所述肌肉紊乱包含裘馨氏肌肉萎缩症。在一些实施方式中,所述受试者患有肌肉紊乱。在一些实施方式中,所述受试者有发展肌肉紊乱的风险。在一些实施方式中,所述受试者在遗传上倾向于发展肌肉紊乱。在一些实施方式中,所述受试者在给药之前表现出以下中的一种或多种:耐力下降和骨骼肌功能下降。

[0018] 还提供了一种用于治疗炎症病症的方法,所述方法包含向需要治疗炎症病症的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种,从而治疗炎症病症。任选地,所述炎症病症包含感染性疾病的症状或后遗症。在一些实施方式中,所述感染性疾病包含病毒感染。在一些实施方式中,所述炎症病症包含细胞因子风暴。在一些实施方式中,所述炎症病症与免疫治疗(例如,针对癌症)相关。在一些实施方式中,所述炎症病症是硬皮病,所述硬皮病是影响皮肤的自身免疫病症。在一些实施方式中,所述炎症病症是系统性硬化,所述系统性硬化是类似硬皮病但不仅影响皮肤而且影响包含肺和心脏在内的内部器官的自身免疫病症。

[0019] 还提供了一种用于治疗纤维化病症的方法,所述方法包含向需要治疗纤维化病症的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种,从而治疗纤维化病症。任选地,所述纤维化病症包含感染性疾病的症状或后遗症。在一些实施方式中,所述感染性疾病包含病毒感染。在一些实施方式中,纤维化病症是特发性肺纤维化。在一些实施方式中,纤维化病症是肝硬化。

[0020] 在一些实施方式中,所述治疗有效量的核酸包含约0.001μg/g至约100μg/g。在一些实施方式中,本发明所述任意一种用于治疗的方法包含给予治疗有效量的核酸或组合物不超过一周两次。在一些实施方式中,所述方法包含静脉内、肌内、心内或口服给予治疗有效量的核酸或组合物。任选地,口服给予治疗有效量的核酸或组合物。

[0021] 还提供了一种提升巨噬细胞的抗炎活性的方法,所述方法包含将本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种与巨噬细胞群体接触,从而提升所述群体的巨噬细胞的抗炎活性。任选地,所述接触包含向需要治疗特征为炎症和/或纤维化的病症的受试者给予有效量的核酸或组合物,从而提升受试者中巨噬细胞的抗炎活性。在一些实施方式中,所述巨噬细胞是人巨噬细胞。

[0022] 还提供了一种用于治疗与炎症和/或纤维化相关的病症的方法,包含向需要治疗与炎症和/或纤维化相关的病症的受试者施用治疗有效量的结合易位启动子区(TPR)的核酸,从而治疗与炎症和/或纤维化相关的病症。任选地,所述与炎症和/或纤维化相关的病症包含心脏、骨骼肌或皮肤的炎症和/或纤维化。在一些实施方式中,所述与炎症和/或纤维化相关的病症包含心力衰竭、肥厚性心肌病、射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)、裘馨氏肌肉萎缩症或硬皮病的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述结合TPR的核酸抑制TPR。在一些实施方式中,所述结合TPR的核酸减少TPR的表达。在一些实施方式中,所述结合TPR的核酸包含本发明的核酸,例如TY4。

[0023] 还提供了一种用于口服递送核酸(例如TY4)的制剂,所述制剂包含本发明的核酸、阳离子脂质、至少一种酪蛋白和壳聚糖。在一些实施方式中,所述制剂的核酸包含如发明提

供的TY4或其衍生物,其中所述RNA以所述制剂的0.0001％至0.01％重量/体积的量存在。在一些实施方式中,所述至少一种酪蛋白包含至少一种α-s1酪蛋白亚单元,所述α-s1酪蛋白亚单元以所述制剂的约0.25％至约7％重量/体积的量存在,所述壳聚糖以所述制剂的约0.0001％至4％重量/体积的量存在。

[0024] 在一些实施方式中,提供了一种用于口服递送核酸的制剂,其包含多个人工脂质胶束、多个核酸、和在所述人工脂质胶束上的包衣,其中所述核酸的一部分被包封在所述人工脂质胶束内,所述包衣包含酪蛋白和壳聚糖聚合物的混合物。在一些实施方式中,所述核酸包含核糖核酸(RNA),并且其中所述RNA以所述制剂的约0.00001％至约0.05％重量/体积的量存在,所述酪蛋白和壳聚糖聚合物的混合物包含至少一种α-s1酪蛋白亚单元,所述α-s1酪蛋白亚单元以所述制剂的约0.5％至约5％重量/体积的量存在,并且其中所述壳聚糖以所述制剂的约0.001％至约1％重量/体积的量存在。

[0025] 在一些实施方式中,所述制剂还包含酸。在一些实施方式中,所述酸以所述制剂的约0.001％至约1％体积的量存在,并且所述酸选自乙酸、柠檬酸、磷酸和柠檬酸。在一个实施方式中,所述制剂还包含乙酸,其中所述乙酸以所述制剂的约0.01％至约1％重量/体积的量存在。

[0026] 在一些实施方式中,所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约0.1微升至约5微升的量存在。在一些实施方式中,所述壳聚糖是低分子量壳聚糖。在一些实施方式中,所述低分子量壳聚糖的质量范围为约50至约190千道尔顿。

[0027] 在一些实施方式中,所述核酸包含本发明的核酸,例如TY4,其中RNA以所述制剂的约0.001％至约0.005％重量/体积的量存在,其中至少一种酪蛋白包含α-s1酪蛋白亚单元、α-s2酪蛋白亚单元、β-酪蛋白亚单元和κ-酪蛋白亚单元的混合物,其中酪蛋白亚单元以所述制剂的约1％至3％重量/体积的量存在,并且其中壳聚糖以所述制剂的约0.01％至0.1％重量/体积的量存在。

[0028] 在一些实施方式中,所述核酸,例如TY4,以所述制剂的约0.0015％至约0.004％重量/体积的量存在,其中所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2％至3％重量/体积的量存在,其中所述壳聚糖以所述制剂的约0.05％％至约0.1％重量/体积的量存在,并且其中所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约3微升的量存在。

[0029] 在一些实施方式中,所述核酸,例如TY4,以所述制剂的约0.0015％至约0.0035％重量/体积的量存在,其中所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2.2％至2.8％重量/体积的量存在,其中所述壳聚糖以所述制剂的约0.06％至约0.09％重量/体积的量存在,并且其中所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约2微升的量存在。

附图说明

[0030] 图1A是示出了EV-YF1序列及其假设的作用机制的示意图。图1B是示出了用EV-YF1处理的骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)中基因表达变化的热图图像。图1C是示出了用EV-YF1处理的BMDM中基因的差异表达的图。图1D是示出了用EV-YF1处理的细胞中组蛋白乙酰化模式的变化的图的集合。

[0031] 图2A是示出了用于测量肥厚性心肌病(HCM)模型中EV-YF1的治疗效果的方案的示意图。图2B是示出了体重随时间变化的图。图2C是舒张中的超声心动图图像的集合。图2D是

示出了舒张末期室间隔厚度(IVSd;左图)和舒张末期左心室后壁厚度(LVPWd;右图)随时间变化的图的集合。图2E是比较理毛行为的图像集合。图2F是将跑步机锻炼距离占WT小鼠跑步距离的百分比进行比较的图。图2G是比较与胫骨长度(TL)相比的心脏重量(HW)比率和相对肺重量(LW)的图的集合。

[0032] 图3A和3B是示出了用EV-YF1变体或溶剂对照处理的巨噬细胞中选定基因的表达水平的比较的图的集合。

[0033] 图4A是示出了TY4的结构特征及其与EV-YF1的序列比对的图像。图4B是示出了用TY4处理的BMDM中基因表达变化的热图图像。图4C是示出了用TY4处理的BMDM中基因的差异表达的图。

[0034] 图5A-5E示出了根据本发明的一些非限制性实施方式,在肥厚性心肌病(HCM)中给予TY4的治疗效果。图5A是示出了用于测量肥厚性心肌病(HCM)模型中的TY4的治疗效果的方案的示意图。图5B是比较舒张末期室间隔厚度(IVSd)的图。图5C是比较舒张末期左心室后壁厚度(LVPWd)的曲线图。图5D是比较跑步机锻炼距离的图。图5E是比较跑步机锻炼测试中的总锻炼距离随时间变化的图。

[0035] 图6A-6E示出了根据本发明的一些非限制性实施方式,在肥厚性心肌病(HCM)中给予TY4的治疗效果。图6A是比较收缩压的图。图6B是比较舒张压的图。图6C是比较在TY4给药期间收缩压随时间变化的图。图6D是比较舒张压随时间变化的图。图6E是比较体重随时间变化的图。

[0036] 图7A-7C示出了根据本发明的一些非限制性实施方式,在肥厚性心肌病(HCM)中给予TY4的治疗效果。图7A是比较外周血中脑钠肽(BNP)水平的图。图7B是比较心脏重量(HW)与胫骨长度(TL)比率的图。图7C是比较与胫骨长度(TL)相比的相对肺重量(LW)的图。

[0037] 图8A-8M显示了根据本发明中的一些非限制性实施方式,在射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)中给予TY4的治疗效果。图8A是示出了在HFpEF模型中测量TY4治疗效果的方案的示意图。图8B是比较收缩压(左图)和舒张压(右图)的图。图8C是比较跑步机锻炼距离的曲线图。图8D是比较早期舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度的比率(E/e')的图。图8E是比较系统性脑钠肽(BNP)水平的图。图8F是比较收缩压(左图)和舒张压(右图)的图的集合。图8G是比较早期舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度的比率(E/e')的图。图8H是比较跑步机锻炼距离的曲线图。图8I是比较系统性BNP水平的图。图8J是比较收缩压随时间变化的图。图8K是比较舒张压随时间变化的图。图8L是比较E/e'比率随时间变化的图。图8M是比较跑步机锻炼距离随时间变化的图。

[0038] 图9A-9G显示了根据本发明的一些非限制性实施方式,在HFpEF中给予TY4的治疗效果。图9A是比较E/e'比率的图。图9B是比较E/e'比率随时间变化的图。图9C是比较体重随时间的图。图9D是比较跑步机锻炼距离的图。图9E是比较跑步机锻炼距离随时间的图。图9F是比较收缩压(上图)和收缩压随时间的相对变化(下图)的图的集合。图9G是比较舒张压(上图)和舒张压随时间的相对变化(下图)的图的集合。

[0039] 图10A和10B显示了根据本发明的一些非限制性实施方式,在HFpEF中给予TY4的治疗效果。图10A是比较外周血中的白介素(IL)-6水平的图,单位pg/mL。图10B是比较外周血中BNP水平的图,单位pg/mL。

[0040] 图11A-11B示出了根据本发明的一些非限制性实施方式,通过测量人特异性Y-RNA

序列来确定CDC-EV的生物分布。图11A是人特异性Y-RNA序列和最接近的小鼠序列的序列比对。图11B是示出了作为组织中的人CDC-EV量的函数的组织中的人特异性Y-RNA序列的检测的图。图11C是比较在CDC-EV的眼球后静脉注射之后在不同组织中人CDC-EV的测量量的图。

[0041] 图12A是根据本发明的一些非限制性实施方式,用于生物活性治疗分子的人巨噬细胞筛选的示意图。

[0042] 图12B是示出了人巨噬细胞中IL10 mRNA表达的图。

[0043] 图13是示出了根据本发明的一些非限制性实施方式,用于测试TY4和/或其衍生物,以及用于TY4和/或其衍生物的替代制剂和给药途径的损伤修饰生物活性的体外实验的示意图。

[0044] 图14A是示出了根据本发明的一些非限制性实施方式,用于产生负载有化学修饰的RNA的CDC-EV的方案的示意图和曲线图的集合。

[0045] 图14B是示出了负载有化学修饰的RNA的CDC-EV中外源RNA的大小分布和量。

[0046] 图14C是示出了通过负载有化学修饰的RNA的CDC-EV将外源RNA递送至新生儿大鼠心肌细胞的示意图和图像的集合。

[0047] 图15是示出了用于测量在建立的裘馨氏肌肉萎缩症模型mdx小鼠中给予TY4的治疗效果的方案的示意图。

[0048] 图16A-16D示出了根据本发明的一些非限制性实施方式,在建立的裘馨氏肌肉萎缩症模型mdx小鼠中给予TY4的体内肌肉功能的治疗效果。图16A是示出了溶剂对照动物中的跑步机锻炼距离随时间变化的图。图16B是示出了甲基化EV-YF1(Y RNAme)处理的动物中跑步机锻炼距离随时间变化的图。图16C是示出了在TY4处理的动物中跑步机锻炼距离随时间变化的图。图16D是示出了跑步机锻炼距离相对于基线随时间变化的图。

[0049] 图17A-17F示出了根据本发明的一些非限制性实施方式,在裘馨氏肌肉萎缩症模型mdx小鼠中给予TY4的体外肌肉功能的治疗效果。图17A是示出了溶剂对照动物中骨骼肌随时间的强直扭矩的图。图17B是示出了甲基化EV-YF1(Y RNAme)治疗的动物中骨骼肌随时间的强直扭矩的图。图17C是示出了在TY4处理的动物中骨骼肌随时间的强直扭矩的图。图17D是示出了溶剂对照动物中骨骼肌随时间的抽搐扭矩的图。图17E是示出了甲基化EV-YF1(Y RNAme)处理的动物中骨骼肌随时间的抽搐扭矩的图。图17F是示出了在TY4处理的动物中骨骼肌随时间的抽搐扭矩的图。

[0050] 图18A是示出了强直扭矩相对于基线随时间变化的图。

[0051] 图18B是示出了EV-YF1(Y RNAme)和TY4相对于对照对强直扭矩的治疗效果的大小的图。

[0052] 图19A-19L是示出了TY4是具有抗衰老特性的工程化的Y来源的小RNA(Ys RNA)。图19A:TY4是从治疗性心脏基质细胞(心肌球衍生细胞;CDC)的细胞外囊泡中天然丰富的较大Y来源的小RNA(EV-YF1)生物启发的。截断版本受到在CDC-EV中也丰富的较短变体的启发。TY4在5”端包含突变(G至C),并且在每一端包含三个交替的锁核酸残基(LNA)。图19B:TY4的预测结构(频谱表示碱基配对概率)。图19C:暴露于溶剂(PBS)或TY4(每组n＝4次生物重复)的骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)的热图。图19D-19H:示出了免疫调节介质上调的测序数据(图19D),TGFβ促纤维化信号传导的抑制(图19E)和肥厚信号传导(图19F)和其上游增强剂Hippo/Yap(图19G)和MAPK信号传导(图19H)。图19I-19L:与溶剂对照或TY4乱码序列相比,

用溶剂TY4预处理并暴露于脂多糖的BMDM示出了减少的衰老标志物(p21;图19I),炎症小体激活(IL1b;图19J)和炎症(NFkB和IL6;分别为图19K,19L)。组蛋白修饰的分析进一步表明,暴露于TY4的巨噬细胞在组蛋白修饰中具有差异变化(n=3次生物重复;图20D)。柱表示组均值,误差棒表示标准差(s.d.)通过单因素ANOVA测定显著性;*,†P<0.05;**,††P<0.01;***,†††P<0.001。*;表示各组与溶剂对照的比较,†,表示各组与对照组的比较。

[0053] 图20A-20D是显示TY4具有抗衰老性质的图的集合。图20A,20B:测序数据示出了与溶剂对照相比,TY4处理的巨噬细胞中去整合素和金属蛋白酶(ADAMs)和基质金属蛋白酶(MMPs)(图20A)和胶原蛋白(图20B)促纤维化的抑制。图20C:与对照相比,在TY4处理的巨噬细胞中组蛋白去乙酰化酶和甲基转移酶(Smyd和Prdm)的调制。图20D:经修饰的组蛋白阵列示出了与乱码对照相比,用TY4处理的巨噬细胞的甲基化和乙酰化情况的变化(由虚线表示;n=1个样品/组)。柱表示组均值,误差棒表示标准差(s.d.)通过Student t检验测定显著性;*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001。

[0054] 图21A-21E是示出了在射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)的小鼠二次打击(two-hit model)模型中TY4给药是具有治疗性生物活性的示意图和图的集合。图21A:用于调查在HFpEF的小鼠二次打击模型中TY4的功效的研究概述。将野生型c57BL/6小鼠置于高脂肪饮食和一氧化氮合酶抑制剂Nω-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)中放置五周,然后将它们随机以每隔一周、每周或每两周(总共10周)的频率接受盐水(阴性对照)或TY4(0.15μg/g)的静脉内(眼球后)输注。图21B-21E:TY4给药减少舒张功能障碍(图21B;n=4至10只动物/组),提高了锻炼耐力(图21C;n=7至10只/组)和减少循环脑钠肽(图21D;n=3至4只/组)和IL6(图21E;n=3至4只动物/组)。柱和散点线表示组均值,误差棒表示标准差(s.d.)通过单因素ANOVA测定显著性;*,†P<0.05;**,††P<0.01;***,†††P<0.001。*;表示各组与溶剂对照的比较,†,表示各组与对照组的比较。

[0055] 图22A-22G是示出了在HFpEF小鼠中TY4递送的效果的图的集合。图22A:与来自溶剂对照的组织(n=3只动物/组)相比,静脉内给予TY430分钟后,TY4在动物的肝脏、心脏和血浆中的相对丰度。图22B:HFpEF小鼠组中保留型射血分数的确认(n)=3只/组)。图22C,22D:与溶剂对照相比,用TY4处理的HFpEF动物(n=5至10只动物/组)中的收缩压和舒张压(分别)衰减。图22E-22G:在接受TY4而没有转染试剂(-TR)的HFpEF动物中的TY4治疗性生物活性的丧失,包含对舒张功能障碍的有益效果的丧失(图22E),锻炼耐力(图22F)和循环BNP水平(图22G)(n=4至5只/组)。柱和线表示组均值,误差棒表示标准差(s.d.)通过单因素ANOVA测定显著性;*P<0.05;**P<0.01。

[0056] 图23A-23E是示出了TY4恢复小鼠中HFpEF失调基因水平的图的集合。显示HFPF-失调基因(与溶剂对照相比)恢复的测序结果(图23A),包含结构蛋白(图23A),发育蛋白(图23B),钙离子处理通道(图23C),钾离子通道蛋白(图23D),溶质载体膜蛋白(图23E)(n=5个心脏/组)。

[0057] 图24A-24J是示出了TY4靶向p21-Smyd4轴以减弱细胞应激和炎症的图和图像的集合。图24A:HFpEF小鼠心脏的热图。图24B-24E:TY4从p21-p16衰老路径,内质网(ER)应激管腔受体(图24C),炎症小体信号传导(图24D)和下游炎症标志物(图24E)(n=5只动物/组)开始抑制患病心脏(与溶剂对照相比)。图24F,24G:和对照(n=3个心脏/组)相比,如基因表达(图24F)和蛋白质(图24G,下方条形图和Western blot图像)所示,P21在TY4处理的HFpEF小

鼠中受到抑制。图24H-24J:p21、smyd4的组蛋白甲基转移酶(图24I)(n＝3个心脏/组)增强剂的基因表达的上调(图24H)和蛋白质水平(图24I)。柱和点表示组均值,误差棒表示标准差(s.d.)通过单因素ANOVA测定显著性;*P<0.05;**P<0.01。

[0058] 图25A-25H是显示TY4抑制HFpEF小鼠的组织中的P21的图和图像的集合。图25A-25D:QPCR展示HFpEF小鼠(与溶剂对照相比;n＝3至5只动物/组)中的肺(图25A)、肝(图25B)、脾(图25C)和肾(图25D)组织中p21的TY4抑制。图25E、25F:血清(n＝3至5只动物/组)和组织(n＝3只动物/组)中p21的蛋白质水平的抑制。图25G:来自HFpEF心脏的测序数据鉴定通过TY4处理抑制的两种组蛋白甲基转移酶Prdm2和Smyd4。图25H:与溶剂对照相比,TY4处理的HFpEF心脏中Prdm2的蛋白水平不变(n＝4只动物/组)。柱和箱型图中线表示组均值,误差棒表示标准差(s.d.)通过单因素ANOVA测定显著性;*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001。*;表示各组和溶剂对照的比较;表示各组和对照的比较。

[0059] 图26A-26D是示出了TY4在心肌梗塞模型中的功效的示意图、图和图像的集合。图26A:心肌梗塞的大鼠模型。与溶剂对照或乱码相比接受静脉内TY4的动物具有减小的梗塞面积(图26B、26C)和较低水平的循环心肌肌钙蛋白(图26D)。

[0060] 图27A和27B是示出了TY4改善了猪心肌梗塞模型的结果的示意图和图的集合。图27A:心肌梗塞的猪模型。与溶剂对照或乱码相比接受静脉内TY4的动物具有减小的梗塞面积(图27B)。

[0061] 图28A-28F是示出了TY4改善了裘馨氏肌肉萎缩症的小鼠模型的结果的示意图、图和图像的集合。图28A:研究设计;Mdx动物每周两次接受TY4的静脉内输注8周。与溶剂对照进行比较,接受TY4的动物具有改善的心脏功能(图4)28B),锻炼耐力(图28C),肌肉力输出(28D),和减少的心脏和骨骼肌纤维化(分别为图28E,28F)。

[0062] 图29A-29D是示出了TY4改善博来霉素诱导的硬皮病的小鼠模型中的结果的示意图和图的集合。图29A:博来霉素诱导的硬皮病的小鼠模型。在博来霉素诱导的组织损伤后接受静脉内TY4的动物具有改善的锻炼耐力(图29B),较低的肺水肿(如通过降低的肺重量与体重比率表明;图29C)和组织中的低纤维化(图29D)。

[0063] 图30是示出了TY4诱导的肥厚和促纤维化级联抑制的预测机制的示意图。

[0064] 图31A-31D是示出了TY4抑制巨噬细胞中的炎症激活的图的集合。测量Nos2(图31A)、IL6(图31B)、IL-1b(图31C)和IL12b(图31D)的促炎基因表达。

[0065] 图32是示出了在HFpEF小鼠中,不是乱码版本的TY4逆转舒张功能障碍的图的集合。***p:<0.001。

[0066] 图33A-33D是示出了静脉内TY4逆转HCM小鼠模型中疾病表现的图的集合。向四月大的$cTNI^{146Gly}$小鼠静脉内每周两次输注TY4持续四周,(图33A)具有显著减小的心室间隔厚度(图33B)、衰减的血流速度(由脉冲多普勒测量;33C)、改进的锻炼耐力(图33D),和减少的循环炎症标志物(BNP;图33E)。

[0067] 图34是示出了用于静脉注射和口服给予TY4的制剂的示意图。

[0068] 图35A-35E是示出了在心肌梗塞模型中通过静脉注射和口服给予的TY4的心脏保护活性的图和图像的集合。图35A和35D是示出了梗塞面积的图。图35B是示出了MI后48小时各组的代表性TTC染色切片的图像。图35C和35E是示出了损伤后48小时动物中心肌肌钙蛋白水平的循环水平的图。

[0069] 图36A-36E是示出了在硬皮病模型中口服给予TY4的功效的图的集合。图36A是比较健康动物(“对照”)、口服溶剂对照处理的硬皮病动物(“PBS”)、口服乱码处理的硬皮病动物、和口服TY4-处理的硬皮病动物中的运动耐力的图。图36B是比较不同治疗组中的终点处的体重的图。图36C是比较不同治疗组中终点处的相对心脏重量的图。图36D是比较不同治疗组中终点处的相对肺重量的图。图36E是比较不同治疗组中终点处的肺重量的图。

[0070] 图37A-37D是示出了在硬皮病模型中口服给予TY4的功效的图像和图的集合。图37A是示出了健康动物(“对照”)、口服溶剂对照处理的硬皮病动物(“PBS”)、口服乱码处理的硬皮病动物、和口服TY4-处理的硬皮病动物中的代表性染色心脏组织切片的图像集合。图37B是比较不同治疗组中终点处的心脏纤维化程度的图。图37C是示出不同治疗组中的代表性染色皮肤组织切片的图像集合。图37D是比较不同治疗组中皮肤厚度的图。

[0071] 图38是示出了在硬皮病模型中口服给予TY4的功效的图的集合。

[0072] 图39A和39B是示出了在HFpEF模型中口服给予TY4的功效的图和图像的集合。

[0073] 图40A-40H是示出了口服递送的TY4的治疗益处的图和图像的集合。图40A是比较在不同治疗组中通过经胸超声波心动描记术测量的左心室射血分数(EF)的图。图40B是使用Masson三色染色比较不同治疗组中的心肌纤维化的图像和图的集合。图40C和40H是比较不同治疗组中的前腿肌肉的扭矩输出的图。图40D是使用Masson三色染色比较不同治疗组中的骨骼肌纤维化的图像和图的集合。图40E是比较不同治疗组中的肌纤维数量的图。图40F和图40G示出了在治疗后八周(分别)每组内锻炼耐力和左心室射血分数的增加。

[0074] 图41A-41D是示出了TY4的体外和体内效力测定的示意图和图的集合。图41A是概述使用小鼠骨髓来源巨噬细胞(BMDM)的TY4的体外和体内效力测定的示意图。图41B是比较LPS激活的BMDM中p21表达的图。图41C是比较LPS激活的BMDM中NFkB表达的图。图41D是比较LPS激活的BMDM中IL-6表达的图。

[0075] 图42是概述在HCM模型中优化用于口服递送TY4的给药策略的示意图。

[0076] 图43A-43C是示出了评估口服TY4的生物分布和药代动力学的示意图和图的集合。图43A是示出了用于评估口服TY4的生物分布的研究设计的示意图。图43B是示出了用于评估口服TY4的生物分布的研究设计的示意图。图43C是示出了通过qPCR在不同组织中眼球后给予TY4的丰度的图。

[0077] 图44是概述口服TY4的安全性和毒理概况的评估的示意图。

[0078] 图45A-45E是示出了TY4结合易位蛋白区(TPR,核孔复合物蛋白)并介导其自噬的图的集合。图45A是比较在用LPS激活时TY4在骨髓来源的巨噬细胞中的亚细胞定位的图。图45B是示出了HUVEC中的与TY4结合的蛋白质的图。图45C是示出了HUVEC中TY4对TPR的下拉的曲线图。图45D是示出了TPR转录物的测序的图的集合。图45E是示出了在TY4暴露的巨噬细胞中与TPR相互作用的蛋白质的图的集合。

[0079] 图46A和46B是分别共同显示,如心肌梗塞的大鼠模型所示,单独的TPR敲除是心脏保护性的示意图和图。

具体实施方式

[0080] CDC-EV中的非编码RNA(nc RNA)涉及CDC-EV的疾病修饰生物活性。在ncRNA中,YRNA引起人们的兴趣,因为它们在CDC-EV(占小RNA的18%)中是丰富的。EV-YF1是在CDC-EV

中发现并由人Y-RNA4基因编码的ncRNA。EV-YF1增加巨噬细胞对白介素10(IL-10)(抗炎细胞因子)的分泌,并且对心肌梗塞(MI)具有心脏保护性。EV-YF1在血管紧张素II输注诱导的高血压和肥厚模型中也是抗纤维化和抗肥厚的。EV-YF1的核苷酸序列提供于SEQ ID NO:1(参见图1A)。本发明提供了核酸,例如TY4,所述核酸是由EV-YF1生物启发的,例如以改善作为治疗剂的稳定性和效力。TY4(SEQ ID NO:4)是EV-YF1的化学修饰变体,并且在许多与炎症和纤维化相关的疾病中具有强的疾病修饰生物活性,所述疾病例如心力衰竭、肥厚性心肌病、射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)、裘馨氏肌肉萎缩症或硬皮病。不受理论束缚,认为TY4特异性结合易位启动子区(TPR),核孔复合物蛋白,以带来其疾病修饰活性。

[0081] 本文提供了分离的核酸,例如RNA,其包含CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)的核苷酸序列、其序列变体和/或化学修饰及其使用方法。如本发明所使用,“化学修饰”是指核酸核苷酸结构相对于相应碱性核苷酸(例如腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶)的化学差异。化学修饰可以是碱性核苷酸的化学结构的天然修饰或人工修饰。在一些实施方式中,所述分离的核酸包含至少一种非天然化学修饰。通常,本发明所述核酸的长度为30nt或更短(例如,16至30nt或24至30nt)。在一些实施方式中,所述核酸是TY4(SEQ ID NO:2)或其序列变体。通常,所述核酸的变体,例如序列变体或化学修饰,包含功能性的变体和化学修饰。因此,预期的序列变化和化学修饰是基本上保持原始分子的治疗效力的那些(例如,具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列)。在一些实施方式中,本发明所述分离的核酸是

[0082] 本发明所述核酸,例如,TY4和/或其变体,可用于治疗炎症和/或组织损伤是病理的主要驱动因素的病症。在一些实施方式中,本发明所述核酸,例如TY4和/或其变体,治疗特征在于炎症和/或纤维化的疾病和病症。如发明所使用,“纤维化”可包含组织(例如,结缔组织、骨骼肌、心肌、皮肤)的任何重塑(例如,病理重塑),例如但不限于纤维化和/或脂肪组织的沉积、用纤维化和/或脂肪组织替换肌肉组织等。在一些实施方式中,本发明所述核酸,例如,TY4和/或其变体,治疗的病症包含但不限于炎性疾病、肌营养不良或心脏损伤。在一些实施方式中,本发明所述核酸,例如,TY4和/或其变体,在给予由于但不限于心肌梗塞和/或心力衰竭而患有心脏损伤的受试者时具有心脏保护作用。不受理论的束缚,所述核酸,例如TY4可以,例如,通过促进由巨噬细胞分泌白介素10(IL-10)来增加巨噬细胞的抗炎活性。在一些实施方式中,本发明所述核酸诱导暴露于核酸的巨噬细胞中的一种或多种基因产物的表达和/或表观遗传变化的变化。在一些实施方式中,本发明所述核酸,例如,TY4和/或其变体,治疗的病症(例如,炎性疾病、肌营养不良或心脏损伤)是响应IL-10的抗炎作用的病症。不受理论的束缚,所述核酸例如TY4可以抑制例如受损组织中的肥厚和/或促纤维化信号传导级联。

[0083] 不受理论的束缚并且如上所述,认为TY4通过特异性结合易位启动子区(TPR)而表现出其治疗效果。因此,只要在本发明中讨论TY4,也考虑特异性结合TPR的任何试剂,例如核酸。在任何治疗方法中,在一些实施方式中,所述治疗方法考虑向有需要的受试者施用TPR结合核酸,例如TY4,例如针对TPR的抑制性核酸(例如siRNA)。

[0084] 在一些实施方式中,本发明所述核酸被化学修饰以增加稳定性,例如体内和/或体外稳定性。在一些实施方式中,本发明所述核酸被化学修饰以降低免疫原性。在一些实施方式中,所述核酸的化学修饰增加核酸的治疗活性。在一些实施方式中,与内源性编码的RNA分子(例如,内源性编码的Y RNA片段,诸如EV-YF1)相比,本发明所述核酸具有增强的治疗

效力。在一些实施方式中,本发明所述核酸可在组合物(例如,药物组合物)或试剂盒中提供。

[0085] 本发明所述治疗性核酸可以通过任何合适的途径给药,包含但不限于静脉内或口服。本发明提供了用于给予本发明所述核酸(例如,TY4)的静脉内或口服制剂及其用于治疗与炎症和/或纤维化相关的病症的用途。

[0086] 定义

[0087] 如本文所用,术语“核酸”或“寡核苷酸”是指多个核苷酸(例如,包含连接到一个磷酸基团和一个可交换有机碱基的糖(例如核糖或脱氧核糖)的分子,所述可交换有机碱基是一个取代的嘧啶(例如胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))或一个取代的嘌呤(例如腺嘌呤(A)或鸟嘌呤(G))。该术语包含多核苷(即,多核苷酸减去磷酸盐)和任何其他含有有机碱基的聚合物。嘌呤和嘧啶包含但不限于腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、次黄嘌呤核苷、5-甲基胞嘧啶、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、次黄嘌呤和其它天然和非天然存在的核苷碱基、取代和未取代的芳香族。核酸可以包含任何其他合适的修饰。因此,所述术语核酸还涵盖例如在碱基和/或糖中具有取代或修饰的核酸。

[0088] 本发明的多肽或核酸分子可以与参考分子(例如,参考多肽或参考多核苷酸),例如与本领域描述的分子(例如,工程或设计分子或野生型分子)共享一定程度的序列相似性或同一性。本领域已知的术语“同一性”是指通过比较序列而确定的两种或更多种多肽或多核苷酸的序列之间的关系。在本领域中,同一性还意味着它们之间的序列相关性的程度,所述序列相关性由两个或更多个氨基酸残基串或核酸残基串之间的匹配的数量确定。同一性测量由特定数学模型或计算机程序(例如,“算法”)解决的具有空位比对(如果有)的两个或更多个序列中较小者之间的相同匹配的百分比。相关肽的同一性可以通过已知方法容易地计算。当它适用于多肽或多核苷酸序列时,“%同一性”被定义为在比对序列并在必要时引入空位以实现最大百分比同一性之后,候选氨基酸或核酸序列中与第二序列的氨基酸序列或核酸序列中的残基相同的残基(氨基酸残基或核酸残基)的百分比。可以使用用于比对的任何合适的方法和计算机程序。应当理解,同一性取决于同一性百分比的计算,但是可能由于在计算中引入的空位和罚分而在值上不同。通常,通过本发明描述的和本领域技术人员所知的序列比对程序和参数而确定,一个特定多核苷酸或多肽的变体与其特定参考多核苷酸或多肽具有至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%但小于100%的序列同一性。这种用于比对的工具包含BLAST套件(Stephen F.Altschul等人(1997),“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”.Nucleic Acids Res.25:3389-3402)。另一种流行的局部比对技术基于Smith-Waterman算法(Smith,T.F.&Waterman,M.S.(1981)“Identification of common molecular subsequences.”J.Mol.Biol.147:195-197)。一种基于动态编程的通用全局比对技术为Needleman-Wunsch算法(Needleman,S.B.&Wunsch.C.D.(1970)“A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins.”J.Mol.Biol.48:443-453)。最近,已经开发了一种快速优化全局序列比对算法(FOGSAA),据称该算法比其他包含Needleman-Wunsch算法的优化全局比对算法更快地产生核苷酸和蛋白质序列的全局比对。本发明中具体地在以下“同一性”的定义中描述了其他工具。

[0089] 术语“同一性”是指聚合物分子之间,例如多核苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。例如,两个多核酸序列的同一性百分比的计算可通过将两个序列进行比对,以达到优化比较目的(例如,为了优化比对,可以在第一和第二核酸序列中的一个或两个中引入空位,并且为了比较目的可以忽略不相同的序列)。在某些实施方式中,为了比较目的比对序列的长度为参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比较相应核苷酸位置处的核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的核苷酸占据时,则分子在该位置处相同。在考虑到为了优化比对而引入的空位的数量和每个空位的长度的情况下,两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数量的功能。可以使用合适的数学算法来完成序列的比较和确定两个序列之间的同一性百分比。例如,两个核酸序列之间的同一性百分比可以使用例如在Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects.Smith.D.W.,ed.,Academic Press.New York,1993;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.,及Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;和Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.及Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991中描述的方法来确定;其各自通过引用并入本文。例如,两个核酸序列之间的同一性百分比可以使用Meyers-Miller算法(CABIOS,1989,4:11-17)来确定,其已经使用PAM 120重量残基表、空位长度罚分12分以及空位罚分4分并入ALIGN程序(版本2.0)中。或者,两个核酸序列之间的同一性百分比可以使用GCG软件包的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵来确定。通常用于确定序列之间的同一性百分比的方法包含但不限于Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math.,48:1073(1988)中公开的方法;其通过引用并入本文。用于确定同一性的技术被编码在公开可用的计算机程序中。用于确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包含但不限于GCG程序包,Deverux,J.等人,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984)),BLASTP,BLASTN和FASTA Altschul,S.F.等人,J.Biol.,215,403(1990)。

[0090] 术语“Watson-Crick碱基配对”或“碱基配对”是指在特定的核苷酸碱基对(“互补碱基对”)之间形成氢键。例如,腺嘌呤(A)和尿嘧啶(U)之间形成两个氢键,鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)之间形成三个氢键。一种评估两个多核苷酸之间的键合强度的方法是通过量化两个多核苷酸的鸟嘌呤和胞嘧啶碱基之间形成的键的百分比(“GC含量”)。在一些实施方式中,多聚体分子(例如,mRNA多聚体分子)的两个核酸之间的键的GC含量为至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在一些实施方式中,多聚体分子(例如,mRNA多聚体分子)的两个核酸之间的键的GC含量为10%至70%、约20%至约60%、或约30%至约60%。通过互补碱基对的键形成核酸双链体也可称为“杂交”。通常,共享互补性区域的两种核酸在合适的条件下能够杂交(例如,经由核酸碱基配对)以形成双链体结构。互补性区域的尺寸可以变化。在一些实施方式中,互补性区域的长度范围为约2个碱基对至约100个碱基对。在一些实施方式中,互补性区域的长度范围为约5个碱基对至约75个碱基对。在一些实施方式中,互补性区域的长度范围为约10个碱基对至约50个碱基对。在一些实施方式中,互补性区域的长度范围为约20个碱基对至约30个碱基对。

[0091] 本发明所使用的“分离的”指分离的生物分子,如核酸,对本领域普通技术人员而言,具有与本发明内容相同的常规和普通含义。分离的生物分子,例如分离的核酸,通常处于非自然环境中,或者处于如果没有人类对生物分子或其环境的干预,生物分子本来不会处于的环境中。在一些实施方式中,分离的生物分子不在细胞或生物体内。

[0092] 本发明所使用的“细胞外囊泡”或“EV”对本领域普通技术人员而言,具有与本发明内容相同的常规和普通含义。EV包含由细胞产生的脂质双分子层结构,并且包含外泌体(exosomes)、微囊泡(microvesicles)、附睾小体(epididimosomes)、阿尔戈体(argosomes)、外泌体样囊泡(exosome-like vesicles)、微粒(microparticles)、突出体(prominosomes)、前列腺小体(prostasomes)、帝萨体(dexosomes)、德萨体(texosomes)、dex、tex、四醚脂质体(archeosomes)和癌小体(oncosomes)。

[0093] 本发明所使用的“胶束”对本领域普通技术人员而言,具有与本发明内容相同的常规和普通含义。酪蛋白胶束是可以包含一种或多种酪蛋白磷酸蛋白(例如,α-S1酪蛋白、α-S2酪蛋白、β-酪蛋白和κ-酪蛋白其中的一种或多种,两种或更多种,三种或更多种,或全部四种)的聚集体的胶体粒子。

[0094] 本发明所使用的“受试者”是指任何包含哺乳动物和非哺乳动物脊椎动物。受试者可以包含灵长类动物,包含人和非灵长类哺乳动物,例如啮齿动物、家畜或野生动物。非灵长类哺乳动物可包含小鼠、大鼠、仓鼠、兔、狗、狐、狼、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、骆驼、鹿、水牛、野牛等。非哺乳动物可以包含鸟类(例如,鸡、鸵鸟、鹌鹑、鸽子)、爬行类动物(例如,蛇、蜥蜴、龟)、两栖类动物(例如,蛙、蝾螈)、鱼类(例如,鲑鱼、鳕鱼、河豚、金枪鱼)等。术语“个体”、“受试者”和“受试者”在本发明中可互换使用。

[0095] 本发明所使用的“给药”可包含给予本发明公开的治疗剂或组合物的任何合适的给药途径。合适的给药途径包含但不限于口服、肠胃外、静脉内、肌内、皮下、透皮、气道(气溶胶)、肺、皮肤、注射或局部给药。给药可以是局部的或系统性的。

[0096] 如本发明所使用,“治疗”包含治愈、改善、缓解、降低其严重性、预防、减缓其进展和/或延迟其疾病、病症和/或症状的出现。

[0097] 如果本文所述的病症的一种或多种体征或症状以有益的方式改变,其他临床接受的症状得到改善,或甚至得到缓解,或在根据本文所述的方法治疗后诱导所需反应例如至少2%、3%、4%、5%、10%或更多,则治疗可被认为是如本文所用的“有效的”或“治疗有效的”。例如,可以通过测量根据本发明所述方法治疗的病症的标记、指标、症状和/或发生率或任何其他合适的可测量参数(例如,锻炼耐力)来评估功效。功效也可以通过如住院所评估的个体没有恶化或需要医疗干预(例如,疾病的进展停止)来测量。治疗包含个体或动物(一些非限制性实施例包含人或动物)中的疾病或病症的任何治疗,并且包含:(1)抑制疾病或病症,例如,预防症状(例如,疼痛或炎症)恶化;或(2)减轻疾病或病症的严重性,例如,引起症状消退。用于治疗疾病或病症的有效量是指,当对有需要的受试者给药时,足以对该疾病或病症产生本文所定义的有效治疗效果的用量。可以通过评估病症或预期反应(例如,肌肉功能、质量或体积)的身体指标来确定试剂的功效。本领域技术人员可以通过测量这些参数中的任何一个或参数的任何组合来监测给药和/或治疗的功效。

[0098] 如本发明所使用,术语“有效量”或“治疗有效量”是指减轻疾病或病症的至少一种或多种症状所需的组合物或药剂的量,并且涉及足够量的治疗组合物以提供所需效果。术

语“有效量”或“治疗有效量”可以是指在对典型受试者给药时足以提供特别是抗炎和/或心脏保护作用的组合物或治疗剂的量。在各种语境下,本发明所用的有效量可包含足以延迟疾病或病症的症状的发展、改变症状疾病或病症的进程(例如但不限于,减慢疾病或病症的症状的进展)或逆转疾病或病症的症状的量。在一些实施方式中,所述治疗有效量以一种或多种剂量的治疗剂进行给药。在一些实施方式中,所述治疗有效量以单次给药或在一段时间内以多个剂量给药。

[0099] 如本发明所使用,短语“生理学上相容的”和“药学上可接受的”在本文中可互换使用,指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,所述化合物、材料、组合物和/或剂型在合理的医学判断的范围内适用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。

[0100] 细胞生物学和分子生物学中常见术语的定义可见于“Merck Manual of Diagnosis and Therapy”,第十九版,由Merck Research Laboratories出版,2006(ISBN 0-91 1910-19-0);Robert S.Porter等人(eds.),The Encyclopedia of Molecular Biology,由Blackwell Science Ltd.出版,1994(ISBN 0-632-02182-9);Benjamin Lewin,Genes X,由Jones&artlett Publishing出版,2009(ISBN-10:0763766321);Kendrew等人(eds.),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8)和Current Protocols in Protein Sciences 2009,Wiley Intersciences,Coligan等人,eds。

[0101] 除非上下文另有明确指示,否则单数术语“一个”、“一种”和“所述”包含复数指示物。类似地,除非上下文另有明确指示,词语“或”旨在包含“和”。“例如”在本发明中用于指示非限制性实施例。因此,缩写“例如”与术语“例如”同义。本发明所使用的术语“约”例如定义分子量的值和范围是指指示的值和/或范围限制可以在±20%内,例如,在±10%内,包含在±5%内变化。在数字之前使用“约”时包含数字本身。例如,“约5”为“5”提供了明确的支持。范围中提供的数字包含重叠范围和其间的整数;例如1至4和5至7的范围包含例如1至7、1至6、1至5、2至5、2至7、4至7、1、2、3、4、5、6和7。

[0102] 核酸

[0103] 本发明提供了分离的核酸,其包含CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)或其变体的核苷酸序列。在一些实施方式中,所述核酸是RNA。在一些实施方式中,所述核酸包含与CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)至少80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、98%、99%相同的核苷酸序列。在一些实施方式中,所述核酸包含CGUCCGAUGGUAGUGGGUAAUCAG(SEQ ID NO:12)的核苷酸序列,其序列变异在核苷酸序列中的至多1、2、3、4或5个位置。如本发明所使用,相对于核苷酸序列或核酸的5’末端定义核苷酸序列或核酸内的“位置”。在一些实施方式中,所述核酸的核苷酸序列为CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)或其序列变体。所述核酸可以是任何合适的长度。在一些实施方式中,所述核酸的长度为24个核苷酸(nt)。在一些实施方式中,所述核酸的长度为16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40nt或更长。在一些实施方式中,所述核酸的长度至多为30nt。在一些实施方式中,所述核酸的长度为16nt至30nt,或24nt至30nt。

[0104] 本发明的核酸可以是单链或双链的(例如,RNA/DNA杂交体)。在一些实施方式中,

所述核酸是单链的。

[0105] 在一些实施方式中,本发明的分离的核酸包含一个或多个化学修饰的核苷酸,例如具有修饰的主链的核苷酸。通常,化学修饰是基本上保留或增强核酸的治疗效力的化学修饰。所述核酸的任何合适数量的核苷酸可以被化学修饰。在一些实施方式中,所述核酸包含1个或更多、2个或更多、3个或更多、4个或更多、5个或更多、6个或更多、7个或更多、8个或更多、9个或更多、10个或更多、11个或更多、12个或更多、13个或更多、14个或更多、15个或更多、16个或更多、17个或更多、18个或更多、19个或更多、20个或更多、21个或更多、22个或更多、23个或更多、24个或更多、25个或更多、26个或更多、27个或更多、28个或更多、29个或更多、30个或更多化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含1至5、1至6、1至7、1至8、1至9、1至10、1至15、1至20、1至25或1至30个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含1至10个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含8个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含6个化学修饰的核苷酸。

[0106] 所述化学修饰的核苷酸可以以任何合适的方式沿着分离的核酸分布。在一些实施方式中,所述核酸包含在核酸的第一半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核酸的5'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含在核酸的第二半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核酸的3'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含在核酸的第一半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核酸的5'半部分,和在核酸的第二半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核酸的3'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含从核酸的5'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多核苷酸内的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含从核酸的3'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多核苷酸内的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,在所述核酸中没有两个化学修饰的核苷酸彼此相邻。在一些实施方式中,所述核酸包含分别在从核酸的5'端起的1个、2个、3个、5个、5个、6个、7个、8个、9个、10个核苷酸内的1个、1个、2个、2个、3个、3个、4个、4个、5个、5个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含分别在从核酸的3'端起的1个、2个、3个、5个、5个、6个、7个、8个、9个、10个核苷酸内的1个、1个、2个、2个、3个、3个、4个、4个、5个、5个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸在核酸的5'半部分和3'半部分中包含相同数量的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含距核酸5'端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸和/或距核酸3'端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸。

[0107] 在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸在CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)或其序列变体内。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的第一半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核苷酸序列的5'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的1至12位内的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的第二半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核苷酸序列的3'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的13至24位内的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的1至12位内的至少一个化学修饰的核苷酸,和在核苷酸序列的位置13至24内的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含在从核苷酸序列的5'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多核苷酸内的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核

酸包含在从核苷酸序列的3’端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多核苷酸内的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,在所述核苷酸序列中没有两个化学修饰的核苷酸彼此相邻。在一些实施方式中,所述核酸包含分别在从核苷酸序列的5’端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个核苷酸内的1个、1个、2个、2个、3个、3个、4个、4个、5个、5个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含分别在从核苷酸序列的3’端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个核苷酸内的1个、1个、2个、2个、3个、3个、4个、4个、5个、5个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸在核苷酸序列的5’半部分和3’半部分中包含相同数量的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含距核苷酸序列的5’端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸和/或距核苷酸序列的3’端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸在核苷酸序列的5’半部分和3’半部分中包含不同数量的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸在核苷酸序列的3’半部分中包含比5’半部分中更多数量的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含距核苷酸序列的5’端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸和/或距核苷酸序列的3’端5个核苷酸内的3个、4个或5个化学修饰的核苷酸。

[0108] 在一些实施方式中,所述分离的核酸包含在核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的一个或多个位置处的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述分离的核酸包含在核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述分离的核酸具有核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)或其序列变体,其中1、3、5、20、22和24位上的一个或多个被化学修饰。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸增加核酸的体外和/或体内稳定性。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸增加核酸的治疗效力,例如用于治疗炎症病症、心脏损伤或肌营养不良。

[0109] 在一些实施方式中,所述分离的核酸包含一种类型,或两种或更多种不同类型的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸具有连接核苷酸糖环的2’-O原子和4’-C原子以锁定构象(锁核酸(LNA))的亚甲基桥。在一些实施方式中,所述分离的核酸包含核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)或其序列变体,其中1、3、5、20、22和24位上的一个或多个是LNA。在一些实施方式中,所述分离的核酸具有核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)或其序列变体,其中1、3、5、20、22和24位上的一个或多个是LNA。在一些实施方式中,所述分离的核酸包含核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:2)或其序列变体,其中1、3、5、20、22和24位上是LNA。在一些实施方式中,分离的核酸具有核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:2),其中1、3、5、20、22和24位上是LNA。

[0110] 在一些实施方式中,所述分离的核酸可以包含任何合适的化学修饰。在一些实施方式中,所述化学修饰是主链修饰,例如糖/磷酸盐主链的修饰。在一些实施方式中,所述化学修饰是主链糖修饰。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸包含LNA。在一些实施方式中,所述化学修饰包含引入硫代磷酸酯基团作为核苷酸之间的接头。所述化学修饰的核苷酸的合适主链修饰包含但不限于硫代磷酸酯、磷酸三酯、甲基膦酸盐、短链烷基或环烷基糖间键或短链杂原子或杂环糖间键。在一些实施例中,所述化学修饰是碱修饰。

[0111] 可以使用任何合适的选项制备本发明所述核酸。合适的选项包含但不限于化学合成、酶促生产和/或生物生产。在一些实施方式中,使用化学合成制备所述核酸。可以使用化

学合成核酸的任何合适的选项。合适的选项包含但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、亚磷酰胺、亚磷酸酯-三酯和固相合成方法。在一些实施方式中,制备所述核酸包含体外转录。在一些实施方式中,使用重组DNA技术制备所述核酸。在一些实施方式中,通过化学修饰具有感兴趣的核苷酸序列的未修饰核酸来制备所述核酸。

[0112] 组合物

[0113] 本发明还提供了包含本发明所述核酸的组合物。在一些实施方式中,所述组合物是药物组合物。在一些实施方式中,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,所述组合物是不含细胞的组合物,例如,组合物基本上不含细胞,例如CDC。在一些实施方式中,所述组合物是不含细胞的外囊泡的组合物,例如,所述组合物基本上不含细胞外囊泡,例如外泌体。

[0114] 可用作药学上可接受的赋形剂的材料的一些非限制性实例包含:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和乙酸纤维素;(4)粉末状黄芪胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,例如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石;(8)可可脂和栓剂蜡;(9)油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG);(12)酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;(22)膨胀剂,例如多肽和氨基酸(23)血清组分,例如血清白蛋白、HDL和LDL;(22)C2-C12醇,例如乙醇;和(23)药物制剂中使用的其它无毒的相容物质。

[0115] 在一些实施方式中,所述组合物包含转染试剂,例如,用于促进核酸递送到靶细胞靶标(体外或体内)。所述组合物中可包含任何合适的转染试剂。合适的转染试剂包含但不限于脂质体、细胞外囊泡(EV)和聚乙二醇(PEG)-阳离子脂质复合物(PCLC)。在一些实施方式中,所述转染试剂包含脂质(例如,形成脂质体的脂质)或聚乙二醇化脂质。在一些实施方式中,所述脂质是如发明提供的阳离子脂质。在一些实施方式中,所述转染试剂包含DharmaFECT®或Lipofectamine®。在一些实施方式中,本发明所述核酸与所述组合物中的转染试剂一起制成,用于促进核酸的细胞摄取和/或药代动力学。

[0116] 脂质体是人工制备的囊泡,其主要由脂质双分子层组成并且可以用作用于给予药物制剂的递送载体。脂质体可以具有不同的尺寸,例如但不限于多层囊泡(MLV)、直径可以小于50nm的小单层囊泡(SUV)和直径可以在50nm至500nm的大单层囊泡(LUV),所述多层囊泡(MLV)具有可以为数百纳米的直接并且包含一系列由狭窄的水性隔室分隔的同心双层。脂质体设计可以包含但不限于调理素或配体,以便改善脂质体与靶组织/细胞的附着,或激活事件,例如但不限于内吞作用。脂质体可含有低或高pH以改善物质(例如,本发明所述核酸)的递送。

[0117] 在一些实施方式中,所述组合物包含但不限于例如由1,2-二油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)脂质体、来自Marina Biotech(Bothell,Wash.)的DiLa2脂质体、1,2-二亚林酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚林酰氧基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]二氧戊环(DLin-KC2-DMA)和MC3形成的脂质体,以及例如但不限于来自Janssen Biotech,Inc.(Horsham,Pa.)的DOXIL®脂质体。

[0118] 在一些实施方式中,所述组合物包含阳离子脂质。任何合适的阳离子脂质可用于本发明所述组合物中。合适的阳离子脂质包含但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA和氨基醇脂质。在一些实施方式中,所述组合物包含阳离子脂质复合物,例如,聚乙二醇(PEG)-阳离子脂质复合物(PCLC)。在一些实施方式中,所述阳离子脂质是聚乙二醇化的,例如2kDa PEG("PEG2000")。可以使用任何合适的选项来聚乙二醇化阳离子脂质。在一些实施方式中,通过将PEG和阳离子脂质的混合物暴露于一个或多个冷冻/解冻循环,例如,1个、2个、3个、4个、5个或更多个冷冻/解冻循环来形成PCLC。在一些实施方式中,冷冻/解冻循环包含用液氮(例如,约-190℃)冷冻混合物约5分钟,并在约60℃下解冻约5分钟。本发明的核酸可以与PCLC混合以产生核酸和PCLC的复合物。

[0119] 在一些实施方式中,所述组合物包含细胞外囊泡(EV),例如,外泌体。所述细胞外囊泡(EV)可以来自任何合适来源,例如衍生自心肌球衍生细胞(CDC)或来自成纤维细胞的EV。合适的EV,例如CDC衍生的EV,提供于例如,美国申请公开号20080267921、20160158291和20160160181;Smith等人,Circulation.2007.115:896-908;Aminzadeh,M.A.等人Stem Cell Reports 10,942-955(2018);和Ibrahim等人,Stem Cell Reports.2014年5月8日;2(5):606-19,Ibrahim,A.G.等人Nanomedicine 33,102347(2020),其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,所述EV是从由培养物中的人CDC调节的无血清培养基中分离的那些。在一些实施方式中,所述组合物包含EV和脂质体和/或PCLC作为转染试剂。在一些实施方式中,所述组合物基本上不含CDC衍生的EV。

[0120] 根据实施方式,本发明公开的EV,例如外泌体的大小可以变化。根据实施例,所述EV的尺寸的直径范围为约15nm至约95nm,包含约15nm至约20nm、约20nm至约30nm、约30nm至约40nm、约40nm至约50nm、约50nm至约60nm、约60nm至约70nm、约70nm至约80nm、约80nm至约90nm、约90nm至约95nm及其重叠范围。在一些实施例中,EV较大(例如,范围从约140nm至约210nm,包含约140nm至约150nm、约150nm至约160nm、约160nm至约170nm、约170nm至约180nm、约180nm至约190nm、190nm至约200nm、约200nm至约210nm及其重叠范围)。在一些实施例中,EV直径在约15nm至约200nm的范围内,包含约15nm至约20nm、约20nm至约30nm、约30nm至约40nm、约40nm至约50nm、约50nm至约60nm、约60nm至约70nm、约70nm至约80nm、约80nm至约90nm、约90nm至约100nm、约100nm至约110nm、约110nm至约120nm、约120nm至约130nm、约130nm至约140nm、约140nm至约150nm、约150nm至约160nm、约160nm至约170nm、约170nm至约180nm、约180nm至约190nm、约190nm至约200nm及其重叠范围。在一些实施例中,从原始细胞体生成的EV在至少一个维度(例如,直径)上比原始细胞体小100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000或10000倍。

[0121] 包含本发明所述EV和核酸的组合物可以使用任何合适的选项来制备。在一些实施方式中,将所述核酸装载到EV中包含:将核酸与脂质体和/或PCLC配制,例如如上所述,以产生核酸-脂质体混合物;将核酸-脂质体混合物与EV组合;以及富集与外泌体标记物相关的EV,以产生富集核酸的EV群体。可以使用任何合适的选项将核酸-脂质体混合物与EV组合。在一些实施方式中,所述核酸-脂质体混合物与EV在37℃下在摇动下组合约30分钟或更长时间。富集以产生富集核酸的EV群体可以使用任何合适的选项来完成。在一些实施方式中,所述富集与外泌体标记物相关的EV包含使用对外泌体标记特异性的抗体免疫沉淀与外泌体标记相关的EV。在一些实施方式中,所述外泌体标记物是CD9、CD63和CD81中的一种或多

种。在一些实施方式中,所述富集与外泌体标志物相关的EV包含免疫沉淀与所有外泌体标志物CD9、CD63和CD81相关的EV。在一些实施方式中,所述富集核酸的EV群体的大小分布基本上是单峰的。在一些实施方式中,至少80%、85%、90%、95%、97%、99%的群体的直径在尺寸分布中具有单个峰。在一些实施方式中,所述富集核酸的EV群体的平均直径为约50nm至180nm,例如60nm至170nm、70nm至160nm、80nm至150nm、90nm至140nm、100nm至130nm或约110nm至130nm。

[0122] 在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白,例如,酪蛋白胶束。在一些实施方式中,所述组合物包含壳聚糖。在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白和壳聚糖,例如,酪蛋白-壳聚糖胶束。在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白-壳聚糖复合物。在一些实施方式中,所述组合物中分离的核酸被包封在酪蛋白-壳聚糖复合物中。在一些实施方式中,所述组合物包含一种或多种磷酸蛋白:α-s1酪蛋白、α-s2酪蛋白、β-酪蛋白和κ-酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含两种或更多种、三种或更多种或全部四种磷酸蛋白:α-s1酪蛋白、α-s2酪蛋白、β-酪蛋白和κ-酪蛋白。所述磷酸蛋白可以以任何合适的浓度(相对于彼此,并且相对于组合物的总体积)存在于组合物中,并且在一些实施方式中,以适合形成酪蛋白胶束的量存在。在一些实施方式中,所述酪蛋白磷酸蛋白以约5%至10%(重量/体积)共同存在于组合物中。在一些实施方式中,所述酪蛋白磷酸蛋白以约8%(重量/体积)共同存在于组合物中。在一些实施方式中,所述酪蛋白磷酸蛋白以约5%(重量/体积)共同存在于组合物中。酪蛋白磷酸蛋白可以来自任何合适动物,例如哺乳动物,例如但不限于人、非人类灵长类动物、牛、猪、马、骆驼、山羊和绵羊。在一些实施方式中,所述酪蛋白磷酸蛋白是牛α-s1酪蛋白、牛α-s2酪蛋白、牛β-酪蛋白和牛κ-酪蛋白。具有EV的合适酪蛋白制剂提供于,例如,Aminzadeh等人,J Extracell Vesiles.2021年1月;10(3):e12045中,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,用本发明提供的酪蛋白制成的本发明的组合物(例如药物组合物)适合于向受试者口服给药。不受理论的束缚,认为组合物中的酪蛋白磷酸蛋白增加口服给药的EV和/或脂质体及其负载,例如,本发明的核酸的生物利用度。

[0123] 在一些实施方式中,一种用于增强本发明所述治疗性核酸的口服生物利用度的组合物包含在生理学上相容的赋形剂中的选自α-s1酪蛋白、α-s2酪蛋白、β-酪蛋白和κ-酪蛋白的至少两种磷酸蛋白,其中磷酸蛋白以组合物的约5%至约10%(重量/体积)的量存在。在一些实施方式中,所述组合物包含组合物中的磷蛋白质量的约0%至约50%(例如,约10%至约45%,约20%至约40%,约25%至约40%,约包含30%至约40%)(按重量计)的量的α-s1酪蛋白、约0%至约20%(例如,约5%至约15%,约7%至约12%,包含约8%至约12%)(按重量计)的量的α-s2酪蛋白、约0%至约50%(例如,约10%至约45%,约20%至约40%,约25%至约40%,约包含30%至约40%)(按重量计)的量的β-酪蛋白和约0%至约20%(例如,约5%至约18%,约8%至约18%,包含约10%至约15%)(按重量计)的量的κ-酪蛋白。本发明所述组合物可提高治疗性核酸,例如TY4的口服生物利用度。

[0124] 在一些实施方式中,本发明提供的制剂为脂质键囊泡形式,例如,胶束或脂质体,因此可包含任何合适数量的粒子。在一些实施方式中,胶束(例如,酪蛋白至壳聚糖涂覆的胶束)的量在约10^6至约10^{10}粒子的范围内,例如,约2×10^6至约10^{10}粒子、约5×10^6至约10^{10}粒子、约10^7至约5×10^9粒子、约2×10^7至约5×10^9粒子、约5×10^7至约5×10^9粒子,包含约1×10^8至约2×10^9粒子。在一些实施方式中,在群体中胶束(例如,酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶

束)的量为约10^6、约2×10^6、约5×10^6、约10^7、约2×10^7、约5×10^7、约10^8、约2×10^8、约5×10^8、约10^9、约2×10^9、约5×10^9、或约10^{10}粒子,或前述值中的任何两个之间的量。

[0125] 在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白-壳聚糖涂覆的脂质胶束,其中所述酪蛋白磷酸蛋白以合适的量(例如,组合物中合适的磷酸蛋白质量总量、相对于彼此的合适比例的磷酸蛋白)存在于组合物中。在一些实施方式中,所述组合物包含选自α-s1酪蛋白、α-s2酪蛋白、β-酪蛋白和κ-酪蛋白中的两种、三种或全部四种磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述组合物中磷酸蛋白的量取决于组合物中存在的一种或多种其它磷酸蛋白的量。

[0126] 在一些实施方式中,所述α-s1酪蛋白是与基因名称CSN1S1相关的磷酸蛋白。所述α-s1酪蛋白可以是来自任何合适哺乳动物的CSN1S1磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述α-s1酪蛋白是牛(Gene ID:282208)、猪(Gene ID:445514)、马(Gene ID:100033982)、棉羊(Gene ID:443382)、山羊(Gene ID:100750242)、骆驼(Gene ID:105090954)或人(Gene ID:1446)的α-s1酪蛋白。在一些实施方式中,所述α-s1酪蛋白是非人α-s1酪蛋白。在一些实施方式中,α-s1酪蛋白是具有与SEQ ID NO:17所示序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或约100%相同的氨基酸序列的多肽。

[0127] 在一些实施方式中,所述组合物包含任何合适量的α-s1酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含α-s1酪蛋白,其量按重量计占组合物中的磷酸蛋白质量的约0%至约50%,例如,约5%至约50%,约10%至约50%,约15%至约45%,约20%至约45%,包含约25%至约40%。在一些实施方式中,所述组合物包含按重量计约0%、5%、10%、15%、20%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%的α-s1酪蛋白,或由前述值中的任何两个限定的范围内的量。

[0128] 在一些实施方式中,所述α-s2酪蛋白是与基因名称CSN1S2相关的磷酸蛋白。所述α-s2酪蛋白可以是来自任何合适哺乳动物的CSN1S2磷酸蛋白。在一些实施方式中,α-s2酪蛋白是牛(Gene ID:282209)、猪(Gene ID:445515)、马(Gene ID:100327035)、绵羊(Gene ID:443383)、山羊(Gene ID:100861229)或骆驼(Gene ID:105090951)的α-s2酪蛋白。在一些实施方式中,α-s2酪蛋白是具有与SEQ ID NO:18所示序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或约100%相同的氨基酸序列的多肽。

[0129] 所述组合物可包含任何合适量的α-s2酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含α-s2酪蛋白,其量按重量计占组合物中的磷酸蛋白质量的约0%至约20%,例如约2%至约18%、约3%至约18%、约4%至约17%、约5%至约16%,包含约5%至约15%。在一些实施方式中,所述组合物包含按重量计约0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、18%、20%的α-s2酪蛋白,或由前述值中的任何两个限定的范围内的量。

[0130] 在一些实施方式中,所述β-酪蛋白是与基因名称CSN2相关的磷酸蛋白。所述β-酪蛋白可以是来自任何合适哺乳动物的CSN2磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述β-酪蛋白是牛(Gene ID:281099)、猪(Gene ID:404088)、马(Gene ID:100033903)、绵羊(Gene ID:443391)、山羊(Gene ID:100860784)、骆驼(Gene ID:105080412)或人(Gene ID:1447)的β-酪蛋白。在一些实施方式中,所述β酪蛋白是非人β-酪蛋白。在一些实施方式中,所述β-酪蛋白是具有与SEQ ID NO:19或20所示序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或约100%相同的氨基酸序列的多肽。

[0131] 所述组合物可包含任何合适量的β-酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含β-酪蛋白,其量按重量计占组合物中的磷酸蛋白质量的约0%至约50%,例如约5%至约50%,约10%至约50%,约15%至约45%,约20%至约45%,包含约25%至约40%。在一些实施方式中,所述组合物包含按重量计约0%、5%、10%、15%、20%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%的β-酪蛋白,或由前述值中的任何两个限定的范围内的量。

[0132] 在一些实施方式中,所述κ-酪蛋白是与基因名称CSN3相关的磷酸蛋白。所述β酪蛋白可以是来自任何合适哺乳动物的CSN3磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述κ-酪蛋白是牛(Gene ID:281728)、猪(Gene ID:445511)、马(Gene ID:100033983)、绵羊(Gene ID:443394)、山羊(Gene ID:100861231)、骆驼(Gene ID:105080408或105090949)或人(Gene ID:1448)的κ-酪蛋白。在一些实施方式中,所述κ-酪蛋白是非人κ-酪蛋白。在一些实施方式中,所述κ-酪蛋白是具有与SEQ ID NO:21所示序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或约100%相同的氨基酸序列的多肽。

[0133] 所述组合物可包含任何合适量的κ-酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含κ-酪蛋白,其量按重量计占组合物中的磷酸蛋白质量的约0%至约20%,例如约2%至约18%、约3%至约18%、约4%至约17%、约5%至约16%,包含约5%至约15%。在一些实施方式中,所述组合物包含按重量计约0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、18%、20%的κ-酪蛋白,或由前述值中的任何两个限定的范围内的量。

[0134] 在一些实施方式中,使用来自不同物种的酪蛋白的组合。例如,在一些实施方式中,一种或多种人酪蛋白与一种或多种牛酪蛋白组合使用。在一些实施方式中使用酪蛋白的比率,例如α-s1酪蛋白:α-s2酪蛋白:β-酪蛋白:κ-酪蛋白的比率为3:1:3:1。在一些实施例中,可以使用不同的比率,例如4:1:4:1、2:1:2:1或1:1:1:1。所述组合物中任何两种给定的酪蛋白之间也可以使用范围为1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、1:5、1:4、1:3、1:2等的比率。

[0135] 组合物中可存在任何合适总量的磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述磷酸蛋白以组合物的5%至约10%,例如,约6%至约10%,约6%至约9%,包含约6%至约8%(重量/体积)的量存在。在一些实施方式中,所述磷酸蛋白以组合物的约5%、6%、7%、8%、9%、10%的量或由前述值中的任何两个(重量/体积)限定的范围内的量存在。

[0136] 在一些实施方式中,一种或多种酪蛋白磷酸蛋白是非人酪蛋白磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述外泌体和至少一种酪蛋白磷酸蛋白来自不同的物种。在一些实施方式中,所述外泌体是人外泌体,且一种或多种酪蛋白磷酸蛋白是非人酪蛋白磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述外泌体是人外泌体,且一种或多种酪蛋白磷酸蛋白是牛(或绵羊、猪、山羊、骆驼或马)酪蛋白磷酸蛋白。

[0137] 在一些实施方式中,所述组合物包含由至少一部分酪蛋白磷酸蛋白形成的胶束结构。在一些实施方式中,所述酪蛋白胶束基本上是球形的。在一些实施方式中,所述组合物中的酪蛋白胶束的平均直径(按胶束测量)为约40nm、约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm、约100nm、约110nm、约120nm、约130nm、约150nm、约200nm、约250nm、约300nm、约350nm、约400nm、约450nm、约500nm或更大,或平均直径在由前述值中的任何两个限定的范围内。在一些实施方式中,所述组合物中的酪蛋白胶束的平均直径(按胶束测量)为约40nm至约

500nm,例如约40nm至约400nm、约50nm至约300nm、约60nm至约250nm、约70nm至约250nm、约80nm至约200nm,包含约90nm至约150nm。本发明组合物所述酪蛋白胶束通常不沉淀或呈凝胶形式。

[0138] 在一些实施方式中,所述组合物包含一种或多种胶体矿物质(例如,悬浮液中的矿物质)。在一些实施方式中,使用复合(例如,两种或更多种)矿物质作为胶体矿物质复合物。所述胶体矿物质复合物可包含任何合适的矿物质化合物和/或其盐。在一些实施方式中,所述胶体矿物质复合物包含但不限于钙、镁、无机磷酸盐、柠檬酸盐、钠、钾和氯化物或它们各自的盐中的一种或多种。在一些实施方式中,所述胶体矿物复合物以组合物中的磷酸蛋白质量的约2%至约15%,例如,约2%至约12%、约5%至约10%、约5%至约9%,包含约6%至约9%(按重量计)的量存在。在一些实施方式中,所述胶体矿物复合物以约2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%的量或由前述百分比中的任何两个限定的范围内的量存在。

[0139] 在一些实施方式中,所述组合物为肠胃外剂量形式。在一些实施方式中,所述肠胃外剂型是无菌的或能够在给予患者之前灭菌。肠胃外剂型的示例包含但不限于准备注射的溶液、准备溶解或悬浮在药学上可接受的注射载体中的干燥产品、准备注射的悬浮液和乳剂。此外,可以制备控释肠胃外剂型以用于给予受试者。可用于提供核酸的肠胃外剂型的合适的赋形剂包含但不限于:无菌水;注射用水USP;盐水溶液;葡萄糖溶液;水性载体,例如但不限于氯化钠注射液、林克氏注射液、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液和乳酸林克氏注射液;水混溶性载体,例如但不限于乙醇、聚乙二醇和丙二醇;和非水性载体,例如但不限于玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。

[0140] 本发明还提供了包含本发明所述核酸的巨噬细胞。在一些实施方式中,所述巨噬细胞是CD68+巨噬细胞。在一些实施方式中,所述巨噬细胞是人巨噬细胞。在一些实施方式中,与合适的对照(例如未暴露于核酸的巨噬细胞或已暴露于对照核酸的巨噬细胞)相比,已暴露于核酸的巨噬细胞增加抗炎活性。在一些实施方式中,所述巨噬细胞是骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)。在一些实施方式中,所述巨噬细胞具有IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的增加的表达。在一些实施方式中,与合适的对照(例如未与核酸接触的巨噬细胞)相比,巨噬细胞具有IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的增加的mRNA表达。在一些实施方式中,与合适的对照(例如未与核酸接触的巨噬细胞)相比,巨噬细胞具有IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的增加的mRNA表达。在一些实施方式中,与合适的对照(例如,未与核酸接触的巨噬细胞)相比,具有核酸的巨噬细胞中IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的mRNA表达各自独立地增加至少1.5倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、30倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍或更多,或增加由前述值中的任何两个限定的范围内的倍数量。在一些实施方式中,与合适的对照(例如未与核酸接触的巨噬细胞)相比,巨噬细胞具有IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的增加的蛋白质表达。在一些实施方式中,与合适的对照(例如,未与核酸接触的巨噬细胞)相比,具有核酸的巨噬细胞中IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的蛋白质表达各自独立地增加至少1.5倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、30倍、50倍、100倍、200倍或更多,或增加由前述值中的任何两个限定的范围内的倍数量。在一些实施方式中,与合适的对照,例如未与核酸接触的巨噬细胞相比,巨噬细胞具有增加的IL-10分泌。在一些实施方式中,与合

适的对照,例如未与核酸接触的巨噬细胞相比,具有核酸的巨噬细胞中的IL-10分泌各自独立地增加至少约1.2倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、50倍或更多,或增加由前述值中的任何两个限定的范围内的倍数。在一些实施方式中,所述巨噬细胞在培养物中。在一些实施方式中,所述巨噬细胞在受试者中,例如在外周血、骨髓中和/或在组织损伤部位处。

[0141] 方法

[0142] 本发明提供了使用本发明所述核酸治疗有需要的受试者的方法(本发明也称为"治疗方法")。可通过治疗方法用于治疗的病症包含但不限于心脏病症和炎症病症。在一些实施方式中,所述病症包含但不限于肌肉紊乱、心肌梗塞、心脏紊乱、心肌病变、肌营养不良、纤维化疾病、炎性疾病、病毒感染、败血症或伤口愈合。在一些实施方式中,通过所述治疗方法用于治疗的病症包含但不限于与炎症和/或纤维化相关的病症。在一些实施方式中,根据本发明的治疗方法,通过向需要治疗与炎症和/或纤维化相关的病症的受试者给予本发明所述核酸治疗。与炎症和/或纤维化相关的病症可包含但不限于心脏、骨骼肌或皮肤的炎症和/或纤维化。在一些实施方式中,所述与炎症和/或纤维化相关的病症包含衰老。在一些实施方式中,通过根据本发明所述治疗方法给予本发明所述核酸来治疗或逆转与衰老相关的炎症和/或纤维化的一种或多种症状。在一些实施方式中,通过根据本发明所述治疗方法给予本发明所述核酸来治疗患有加速老化的受试者(例如,早衰症)。在一些实施方式中,通过本治疗方法治疗的病症是感染的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述感染是病毒感染,例如呼吸道病毒感染,例如COVID-19,由于其他的冠状病毒引起的感染,或其他病毒病原体(例如,流感、H1N1、丙型肝炎、HIV等)。

[0143] 在一些实施方式中,所述治疗方法包含治疗肌肉紊乱(或肌肉病症)或其症状的方法,所述方法包含向需要治疗肌肉紊乱或其症状的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸(或含有所述核酸的组合物)。所述肌肉紊乱可以是但不限于骨骼肌紊乱或心肌紊乱。在一些实施方式中,所述肌肉紊乱包含肌营养不良,例如,裘馨氏肌肉萎缩症。在一些实施方式中,受试者患有肌营养不良,或有发生肌营养不良的风险。在一些实施方式中,受试者在遗传上倾向于发生肌营养不良,例如,裘馨氏肌肉萎缩症。在一些实施方式中,受试者在肌营养不良蛋白基因中具有一个或多个突变,所述突变使受试者倾向于发生肌营养不良,例如裘馨氏肌肉萎缩症。

[0144] 在一些实施方式中,所述治疗方法包含用于治疗皮肤病症,例如皮肤的炎症和/或纤维化(例如但不限于硬皮病)的方法。在一些实施方式中,所述方法包含向需要治疗皮肤的炎症和/或纤维化的受试者施用治疗有效量的本发明所述核酸(或含有所述核酸的组合物)。在一些实施方式中,所述皮肤的炎症和/或纤维化是硬皮病。

[0145] 在一些实施方式中,所述治疗方法包含治疗心脏病症或其症状的方法,所述方法包含向需要治疗心脏病症或其症状的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸(或含有所述核酸的组合物)。在一些实施方式中,所述受试者是人类受试者。在一些实施方式中,所述受试者是非人类受试者,例如非人类哺乳动物。

[0146] 可通过所述方法治疗多种心脏病症。在一些实施方式中,所述心脏病症包含心力衰竭或心肌梗塞的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述心脏病症包含肥厚性心肌病。在一些实施方式中,所述心脏病症包含射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)。

[0147] 在一些实施方式中,所述受试者处于发展心脏病症的风险中。在一些实施例中,受试者处于基于受试者的家族史、遗传倾向、生活方式和病史中的一个或多个发展心脏病症的风险中。在一些实施方式中,所述受试者在心肌肌钙蛋白I中具有突变,该突变使受试者倾向于发生肥厚性心肌病(HCM)。在一些实施方式中,受试者具有一种或多种心脏病症的合并症。在一些实施方式中,所述一种或多种合并症包含肥胖和高血压。在一些实施方式中,受试者患有或诊断患有心脏病症。

[0148] 在一些实施方式中,受试者表现出以下中的一种或多种:高血压、升高的E/e'比率、心脏肥大、心肌纤维化、肥胖、消瘦、耐力下降和系统性炎症标志物升高。在一些实施方式中,受试者患有高血压,并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)降低受试者的血压。在一些实施方式中,患有高血压的受试者具有超过130/90mmHg的静息血压。在一些实施方式中,患有高血压的受试者具有超过140/90mmHg的静息血压。在一些实施方式中,给予治疗有效量的核酸(或其组合物)降低受试者的收缩压或舒张压。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的血压(收缩压或舒张压)降低至少约5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、25%、30%或更多,或降低由任何两个前述值限定的范围内的百分比。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的血压(收缩压或舒张压)至少降低至被认为不再是高血压的水平。

[0149] 在一些实施方式中,受试者具有升高的E/e'比率,并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)降低E/e'比率。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的E/e'比率降低至少约5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多,或降低由任何两个前述值限定的范围内的百分比。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的E/e'比率至少降低至被认为不再临床相关的水平。

[0150] 在一些实施方式中,所述受试者患有心脏肥大,并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)减少心脏肥大。可以使用任何合适的选项来测量心脏肥大。在一些实施方式中,使用超声心动描记术测量心脏肥大。在一些实施方式中,通过超声心动描记术测量,患有心脏肥大的受试者具有增加的舒张末期室间隔厚度(IVSd)和/或舒张末期左心室后壁厚度(LVPWd),并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)减少IVSd和/或LVPWd。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的IVSd或LVPWd减少至少约5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、25%、30%或更多,或减少由任何两个前述值限定的范围内的百分比。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的IVSd或LVPWd至少降低至被认为不再肥厚的水平。

[0151] 在一些实施方式中,所述受试者患有心肌纤维化,并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)减少心脏纤维化。如本发明所使用,"纤维化"可包含组织(例如,心肌)的任何重塑(例如,病理重塑),例如但不限于纤维化和/或脂肪组织的沉积、用纤维化和/或脂肪组织替换肌肉组织等。使用任何合适的手段监测心脏纤维化,例如活检、超声检查或MRI。在一些实施方式中,给予治疗有效量的核酸(或其组合物)消除或延缓心肌纤维化的发展。

[0152] 在一些实施方式中,所述受试者患有与自身免疫病症相关的炎症和/或纤维化。在一些实施方式中,所述受试者患有硬皮病或系统性硬化。

[0153] 在一些实施方式中,受试者表现出消瘦或体重减轻,并且给予治疗有效量的核酸

(或其组合物)延缓或防止消瘦。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者表现出至多约20%、15%、10%、5%、3%或更低,或由前述值中的任何两个限定的范围内的百分比的体重减轻。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的体重恢复到或基本上保持在治疗前水平。

[0154] 在一些实施方式中,受试者表现出耐力下降,例如锻炼耐力,并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)延缓或防止耐力下降。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者表现出至多约20%、15%、10%、5%、3%或更低,或由前述值中的任何两个限定的范围内的百分比的耐力下降。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的锻炼耐力恢复到或基本上保持在治疗前水平。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者表现出至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%或更高,或在由前述值中的任何两个限定的范围内的百分比的耐力改善。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后耐力在治疗期间持续改善。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后耐力的跨多次给药剂量持续改善。

[0155] 在一些实施方式中,所述受试者表现出升高水平的系统性炎症标志物,例如在外周血中。在一些实施方式中,系统性炎症标记物包含IL-6和脑钠肽(BNP)中的一种或多种。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,系统性炎症标志物降低至少约5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多,或降低由任何两个前述值限定的范围内的百分比。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的系统性炎症标志物至少降低至被认为不再升高的水平。

[0156] 在一些实施方式中,在受试者肥胖的情况下,给予核酸的治疗效果独立于受试者的肥胖。在一些实施方式中,给予核酸(或其组合物)不影响受试者的重量。

[0157] 在一些实施方式中,受试者表现出骨骼肌功能下降,例如骨骼肌群施加的力或扭矩的量。在一些实施方式中,受试者表现出降低的骨骼肌功能,并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)延缓了骨骼肌功能降低的发展,防止骨骼肌功能的恶化,或增强骨骼肌功能。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的骨骼肌功能恢复到或基本上保持在治疗前水平。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者表现出至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%或更高,或在由前述值中的任何两个限定的范围内的百分比的骨骼肌功能。

[0158] 在一些实施方式中,给予治疗有效量的本发明所述核酸(或其组合物)的任何治疗效果在治疗期间持续。跨多个给药剂量维持。在一些实施方式中,给予治疗有效量的本发明所述核酸(或其组合物)的任何治疗效果在治疗期间不是瞬时的。

[0159] 在一些实施方式中,本发明的治疗方法用于治疗多种炎症病症中的任何一种或多种。在一些实施方式中,所述炎症病症是慢性病症。在一些实施方式中,所述炎症病症是响应IL-10的抗炎作用的病症。在一些实施方式中,所述炎症病症包含自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病(GVHD)或对器官移植的免疫应答。在一些实施方式中,所述炎症病症包含病毒感染、败血症、关节炎(类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎)、多发性硬化、天疱疹和1型糖尿病(也称为胰岛素依赖型糖尿病(IDDM))。在一些实施方式中,所述炎

症病症包含白塞病、多肌炎/皮肌炎、自身免疫性细胞减少、自身免疫性心肌炎、原发性肝硬化、Goodpesture综合征、自身免疫性脑膜炎、Sjögren综合征、系统性红斑狼疮、阿迪森氏病、斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩病、胰岛素依赖型糖尿病、营养不良型大疱性表皮松解症、表皮炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、Guillain-Barré综合征、桥本病、溶血性贫血、多发性硬化、重症肌无力、寻常型天胞疮、银屑病、风湿性热、类风湿性关节炎、肉样瘤病、硬化、脊椎关节病、甲状腺炎、脉管炎、白癜风、黏液性水肿、恶性贫血和溃疡性结肠炎。在一些实施方式中,所述炎症与骨髓移植有关。在一些实施方式中,所述炎症与组织移植后的同种异体移植物排斥有关。在一些实施方式中,所述自身免疫性疾病是心脏自身免疫性疾病,例如自身免疫性心肌炎。在一些实施方式中,所述自身免疫疾病是硬皮病或系统性硬化。

[0160] 在一些实施方式中,本发明所述的治疗方法,用于治疗多种感染性疾病中的任何一种或多种的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,本发明所述的核酸治疗心脏病症或炎性病症,包含感染性疾病的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述感染性疾病与心肌损伤相关。在一些实施方式中,所述心脏病症包含与感染性疾病相关的急性心肌炎。在一些实施方式中,所述炎症病症包含与感染性疾病相关的细胞因子风暴或超炎。在一些实施方式中,所述炎症病症包含急性肺损伤或急性呼吸遇险综合征(ARDS)。

[0161] 在一些实施方式中,感染性疾病是通过但不限于以下病原体中的一种或多种的感染:病毒(包含但不限于,冠状病毒、人免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乳头瘤病毒、副流感病毒、流感病毒、肝炎病毒、柯萨奇病毒、带状疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹、狂犬病病毒、出血性病毒热、H1N1等)、阮病毒、寄生虫、真菌、霉菌、酵母和细菌(革兰氏阳性和革兰氏阴性)。在一些实施方式中,病原体包含但不限于白色念珠菌、黑曲霉菌、大肠杆菌(E.coli)、绿脓杆菌(P.aeruginosa),和金黄色葡萄球菌(S.aureus)、A族乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌、结核分枝杆菌、空肠弯曲菌、沙门氏菌、志贺氏菌和多种耐药细菌。

[0162] 在一些实施方式中,所述炎症在病毒,例如DNA或RNA病毒感染之后或同时发生。在一些实施方式中,所述病毒是RNA病毒,例如单链或双链病毒。在一些实施方式中,所述RNA病毒是正义单链RNA病毒。在一些实施方式中,所述病毒属于套式病毒目。在一些实施方式中,所述病毒属于冠病病毒科家族。在一些实施方式中,所述病毒属于α冠状病毒、β冠状病毒、γ冠状病毒或δ冠状病毒属。在一些实施方式中,所述α冠病毒是但不限于人冠状病毒229E、人冠状病毒NL63或传染性胃肠炎病毒(TGEV)。在一些实施方式中,β冠病毒是但不限于严重急性呼吸道综合征冠状病毒(SARS-CoV)、SARS-CoV-2(COVID-19)、中东呼吸道综合征(MERS-CoV)、人冠状病毒HKU1或人冠状病毒OC43。在一些实施方式中,γ病毒是传染性支气管炎病毒(IBV)。

[0163] 核酸可以以任何合适的量给予受试者。在一些实施方式中,核酸的治疗有效量包含约0.01μg、0.02μg、0.05μg、0.1μg、0.2μg、0.5μg、1μg、2μg、3μg、4μg、5μg、6μg、7μg、8μg、9μg、10μg、15μg、20μg、25μg、30μg、40μg、50μg、75μg、100μg、125μg、150μg、175μg、200μg、250μg、300μg、400μg、500μg、600μg、700μg、800μg、900μg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、10mg、15mg、20mg、30mg、40mg、50mg、75mg、100mg或更多,或由前述值中的任何两个限定的量(例如,0.01μg至0.1μg、0.1μg至1μg、1μg至10μg、10μg至100μg、100μg至1mg、1mg至10mg、10mg至100mg)。在一些实施方式中,核酸的治疗有效量包含以体重计约0.001μg/g、0.002μg/g、0.005μg/g、

0.01μg/g、0.02μg/g、0.05μg/g、0.1μg/g、0.15μg/g、0.2μg/g、0.5μg/g、1μg/g、2μg/g、3μg/g、4μg/g、5μg/g、6μg/g、7μg/g、8μg/g、9μg/g、10μg/g、15μg/g、20μg/g、25μg/g、30μg/g、35μg/g、40μg/g、45μg/g、50μg/g、60μg/g、70μg/g、80μg/g、90μg/g、100μg/g或更多,或由前述值中的任何两个限定的量(例如,0.001μg/g至0.01μg/g、0.01μg/g至0.1μg/g、0.1μg/g至1μg/g、1μg/g至10μg/g、10μg/g至100μg/g)。在一些实施方式中,核酸的治疗有效量包含以体重计约0.001μg/g、0.002μg/g、0.005μg/g、0.01μg/g、0.02μg/g、0.05μg/g、0.1μg/g、0.2μg/g、0.5μg/g、或1μg/g,或更多,或由前述值中的任何两个限定的量(例如,0.001μg/g至0.01μg/g、0.01μg/g至0.05μg/g、0.05μg/g至0.1μg/g、0.1μg/g至0.2μg/g、0.2μg/g至0.5μg/g、或0.5μg/g至1μg/g)。

[0164] 核酸或组合物可以以任何合适的给药方案给予受试者。在一些实施方式中,向受试者给予治疗有效量的核酸或组合物不超过每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次或更长,或以由前述值中的任何两个限定的范围内的频率给药。在一些实施方式中,将所述核酸给予受试者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30或更多次。在一些实施方式中,以规则的间隔向受试者给予核酸。

[0165] 核酸或组合物可以以任何合适的途径给药。给药可以是局部的或系统性的。在一些实施方式中,是肠胃外给药。用于给药的合适选项包含但不限于静脉内、肌内、皮下、动脉内、腹膜内或口服给药。在一些实施方式中,所述核酸或组合物静脉内给药。在一些实施方式中,通过输注给予核酸或组合物。

[0166] 本发明还提供了提升巨噬细胞的抗炎活性的方法(本发明也称为巨噬细胞调制方法)。所述方法通常包含将本发明的核酸或组合物与巨噬细胞群接触。在一些实施方式中,所述核酸包含诱导暴露于核酸的巨噬细胞中的基因表达和/或表观遗传变化的变化。在一些实施方式中,所述接触核酸(或组合物)增加IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的表达。在一些实施方式中,所述接触核酸(或组合物)增加IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的转录或翻译。在一些实施方式中,与合适的对照(例如,未与核酸接触的巨噬细胞)相比,接触核酸(或组合物)使IL-10、IRF-7、NOS-2和ARG-1中的一种或多种的转录各自独立地增加至少约1.5倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、30倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍或更多,或增加由前述值中的任何两个限定的范围内的倍数量。

[0167] 在一些实施方式中,所述接触核酸(或组合物)增加巨噬细胞中白介素10(IL-10)的分泌。在一些实施方式中,与合适的对照(例如未与核酸接触的巨噬细胞)相比,接触核酸(或组合物)使来自巨噬细胞的IL-10分泌增加至少约1.2倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、50倍或更多,或增加由前述值中的任何两个限定的范围内的倍数。

[0168] 所述巨噬细胞群可以与核酸或组合物以任何合适的时间接触。在一些实施方式中,所述接触持续24小时或更长时间、36小时或更长时间、48小时或更长时间、60小时或更长时间、72小时或更长时间,或在前述值中的任何两个之间的范围内的时间量。

[0169] 在一些实施方式中,所述接触在体外进行。在一些实施方式中,所述接触在体内进行。在一些实施方式中,所述接触包含向需要治疗炎症的受试者施用有效量的核酸或组合物。在一些实施方式中,所述巨噬细胞是人巨噬细胞。在一些实施方式中,所述受试者是人

类受试者。在一些实施方式中,所述受试者是非人类受试者,例如非人类哺乳动物。

[0170] 可以使任何合适量的核酸与巨噬细胞群接触以提升巨噬细胞的抗炎活性。在一些实施方式中,所述有效量取决于接触是在体内还是在体外完成。

[0171] 在任何治疗方法中,所述方法可以包含给予特异性结合易位启动子区(TPR)的核酸。在任何治疗方法中,在一些实施方式中,所述方法可以包含给予特异性结合TPR的核酸。在一些实施方式中,所述TPR是人TPR(Gene ID 7175)。在一些实施方式中,所述TPR具有如下所示的氨基酸序列,或与其至少80%、85%、90%、95%、97%、99%相同的氨基酸序列:

[0172] 1maavlqqvle rtelnklpks vqnklekfla dqqseidglk grhekfkves eqqyfeiekr

[0173] 61lshsqerlvn etrecqslrl eleklnnqlk alteknkele iaqdrniaiq sqftrtkeel

[0174] 121eaekrdlirt nerlsqeley ltedvkrlne klkesnttkg elqlkldelq asdvsvkyre

[0175] 181krleqekell hsqntwlnte lktktdella lgrekgneil elkcnlenkk eevsrleeqm

[0176] 241nglktsnehl qkhvedlltk lkeakeqqas meekfhneln ahiklsnlyk saaddseaks

[0177] 301neltraveel hkllkeagea nkaiqdhlle veqskdqmek emlekigrle kelenandll

[0178] 361satkrkgail seeelaamsp taaavakivk pgmkltelyn ayvetqdqll leklenkrin

[0179] 421kyldeivkev eakapilkrq reeyeraqka vaslsvkleq amkeiqrlqe dtdkankqss

[0180] 481vlerdnrrme iqvkdlsqqi rvllmeleea rgnhvirdee vssadissss evisqhlvsy

[0181] 541rnieelqqqn qrllvalrel getrereeqe ttsskitelq lklesaltel eqlrksrqhq

[0182] 601mqlvdsivrq rdmyrillsq ttgvaiplha sslddvslas tpkrpstsqt vstpapvpvi

[0183] 661esteaieaka alkqlqeife nykkekaene kiqneqlekl qeqvtdlrsq ntkistqldf

[0184] 721askryemlqd nvegyrreit slhernqklt attqkqeqii ntmtqdlrga neklavaevr

[0185] 781aenlkkekem lklsevrlsq qresllaeqr gqnllltnlq tiqgilerse tetkqrlssq

[0186] 841iekleheish lkkkleneve qrhtltrnld vqlldtkrql dtetnlhlnt kellknaqke

[0187] 901iatlkqhlsn mevqvasqss qrtgkgqpsn kedvddlvsq lrqteeqvnd lkerlktsts

[0188] 961nveqyqamvt sleeslnkek qvteevrkni evrlkesaef qtqlekklme vekekqelqd

[0189] 1021dkrraiesme qqlselkktl ssvqnevqea lqrastalsn eqqarrdcqe qakiaveaqn

[0190] 1081kyerelmlha advealqaak eqvskmasvr qhleettqka esqlleckas weerermlkd

[0191] 1141evskcvcrce dlekqnrllh dqieklsdkv vasvkegvqg plnvslseeg ksqeqileil

[0192] 1201rfirrekeia etrfevaqve slryrqrvel lerelqelqd slnaerekvq vtaktmaqhe

[0193] 1261elmkktetmn vvmetnkmlr eekerleqdl qqmqakvrkl eldilplqea naelseksgm

[0194] 1321lqaekkllee dvkrwkarnq hlvsqqkdpd teeyrkllse kevhtkriqq lteeigrlka

[0195] 1381eiarsnaslt nnqnliqslk edlnkvrtek etiqkdldak iidiqekvkt itqvkkigrr

[0196] 1441 yktqyeelka qqdkvmetsa qssgdhqeqh vsvqemqelk etlnqaetks kslesqvenl

[0197] 1501 qktlsekete arnlqeqtvq lqselsrlrq dlqdrttqee qlrqqiteke ektrkaivaa

[0198] 1561 kskiahlagv kdqltkenee lkqrngaldq qkdeldvrit alksqyegri srlerelreh

[0199] 1621 qerhleqrde pqepsnkvpe qqrqitlktt pasgergias tsdpptanik ptpvvstpsk

[0200] 1681 vtaaamagnk stprasirpm vtpatvtnpt ttptatvmpt tqvesqeamq segpvehvpv

[0201] 1741 fgstsgsvrs tspnvqpsis qpiltvqqqt qatafvqptq qshpqiepan qelssnivev

[0202] 1801 vqsspverps tstavfgtvs atpssslpkr treeeedsti easdqvsddt vemplpkklk

[0203] 1861 svtpvgteee vmaeestdge vetqvynqds qdsigegvtq gdytpmedse etsqslqidl

[0204] 1921 gplqsdqqtt tssqdgqgkg ddvividsdd eeedddendg ehedyeedee dddddeddtg

[0205] 1981 mgdegedsne gtgsadgndg yeaddaeggd gtdpgtetee smgggegnhr aadsqnsgeg

[0206] 2041 ntgaaessfs qevsreqqps saserqapra pqsprrpphp lpprltihap pqelgppvqr

[0207] 2101 iqmtrrqsvg rglqltpgig gmqqhffdde drtvpstptl vvphrtdgfa eaihspqvag

[0208] 2161 vprfrfgppe dmpqtssshs dlgqlasqgg lgmyetplfl aheeesggrs vpttplqvaa

[0209] 2221 pvtvftestt sdasehasqs vpmvttstgt lsttnetatg ddgdevfvea esegisseag

[0210] 2281 leidsqqeee pvqasdesdl pstsqdppss ssvdtsssqp kpfrrvrlqt tlrqgvrgrq

[0211] 2341 fnrqrgvsha mggrgginrg nin(SEQ ID NO:16)

[0212] 在一些实施方式中,所述TPR结合核酸以10^{-5}M至10^{-12}M,例如10^{-6}M至10^{-11}M的结合亲和力结合TPR。在一些实施方式中,所述特异性结合TPR核酸抑制或减少TPR的功能和/或表达。在一些实施方式中,所述特异性结合TPR核酸是RNA。在一些实施方式中,所述特异性结合TPR核酸是非编码RNA。在一些实施方式中,所述特异性结合TPR核酸是Y RNA或其衍生物,例如其合成衍生物。在一些实施方式中,所述特异性结合TPR核酸是衍生自EV-YF1的本发明所述核酸中的任一种,例如TY4。

[0213] 试剂盒

[0214] 本发明还提供了包含本发明所述核酸或组合物的试剂盒。如本发明提供,在一些实施方式中,所述试剂盒可用于治疗肌肉紊乱、心脏病症或炎性病症(例如,与病毒感染相关)。试剂盒可以包含本发明所述的核酸和转染试剂。所述转染试剂可以是本发明提供的任何合适的转染试剂。在一些实施方式中,所述转染试剂包含脂质(例如,形成脂质体的脂质)、聚乙二醇化脂质和细胞外囊泡中的一种或多种。在一些实施方式中,所述试剂盒包含如本发明提供的药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,所述试剂盒包含酪蛋白和/或壳聚糖。试剂盒可包含用于支持试剂盒的一个或多个部件的一个或多个容器(例如,小瓶、安瓿、试管、烧瓶或瓶子)。试剂盒还可以包含使用试剂盒治疗病症(例如,HCM、HFpEF、肌营养不良、硬皮病和与病毒感染相关的炎症病症)的说明书。信息和说明可以是文字、图片或

两者的形式等。

[0215] 本发明中引用的所有专利和其他出版物;包含文献参考文献、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请,为了描述和公开例如可能与本发明描述的技术结合使用的这些出版物中描述的方法,通过引用明确地并入本发明。这些出版物仅在本申请提交日之前公开。这方面的任何内容都不应被解释为承认发明人无权因先前的发明或任何其他原因而提前公开。所有关于这些文件的日期或内容的陈述均基于申请人所掌握的信息,并不构成对这些文件的日期或内容正确性的任何承认。

[0216] 本发明的实施例的描述并非旨在穷举或将本发明限制于所公开的精确形式。虽然本发明出于说明性目的描述了本发明的具体实施例和示例,但是如本领域技术人员将认识到的,各种等效修改在本发明的范围内是可能的。例如,虽然以给定顺序呈现了方法步骤或功能,但是替代实施例可以以不同的顺序执行功能,或者可以基本上同时执行功能。本发明提供的教导可以适当地应用于其他程序或方法。本发明描述的各种实施例可以组合以提供另外的实施例。如果需要,可以修改本发明的各方面以采用上述参考文献和应用的组成、功能和概念来提供本发明的另外的实施例。此外,由于生物功能等效性考虑,可以在蛋白质结构中进行一些改变而不影响种类或量的生物或化学作用。根据详细描述,可以对本发明进行这些和其他改变。所有这些修改旨在包含在所附权利要求的范围内。

[0217] 上述任何实施例中的特定元素都可以组合或替代其他实施例中的元素。此外,虽然已经在这些实施例的上下文中描述了与本发明的某些实施例相关联的优点,但是其他实施例也可以表现出这样的优点,并且并非所有实施例都必须表现出这样的优点以落入本发明的范围内。

[0218] 本发明描述的技术通过以下实施例进一步说明,这些实施例决不应当被解释为进一步限制。

[0219] 实施例

[0220] 实施例1

[0221] 该非限制性实施例示出了衍生自CDC衍生的细胞外囊泡(CDC-EV)的非编码RNA(ncRNA)的生物活性的潜在作用机制。

[0222] EV-YF1(SEQ ID NO:1;图1A)是在CDC-EV中发现的56-核苷酸(nt)ncRNA并且由人Y-RNA4基因编码。EV-YF1增加巨噬细胞对IL-10(抗炎细胞因子)的分泌,并且对心肌梗塞(MI)具有心脏保护性。EV-YF1在血管紧张素II输注诱导的高血压和肥瘦模型中发挥与CDc-EV相当的抗纤维化和抗肥厚的益处。EV-YF1及其衍生物在HFpEF模型中也显示出强的生物活性。

[0223] 巨噬细胞作为EV的疾病相关靶标。作为先天免疫中的关键参与者,巨噬细胞分泌炎症介质、清除细胞碎片(通过胞葬作用)和重塑损伤后组织。巨噬细胞被认定为由CDC-EV诱导的MI后心脏保护的关键效应物,并且在机制中涉及增强的胞葬作用。来自巨噬细胞耗尽不仅破坏心脏保护,而且加剧鼠HFpEF以及mdx心肌病的发现进一步验证了巨噬细胞在心力衰竭(HF)中的中心作用。新出现的概念是,巨噬细胞不仅是受EV调节的“第一应答者”,还是EV生物活性的强大、与疾病相关的体外报告者。大鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)可用于分别研究EV-YF1和CDC-EV对转录组和表观遗传组的影响。巨噬细胞可能是心力衰竭(HF)的重要调节剂,并且CDC-EV显著改变巨噬细胞表型。

[0224] 实施例2

[0225] 该非限制性实施例示出了EV-YF1在肥厚性心肌病(HCM)模型中对靶细胞转录组的作用和EV-YF1的治疗作用。

[0226] Y-RNA对基因表达和表观遗传组学的影响。图1A描述了Y-RNA衍生物诱导表观遗传修饰从而改变靶细胞基因表达的工作假设。表观遗传调控是指建立持久基因表达模式的染色质适应或DNA甲基化。实际上,EV-YF1诱导大鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)的主要转录组学变化(图1B),其包含增强的IL10表达(图1C)。CDC-EV效应(以及可能的EV-YF1效应)的一个独特特征是它们的持久性,其可以通过表观遗传调制来解释。图1D示出了IL10基因座的H3K27ac标记(组蛋白H3的表观遗传修饰),其中3个通过暴露于CDc-EV而诱导。H3K27ac定义了选择性增加转录的活性增强子。

[0227] 图1A,EV-YF1序列和假设的作用机制。图1B,EV-YF1对大鼠BMDM转录组学的影响。图1C,IRF7、IL10是差异表达最大的基因之一。图1D,H3K27乙酰化在CDC-EV暴露后通过ChIP-seq标记IL10基因。标记为1、3和4的峰对于CDC-EV治疗的大鼠BMDM是独特的。

[0228] 在HCM小鼠中EV-YF1的治疗益处。肥厚性心肌病(HCM)(或肥厚性阻塞性心肌病(HOCM))是可导致HFpEF的遗传疾病。HCM/HOCM的症状包含但不限于肌细胞纤维混乱、间质纤维化、心脏过度收缩、肥厚、舒张功能障碍、体重减轻、早熟和/或猝死。

[0229] 考虑到EV-YF1(此处称为YF-1)在减轻血管紧张素诱导的肥厚方面的功效,在转基因$cTnI^{146Gly}$小鼠(特别致命的人类HCM变异模型)中对其进行了测试。在4个月的年龄下,$cTnI^{146Gly}$小鼠静脉内接受溶剂对照或YF1(经眼球后[r.o.]注射)每周两次,持续4周(图2A)。生长不受影响(图2B),但超声波心动描记术(图2C)揭示了舒张末期室间隔厚度(IVSd;图2D,左图)和舒张末期左心室后壁厚度(LVPWd;图2D,右图)显著减小。如更好的自梳理(图2E)和增加的锻炼耐量(图2F)所证明的,总体上身体状况改善。在终点处,心脏重量(HW)与胫骨长度(TL)的比率在溶剂对照组中大量增加,但随着YF-1减小;与TL相比的相对肺重量(LW)在所有组中相当(即,没有一个具有肺充血的明显HF;图2G)。初步组织学发现还示出了YF1减少间质心脏纤维化。因此,EV-YF1在HCM小鼠中是高度治疗性的,进一步支持HFpEF作为EV-YF1及其衍生物的潜在指示。

[0230] 图2A-2G:HCM小鼠中的EV-YF1。图2A,方案示意图。图2B,体重(BW)随时间变化。图2C,舒张中的超声心动图。图2D,IVSd和LVPWd随时间变化。图2E,是示出了理毛行为的图像。图2F,跑步机锻炼距离占WT小鼠跑步距离的百分比。图2G,终点处的HW/TL和LW/TL。

[0231] 实施例3

[0232] 该非限制性实例示出了EV-F1变体,包含TY4在骨髓来源的巨噬细胞(MBDM)中的生物活性。

[0233] EV-FY1的修饰截短突变体作为候选先导基因。虽然图2A-2G表明EV-FY1本身在若干疾病模型中是生物活性的,但是它相对合成RNA药物(大多数18nt至30nt)较长,并且化学未修饰,具有潜在地不稳定和免疫原性。为了绕过这些限制,合成了几种EV-YF1启发的分子并在BMDM中筛选。测试的候选分子列于下表中。LNA残基用粗体表示。

[0234] 表1

[0235]

EV-YF1 变体	序列	SEQ ID NO:
2 由 5	CUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAACAUUAGUGUCACUAAAGU	7
2 由 5_54U 至 A	CUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAACAUUAGUGUCACUAAAG**A**	8
2 由 5_54U 至 A LNA_Gapmer	**CUG**GUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAACAUUAGUGUCACUAA**AG**A	9
2 由 5_54U 至 A LNA_Mixmer	**CUGG**UCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAACAUUAGUGUCACU**AAAG**A	10
TY4（原始）	GGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG	11
TY4 1G 至 C	**C**GUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG	12
TY4 1G 至 C LNA_Gapmer	**CGU**CCGAUGGUAGUGGGUUAU**CAG**	13
TY4 1G 至 C LNA_Mixmer	**CGUCC**GAUGGUAGUGGGUU**AUCAG**	2

[0236] EV-YF1变体的筛选鉴别了两种在巨噬细胞体外测定中表现出增加的生物活性(图3A、3B)。BMDM中“2由5_54U至A”和“TY4 1G至C LNA_Mixmer”的转染诱导IL-10、Nos-2和Arg-1表达增加,重述了EV-YF1对巨噬细胞的作用。除非另有说明,否则“TY4 1G至C LNA_Mixmer”在本文中也被称为“TY4”。如上表1以及图3A和3B所示,“TY4”与指示为“原始”的“TY4”不同。“对照”表示用溶剂处理的BMDM。

[0237] 图4A-4C进一步显示,TY4,EV-YF1(图4A)的24-nt修饰的RNA(具有锁核酸取代)突变体衍生物,以类似于EV-YF1本身的模式影响BMDM中的基因表达(全局[图4B]和IRF7和IL10[图4C])。

[0238] 图4A-4C:衍生自EV-YF1的TY4。图4A,TY4与母EV-YF1比对。下划线表示化学修饰的核苷酸。图4B,是大鼠BMDM中的RNA热图。图4C,TY4在IRF7和IL10上重述EV-YF1作用。

[0239] 在一些实施方式中,EV-YF1的截短和/或化学修饰的变体,例如TY4或具有SEQ ID NO:2、11-14中任一项的序列的分离的RNA诱导巨噬细胞的转录变化。在一些实施方式中,EV-YF1的截短和/或化学修饰的变体,例如TY4或具有SEQ ID NO:2、11-14中任一项的序列的分离的RNA诱导巨噬细胞中IL10和/或IRF7的上调。在一些实施方式中,EV-YF1的截短和/或化学修饰的变体,例如TY4或具有SEQ ID NO:2、11-14中任一项的序列的分离的RNA重述EV-YF1对巨噬细胞的影响。在一些实施方式中,截短的EV-YF1变体具有以下核苷酸序列:CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:12)在一些实施方式中,截短的,化学修饰的EV-YF1变体具有以下核苷酸序列:CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG(SEQ ID NO:2),其中1、3、5、20、22和24位上是锁核酸(LNA)。

[0240] 实施例4

[0241] 该非限制性实施例示出了TY4在HCM模型中的治疗效果。

[0242] 在HCM中的TY4的治疗益处。如上述实施例2所述,TY4重述了EV-YF1在HCM动物模型中的治疗效果。在4个月的年龄下,$cTnI^{146Gly}$小鼠静脉内接受溶剂对照、EV-YF1或TY4(经眼球后[r.o.]注射)(0.15μg/g体重)每周两次,持续4周(图5A)。给药开始后3周与给予EV-YF1的效果类似,给予TY4的动物显示出显著降低的舒张末期室间隔厚度(IVSd;图5B)和舒张末期左心室后壁厚度(LVPWd;图5C)。因此,通过TY4和EV-YF1治疗减弱了室间隔厚度和左心室后壁厚度的重塑。在TY4处理的$cTnI^{146Gly}$动物中,锻炼耐力也得到改善,其表现出比接受盐水的$cTnI^{146Gly}$动物更大的运动距离(图5D),并且耐力随时间的增加表现出与野生型动物相似(图5E)。TY4对锻炼耐力的治疗效果大于在EV-YF1处理的动物中观察到的效果(图5D、5E)。

[0243] 在4周时,TY4给药减轻HCM动物中的舒张松弛受损(图6A-6D)。TY4处理的$cTnI^{146Gly}$动物具有比YF1处理的$cTnI^{146Gly}$动物低的舒张压(图6B)。此外,在4周时,TY4处理的$cTnI^{146Gly}$动物的体重与野生型对照动物相当,而给予盐水的$cTnI^{146Gly}$动物的体重降低(图6E)。EV-YF1处理的动物也具有与给予盐水的$cTnI^{146Gly}$动物相当的降低的体重。因此,在HCM小鼠模型中,与EV-YF1相比,TY4发挥增强的治疗性生物活性。

[0244] 在7周时,如通过脑钠肽(BNP)水平测量的(图7A),TY4给药的动物示出了显著降低的系统性炎症。降低的水平与用EV-YF1治疗的动物的水平相当。TY4给药也减弱7周时的体重减轻/消瘦(如通过心脏重量与胫骨长度或肺重量与胫骨长度的比率测量)(图7B、7C)。

[0245] 这些结果表明,在肥厚性心肌病模型中,TY4完全重述EV-YF1的治疗效果。

[0246] 在一些实施方式中,向患有肥厚性心肌病(HCM)的受试者静脉内给予治疗有效量的TY4治疗HCM。在一些实施方式中,向患有肥厚性心肌病(HCM)的受试者静脉内重复给予治疗有效量的TY4治疗HCM。在一些实施方式中,向患有HCM的受试者静脉内给予治疗有效量的TY4减少或减轻HCM的一种或多种症状。在一些实施方式中,向患有HCM的受试者静脉内给予治疗有效量的TY4减少或减轻由于HCM引起的IVSd增加、LVPWd增加、锻炼耐力受损、血压升高、系统性炎症和体重减轻中的一种或多种。

[0247] 实施例5

[0248] 该非限制性实施例示出了TY4在具有射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)模型中的治疗效果。

[0249] 在HFpEF中的TY4的治疗益处。鉴于EV-YF1在肥厚模型中的生物活性(实施例2)和TY4在相同模型中的类似治疗效力(实施例4),我们用HFpEF测试小鼠中的TY4。该“二次打击(two-hit)”模型结合了通常与人HFpEF(肥胖和高血压)相关的两种合并症,并再现了来自HFpEF受试者的心脏组织中看到的一氧化氮信号异常。图8A描绘了实验方案。小鼠在没有干预(WT)或饲喂高脂饮食(HFD)和L-NAME补充水的情况下被观察。在5周内,HFD/L-NAME小鼠变得肥胖和高血压,具有舒张功能障碍但正常的EF(通过基线超声心动图)。然后随机分配HFpEF小鼠以接受每周两次溶剂对照或TY4的r.o.注射(“静脉注射”)或口服剂量(“口服”)。每次注射或口服TY4的剂量为0.15μg/g。对于口服给药,首先将TY4与脂质体组合以形成TY4-脂质体复合物,然后将其包封在酪蛋白-壳聚糖复合物中。输注给药前/口服给药前和在各种时间点之后,小鼠经历血压测量、跑步机测试、超声心动描记术和/或循环生物标志

物的抽血。组之间的基线的唯一差异是与疾病相关的(在HFpEF对比WT中的高血压、低锻炼耐力、升高的E/e'比率)。

[0250] 10周后,以下差异是明显的:在TY4动物(静脉注射)中,血压较低(图3B),锻炼耐力较高(图3C),E/e'比率较低(图3D),并且与给予溶剂对照的HFpEF动物相比,脑钠肽(BNP)水平较低(图3E)。这些健康指数与WT水平(非HFpEF动物)相当。这种效果不是由于饮食消耗:TY4小鼠保持肥胖。该发现揭示了TY4的显著的疾病修饰生物活性,特别是考虑到HFpEF的难治性。

[0251] 图8A-8C:静脉内给药的TY4逆转HFpEF小鼠的疾病进展。图8A:示意性研究设计。在研究终点,静脉内接受TY4的动物具有较低的收缩压(SBP)和舒张压(DBP)(图8B),改善的锻炼耐力(图8C)和舒张功能(E/e',图8D),以及降低的心力衰竭血清生物标志物水平(BNP;图8E)。

[0252] 在用TY4口服治疗的动物中观察到类似的治疗效果,并且在一些情况下观察到优异的治疗结果。与给予溶剂对照的HFpEF动物相比,口服给予TY4降低了血压(图8F)、降低了E/e'比率(图8G)、增加了锻炼耐力(图8H)和降低了BNP水平(图8I)。在TY4口服治疗的动物中,血压、锻炼耐力和E/e'比率与WT水平(非HFpEF动物)相当。

[0253] 图8F-8I:TY4的口服给药逆转HFpEF小鼠的疾病进展。实验方案示于图8A中。在研究终点,口服接受TY4的动物具有较低的收缩压(SBP)和舒张压(DBP)(图8F),改善的舒张功能(E/e',图8G)和锻炼耐力(图8H),以及降低的心力衰竭的血清生物标志物水平(BNP;图8I)。

[0254] 在静脉内和口服给予动物的治疗过程中始终观察到TY4的治疗效果。在第9周立刻观察到收缩压降低(图8J),而从第7周观察到舒张压降低(图8K)。从第9周并且至少在第14周观察到改善的E/e'比率(图8L)。在口服治疗的动物中更一致地观察到改善的锻炼耐力,并且所有TY4治疗的动物在至少第11周显示更高的锻炼耐力(图8M)。

[0255] 为了测试给药频率对在HFpEF中的TY4的治疗效果的影响,除了以每周两次、每周一次或每两周一次的频率静脉内给药HFD/L-NAME动物,进行如图8A中的实验方案。在14周时,在所有频率下观察到静脉内TY4处理的动物中E/e'比率降低,表明舒张功能障碍减弱(图9A、9B)。如前所述,治疗效果不是由于饮食消耗,因为体重增加在所有三个给药频率都没有改变(图9C)。锻炼耐力以剂量频率依赖性方式改善,因为在每周一次或两次的施用频率下观察到一致的改善,而当每两周施用一次时几乎没有改善(图9D、9E)。TY4减弱高血压(图9F、9G)。特别地,在每周两次和每周一次的施用频率下,收缩压在8周之后的时间段内下降,而在每两周一次施用TY4时,收缩压在相同时间段内保持相同(图9F,下图)。在16周时通过IL-6和BNP水平测量,TY4在所有给药频率下减弱系统性炎症(图10A、10B)。

[0256] 在一些实施方式中,向患有HFpEF的受试者静脉内或口服给予治疗有效量的TY4治疗HFpEF(或其一种或多种症状)。在一些实施方式中,向患有HFpEF的受试者重复施用(静脉内或口服)治疗有效量的TY4治疗HFpEF(或其一种或多种症状)。在一些实施方式中,向患有HFpEF的受试者静脉内或口服施用治疗有效量的TY4减少或减轻HFpEF的一种或多种症状。在一些实施方式中,向患有HFpEF的受试者静脉内或口服施用治疗有效量的TY4减少或减轻由于HFpEF引起的锻炼耐力受损、血压升高、E/e'比率升高和系统性炎症中的一种或多种。

[0257] 实施例6

[0258] 该非限制性实施例示出了通过测量人特异性Y-RNA序列来确定CDC-EV的生物分布。

[0259] 为了评估生物分布,设计定量PCR(qPCR)引物以扩增部分EV-YF1的序列,因为其在CDC-EV中丰富。图11A示出了所选区域(此处表示为NT4)与最接近的小鼠序列(RNA Y1)不具有高同源性。掺入到均质小鼠肝组织中的人CDC-EV可以以10^4EV/20mg解析(图11B),使得能够在r.o.注射后一小时定量生物分布(图11C)。

[0260] 图11A-11C:CDc-EV的生物分布。图11A:人和小鼠序列和正向PCR引物。图11B:在10^3至10^4EV/20mg组织下的分辨率极限。图11C:r.o.注射后1小时,每克组织中的CDc-EVs。

[0261] 在一些实施方式中,在向动物给予CDC-EV之后,可以通过检测在组织中已知的CDC-EV(例如,人CDC-EV)中的人特异性Y-RNA序列来评估CDC-EV和/或其载荷在非人动物中的生物分布。

[0262] 实施例7

[0263] 该非限制性实施例示出了用于测试候选治疗分子例如TY4和/或其变体在体外和体内的生物活性的实验设计。

[0264] 测试候选治疗剂用于确定在人巨噬细胞(HM)中基因表达的选定变化。在体内测试具有转录组模式的(至少部分模拟由已知盐变体诱导)。进行体内测试的候选物在两个互补的、成熟的HFpEF模型中表征。

[0265] 巨噬细胞筛选。图12A中描绘了概述方法。获得人骨髓单核细胞,并在IMDM(补充有10%FBS、1%青霉素/链霉素和人M-CSF[R&Systems])中分化,以在6至7天内产生HM,类似于实施例2和3中对大鼠巨噬细胞所做的。图12B中的数据证实HM可以被培养并且它们在IL10 mRNA上调方面类似地响应EV-YF1。合成TY4和衍生物,并在无血清培养基中与5μl小RNA转染试剂(Dharma FECT,GE)混合至终体积100μl。搅拌和孵育(形成脂质体-RNA复合物)后,将制剂加入HM培养基至终浓度为80nM。对TY4的每个新化学变体和惰性乱码序列重复相同的过程。24小时后提取RNA,并通过定量聚合酶链式反应(qPCR)进行分析,以确定抗炎细胞因子IL10、诱导型一氧化氮合酶(NOS2)和HPRT1(用作内源性对照的管家酶)的转录物水平。IL10可用作阳性效力标记物,并且诱导型一氧化氮合酶(NOS2)可用作阴性效力标记物。为了通过该筛选并继续进行体内测试,任何给定的变体将IL10mRNA水平增加至少3倍,而不增加NOS2 mRNA水平,两者均通过HPRT1 mRNA水平归一化,并且与用乱码序列转导的HM中的mRNA水平相比。

[0266] 啮齿动物模型。HFpEF的小鼠模型(模型1)是其中初步数据显示使用TY4的疾病修饰生物活性的模型(图8A-8M)。将野生型小鼠置于高脂饮食和L-NAME补充水中(或正常饮食和水作为健康对照)总共15周。在5周(当肥胖和舒张功能障碍已经明显时),随机分配动物以接受候选分子或溶剂对照。动物以0.15μg/g体重的起始剂量以眼球后注射或口服接受ncRNA或安慰剂的两周输注。调整剂量和/或剂量间隔作为系统剂量发现研究的一部分。可以进行剂量升级研究以获得有益的结果。一旦建立了给药方案,每2周评估血压、超声波心动描记术、锻炼耐力和血清BNP(心脏功能的生物标志物)。在研究终点(15周高脂饮食+L-NAME,和开始干预后10周),进行最终表型分析,并且在麻醉下去除心脏以用于组织学。将心肌组织切片并染色以用于纤维化(Mason三色染色)、炎症(苏木精和伊红,加上CD45[用于所有白细胞]和CD68[用于巨噬细胞]的免疫组织化学)。

[0267] 使用在建立的疾病的数月内具有可忽略的死亡率的二次打击小鼠模型,和具有高血压、胰岛素抵抗和高脂血症的合并症的Dahl盐敏(DS)大鼠。与二次打击模型不同,高盐饮食的DS大鼠发展出具有高死亡率的严重和快速进行性疾病,使得能够使用存活作为终点。DS大鼠在上午6点到下午6点保持12小时亮/暗循环,并且不受限制地接近食物和水。将七周龄DS大鼠分配给低盐(0.3%盐;对照)或高盐饮食(8%盐)。在6至7周后,通过超声波心动描记术对动物进行表型分析,以确保和量化舒张功能障碍(E/A和E/e'比率),并寻找收缩功能障碍或LV扩张(我们的饲喂高盐饮食的DS大鼠的10%发展为HFrEF,其可以被排除)。在基线表型分析之后,使用上述给药方案(其将根据需要定制)用安慰剂或每个ncRNA治疗大鼠。在干预之后,跟随动物直到死亡或4周,无论哪一个更早(此时安慰剂大鼠的死亡率为50%)。在4周时再次使用超声波心动描记术对存活者进行彻底表型分析,之后将大鼠安乐死并去除心脏用于组织学。

[0268] 实施例8

[0269] 该非限制性实施例示出了在与巨噬细胞共培养中使用人同种异体CDC(临床相关的祖细胞群)在体外测定中评估损伤修饰生物活性的实验设计(图13)。

[0270] 来自两个用于临床使用合格的分组系的人CDC经受无血清条件和氧化应激(H_2O_2,75μmol/L,20min)以诱导细胞凋亡。然后,将应激的CDC与人巨噬细胞(HM)共培养24小时,所述人巨噬细胞已经暴露于本发明所述治疗性化合物(例如,TY4或其衍生物)或单独暴露于转染试剂。共培养6小时后,通过TUNEL测定定量CDC凋亡(TUNEL+CD105+细胞/总计CD105+细胞[%])。

[0271] 为了测试本发明所述治疗性化合物(例如,TY4或其衍生物)的直接作用,将化合物(或单独的转染试剂)在不加入HM的状态下直接暴露于CDC,并且定量细胞凋亡的差异。

[0272] 在一些实施方式中,用TY4和/或其衍生物治疗人巨噬细胞(HM)诱导或促进HM降低应激CDC中的细胞凋亡的能力。在一些实施方式中,用TY4和/或其衍生物治疗应激的CDC减少或抑制细胞凋亡。

[0273] 实施例9

[0274] 该非限制性实施例示出了测试不同制剂体内递送TY4和/或其衍生物的研究设计(图13)。

[0275] PEG包裹。使用2kDa聚乙二醇(PEG2000;30%v/v)和Dharmafect的混合物形成PEG-阳离子脂质复合物(PCLC)。参考先前的制备,使用5个冷冻/解冻循环(液氮/60℃)形成复合物。单次冷冻-解冻循环涉及将混合物在-190℃(液氮)冷冻5分钟,随后在60℃解冻5;通过将适当浓度的TY4(和/或其衍生物)与5μl PCLC混合至100μl的最终体积来制备TY4(和/或其衍生物)与PCLC的复合物。将制剂在室温下搅拌培养5分钟。

[0276] 在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)被配制为与PCLC的复合物。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的药物组合物包含TY4(和/或其衍生物)和PCLC。

[0277] 实施例10

[0278] 该非限制性实施例示出了包装到外泌体中的化学修饰的RNA的细胞摄取。

[0279] 将编码GFP的LNA修饰的mRNA加载到CDc-EV中。首先,产生含有修饰的mRNA的标准制剂脂质体。将修饰的mRNA-脂质体制剂与CDc-EV(从培养物中的人CDC调理的无血清培养基中分离)在37℃在摇床中混合30min。通过动态光散射测量的脂质体-外泌体复合物尺寸

分布(Nano Sight NS300)揭示了多个峰(图14A),指示异质群体。为了选择外泌体,使用抗CD9、抗CD63和抗CD81抗体(所有这些抗体靶向外泌体特异性表面蛋白)的免疫沉淀。如图14B所示,免疫沉淀剂显示单峰(直径120nm),是外泌体的特征。通过qPCR,GFP mRNA水平显著高于对照外泌体。将免疫沉淀的外泌体添加到培养物中的新生儿大鼠心肌细胞诱导GFP表达,如24小时后通过表荧光可以观察到(图14C),证实了来自负载到外泌体中的修饰的GFP mRNA的功能性转基因表达的能力。

[0280] 在一些实施方式中,将本发明的治疗性化合物例如TY4和/或其衍生物装载到外泌体中(图13)。在一些实施方式中,将本发明的治疗性化合物(例如,TY4或其衍生物)加载到CDC-EV中,并且使用免疫沉淀来选择CDC-EV。

[0281] 实施例11

[0282] 该非限制性实施例显示了测试不同给药途径以体内递送TY4和/或其衍生物的研究设计(图13)。

[0283] 体内研究。比较三种制剂(默认,PEG,外泌体),包含实施例9和10中所示的那些,的小鼠HFpEF模型中的疾病调节生物活性。如实施例7所示进行表型分析和末端分析。同样,如实施例7所示进行初始剂量的选择以及剂量和给药间隔的排列。一旦选择了优选的给药方案和制剂,就将使用实施例6中的方法评估生物分布。

[0284] 选择优选制剂时称重的标准可包含对心脏功能和血清生物标志物的治疗益处的大小、锻炼耐量和组织学益处(对纤维化和炎症)。

[0285] 在一些实施方式中,与常规转染试剂混合的TY4脂质体(和/或其衍生物)通过静脉内或口服给药向受试者体内递送治疗有效量的TY4(和/或其衍生物)。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的PEG包裹改善了静脉内递送之后类型4(和/或其衍生物)的脂质体和/或有效载荷递送和/或药代动力学的摄取。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的PEG包裹促进TY4(和/或其衍生物)的口服摄取。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的PEG包裹改善了静脉内递送之后类型4(和/或其衍生物)的脂质体和/或有效载荷递送和/或药代动力学的摄取。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的PEG包裹促进TY4(和/或其衍生物)的口服摄取。

[0286] 实施例12

[0287] 该非限制性实施例示出了用于口服给药的具有酪蛋白的CDC-EV的制剂。

[0288] 当口服给药时,可以吸收未改变的CDc-EV。酪蛋白,作为母乳中的显性蛋白可以增强吞入的CDc-EV的摄取和生物活性,改变血细胞中的基因表达并增强mdx(肌营养不良)小鼠中的肌肉功能。

[0289] 定量口服摄取。如上文在实施例11(Nano Sight)中所述对脂质体或EV进行计数。选择10^7粒子作为起始“剂量”。本发明所述治疗性化合物(例如,TY4和/或其衍生物)按原样施用或与8%酪蛋白的磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液混合。每种治疗性化合物制剂或酪蛋白溶液和每种治疗性化合物制剂的混合物在仅禁食18小时后通过口服灌胃被饲喂至HFpEF小鼠,并且与在只禁食18小时后单独饲喂PBS或单独饲喂8%酪蛋白溶液进行比较。在口服给予每个测试制品一小时后,从下腔静脉收集血液用于RNA提取。通过使用RNA分离方法通过qPCR测量全血中的治疗化合物水平来定量血液中的摄取。按照实施例6中的方法,将测量的PCR循环与通过将已知水平的TY4掺入小鼠血液中产生的标准进行比较。TY4来源于人特异

性序列,因此小鼠中的背景水平低于可靠PCR检测的极限。进一步表征的选择基于血液中的TY4的测量水平。如果通过对照的2个扩增循环[Ct]或更早通过qPCR检测到TY4,则可以认为制剂(无论是否具有酪蛋白)提供口服递送。在一些实施方式中,制剂通过qPCR提供了低于最接近的竞争者>3Ct的检测。可以进一步测试制剂的体内生物活性。

[0290] 体内生物活性。为了评估改变生物活性的疾病,使用小鼠HFpEF模型。在高脂饮食+L-NAME开始后5周开始,将每隔一天向HFpEF小鼠饲喂溶剂对照(PBS)和每个先进制剂(具有或不具有酪蛋白)。表型和末端分析遵循实施例7中的描述。一旦选择了优选的给药方案和制剂,就使用实施例6中的方法评估生物分布。

[0291] 在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)(在脂质体或CDC-EV中)与酪蛋白一起配制。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的药物组合物包含脂质体或CDC-EV和酪蛋白中的TY4(和/或其衍生物)。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的药物组合物包含脂质体或CDC-EV中的TY4(和/或其衍生物)和8%酪蛋白。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)(在脂质体或CDC-EV中)和酪蛋白(例如8%酪蛋白)的制剂促进TY4(和/或其衍生物)的口服摄取。

[0292] 实施例13

[0293] 该非限制性实施例示出了TY4在裘馨氏肌肉萎缩症模型中的治疗效果。

[0294] 每周给予10个月大的雌性mdx小鼠甲基化EV-YF1(Y RNAme),TY4或溶剂对照(图15)。每2周测量心脏和肌肉功能。

[0295] 与载体对照相比,用EV-YF1和TY4处理的mdx动物的锻炼耐量增加(图16A-16D)。虽然在EV-YF1处理的动物中增加的锻炼耐量是短暂的,在第二周和第四周附近达到峰值(图16B和16D),但是用TY4处理的动物显示从第二周到第八周锻炼耐量持续增加(图16C和16D)。

[0296] 与溶剂对照相比,在用EV-YF1和TY4治疗的mdx动物的骨骼肌中通过强直扭矩和抽搐扭矩改善测量的肌肉功能(图17A-17F,18A)。在对照动物中,肌肉功能在实验过程中稳定下降(图17A、17B、18A)。相反,EV-YF1和TY4治疗防止mdx动物肌肉功能恶化(图17B、17C、17E、17F、18A)。虽然在EV-YF1处理的动物中,强直扭矩随时间保持相对恒定(图17B、18A),但是用TY4处理的那些示出了随时间的强直扭矩增加(图17C、18A)。因此,就mdx动物的肌肉功能改善而言,TY4示出了比EV-YF1更大的治疗效果(图18A、18B;*$p<0.05$,**$p<0.01$)。

[0297] 在一些实施方式中,向患有肌营养不良症(例如,裘馨氏肌肉萎缩症)的受试者给予TY4治疗肌营养不良症或其一种或多种症状。在一些实施方式中,向患有肌营养不良症(例如,裘馨氏肌肉萎缩症)的受试者给予TY4改善了锻炼耐量。在一些实施方式中,向患有肌营养不良症(例如,裘馨氏肌肉萎缩症)的受试者给予TY4在持续时间段改善了锻炼耐量。在一些实施方式中,向患有肌营养不良症(例如,裘馨氏肌肉萎缩症)的受试者给予TY4在给药期间改善了锻炼耐量。在一些实施方式中,向患有肌营养不良症(例如,裘馨氏肌肉萎缩症)的受试者给予TY4改善了骨骼肌功能。在一些实施方式中,向患有肌营养不良症(例如,裘馨氏肌肉萎缩症)的受试者给予TY4防止骨骼肌功能劣化。在一些实施方式中,给予患有肌营养不良症(例如,裘馨氏肌肉萎缩症)的受试者的TY4的治疗效果的持续时间和/或效果大于EV-YF1的治疗效果。在一些实施方式中,给予患有肌营养不良症(例如,裘馨氏肌肉萎缩症)的受试者的TY4的治疗效果比EV-YF1的治疗效果更持续。

[0298] 实施例14

[0299] 以下材料和方法用于实施例15至22。

[0300] 实验动物

[0301] 所有研究软件在西达-赛奈医学中心根据机构动物护理和使用委员会指南执行。

[0302] 射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)小鼠模型。

[0303] 从Charles River实验室获得八至十周龄的雄性C57BL/6小鼠。将小鼠置于12:12-时黑暗周期的控制下,并不受限制地接触食物(2916,Teklad for Control groups and D12492,Research Diet for High Fat Diet groups)和水。调节pH至7.4后,在饮用水中加入L-NAME(Nω-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐,N5751,Milliporeσ0.5g/l)。

[0304] 血压分析:在有意识的小鼠中使用BP-2000(Visitech System)非侵入性地测量收缩压和舒张压。将小鼠置于37度温度下的各个支架中。每期记录血压至少20次。

[0305] 超声波心动描记术:使用Vevo 3100(Visual Sonics)在全身麻醉下通过经胸超声心动描记术评估心脏功能和形态。使用脉冲波和二尖瓣水平处的组织多普勒成像执行用于舒张功能测量的心尖四腔切面。在超声心动描记术期间,控制小鼠的体温并将异氟烷降低至1.0%以下并调节以将心率维持在420bpm至470bpm的范围内。

[0306] 大鼠缺血/再灌注模型:I/R模型,心室内和眼球后静脉注射。所有大鼠均饲养在无病原体的设施中(笼子垫料:Sani-Chips,PJ Murphy),14小时/10小时光照/黑暗循环,食物(PicoLab Rodent Diet 20[编号:5053],Lab Diet)和水自由供给。在体内,对7至10周龄雌性Wistar-Kyoto(Charles River Labs,Wilmington,MA)进行实验方案。为了诱导缺血性损伤,给大鼠提供全身麻醉,然后在第四肋间空间进行胸廓切开术以暴露心脏和左前降(LAD)冠状动脉。然后使用7-0丝缝合线来结扎左前降冠状动脉,其随后在45分钟后移除以允许再灌注20分钟。将配制有DharmaFECT转染试剂(Horizon Discovery)的溶剂对照(仅PBS)、TY4(0.15μg/g)、TY4乱码(0.15μg/g)注射到眼球后空间中。

[0307] 大鼠梗塞面积测量:I/R损伤后两天,将10%KCL注射到LV中以阻止心脏舒张。然后,获取心脏,在PBS中洗涤,然后在梗塞区上方从顶点到底部切成1mm切片。将切片与1%的2,3,5-三苯基-2H并四氮唑氯化物溶液(TTC,Sigma-Aldrich))在37℃在黑暗中孵育30分钟,并用PBS洗涤。然后,将切片成像并称重。从活组织(红色)描绘梗塞区(白色)并分析(ImageJ软件)。根据以下公式计算组织切片中的梗塞质量:(梗塞面积/总面积)/重量(mg)。

[0308] 心脏肌钙蛋白I ELISA:在24小时(从尾静脉)或研究终点(从心脏)在EDTA管中从动物收集血液。在4℃保持不受干扰30分钟后,在4000rpm离心15分钟后获得血浆。根据制造商的方案,使用RAT心肌肌钙蛋白-I ELISA试剂盒(Life Diagnostics)定量心肌肌钙蛋白I。

[0309] 猪缺血/再灌注模型:在成年雌性迷你猪Yucatan中诱导心肌梗塞。登记相似大小(30kg至35kg)的年龄匹配动物。标准球囊血管成形术导管(TREK)在左前降(LAD)动脉的近侧三分之一处被推进到第一对角线分支的远侧。球囊膨胀90分钟,随后再灌注48小时。再灌注后三十分钟动物接受0.15μg/g的TY4、乱码或溶剂(盐水)对照。在再灌注后48小时进行心脏MRI。使用龙胆紫、硫黄素T和氯化三苯四氮唑(TTC)染色测定梗塞面积。该研究在西达-赛奈医学中心根据机构动物护理和使用委员会指南的方案上进行。

[0310] 裘馨氏肌肉萎缩症:对8周龄Mdx动物(和健康野生型,年龄匹配)给予口服输注TY4

或溶剂对照(0.15μg/g,每周两次)八周。

[0311] 小鼠硬皮病模型:野生型小鼠接收皮下注射硫酸博莱霉素三周,然后每两周口服TY4、乱码或溶剂对照(0.15μg/g,每周两次)四周。

[0312] 锻炼耐力测试

[0313] 将小鼠以5度高度放置在Exer-6啮齿动物跑步机(Columbus Instruments)内。首先,速度增加到5m/min持续2min,速度保持10m/min持续5min。然后将速度增加到2m/2min直到小鼠力竭。力竭被定义为小鼠不能从震动网格返回10秒。

[0314] 蛋白质印迹

[0315] 通过在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(78442,Thermo Scientific)的RIPA缓冲液(89900,Thermo Scientific)中裂解来制备来自小鼠组织的蛋白质提取物。分离蛋白质样品(归一化值在10μg至30μg之间)用于凝胶电泳(NUPAGE 4%至12%Bis-Tris凝胶,NP0336 Thermo Fisher Scientific)并使用Trans-Blot Turbo Transfer System,Bio-Rad转移至硝化纤维素膜。用以下第一抗体检测蛋白质:p21(ab109199,abcam)和GAPDH(3683S,Cell Signaling technology)。

[0316] RNA分离和qPCR

[0317] 使用RNeasy plus试剂盒(74136,QIAGEN)和Maxtract High density(129056,QIAGEN)从小鼠组织提取总RNA。根据制造方案使用高容量cDNA逆转录试剂盒(4368813,Applied Biosystems)从RNA合成cDNA。使用以下TaqMan基因表达测定探针:IL-6(Mm00446190_m1)、IL1-b(Mm00434228_m1)、p21(Mm00432448_m1)进行三次实时PCR(Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR system;Thermo Fisher Scientific)并通过ddCt方法进行分析。

[0318] RNA测序

[0319] 如前所述,在西达-赛奈Genomics Core对细胞和组织RNA样品进行测序。使用Illumina NextSeq500平台分析总RNA。

[0320] 骨细胞分离、巨噬细胞分化和激活

[0321] 从7至10周龄Wistar Kyoto大鼠中分离出股骨。通过用PBS(含有1%FBS、2mM EDTA)冲洗然后通过70μm网孔过滤来分离骨髓。将红细胞用ACK缓冲液(A1049201,Invitrogen)溶解,然后重悬于含有10ng/ml M-CSF(RP8643,Fisher Scientific)的IMDM(Gibco)中进行接种。每2-3天交换培养基直至第七天,此时获得骨髓衍生的巨噬细胞(BMDM)。使用DharmaFect1用YRNA(80nM)转染BMDM。对于LPS暴露,用溶剂对照TY4(80nM)、TY4乱码对照(80nM)预处理巨噬细胞3小时,随后暴露于脂多糖(10ng/ml;Cayman Chemical)。

[0322] 酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0323] 使用以下ELISA试剂盒分析IL-6和BNP血浆水平:根据制造商的说明书,小鼠IL-6Quantikine ELISA试剂盒(M6000B,R&D systems),小鼠BNP EIA(EIAM-BNP-1,RayBiotech)。

[0324] 过夜孵育后,洗涤细胞并收集用于使用RNeasy plus试剂盒提取RNA。

[0325] 通过qPCR的TY4的生物分布

[0326] 通过眼球后注射给予TY4并且在给药后30分钟收集血液和组织。使收集的血液在

室温下凝结2小时,然后在2000xg下离心20分钟。

[0327] 统计分析

[0328] 包含样品数量(n)、描述性统计(平均值和标准偏差)和显著性的统计参数在附图和附图图例中报告。使用Student t检验或方差分析检查组之间的差异的统计学显著性。p值<0.05的差异被认为是显著的。

[0329] 参考文献

[0330] 1Marban,E.A mechanistic roadmap for the clinical application of cardiac cell therapies.Nat Biomed Eng 2,353-361,doi:10.1038/s41551-018-0216-z(2018).

[0331] 2Smith,R.R.et al.Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens.Circulation 115,896-908,doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655209(2007).

[0332] 3 McDonald,C.M.et al.Repeated intravenous cardiosphere-derived cell therapy in late-stage Duchenne muscular dystrophy(HOPE-2):a multicentre,randomised,double-blind,placebo-controlled,phase 2 trial.Lancet 399,1049-1058,doi:10.1016/S0140-6736(22)00012-5(2022).

[0333] 4 Taylor,M.et al.Cardiac and skeletal muscle effects in the randomized HOPE-Duchenne trial.Neurology 92,e866-e878,doi:10.1212/WNL.0000000000006950(2019).

[0334] 5 Ibrahim,A.G.,Cheng,K.&Marban,E.Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy.Stem Cell Reports 2,606-619,doi:10.1016/j.stemcr.2014.04.006(2014).

[0335] 6 Walravens,A.S.et al.Mechanistic and therapeutic distinctions between cardiosphere-derived cell and mesenchymal stem cell extracellular vesicle non-coding RNA.Sci Rep 11,8666,doi:10.1038/s41598-021-87939-9(2021).

[0336] 7 de Couto,G.et al.Exosomal MicroRNA Transfer Into Macrophages Mediates Cellular Postconditioning.Circulation 136,200-214,doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024590(2017).

[0337] 8 Cambier,L.et al.Y RNA fragment in extracellular vesicles confers cardioprotection via modulation of IL-10 expression and secretion.EMBO Mol Med 9,337-352,doi:10.15252/emmm.201606924(2017).

[0338] 9 Cambier,L.et al.Angiotensin II-Induced End-Organ Damage in Mice Is Attenuated by Human Exosomes and by an Exosomal Y RNAFragment.Hypertension 72,370-380,doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11239(2018).

[0339] 10 Huang,F.et al.Exosomally derived Y RNAfragment alleviates hypertrophic cardiomyopathy in transgenic mice.Mol Ther Nucleic Acids 24,951-960,doi:10.1016/j.omtn.2021.04.014(2021).

[0340] 11 Egli,M.&Manoharan,M.Re-Engineering RNAMolecules into Therapeutic Agents.Acc Chem Res52,1036-1047,doi:10.1021/acs.accounts.8b00650(2019).

[0341] 12 Mathews,D.H.et al.Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNAsecondary structure.Proc Natl Acad Sci U S A 101,7287-7292,doi:10.1073/pnas.0401799101(2004).

[0342] 13 Shah,S.J.et al.Research Priorities for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction:National Heart,Lung,and Blood Institute Working Group Summary.Circulation 141,1001-1026,doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041886(2020).

[0343] 14 Hieda,M.et al.Increased Myocardial Stiffness in Patients With High-Risk Left Ventricular Hypertrophy:The Hallmark of Stage-B Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.Circulation 141,115-123,doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040332(2020).

[0344] 15 Sweeney,M.,Corden,B.&Cook,S.A.Targeting cardiac fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction:mirage or miracle?EMBO Mol Med 12,e10865,doi:10.15252/emmm.201910865(2020).

[0345] 16 Sabbah,M.S.et al.Obese-Inflammatory Phenotypes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.Circ Heart Fail 13,e006414,doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006414(2020).

[0346] 17 Schiattarella,G.G.et al.Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction.Nature568,351-356,doi:10.1038/s41586-019-1100-z(2019).

[0347] 18 Ibrahim,A.G.E.et al.Augmenting canonical Wnt signalling in therapeutically inert cells converts theminto therapeutically potent exosome factories.Nat Biomed Eng 3,695-705,doi:10.1038/s41551-019-0448-6(2019).

[0348] 实施例15

[0349] 如以上实施例3中所讨论的,TY4衍生自EV-YF1,其中TY4在其5′端处包含一处突变(G至C);以及在加下划线的残基处的六个锁核酸(LNA)修饰(图3)。作为对照,创建了含有与TY4相同以及含有相同位置处的6个LNA但随机顺序的核苷酸的乱码版本(底行)。在TY4结构的计算机预测[12]中,显示中断的茎环结构和由3′和5′形成的外环;由TY4在骨髓来源的巨噬细胞中诱导的深远转录组学变化,如图4B所示。也在图19C以不同的格式表示。如图4C所示,除了提高IL10表达之外,还观察到在与炎症(图19D)、纤维化(图19E、图20A、20B)、肥厚(图19F)相关的通路中基因表达的显著变化。潜在上游调节剂的分析鉴定了TY4诱导的Hippo/Yap通路的抑制(图19G)和Erk/Map激酶通路(图19H)。这些广泛的变化进一步表现为改变的组蛋白修饰基因表达,包含去乙酰化酶和甲基转移酶(图20C),其结果在改进的组蛋白ELISA阵列中是明显的(图20D)。这些发现揭示了对控制炎症、肥厚和纤维化的主调节剂和下游信号的影响。作为基本作用的进一步证据,与溶剂对照或乱码相比,暴露于TY4的巨噬细胞表现出对细胞周期抑制剂p21(图19I)、炎症小体信号传导(IL-1b;图19J)和炎症(分别为NFkB和IL6;图19K,19L)的抑制。

[0350] 实施例16

[0351] 如实施例5所述的,以及提供的附加结果分析,该非限制性实施例示出了TY4在具有射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)模型中的治疗效果。

[0352] 具有射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)是系统性疾病[13],对于常规治疗是不难理解的,并且由心脏肥大[14]、纤维化[15]和炎症[16]标记。考虑到TY4似乎抑制所有这些过程,研究了高脂肪饮食和L-NAME[17]诱导的HFpEF小鼠模型中的TY4。5周后,当HFpEF的迹象明显时,以各种给药频率(每两周、每周和每周两次;0.15μg TY4/g体重/剂量)静脉内(IV)给予TY4,并将结果与静脉内溶剂对照进行比较(图21A)在单次静脉内剂量后三十分钟,在肝和心脏中的背景以上检测到TY4(图22A)。TY4对HFpEF的各种关键表现具有严重影响,包含舒张功能障碍(超声心动图参数E/e′越高,心脏功能越差;图21B),锻炼耐力(图21C)和循环BNP(心力衰竭标志物;图21D)和IL6(炎性细胞因子;图21E)。如HFpEF中所预期的(图22B),在给药10周后,所有组具有正常的射血分数(如来自对照、溶剂对照和TY4处理组的代表性样品所示)。接受TY4的组还具有较低的血压(收缩血压具有比舒张血压更一致的降低;图22C和22D)。虽然所有给药方案对舒张功能和血清生物标志物都是有效的,但是仅使用每周一次或每周两次的TY4改善了锻炼耐力(图21C)。给予不含转染试剂的TY4消除其生物活性(舒张功能没有变化[图22E]、锻炼耐力[图22F],或循环BNP水平[图22F]。因此,TY4逆转HFpEF的系统和心脏表现。

[0353] 先天免疫应答的非特异性诱导可以适度改善心脏功能。因为TY4的注射可能激活先天免疫,所以我们将TY4不与溶剂对照进行比较,而是与具有相同核苷酸含量的TY4的乱码版本进行比较(参见图19A。图32,左图,示出了在所有测试的组中EF是相似和正常的。图32,右图,示出了接受Scr的小鼠产生与溶剂对照相似的舒张功能障碍(与图8D比较)与接受TY4的小鼠不同。因此,乱码(Scr)未能校正HFpEF小鼠中的舒张功能障碍,而TY4可以。

[0354] 实施例17

[0355] 由于在HFpEF小鼠中TY4的益处,心脏组织的RNA测序显示TY4广泛重置基因表达(热图,图24A),其包含与结构相关的基因家族的归一化(图23A),规范Wnt信号传导(图23B),钙处理(图23C),电再极化(图23D),和溶质载体家族的膜转运蛋白(图23E)。包含p21/Map激酶通路的上游调节剂的归一化(图24B)与包含管腔内ER应激感应器(图24C)、炎症小体(图24D)和炎症介质(图24F)的关键细胞应激通路的减少相关。先前在巨噬细胞中鉴定的TY4诱导的p21基因表达降低(图19I)在HFpEF心脏中甚至更深远(图24F)并且在蛋白质水平确认(图24G)。不仅在心脏中抑制p21,而且在TY4处理的动物的肺、肝、脾、肾和血清中抑制p21(转录物,图25A-25D;蛋白质,图25E)在TY4处理的巨噬细胞中抑制的染色质修饰基因中(图20C),Smyd4是p21介导的应激的增强剂。发现了在TY4处理的HFpEF心脏中与p21信号传导(Prdm2)抑制相关的另一种组蛋白甲基转移酶(Prdm2)和Smyd4一致转录物(图25G)。然而,在这两者中,只有Smyd4在蛋白质水平被抑制(图24I;cf.Prdm2,图25H)由于TY4的大小与微小RNA和siRNAs的大小相当,我们测试了TY4是否结合非翻译区(UTR)3′以类似地转录调节这些基因。来自HEK293细胞中的荧光素酶3’UTR测定的结果表明,TY4不介导p21或Smyd4的转录抑制,使得另一机制必须起作用(图24J)。

[0356] 实施例18

[0357] 实施例18-21是示出了TY4在心肌梗塞、肌营养不良和硬皮病的模型中是有效的非限制性实施例。

[0358] 鉴于TY4在HFpEF中的显著的疾病调节作用,无论TY4是否能够发挥急性心脏保护作用,研究了慢性疾病。在心肌梗塞的大鼠模型中(图26A),与溶剂对照或乱码对照相比,在再灌注后20分钟单个静脉内剂量的TY4(0.15μg/g)降低了循环心肌肌钙蛋白水平(图26B)和疤痕尺寸(图26C,26D)。

[0359] 实施例19

[0360] 为了扩大临床相关性,研究了心肌梗塞的猪模型(图27A)。如在大鼠中,在心肌梗塞后48小时,与溶剂对照组或乱码组相比,再灌注后的TY4的单次静脉内输注导致保留的全局功能(射血分数,图27B)和减小的疤痕尺寸。

[0361] 实施例20

[0362] 该非限制性实施例示出了如实施例13所述的裘馨氏肌肉萎缩症模型中的TY4的治疗效果,并提供了对结果的附加分析。

[0363] DMD是在心脏和骨骼肌中诱导肌肉损失、炎症和纤维化的遗传疾病。在DMD的mdx小鼠模型中,与对照或乱码相比,每周两次静脉内输注TY4(图28A)改善了射血分数(图28B),并且增加了锻炼耐力(图28C;图16A和16C)。对比目鱼肌的分析证明纤维化减弱(图28E,28F)和增加的强制强直(图28D;图17A和17C)。

[0364] 实施例21

[0365] 硬皮病是自身免疫性疾病,表现为进行性皮肤增厚以及皮肤、心脏和肺纤维化。为了模拟硬皮病,在3周内皮内注射博来霉素,随后注射4周的TY4、乱码或溶剂对照(图29A)。如通过羟脯氨酸含量(图29D)测量的,TY4减少皮肤增厚和皮肤纤维化,改善了锻炼耐力(图29B),归一化的肺重量与体重的比率(图29C),并且减弱重量损失。

[0366] 因此,实施例18-21证明,TY4对如缺血、肌变性和自身免疫等不同的病理过程非常有效。此外,这些实施例与TY4抑制肥厚和促纤维化级联的模型一致(图30)。

[0367] 实施例22

[0368] 该非限制性实施例示出了用于评估TY4活性的体外测定,并且证明了由TY4对骨髓来源的巨噬细胞的预处理减弱了如促炎基因表达所示LPS介导的促炎活化。

[0369] 使用原代BMDM激活测定评估TY4活性。将BMDM暴露于脂多糖(LPS)以刺激炎症反应。从野生型小鼠股骨中分离出单核细胞。通过暴露于巨噬细胞集落刺激因子(MCSF)五天,然后与80nM TY4、溶剂对照(盐水;阴性对照),或JSH23(NFkB的小分子抑制剂;阳性对照)共培养3小时来产生BMDM。然后将BMDM暴露于LPS,并且12小时后分离RNA用于基因表达分析。与溶剂对照组相比,LPS刺激的BMDM暴露于TY4促进IL10和减弱炎症标志物NOS2(图31A)、IL6(图31B)、IL1b(图31C)、IL2b(图31D)的分泌。

[0370] 实施例23

[0371] 该非限制性实施例示出了如实施例4所述的HCM模型中的TY4的治疗效果,并提供了对结果的附加分析。该非限制性实例示出了静脉内TY4减少心脏肥大和全身性炎症,同时改善肥厚性心肌病的小鼠模型中的锻炼耐力。

[0372] 为了评估目标指征中TY4的疾病修饰生物活性,如实施例4所述,使用模拟特别致死的人HCM突变的HCM转基因$cTnI^{146Gly}$小鼠。超声波心动描记术揭示了室间隔(IVS)厚度的显著减小(图33A)通过脉冲波多普勒(PW,图33B)测量的减小的流出速度,增加的锻炼耐量(距离,图33C)图4,和心力衰竭(HF)的循环生物标志物水平的降低(BNP;图33D)。所有这些

参数是疾病相关的:IVS厚度作为肥厚的直接测量,PW作为心室可以多好地喷射血液的指标,距离作为整体物理容量的综合测量,以及BNP作为HF的生物标记。因此,TY4在HCM模型中是高度治疗性的。

[0373] 实施例24

[0374] 该非限制性实施例示出了TY4的静脉内和口服制剂。

[0375] 研究级TY4由Integrated DNA Technologies(IDT,Inc.)商业合成。对于转染和静脉内(IV)制剂,将RNA寡核苷酸与Dharmafect(Perkin Elmer)(用于转染小RNA的阳离子脂质)混合。将TY4与Dharmafect以20ng RNA/1μL Dharmafect的比例混合,并填充至终体积为100μL无血清培养基。将溶液涡旋15秒(总共搅拌3次)并在室温下保持5分钟以形成RNA-转染复合物(图34,静脉内-TY4)。这包含体外制剂以及TY4的静脉内制剂。

[0376] 对于口服制剂,将TY4-Dharmafect复合物进一步包封在酪蛋白-壳聚糖胶束中。这通过首先将5%牛酪蛋白溶液以体积比1:10添加到TY4-Dharmafect溶液中并在室温下孵育15分钟来实现。为了沉淀酪蛋白并形成包封TY4-Dharmafect的壳聚糖-酪蛋白胶束,加入等体积的0.1%乙酸溶液/0.2%壳聚糖溶液。使混合物在室温下孵育1小时,并代表口服制剂(图34,口服-TY4)。

[0377] 实施例25

[0378] 该非限制性实施例显示了在MI模型中口服给予TY4的治疗效果。

[0379] 为了评估治疗性核酸的口服递送的有效性,通过冠状动脉左前降支的开胸闭塞45分钟,然后再灌注来模拟小鼠中的心肌梗塞。然后闭合胸部。再灌注后20分钟,给予小鼠溶剂对照或由本发明所提供的由脂质包封的治疗性RNA组成的IV组合物,或包含包封在脂质胶束中并用酪蛋白-壳聚糖涂覆的治疗性RNA的口服组合物。这里使用的核酸有效载荷的非限制性实施例是TY4。心肌梗塞后48小时切除心脏,并通过组织学方法定量梗塞面积(IS)。

[0380] 图35A示出了了与梗塞面积相关的汇总数据。如图所示,IV和口服组合物都导致梗塞面积减小。值得注意的是,TY4的口服递送示出了梗塞面积的进一步减小。每组的代表性左心室切片显示在图35B中,其中口服治疗的组示出了明显较少的梗塞疤痕。作为心脏损伤的标志物,图35C示出了口服给药的TY4与对照相比产生显著降低。总之,组织学和肌钙蛋白I的数据相互加强示出了口服递送的TY4的心脏保护功效。

[0381] 进一步建立这些发现,图35D和35E中示出了附加的比较分析。图35D示出了容纳在根据本发明公开的实施方式的组合物中的IV注射TY4(或其扩充形式)或口服给药的TY4(例如,用酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束)。本发明的附加组包含包封在胶束中的口服TY4,所述胶束仅涂覆有酪蛋白(无壳聚糖)。图35D的数据增强了上面讨论的关于口服递送治疗性RNA的发现,但也证明,根据优选的实施方式,脂质胶束被酪蛋白和壳聚糖两者涂覆。图35D右侧的实验组是仅涂覆有酪蛋白的包封RNA的胶束。该组的梗塞面积显著增加,表明TY4的生物利用度降低,这被认为是由于在胃的低酸环境中对组合物的保护不太稳健而导致的。图35E示出了与测量心肌肌钙蛋白I有关的功效下降较少,但是仅涂覆酪蛋白的制剂似乎至少趋向于升高的浓度(较少治疗效果)。总之,这些数据支持使用如本发明在一些实施方式中提供的酪蛋白-壳聚糖涂层口服递送的TY4的心脏保护功效。

[0382] 实施例26

[0383] 该非限制性实施例显示包封在脂质胶束中并且用酪蛋白-壳聚糖复合物涂覆的

TY4的口服制剂改善硬皮病的症状。

[0384] 如本发明所提供的,实施例21中描述的硬皮病模型用于使用配置用于口服递送TY4的组合物处理动物。将TY4包封在涂覆有酪蛋白-壳聚糖的脂质胶束中并口服递送。使用乱码RNA序列的口服递送(在相同递送组合物中)作为对照。

[0385] 图36A示出了与跑步机上的耐力测试相关的数据。如图所示,口服递送治疗性RNA导致未处理的对照小鼠的耐力完全恢复,PBS对照和乱码RNA序列对照各自显示耐力显著降低。图36B示出了,口服递送治疗性RNA允许小鼠维持体重,使得其于对照没有显著性差异。图3C示出了心脏指数(HI),其将心脏重量与每组小鼠的体重相关联。如非治疗性组的体重降低所预期的,这些组表现出升高的HI。而且,心脏重量的增加(例如,由于纤维化)也可以解释为是增加HI的一个方面。同样地,当测量肺指数(PI)(其将肺重量作为体重的函数进行指数)时,口服递送的治疗性RNA与非治疗性组相比导致显著降低的PI(尽管PI仍然高于对照)。图36E示出了单独的肺重量数据,其对应于PI数据。

[0386] 具体地,对于心脏测量,图37A示出了与纤维化相关的组织学数据。最上面的行用对应于第二行中提供的放大视图的虚线框示出代表性组织染色。口服递送的治疗性RNA示出了组织的纤维化大大降低。图37B示出了每组的纤维化定量,表明治疗性RNA的口服递送导致显著减少的心脏纤维化。对于影响皮肤的硬皮病的症状,图37C和37D涉及皮肤的纤维化。图37C示出了与皮肤相关的组织学数据,其中左上示出了对照皮肤,右上示出了溶剂对照,左下示出了乱码RNA,以及右下示出了口服递送的TY4 RNA。作为治疗性RNA的非限制性实例,口服递送的TY4 RNA与非治疗组相比导致皮肤明显更少的增厚/纤维化。图37D用每组的皮肤厚度图证实了这一点,其中口服递送的治疗性RNA没有导致皮肤厚度与对照显著不同。

[0387] 关于各种炎性细胞因子的表达水平进行另外的研究。图38A-38F显示了与IL1-B(38A)、IL-6(38B)、TGFβ(38C)、NLRP3(38D)、p21(38E)和IL-4(38F)的定量相关的qPCR数据。当给予口服递送的TY4 RNA时,这些细胞因子中的每一种等同于或显示表达仅适度增加。因此,这些数据支持口服递送TY4 RNA以减少纤维化和/或炎性疾病,例如硬皮病的继发或症状的功效。

[0388] 实施例27

[0389] 该非限制性实施例示出了TY4,特别是口服给予的TY4在具有射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)模型中的治疗效果。

[0390] 进一步研究实施例5中所述的HFpEF模型中口服给予TY4的治疗效果。评估动物的循环血糖浓度。如图39A所示,与对照相比,单独用溶剂对照治疗导致血糖浓度升高。根据本发明公开的实施方式的TY4的口服给药导致循环血糖水平的显著降低,这可能与HFpEF相关的肥胖相关。图39B示出了在溶剂对照治疗的小鼠中的脂肪积聚。如在接受TY4的口服给药的最右边的小鼠所示,脂肪积聚减少。

[0391] 这些数据与实施例5组合进一步增强了口服递送的组合物TY4可以有效地处理HFpEF。在一些实施方式中,当口服给药时,本发明提供的组合物和方法可以有效地减少炎症和/或纤维化,或疾病的症状。

[0392] 实施例28

[0393] 该非限制性实施例示出了包封在脂质胶束中并且用酪蛋白-壳聚糖复合物涂覆的

TY4的口服制剂改善肌营养不良的症状。

[0394] 为了确定口服递送的TY4的作用,每周两次,持续8周给12-14个月大的雌性mdx小鼠被饲喂TY4(0.15μg/g体重)或对照。在喂养之前(即基线)和在8周研究终点测量心脏和骨骼肌功能。解剖心脏和胫骨前肌(TA)并处理用于Masson′s三色染色以定量间质纤维化。

[0395] 如图40A所示,对轻度麻醉的mdx小鼠进行经胸超声心动描记术以测量左心室射血分数(EF)。在基线处,在组之间没有检测到差异。8周后,接受治疗性RNA的口服给药实施例TY4的mdx相对于溶剂对照具有较高的EF,溶剂对照在研究过程中具有下降的EF。如图40B所示,Masson′s三色显微照片和汇总数据(右子图)示出了接受口服给予TY4的mdx小鼠比溶剂对照小鼠具有更少的心肌纤维化。对于通过将mdx小鼠的脚附接到铝鞋(其被附接到力传感器的伺服马达)并刺激左腓总神经来记录前腿肌肉的体内肌肉功能,其中胫骨前(TA)产生该肌肉群的扭矩输出的85%。在200Hz下记录强直扭矩。在基线处,在组之间没有检测到差异(参见图40C)。8周后,接受口服给予TY4的mdx小鼠比溶剂对照小鼠产生更多的扭矩。图40D涉及肌肉纤维化并显示Masson′s三色显微照片和汇总数据(右子图)。这些数据表明,接受口服给予TY4的mdx小鼠比溶剂对照小鼠具有更少的肌肉纤维化。图40E总结了收集的生理数据,其表明存在更大的肌纤维计数(每mm^2)。

[0396] 收集的功能数据进一步支持通过使用包封治疗性RNA并用酪蛋白-壳聚糖复合物包被的脂质胶束递送口服给药的TY4的功效。图40E显示,除了降低的间质纤维化(图40C、40D)之外,通过使用包封TY4的脂质胶束递送的方式口服给予TY4提高了TA中肌纤维的数量。在功能测定(图9F-9H)中证实了这种生理效果,所述功能测定分别显示在接受通过使用脂质胶束包封治疗性RNA的递送来口服给予TY4的动物中增强锻炼能力、心脏功能和肌肉功能。使用双因素方差分析(two-way ANOVA)或独立样本t检验来确定组之间的统计学显著性。*P<0.05,**P<0.01。数据表示为平均值±标准误(mean±SEM)。

[0397] 这些数据进一步支持口服给予的TY4通过使用脂质胶束包封TY4并用酪蛋白-壳聚糖复合物涂覆的递送的功效。在一些实施方式中,通过口服给药递送TY4的此类组合物导致RNA的生物利用度增加,这进而导致炎症和/或纤维化引起的疾病(诸如肌营养不良症)的治疗结果增强。

[0398] 实施例29

[0399] 该非限制性实施例示出了小鼠骨髓来源巨噬细胞中TY4的体外效力测定(图41A)。

[0400] 实验设计

[0401] 基于机理研究,TY4至少部分通过靶向包含p21的促纤维化通路发挥其治疗效果(图24F,24G)。这作为TY4抑制Smyd4的直接结果而发生,已知HMT的活性上调p21。此外,如p21、NFkB和IL6的抑制所示,p21抑制重述TY4的免疫调节作用。因此,开发了体外和离体效力测定以证实各种TY4批次和制剂的生物活性。临床前研究揭示,TY4导致注射动物血浆中p21的下调(图25E)。鉴于这些发现,效力测定集中于小鼠原代BMDM中的p21。

[0402] 方法

[0403] BMDM得自成年FVB小鼠的骨髓(使用M-CSF分化方法)。将细胞暴露于转染试剂Dharmafect中的20nM、40nM、80nM和160nM TY4、相同浓度的乱码对照序列(具有与TY4相同的核苷酸含量和修饰,但以随机序列)、溶剂对照(仅Dharmafect)和仅盐水对照。3小时后,用10ng/ml LPS攻击细胞18小时,然后分离RNA和蛋白质用于qPCR和ELISA以分别定量p21信

使和蛋白质。

[0404] 结果和替代方法

[0405] 炎性BMDM暴露于TY4导致p21 mRNA和蛋白质水平的下调(反映为损伤组织中看到的变化)(图24F,24G)和LPS激活的BMDM;图31A-31D)。LPS激活的BMDM中的附加数据显示通过TY4(或通过uc2288,细胞可渗透的p21抑制剂)而不是通过乱码来抑制p21(图41B-41D)。预暴露于TY4或p21抑制剂(uc2288)的BMDM显示p21的抑制(图41B)和LPS暴露后(n=4个生物重复/组)的炎症标志物NFkB(图41C)和IL6,通过单因素ANOVA与Tukey检验后进行分析以进行多次比较。因此,p21抑制低于TY4治疗生物活性。

[0406] 任选地,细胞因子混合物暴露用于更接近地模拟HFpEF组织的慢性炎性环境(其中首先观察到p21下调)。为了激活BMDM并增加其基础p21水平,巨噬细胞在白介素6(IL6)、肿瘤坏死因子(TNF)和白介素1b(IL1b)中调节。

[0407] 实施例30

[0408] 该非限制性实施例示出了评估口服TY4效力的离体模型(图41A)。

[0409] 实验设计

[0410] 离体测定可以补充体外效力测定,以确认活体模型中TY4的生物活性并确保口服药物制剂的有效性。离体测定包含在健康小鼠中给予口服-TY4,随后分离BMDM以确认p21下调。

[0411] 方法

[0412] 野生型FVB 7-10周龄的健康雄性小鼠和雌性小鼠通过灌胃随机接受口服-TY4、口服-乱码、溶剂对照(仅口服制剂)或盐水。口服-TY4或乱码的剂量是定义为临床前的剂量0.15μg/g。在口服灌胃后12小时和24小时处死动物。使用实施例中描述的体外模型的方法从骨髓中分离BMDM;从小鼠BMDM中分离RNA和蛋白质以证实成功下调p21。

[0413] 结果和替代方法

[0414] 任选地,在TY4摄取后3小时将小鼠在体内暴露于LPS以上调p21。小鼠使用26号针腹膜内注射200μL无菌盐水中的亚致死剂量LPS。任选地,动物接受直接静脉内(通过r.o.注射)输注TY4。

[0415] 如果即使在LPS攻击之后也未能发现响应于TY4的p21变化,则我们将通过添加动物接受直接静脉内(通过r.o.注射)的研究的臂来排除与药物递送相关的挑战以确保药物产品的递送。任选地,使用HCM疾病模型(模型2,FVB-cTnI^{Gly146})(参见实施例4、23)。

[0416] 实施例31

[0417] 该非限制性实施例示出了优化用于向HCM小鼠口服递送TY4的给药策略,包含确认口服配制的TY4在HCM中的生物活性(图42)。

[0418] 使用在其它模型中使用的相同给药范例和制剂(HFpEF:实施例5、27,MI:实施例25,DMD:实施例28)确认在HCM的小鼠模型中口服给予TY4的功效。

[0419] 实验设计和方法

[0420] 通过超声心动图在第0天评估雄性和雌性4周龄cTnI^{146Gly}小鼠的舒张末期室间隔(IVS)厚度(IVSd)以确认病理发作。动物被随机化以每两周一次接受口服-TY4(0.15μg/g)、口服-乱码序列(0.15μg/g)、静脉内TY4(0.15μg/g;作为阳性对照),和静脉内盐水对照。治疗后一个月(总共8次给药),使用脉冲波多普勒评估动物的舒张末期室间隔厚度(IVSd)和

血液速度的变化。为了更广泛地确认治疗效果,评估血清HF生物标志物BNP、锻炼耐力和心脏重量与体重之比。在实体解剖时,将LV组织切片并用Masson′s三色染色以通过组织学定量纤维化。

[0421] 人HCM可由影响几乎所有肌原节基因的多种突变引起。不受理论束缚,TY4的作用机制指示其生物活性可以是可推广的,而不管潜在的HCM突变如何。为了验证治疗原理的概括性,在完全不同的、良好表征的小鼠模型(Tpm^{E180G},也称为TM180)模拟α-原肌球蛋白中的疾病突变,证实了生物活性的关键方面。TM180小鼠表达出经修饰以并入与HCM相关的E180G突变的心脏特异性Tpm1(α-原肌球蛋白)基因。半合子小鼠显示HCM,其中70%小鼠5个月死亡。TM180小鼠购自Jackson Labs(JAX:035611),通过超声波心动描记术、锻炼耐力、生物标记物和尸体解剖,如上所述进行培育半合子和表型。

[0422] 结果和替代方法

[0423] 在各种端点上观察到口服和静脉内TY4的类似效果量值。任选地,增加口服剂量以达到与静脉内给药等同的治疗效果。

[0424] 实施例32

[0425] 该非限制性示例示出了优化用于向HCM小鼠口服递送TY4的给药策略,包含确认识别最大有效剂量和最小给药频率(图42)。

[0426] 实验设计

[0427] HCM的表型标志是心肌的肥大。因此,IVSd用作治疗效果的测量,以鉴定HCM小鼠中口服-TY4的最大有效剂量。

[0428] 方法

[0429] 通过超声波心动描记术在第0天评估雄性和雌性4周龄$cTnI^{146Gly}$小鼠的IVSd,然后随机化以接受每两周剂量的TY4、乱码对照或溶剂对照。剂量范围为0.01、0.05、0.15、0.3和0.6μg/g(或口服乱码)。还包含溶剂对照(仅制剂)。治疗后四周(总共8次口服给药),使用脉冲波多普勒评估动物的IVSd和血液速度的变化。为了证实更广泛的治疗效果,评估血清HF生物标志物BNP、锻炼耐力和心脏重量与体重之比以及通过组织学评估纤维化。产生IVSd的最大变化的最低剂量浓度是最大有效剂量并且用于剂量频率研究。剂量以2X间隔(从两周到每周,到每两周)系统地变化,直到功效减弱(>15%),如在开始治疗后4至8周(允许至少3个剂量)通过表型分析(IVSd,如上所述)评估的。任选地,给药间隔延长一周。保持有效的最长间隔被选择为最佳。

[0430] 结果和替代方法

[0431] 初步研究表明,使用静脉内给予0.15μg/g口服TY4是具有治疗性生物活性的。根据我们在HFpEF、MI和DMD模型中的观察,口服制剂在相同剂量下同样有效。如果我们在较低剂量(即,0.01和0.05μg/g)下看到相同的效果,则我们将使用较低剂量来最小化潜在的毒性或脱靶效果。如果我们看到高于当前剂量的改善的响应,我们将选择该剂量用于剂量频率研究。我们将观察到读出之间关于剂量响应的不一致。在这种情况下,我们将依赖于IVSd的变化来确定最大有效剂量。

[0432] 实施例33

[0433] 该非限制性实施例示出了评估口服-TY4的生物分布和药代动力学(图43A),包含:建立组织提取物中掺入TY4的拷贝数曲线;检测和定量口服饲喂TY4的HCM小鼠的血液和组

织中的TY4;以及确定TY4在组织中的半衰期和尿清除率。

[0434] 实验设计

[0435] 为了评估口服-TY4在体内的生物分布,使用基于qPCR的测定。TY4序列是足够独特的,使得它可以在小鼠组织中检测。因此,在限定的时间点评估TY4在若干关键组织中的保留,以测量器官的相对摄取以及药物产品的半衰期。

[0436] 方法

[0437] 给予健康的7周龄雄性和雌性野生型FVB小鼠口服-TY4或溶剂对照(仅口服制剂)。在15分钟、30分钟、2小时和4小时处死动物,并且分离包含血液、肝、肾、心脏和脾的组织用于RNA分离。进行QPCR以探测TY4丰度(如概念验证概述图43B和43C所示,其中组织水平在r.o.注射后很容易量化)。图43B概述了用于确定r.o.注射后体内TY4的生物分布的步骤。图43C示出了在眼球后注射TY4后30分钟从小鼠分离的组织揭示了TY4在血液、肝、心脏组织中的可跟踪保留。

[0438] 为了评估每毫克组织的TY4拷贝数,使用20mg组织中已知量的TY4拷贝的掺入来生成拷贝数曲线。对于组织特异性结果,为每个器官和血液生成曲线。

[0439] 结果和替代方法

[0440] 在灌胃后几小时内可以从血液和组织中清除口服-TY4。任选地,减少时间增量以在多于一个时间点处检测可跟踪量的TY4以用于半衰期确定。

[0441] 实施例34

[0442] 该非限制性示例示出了对口服TY4的安全性和毒性概况的评估(图44),包含:表征野生型FVB小鼠和长期饲喂TY4的免疫受损小鼠的存活、全部血细胞计数和基础代谢功能;对野生型FVB小鼠和长期饲喂TY4的免疫受损小鼠中的不同组织进行尸体解剖时的全面检查和组织学分析;以及评估在存活和急性毒性方面对野生型FVB小鼠中的TY4的超治疗单剂量(3X至10X最大有效剂量)的应答。

[0443] 实验设计

[0444] 评估口服-TY4的安全性和毒理概况:

[0445] 长期(3个月)治疗研究以最大有效剂量在长期饲喂TY4(或载体)的野生型FVB小鼠中进行,具有以下端点:存活;全部血细胞计数;基础代谢功能;在尸体解剖时的全面检查;不同组织的组织学分析;

[0446] 长期(3个月)治疗研究在长期饲喂TY4的SCID/Beige小鼠中以最大有效剂量进行,具有以下端点:存活;全部血细胞计数;基础代谢功能;在尸体解剖时的全面检查;不同组织的组织学分析;

[0447] 在野生型FVB小鼠中急性给予显著的单一剂量的TY4(最大有效剂量3X、10X和30X),在48小时时具有以下端点:存活;全部血细胞计数;基础代谢功能;基础代谢功能中的异常指标的组织学。

[0448] 方法

[0449] 慢性研究:使用野生型FVB小鼠(用于基本安全性/毒理学)或使用SCID/Beige小鼠(以另外测定肿瘤发生[48、49])。从7至10周龄开始,每组小鼠分成两组:TY4,根据实施例32中测定的方案和剂量口服饲养,或以相同的给药间隔给予溶剂对照(仅制剂)。终点是存活(任何要通过迅速的尸体解剖和组织学研究的死亡)。在3个月的预定义终点(典型小鼠寿命>

15%)时,将小鼠安乐死,对血液取样以获得全部血细胞计数和基础代谢功能(包含肝功能[天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶和胆红素]和肾功能[BUN,肌酸酐]的测试),并进行尸体解剖以进行器官的全面检查。后者包含采集和切片任何肿瘤的组织学(苏木精和伊红),加上脑、肝、脾、肾、肺和心脏的随机组织学。重点在于检测任何意外炎症、纤维化或肿瘤。

[0450] 急性研究:为了评估毒理,野生型FVB小鼠接受超量的单剂量TY4(3X、10X和30X在实施例32中建立最大有效剂量)并监测存活。意外死亡经历上述的尸体解剖。48小时后,存活的小鼠被安乐死,血液取样以获得全部血细胞计数和基础代谢功能(包含肝功能[天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶和胆红素]和肾功能[BUN,肌酸酐]的测试),并且进行尸体解剖以进行器官的全面检查以及脑、肝、脾、肾、肺和心脏的组织学(苏木精和伊红)的采集和切片。评估可能的炎症。肿瘤在两天内不太可能形成。

[0451] 结果和替代方法

[0452] 鉴于迄今为止临床前模型的有利结果,没有观察到慢性炎症或纤维化事件。

[0453] 实施例35

[0454] 该非限制性实例示出了TY4结合易位蛋白区并介导其自噬。

[0455] 为了理解LPS激活后巨噬细胞中TY4作用的机制,观察到巨噬细胞中TY4的定位。在用LPS激活时TY4穿梭至骨髓来源的巨噬细胞中的细胞核(图45A;n=3个生物重复/组)。与TY4在细胞溶质和细胞核之间易位的能力一致,在HUVEC中与TY4结合的蛋白质的下拉鉴定了几种与核苷酸相关的蛋白质,包含易位启动子区(TPR;图45B,n=2生物重复/组)。通过ELISA验证TPR与TY4的结合(图45C;n=3/组)。

[0456] 为了理解TY4和TPR之间相互作用的重要性,测量了TY4发挥治疗效果的疾病模型的组织中TPR的表达(图445D)。心脏组织用于HFpEF(参见实施例5),来自mdx小鼠的胫骨前肌组织用于DMD(参见实施例13),非造血干细胞(非HSC)用于硬皮病(参见实施例21)。mRNA测序示出了TPR水平的抑制(图45D;n=4至5/组)。此外,从暴露于LPS和TY4的巨噬细胞中分离的TPR显示在TY4暴露的巨噬细胞中在TPR周围的自噬介质的积累(图45E)。这些结果表明,在LPS激活时,TY4转移至巨噬细胞中的细胞核,结合TPR,并将自噬介质招集至TPR。

[0457] 实施例36

[0458] 该非限制性实施例示出了MI模型中TPR敲除的心脏保护作用。

[0459] 如实施例14中所述在大鼠中诱导缺血损伤(图46A)再灌注后,将靶向TPR(“siTPR”)的siRNA或乱码siRNA(“siScr”)心内给予动物。如实施例14所述,在I/R损伤后两天,获取心脏并测量梗塞质量。与用乱码siRNA处理的动物相比,用针对TPR的siRNA处理的动物具有显著更小的梗塞质量(图46B)。这些结果表明,在心肌梗塞的大鼠模型中,单独的TPR敲低是心脏保护性的。

[0460] 尽管为了清楚和理解的目的已经通过图示和实施例的方式详细描述了前述内容,但是本领域技术人员将理解,在不脱离本发明的精神的情况下可以进行修改。因此,应该理解的是,本发明所公开的形式仅是说明性的,并不是意在限制本发明的范围,而是也涵盖了与本发明的实施例的真正范围和精神相一致的所有修改和替代方案。

[0461] 预期可进行上文所揭示的实施例的特定特征及方面的各种组合或子组合。此外,本文中关于实施例的任何特定特征、方面、方法、性质、特性、质量、属性、元素等的公开可以用于本发明中阐述的所有其他实施例中。因此,应当理解,所公开的实施例的各种特征和方

面可以彼此组合或替代,以便形成所公开的主题的不同模式。因此,本发明的范围不应限于上述特定公开的实施例。此外,虽然所公开的主题易于进行各种修改和替代形式,但是其特定实施例已经在附图中示出并且在本发明中详细描述。然而,应当理解,本发明不限于所公开的特定形式或方法,而是覆盖落入所描述的各种实施例和所附权利要求的精神和范围内的所有修改、等同物和替代方案。

[0462] 本发明公开的任何方法不需要以所述顺序执行。本发明公开的方法包含由从业者采取的某些动作;然而,它们还可以明确地或暗示地包含那些动作的任何第三方指令。例如,“向需要治疗心脏病症或其症状的受试者口服给予治疗有效量的核酸”的动作包含“指导向受试者给予有效量的核酸”。此外,在本发明的特征或方面根据马库什组来描述的情况下,本领域技术人员将认识到,本发明因此也根据马库什组的成员的任何单独成员或子组来描述。

[0463] 本发明公开的范围还涵盖任何和所有与其重叠的、其子范围及其组合。例如“上至”、“至少”、“大于”、“小于”、“之间”等语言包含所列举的数字。前面有例如“约”或“近似”的术语的数字包含所述数字。例如,“约90%”包含“90%”。在一些实施方式中,至少95%同源包含与参考序列96%、97%、98%、99%和100%同源。此外,当序列被公开为“包含”核苷酸或氨基酸序列时,除非另外指出,否则此类参考还应包含所述序列“包含”、“由……组成”或“基本上由……组成”。

[0464] 除非另有明确说明,否则在本申请中使用的术语和短语及其变型,尤其是在所附权利要求中,应当被解释为开放式的而不是限制性的。作为前述的实施例,术语“包含”应当被理解为意指“非限制性包含”、“包含但不限于”等。

[0465] 本发明中引用的所有专利和其他出版物;包含文献参考文献、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请,为了描述和公开例如可能与本发明描述的技术结合使用的这些出版物中描述的方法,通过引用明确地并入本发明。这些出版物仅在本申请提交日之前公开。这方面的任何内容都不应被解释为承认发明人无权因先前的发明或任何其他原因而提前公开。所有关于这些文件的日期或内容的陈述均基于申请人所掌握的信息,并不构成对这些文件的日期或内容正确性的任何承认。

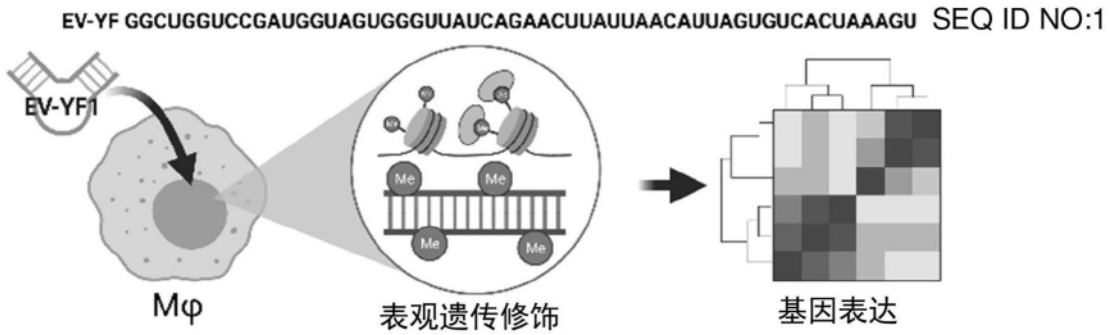

EV-YF GGCUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAACAUUAGUGUCACUAAAGU SEQ ID NO:1
EV-YF1
Me
Me
Me
Me
Mφ
表观遗传修饰
基因表达

图1A

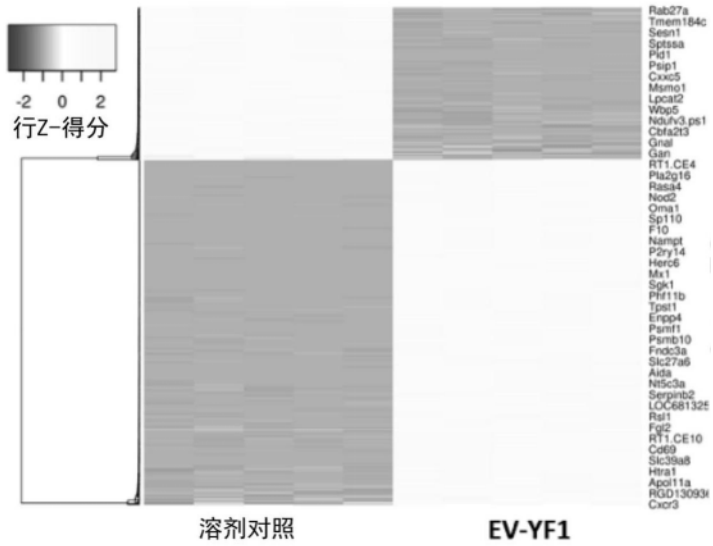

-2 0 2
行Z-得分
溶剂对照
EV-YF1

图1B

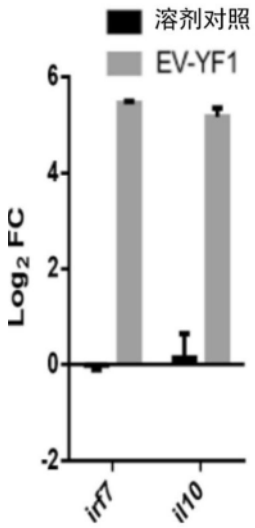

溶剂对照
EV-YF1
Log2 FC
6
4
2
0
-2
irf7
il10

图1C

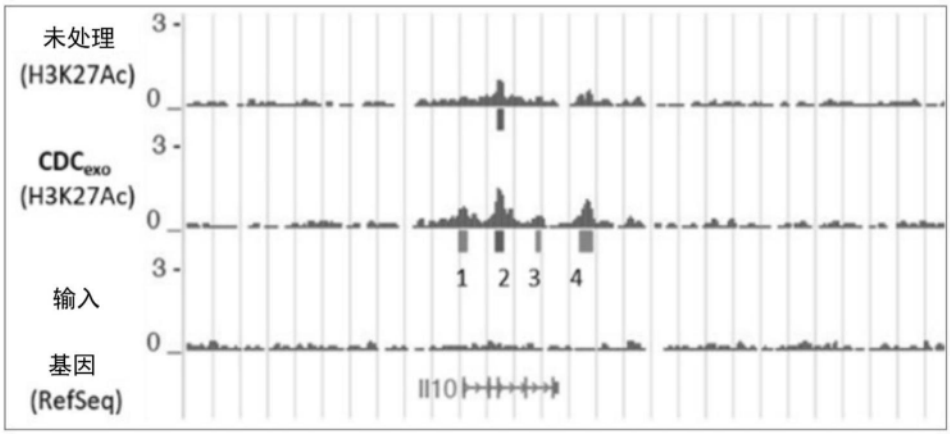

未处理
(H3K27Ac)
CDC exo
(H3K27Ac)
输入
基因
(RefSeq)
3
0
1 2 3 4
Il10

图1D

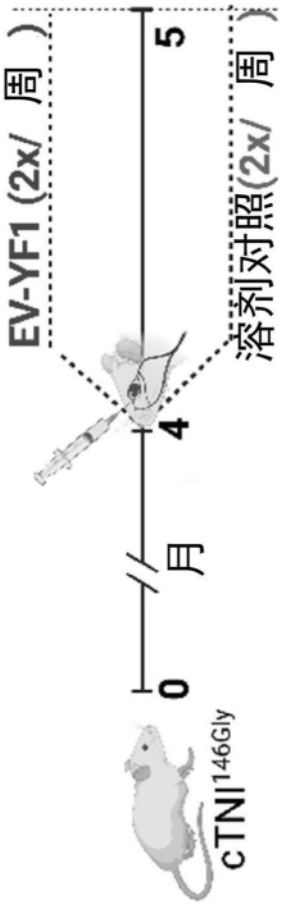

EV-YF1 (2x/ 周)
溶剂对照(2x/ 周)
5
4
月
0
cTNI146Gly

图2A

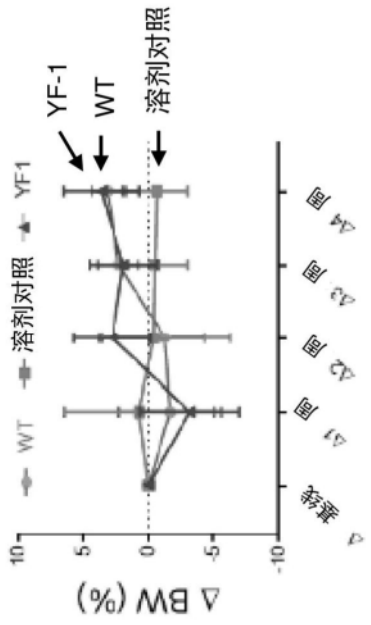

YF-1
WT
溶剂对照
WT
溶剂对照
YF-1
Δ BW (%)
10
5
0
-5
-10
基线
1周
2周
3周
4周

图2B

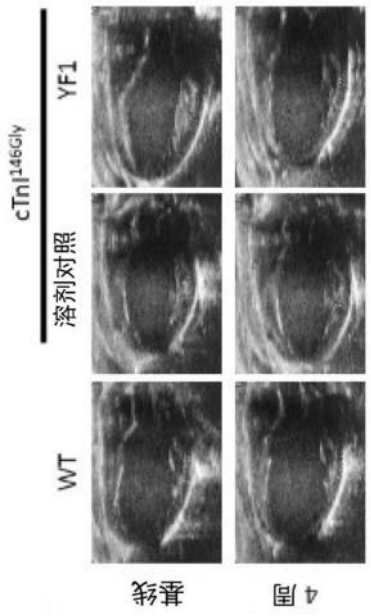

cTnI146Gly
溶剂对照
YF1
WT
基线
4周

图2C

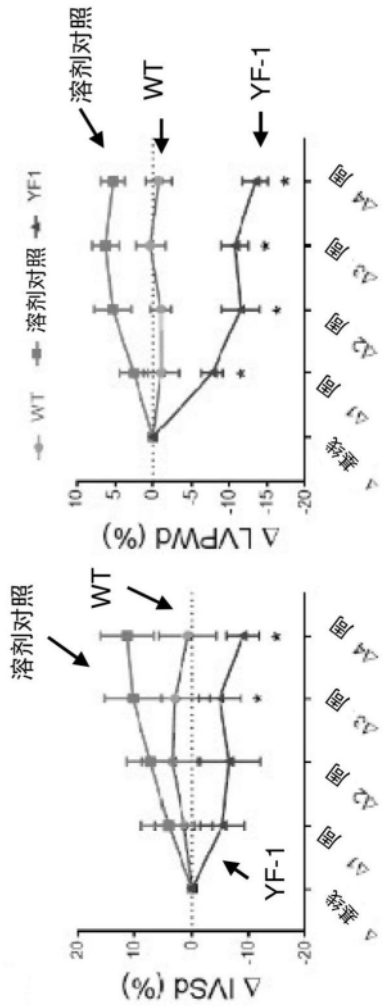

溶剂对照
WT
YF-1
WT
溶剂对照
YF1
Δ LVPWd (%)
基线
4 周
3 周
2 周
1 周
溶剂对照
WT
YF-1
Δ IVSd (%)

图2D

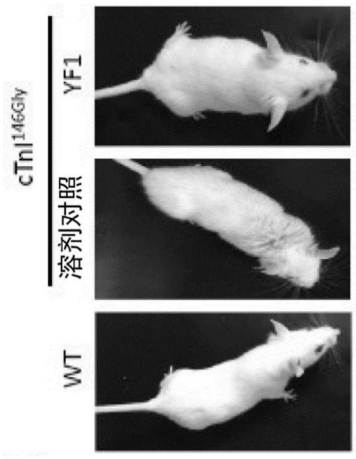

cTnI146Gly
溶剂对照
YF1
WT

图2E

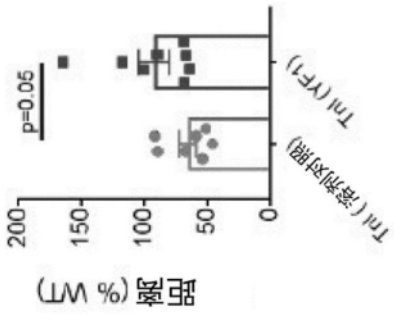

距离(% WT)
200
150
100
50
0
p=0.05
Tm(落剂对照)
Tm(YF-1)

图2F

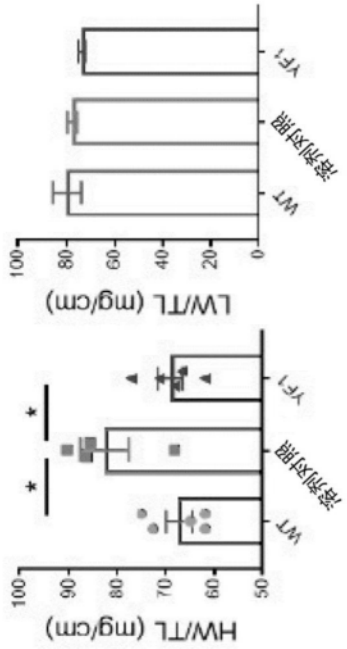

LW/TL (mg/cm)
100
80
60
40
20
0
WT
落剂对照
YF-1
HW/TL (mg/cm)
100
90
80
70
60
50
*
*

图2G

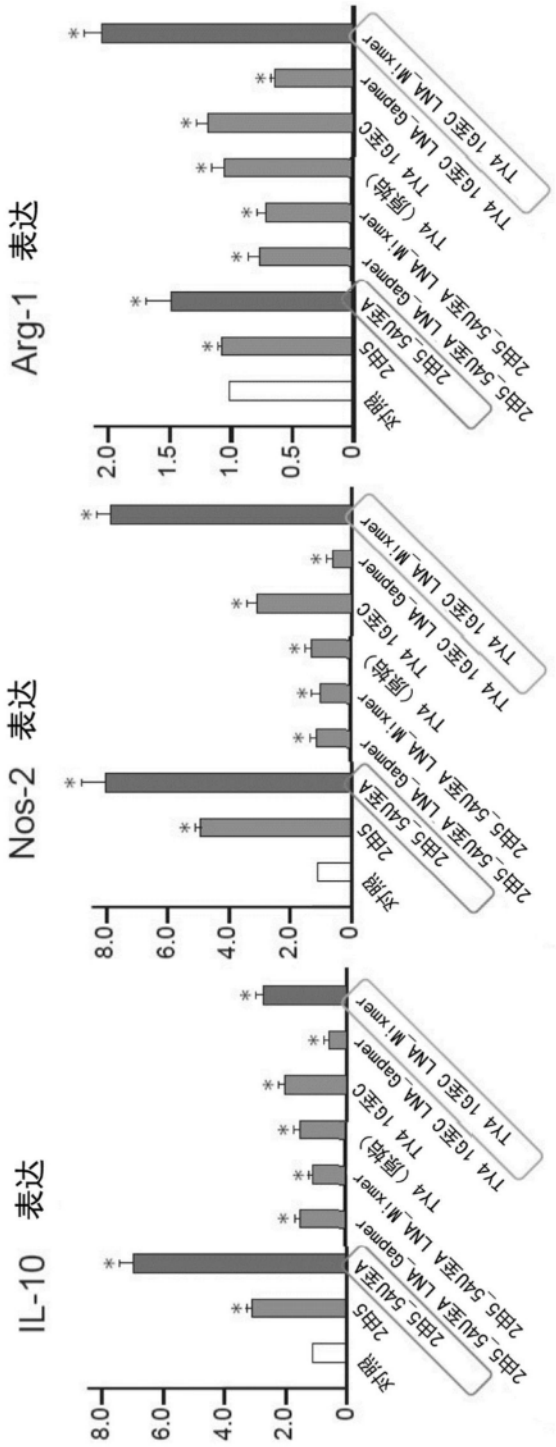

Arg-1 表达
Nos-2 表达
IL-10 表达
对照
2由5
2由5_5AU至A LNA_Gapmer
2由5_5AU至A LNA_Mixmer
TY4 (原始)
TY4 16至C
TY4 16至C LNA_Gapmer
TY4 16至C LNA_Mixmer
2.0
1.5
1.0
0.5
0
8.0
6.0
4.0
2.0
0

图3A

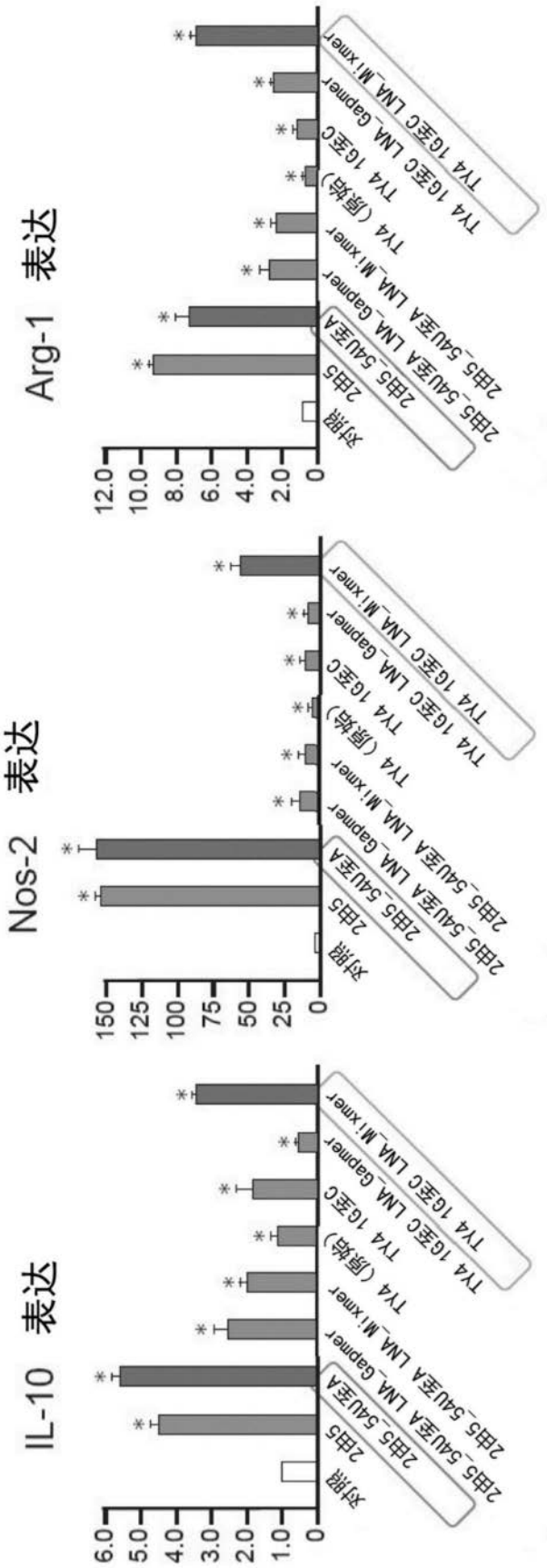

Arg-1 表达
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0
对照
2由5
2由5_54U至A
2由5_54U至A LNA_Gapmer
2由5_54U至A LNA_Mixmer
TY4 (原始)
TY4 16至C
TY4 16至C LNA_Gapmer
TY4 16至C LNA_Mixmer
Nos-2 表达
150
125
100
75
50
25
0
对照
2由5
2由5_54U至A
2由5_54U至A LNA_Gapmer
2由5_54U至A LNA_Mixmer
TY4 (原始)
TY4 16至C
TY4 16至C LNA_Gapmer
TY4 16至C LNA_Mixmer
IL-10 表达
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
对照
2由5
2由5_54U至A
2由5_54U至A LNA_Gapmer
2由5_54U至A LNA_Mixmer
TY4 (原始)
TY4 16至C
TY4 16至C LNA_Gapmer
TY4 16至C LNA_Mixmer

图3B


EV-YF1 GGCUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAACAUUAGUGUCAC SEQ ID NO:14
TY4 CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG SEQ ID NO:2

图4A

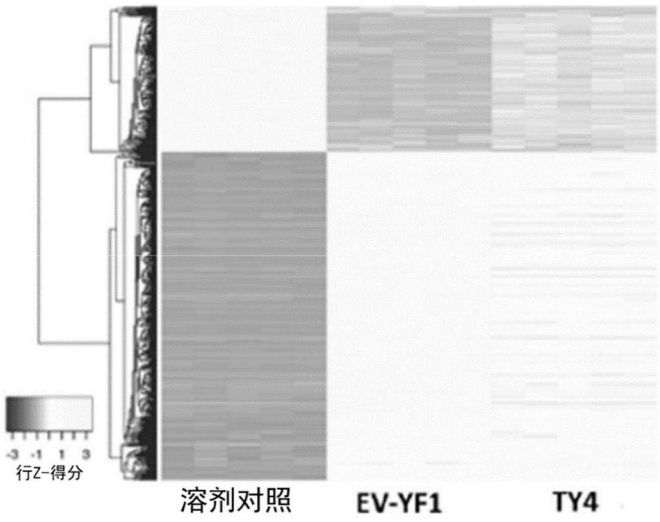

-3 -1 1 3
行Z-得分
溶剂对照
EV-YF1
TY4

图4B

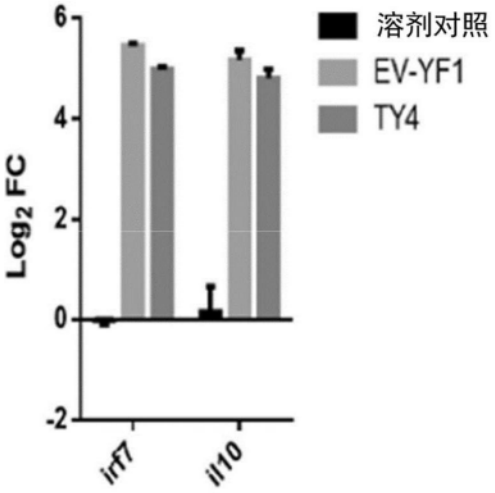

溶剂对照
EV-YF1
TY4
Log2 FC
6
4
2
0
-2
irf7
il10

图4C

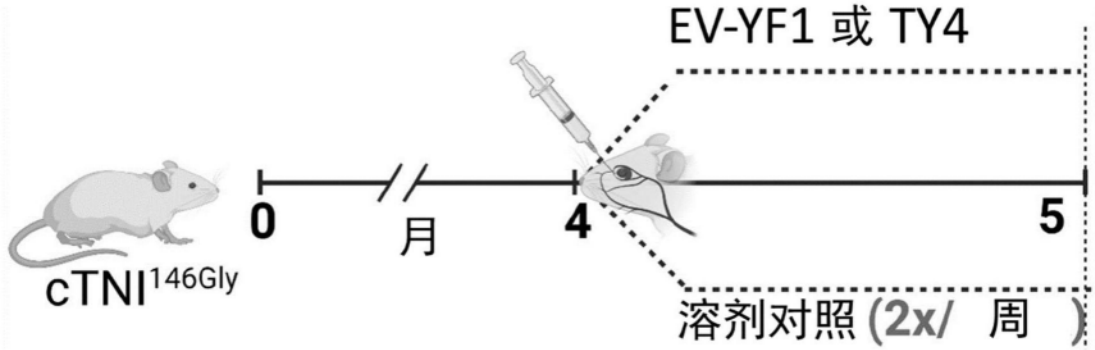

EV-YF1 或 TY4
cTNI146Gly
0
月
4
5
溶剂对照 (2x/ 周)

图5A

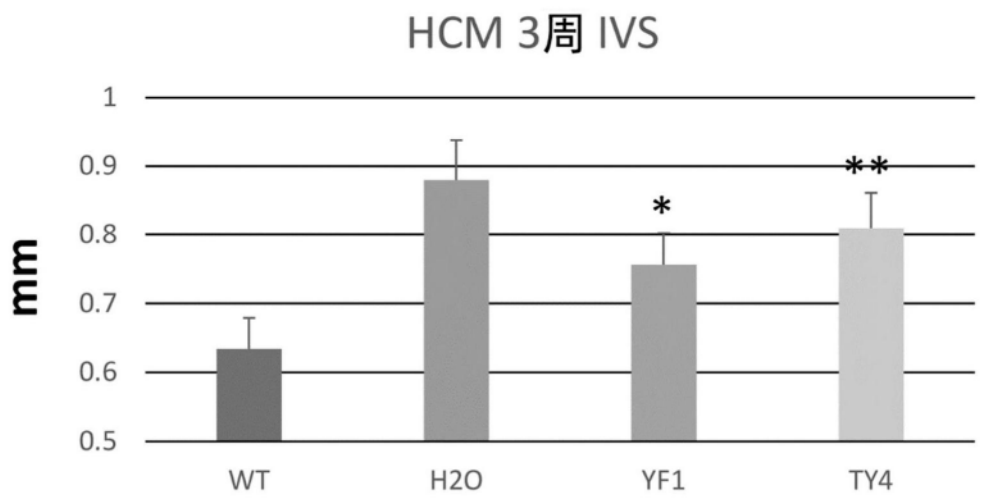

HCM 3周 IVS
mm
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
*
**
WT
H2O
YF1
TY4

图5B

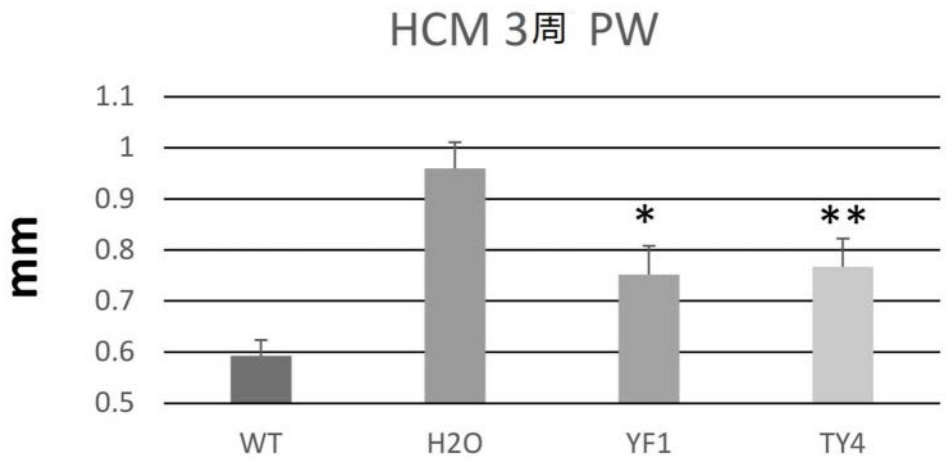

HCM 3周 PW
mm
1.1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
*
**
WT
H2O
YF1
TY4

图5C

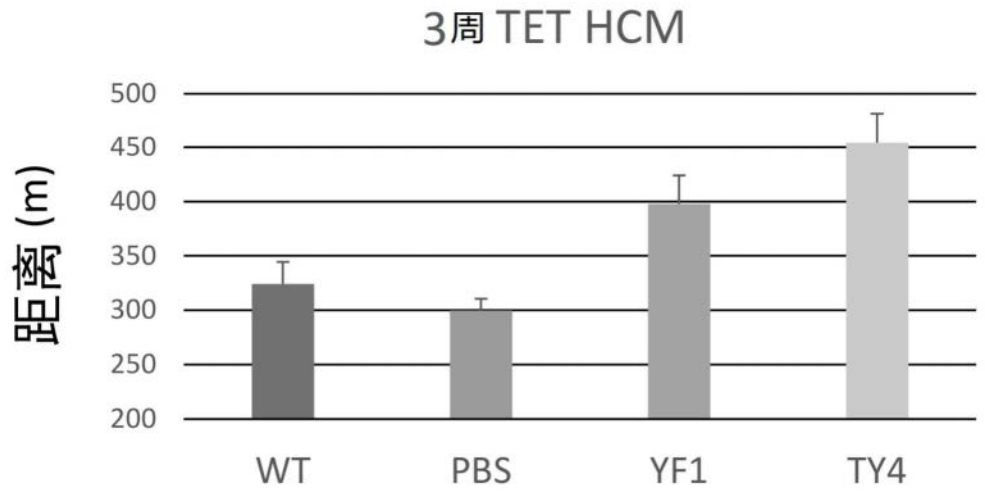

3周 TET HCM
距离 (m)
500
450
400
350
300
250
200
WT
PBS
YF1
TY4

图5D

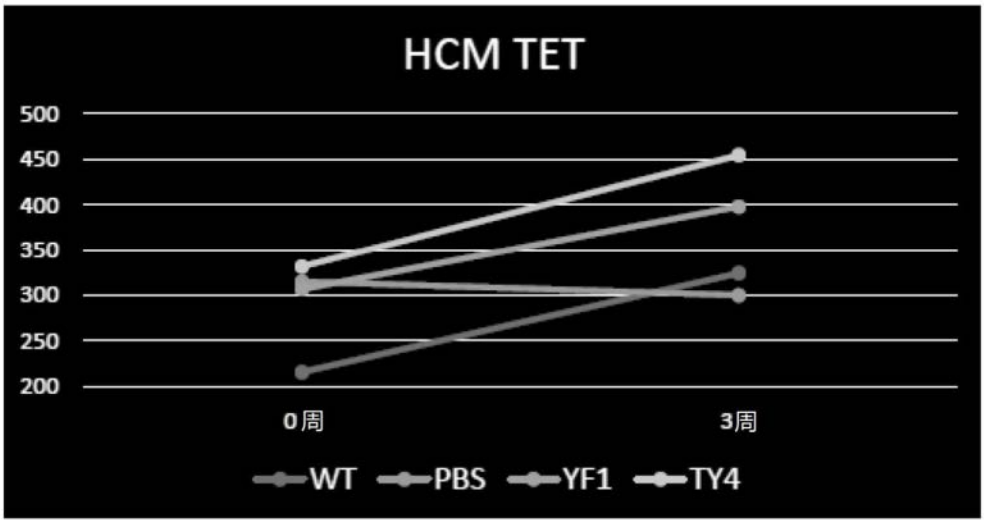

HCM TET
500
450
400
350
300
250
200
0周
3周
WT
PBS
YF1
TY4

图5E

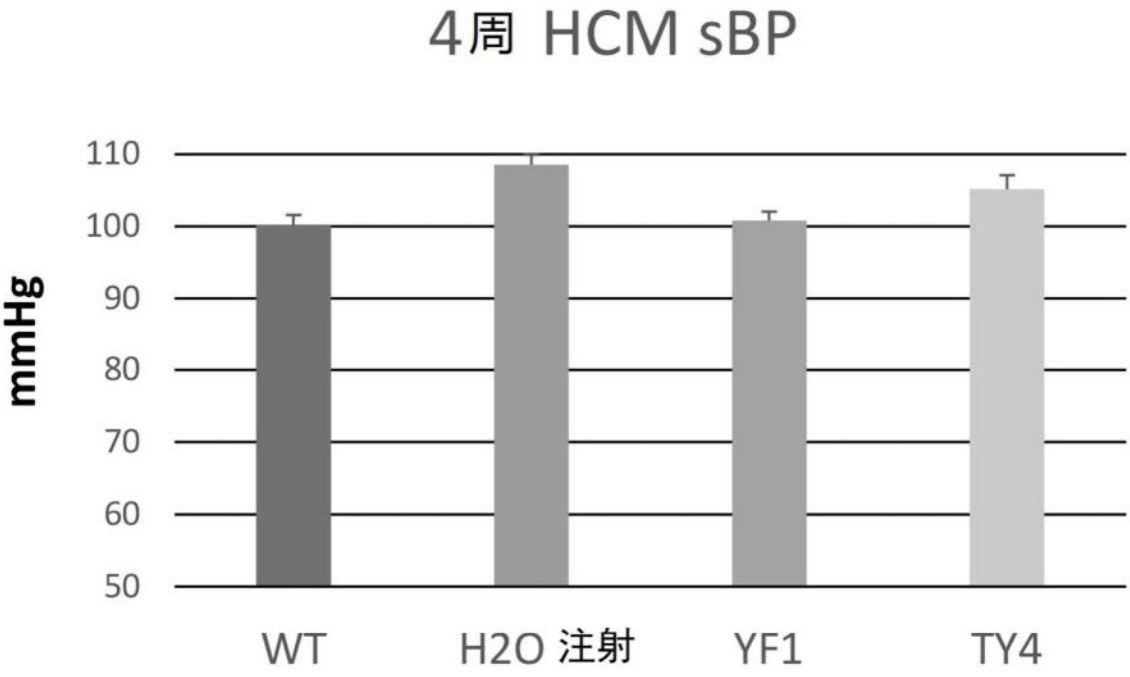

4周 HCM sBP
mmHg
110
100
90
80
70
60
50
WT
H2O 注射
YF1
TY4

图6A

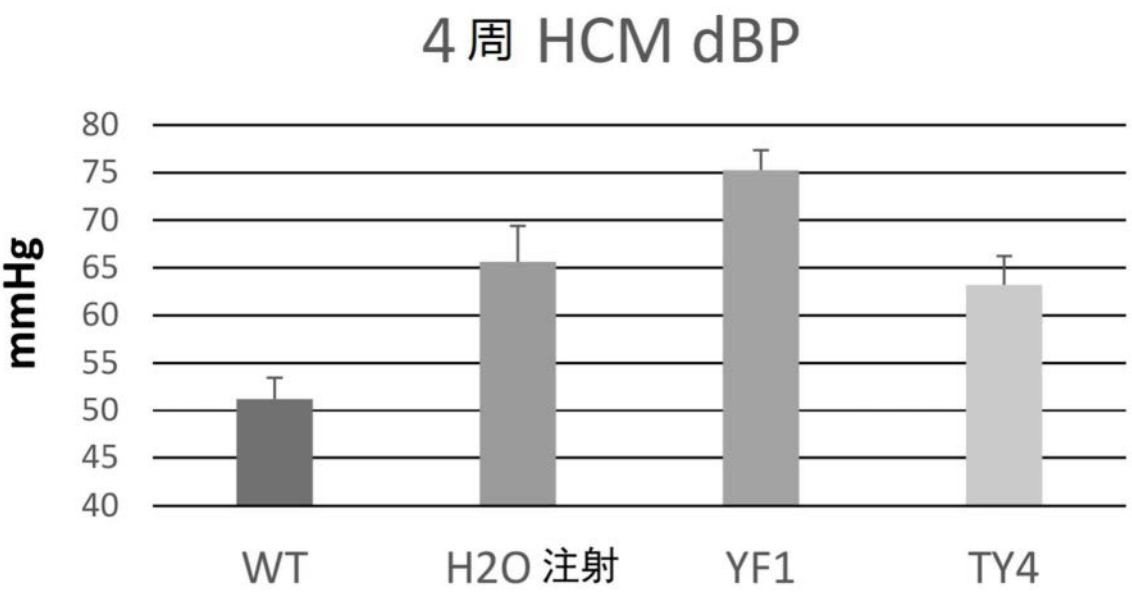

4周 HCM dBP
mmHg
80
75
70
65
60
55
50
45
40
WT
H2O 注射
YF1
TY4

图6B

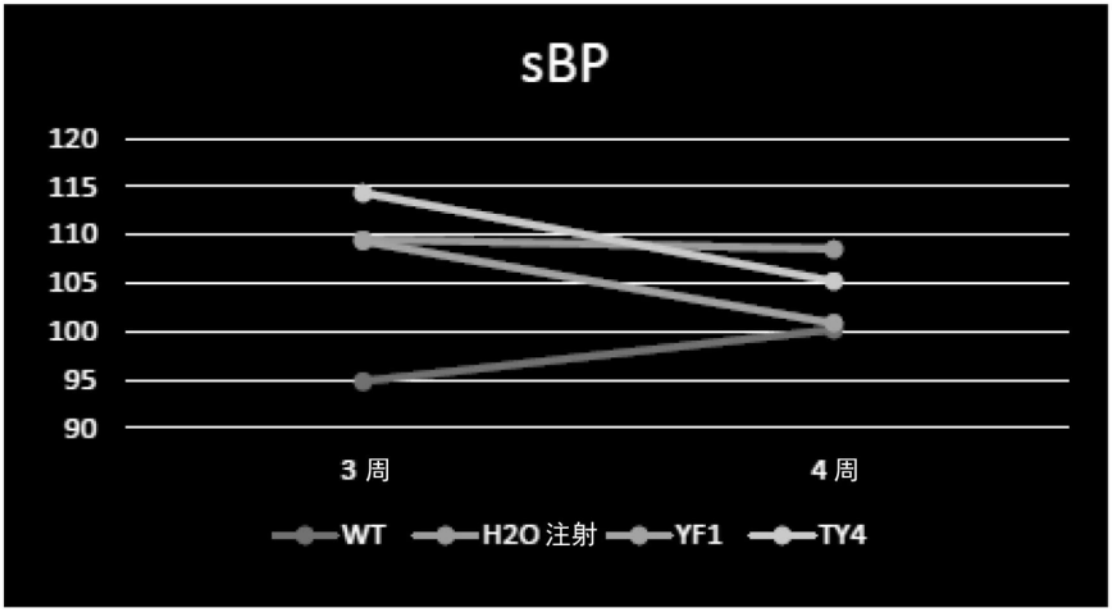

sBP
120
115
110
105
100
95
90
3 周
4 周
WT
H2O 注射
YF1
TY4

图6C

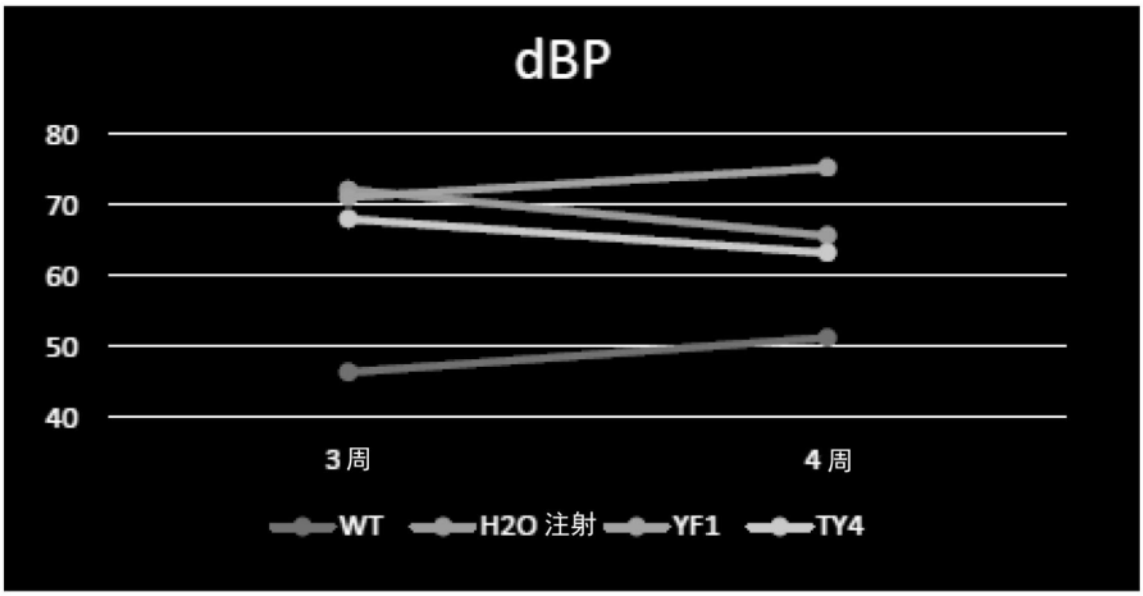

dBP
80
70
60
50
40
3周
4周
WT
H2O注射
YF1
TY4

图6D

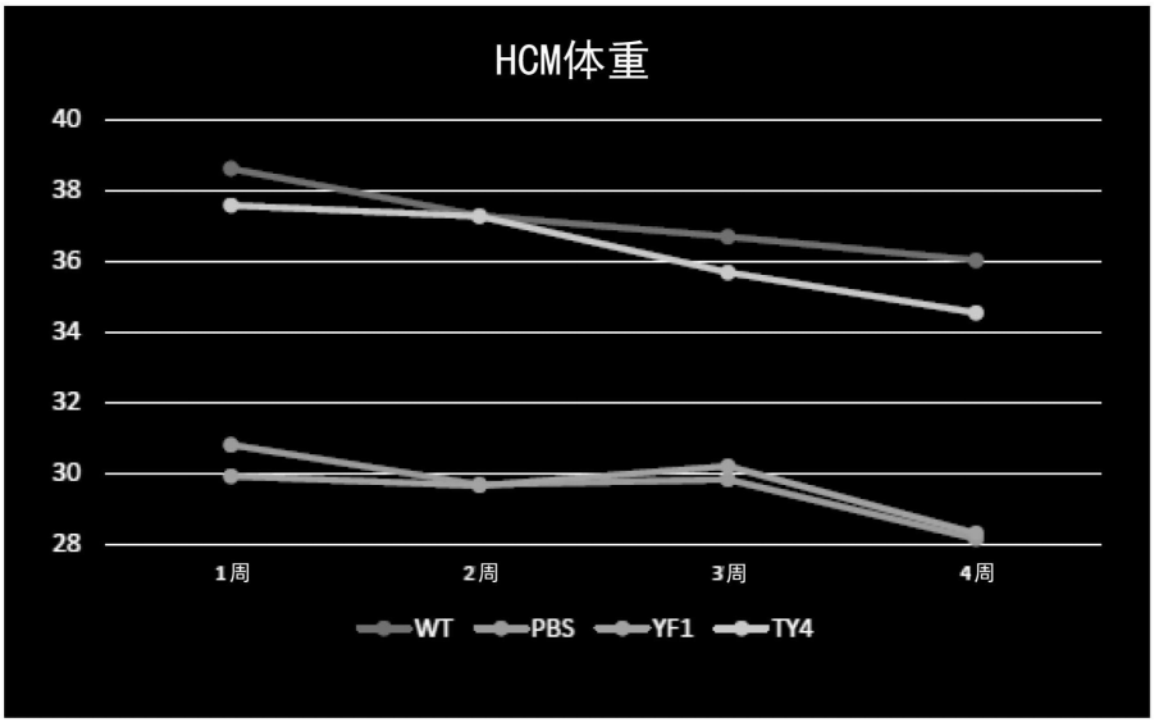

HCM体重
40
38
36
34
32
30
28
1周
2周
3周
4周
WT
PBS
YF1
TY4

图6E

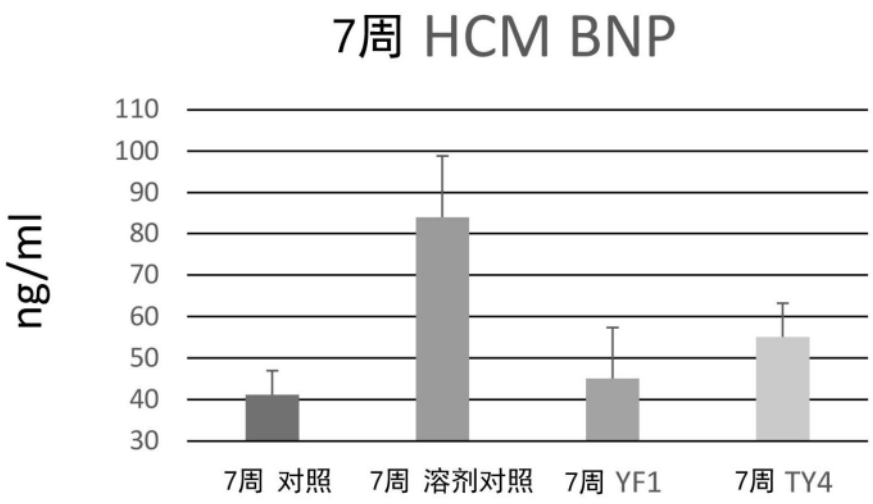

7周 HCM BNP
ng/ml
110
100
90
80
70
60
50
40
30
7周 对照
7周 溶剂对照
7周 YF1
7周 TY4

图7A

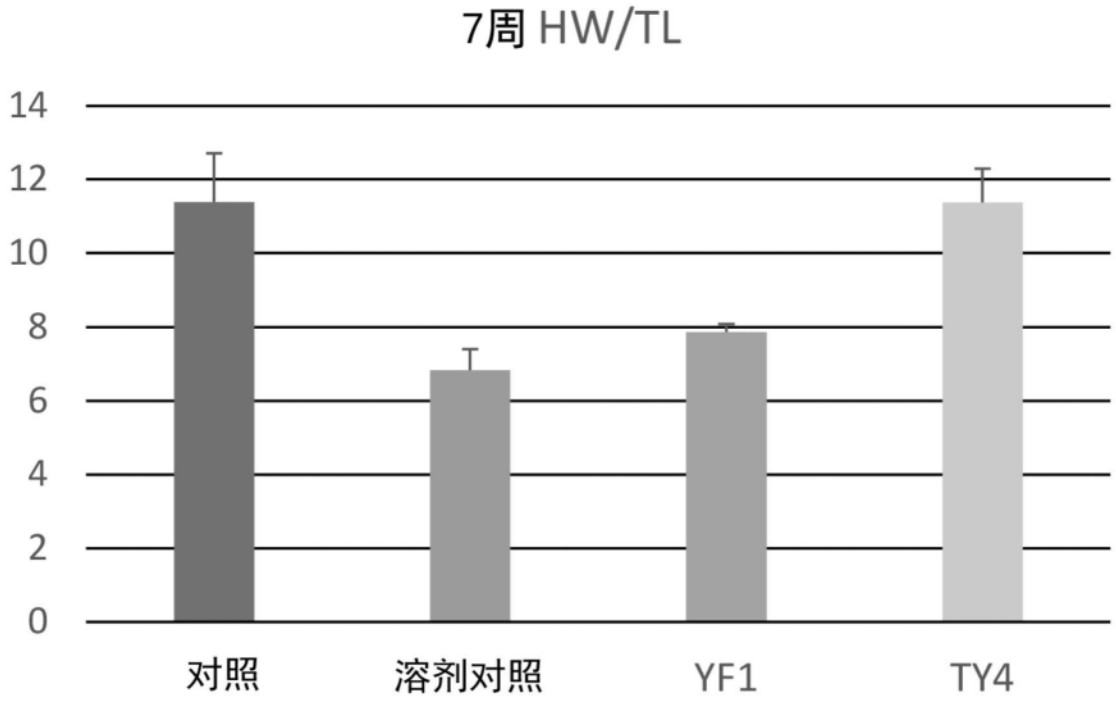

7周 HW/TL
14
12
10
8
6
4
2
0
对照
溶剂对照
YF1
TY4

图7B

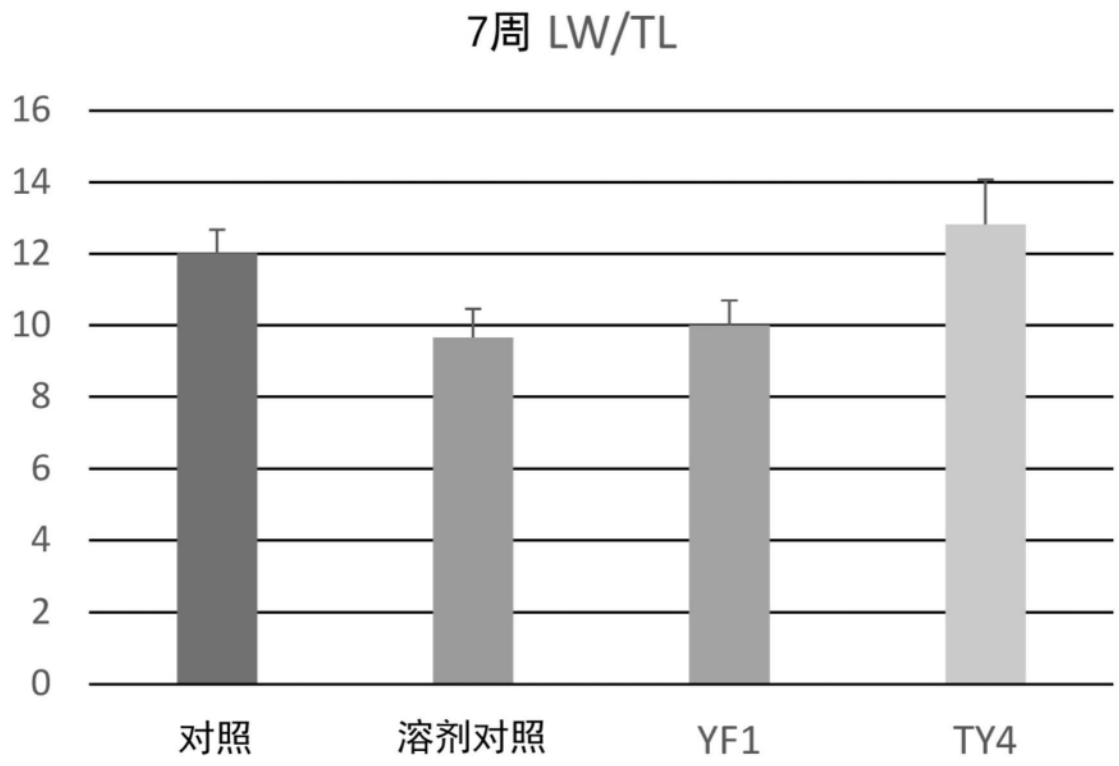

7周 LW/TL
16
14
12
10
8
6
4
2
0
对照
溶剂对照
YF1
TY4

图7C

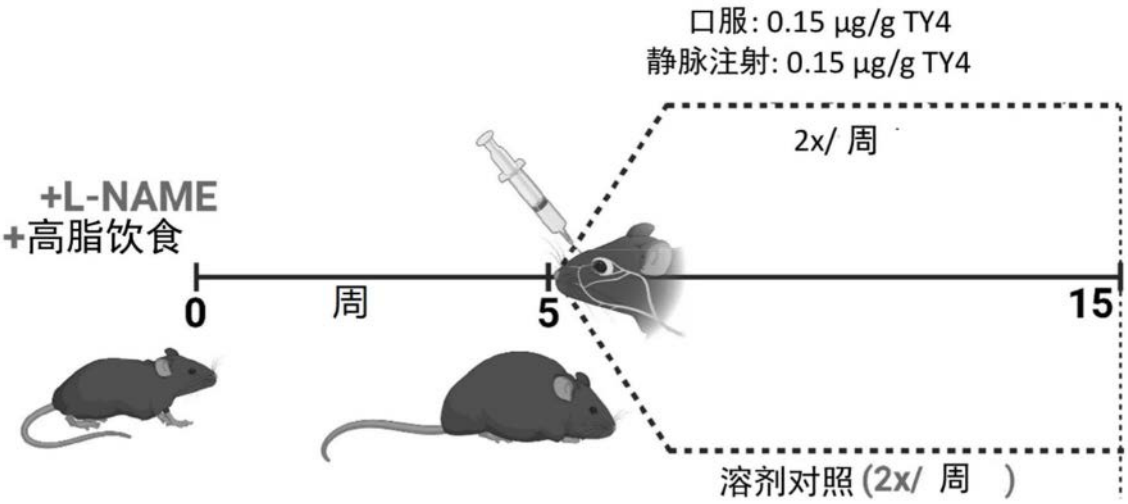

口服: 0.15 μg/g TY4
静脉注射: 0.15 μg/g TY4
2x/ 周
+L-NAME
+高脂饮食
0
周
5
15
溶剂对照 (2x/ 周)

图8A

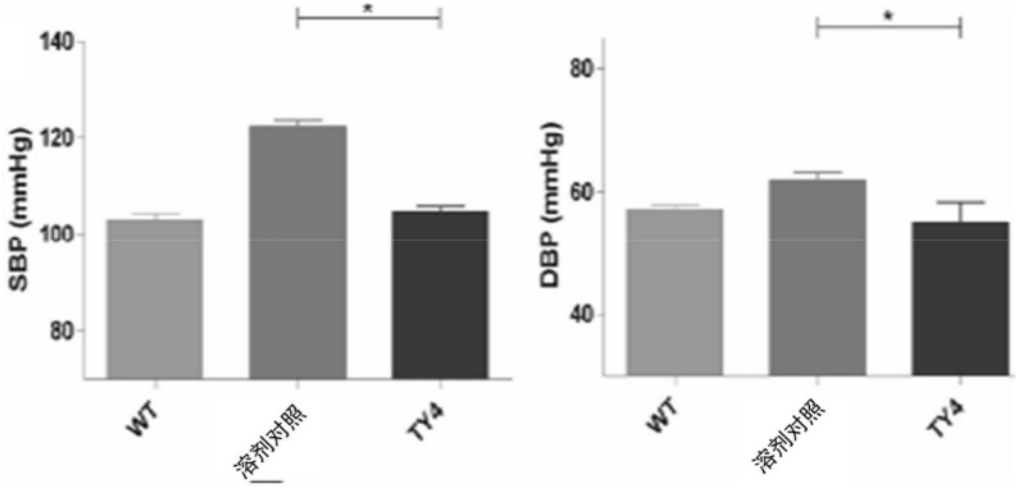

SBP (mmHg)
140
120
100
80
*
WT
溶剂对照
TY4
DBP (mmHg)
80
60
40
*
WT
溶剂对照
TY4

图8B

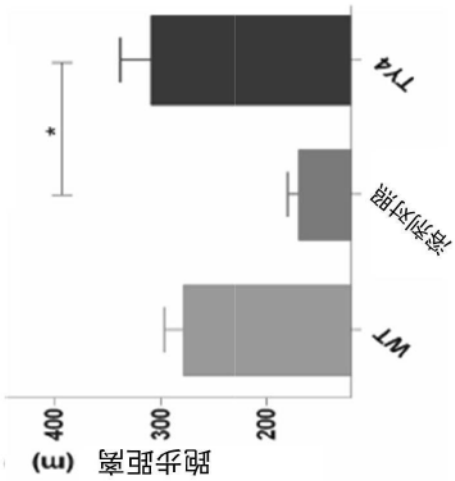

TY4
溶剂对照
WT
*
400
300
200
跑步距离 (m)

图8C

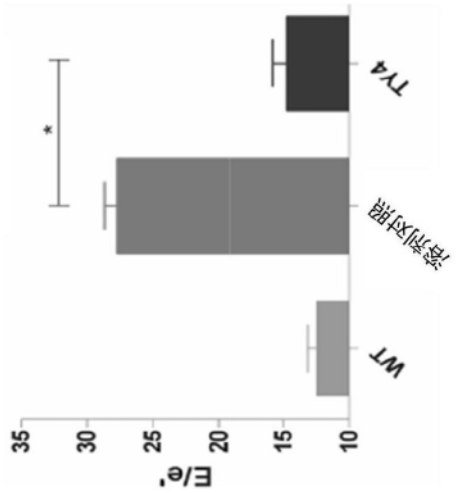

TY4
溶剂对照
WT
*
35
30
25
20
15
10
E/e'

图8D

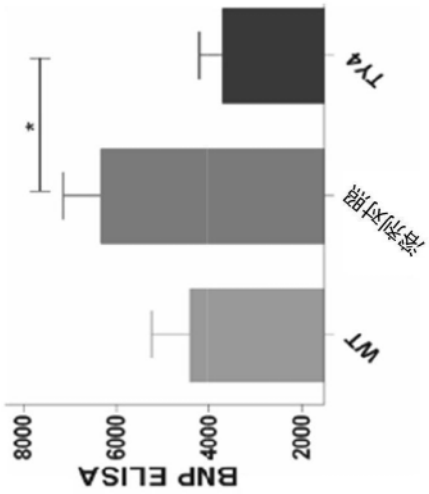

TY4
溶剂对照
WT
*
8000
6000
4000
2000
BNP ELISA

图8E

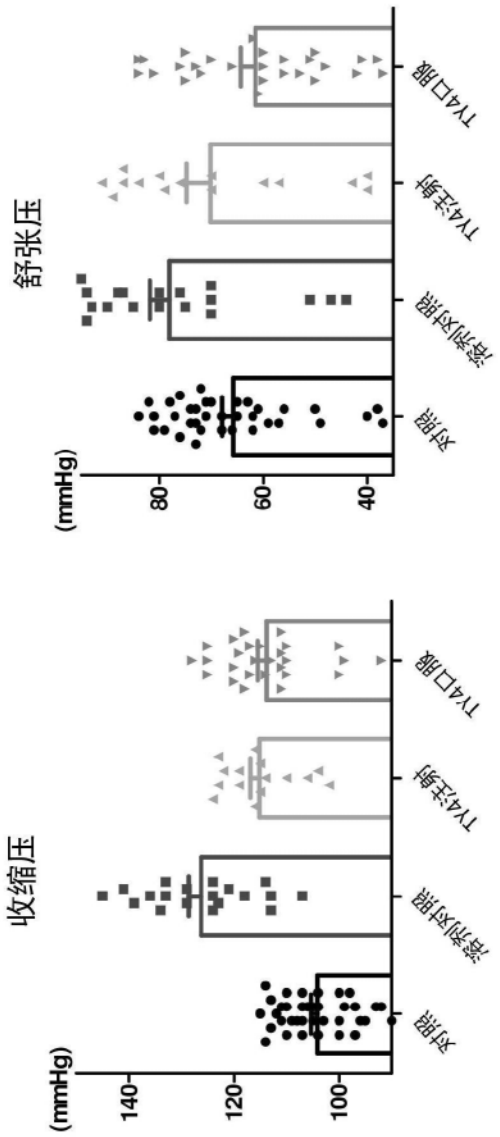

舒张压
(mmHg)
80
60
40
对照
落剂对照
TV4注射
TV4口服
收缩压
(mmHg)
140
120
100
对照
落剂对照
TV4注射
TV4口服

图8F

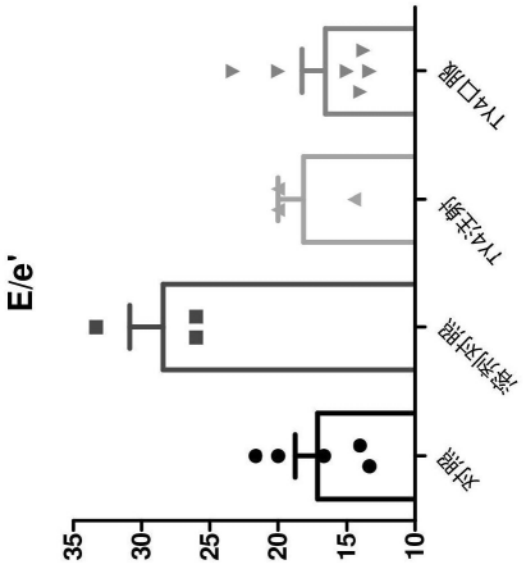

E/e'
35
30
25
20
15
10
对照
溶剂对照
TV4注射
TV4口服

图8G

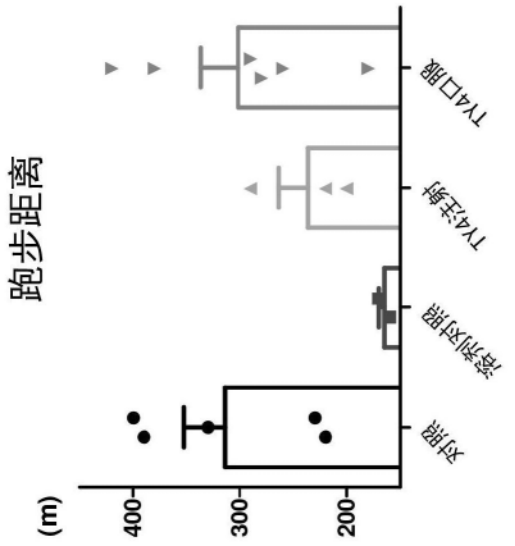

跑步距离
(m)
400
300
200
对照
溶剂对照
TV4注射
TV4口服

图8H

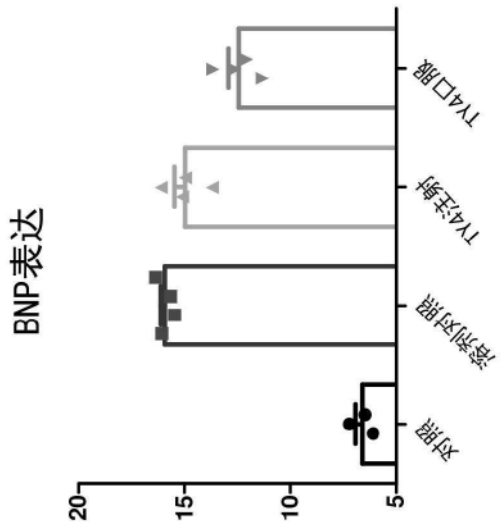

BNP表达
TY4口服
TY4注射
溶剂对照
对照
20
15
10
5

图8I

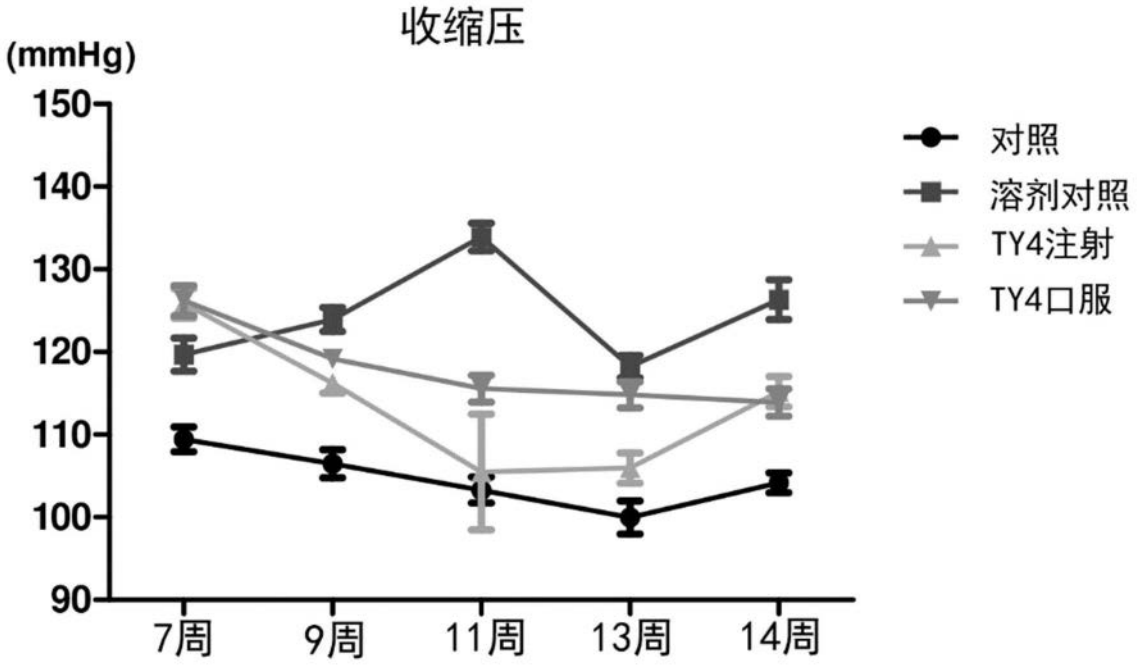

收缩压
(mmHg)
150
140
130
120
110
100
90
7周
9周
11周
13周
14周
对照
溶剂对照
TY4注射
TY4口服

图8J

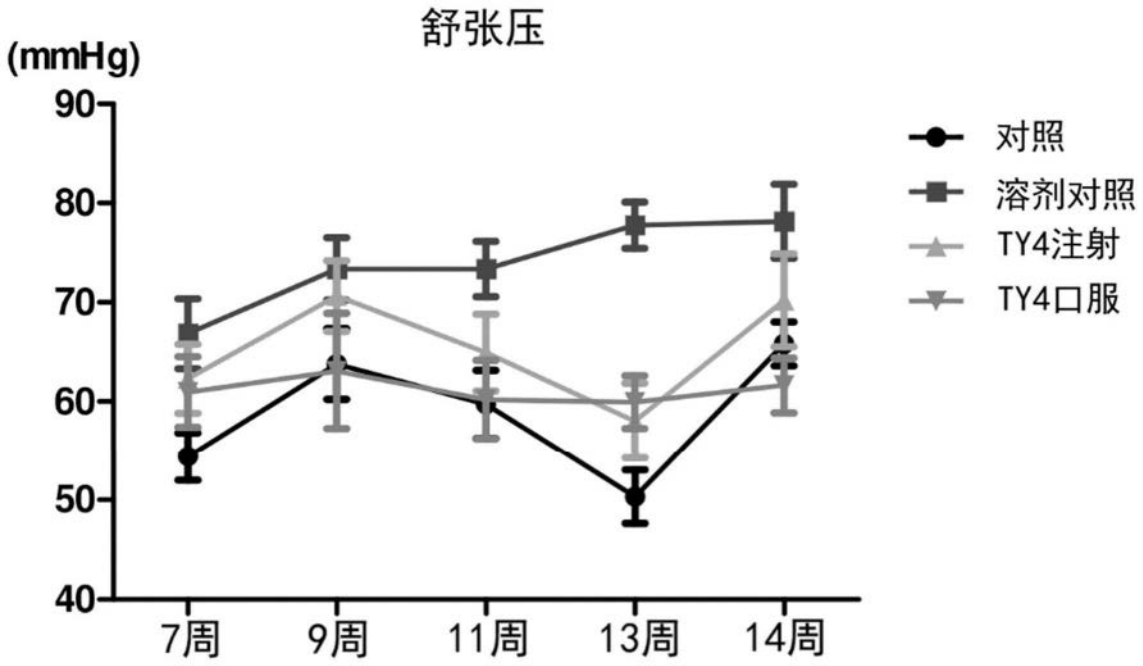

舒张压
(mmHg)
90
80
70
60
50
40
7周
9周
11周
13周
14周
对照
溶剂对照
TY4注射
TY4口服

图8K

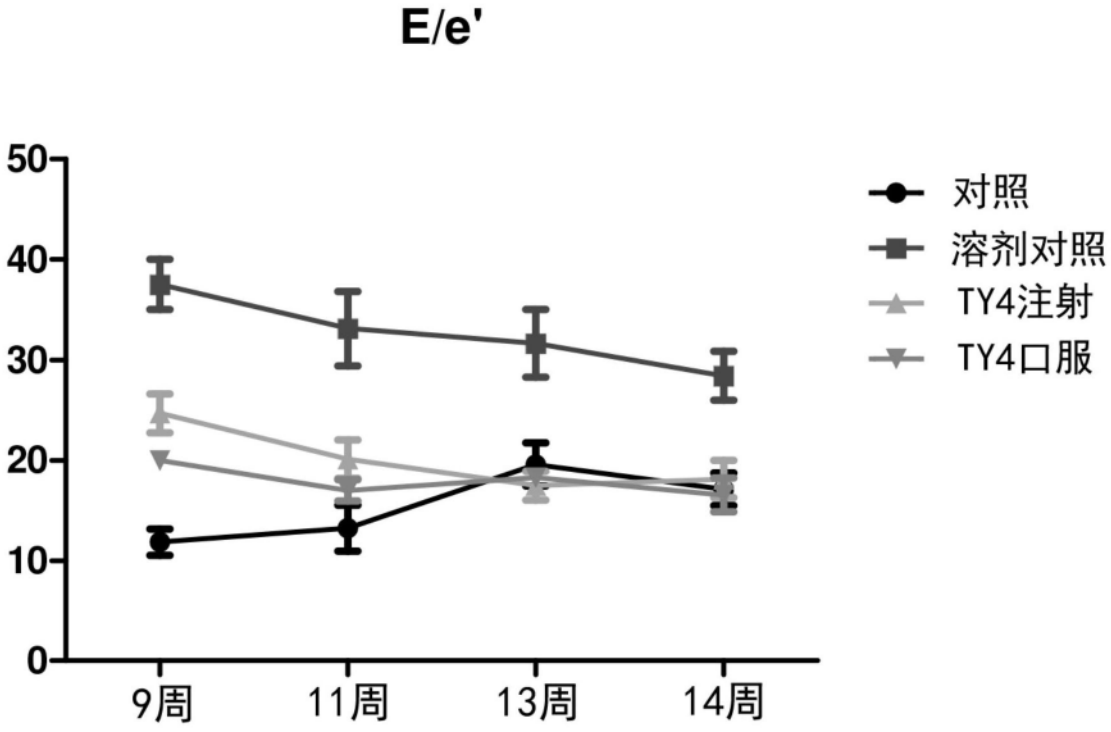

E/e'
50
40
30
20
10
0
9周
11周
13周
14周
对照
溶剂对照
TY4注射
TY4口服

图8L

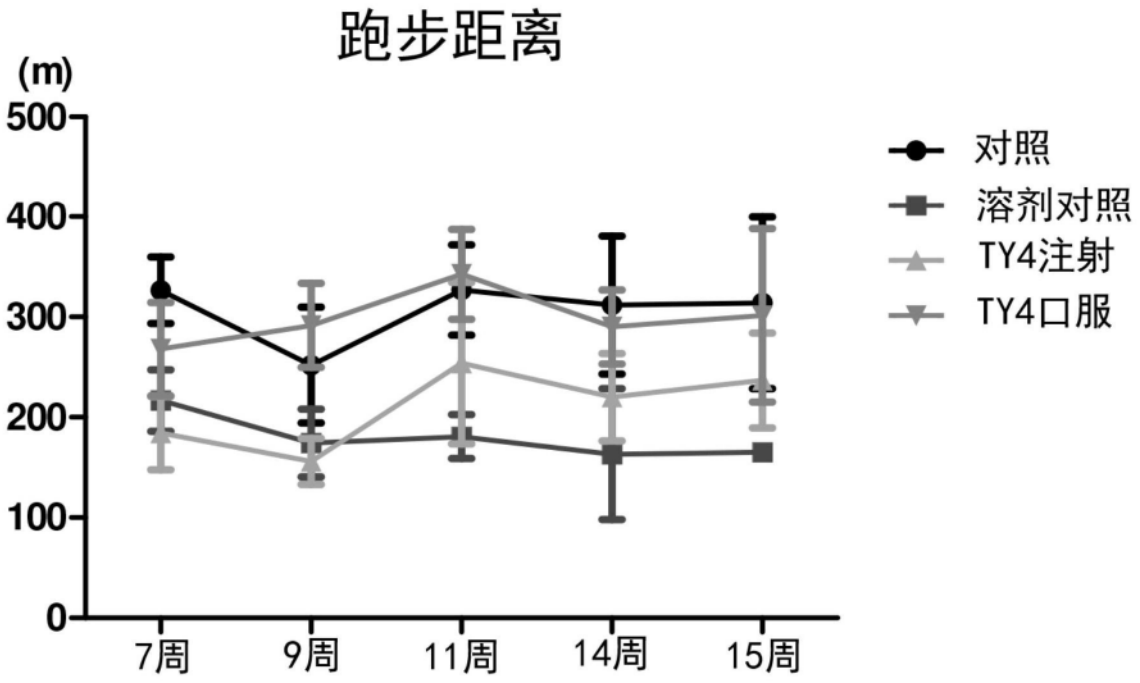

跑步距离
(m)
500
400
300
200
100
0
7周
9周
11周
14周
15周
对照
溶剂对照
TY4注射
TY4口服

图8M

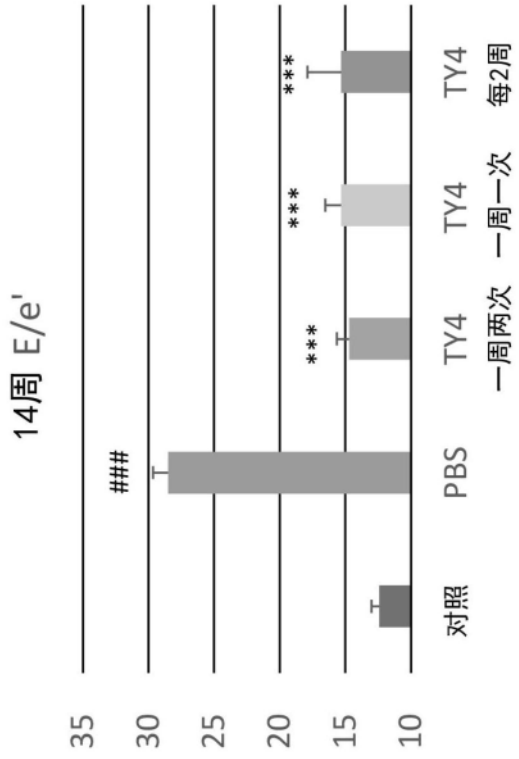

14周 E/e'
###
***
***
***
对照
PBS
TY4
TY4
TY4
一周两次
一周一次
每2周
35
30
25
20
15
10

图9A

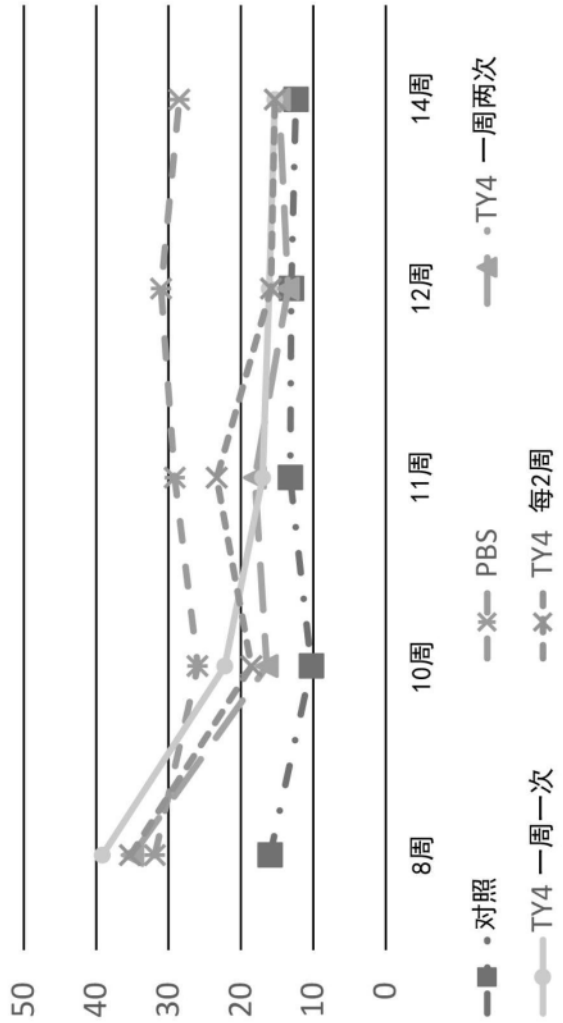

50
40
30
20
10
0
8周
10周
11周
12周
14周
对照
PBS
TY4 一周两次
TY4 一周一次
TY4 每2周

图9B

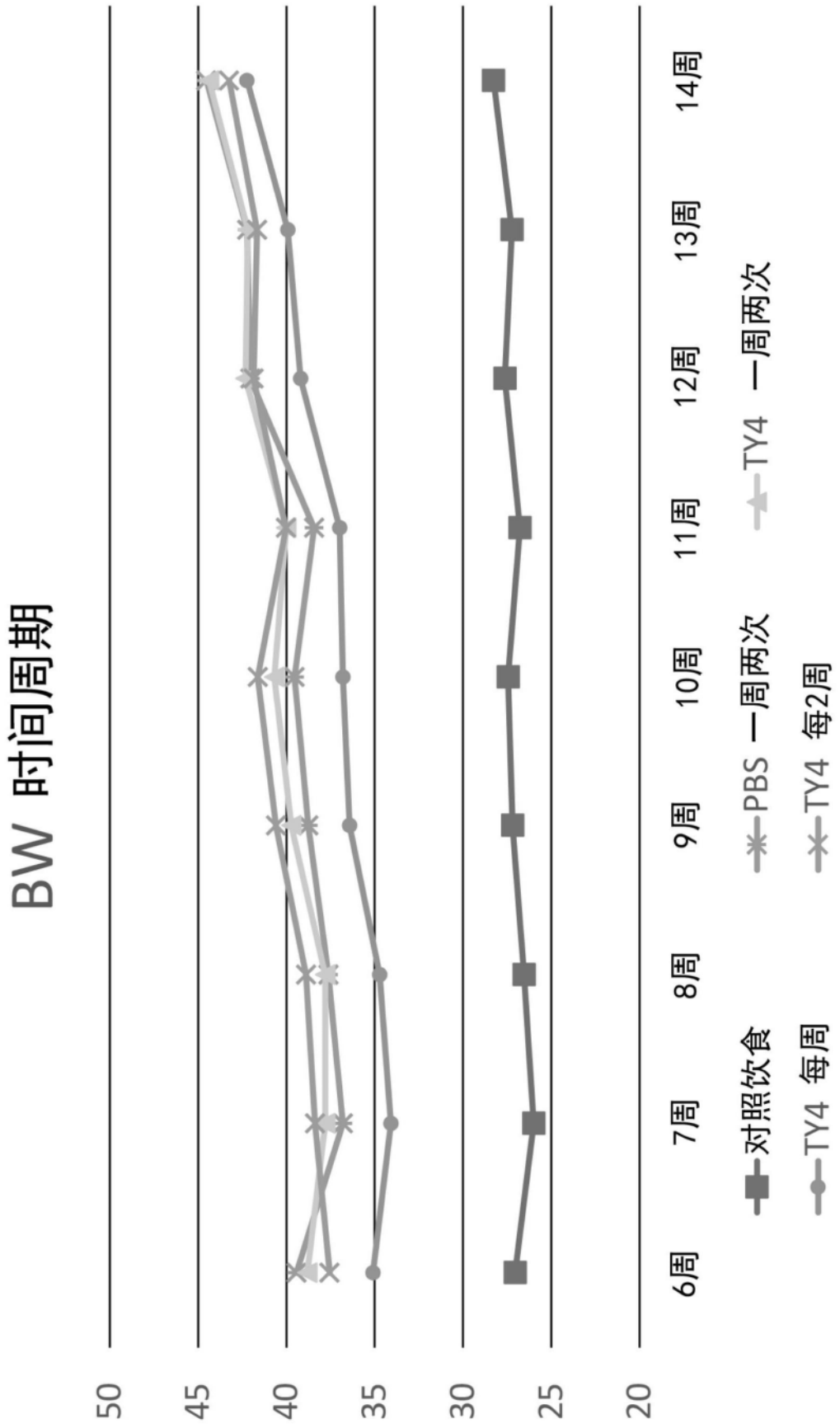

BW 时间周期
50
45
40
35
30
25
20
6周
7周
8周
9周
10周
11周
12周
13周
14周
对照饮食
PBS 一周两次
TY4 一周两次
TY4 每周
TY4 每2周

图9C

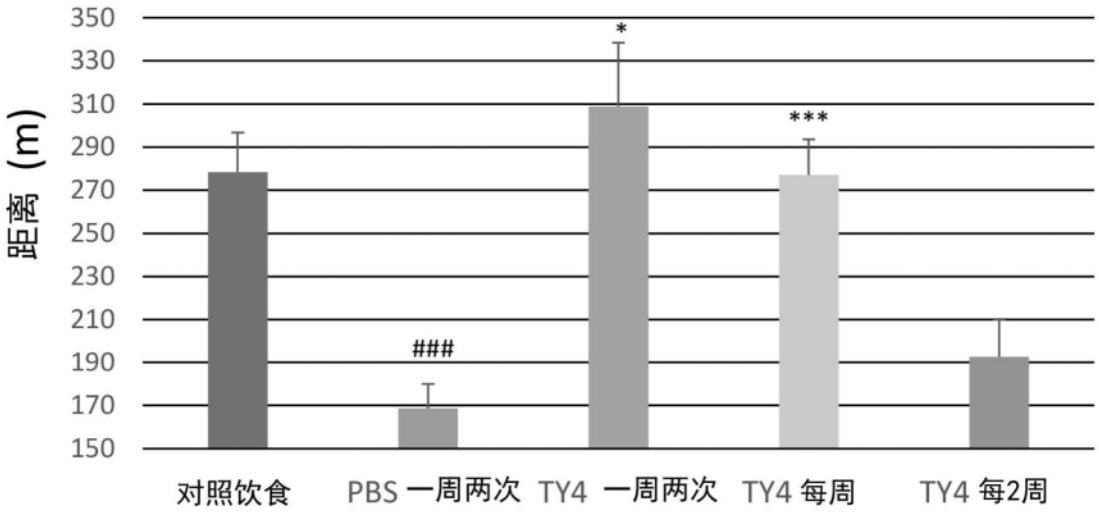

350
330
310
290
270
250
230
210
190
170
150
距离 (m)
*
###
***
对照饮食
PBS 一周两次
TY4 一周两次
TY4 每周
TY4 每2周

图9D

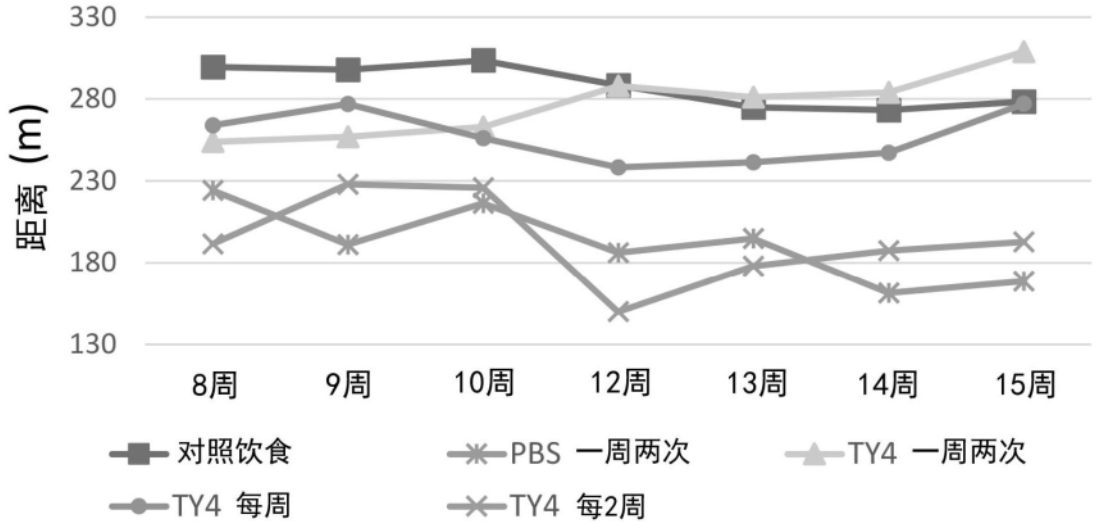

330
280
230
180
130
距离 (m)
8周
9周
10周
12周
13周
14周
15周
对照饮食
PBS 一周两次
TY4 一周两次
TY4 每周
TY4 每2周

图9E

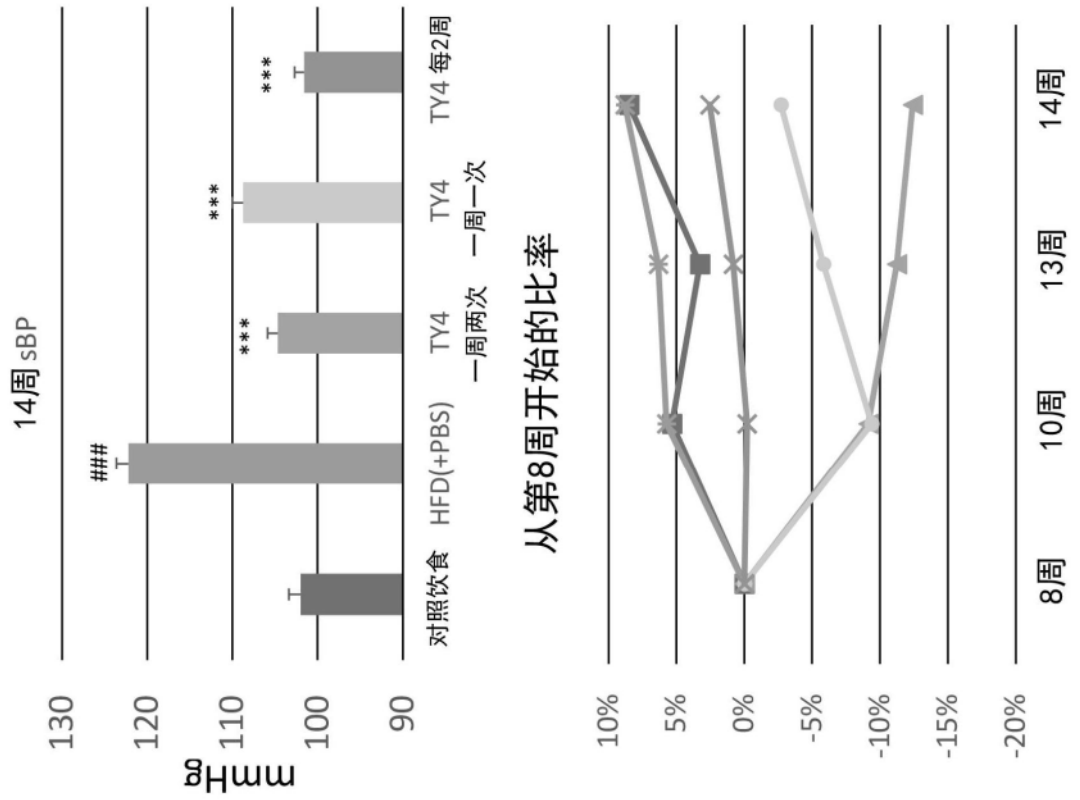

14周 sBP
mmHg
130
120
110
100
90
###
***
***
***
对照饮食
HFD(+PBS)
TY4
TY4
TY4 每2周
一周两次
一周一次
从第8周开始的比率
10%
5%
0%
-5%
-10%
-15%
-20%
8周
10周
13周
14周

图9F

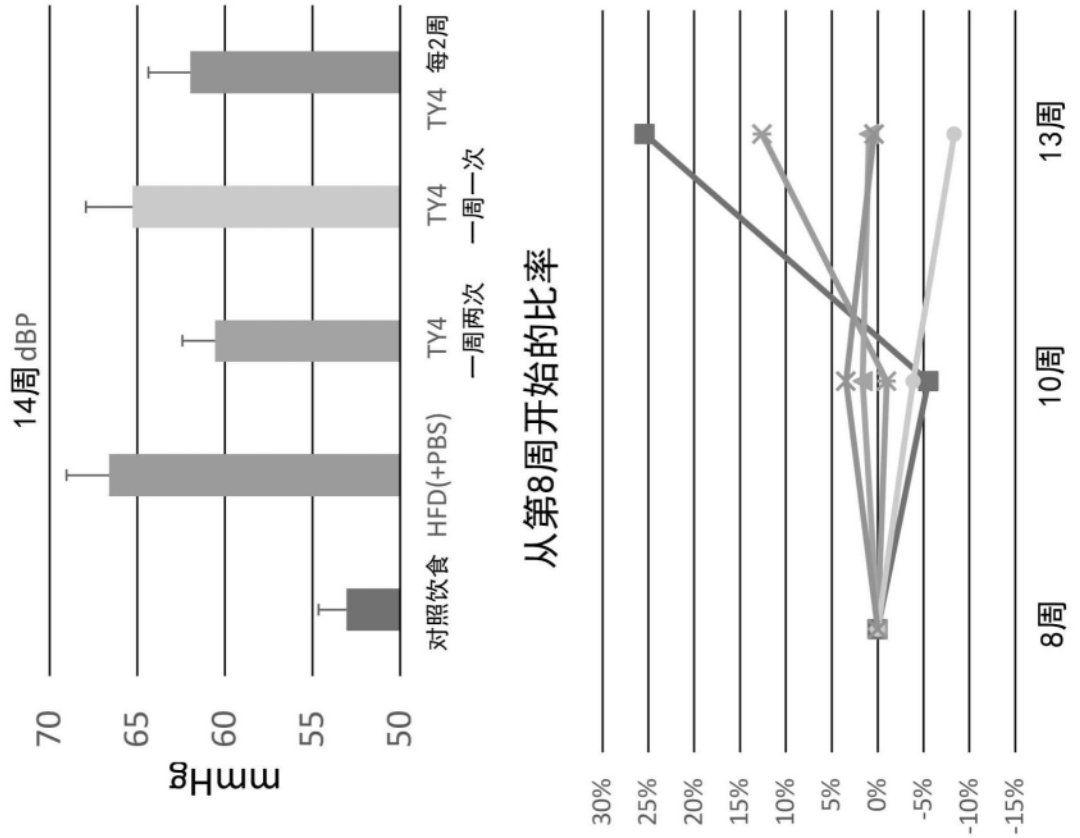

14周 dBP
mmHg
70
65
60
55
50
对照饮食
HFD(+PBS)
TY4 一周两次
TY4 一周一次
TY4 每2周
从第8周开始的比率
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
-5%
-10%
-15%
8周
10周
13周

图9G

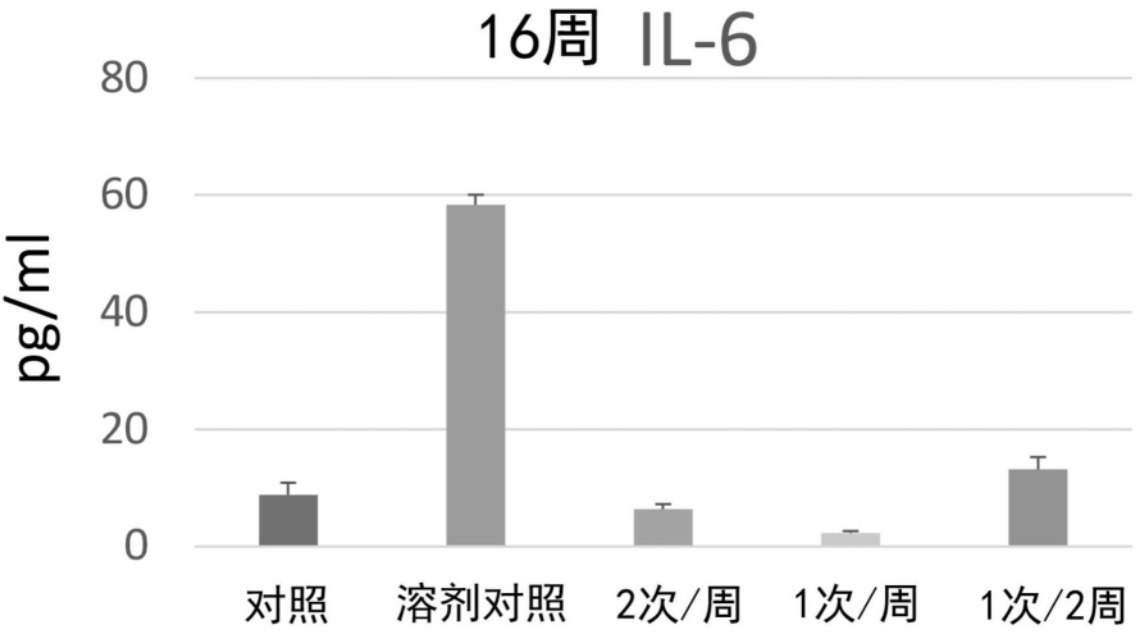

16周 IL-6
pg/ml
80
60
40
20
0
对照
溶剂对照
2次/周
1次/周
1次/2周

图10A

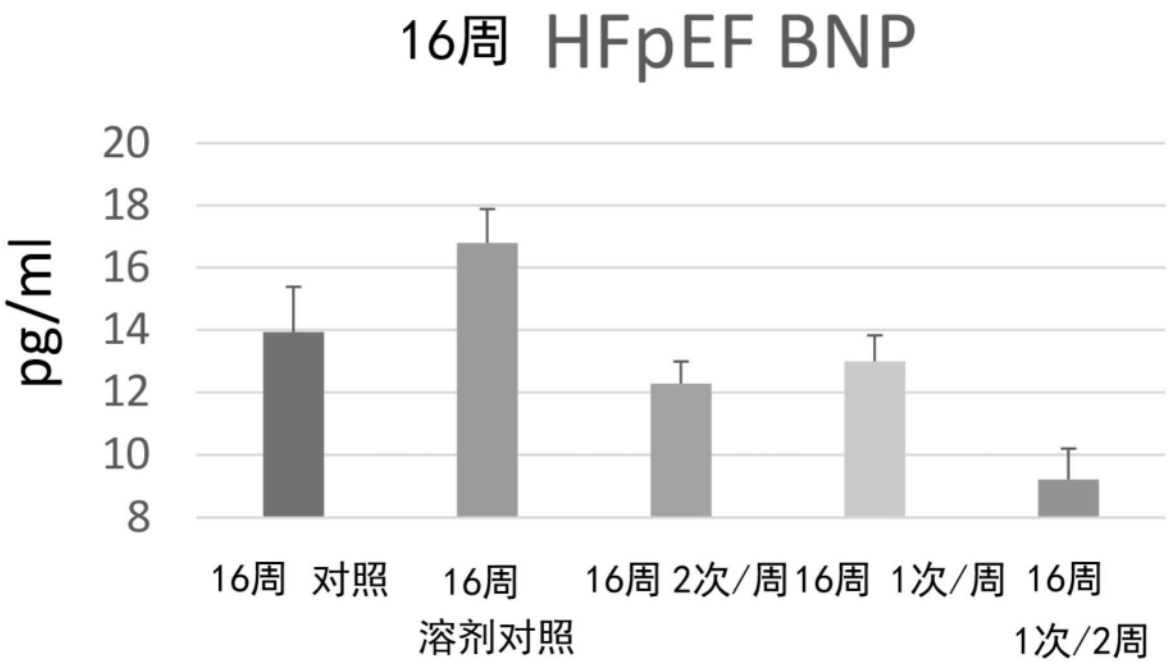


图10B

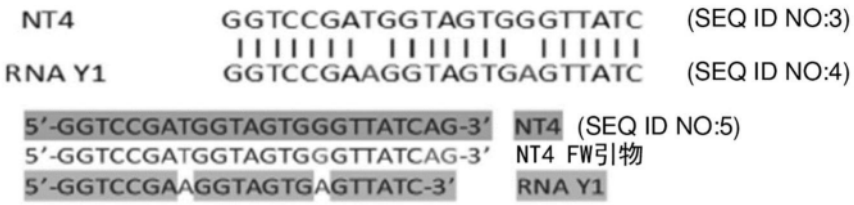


图11A

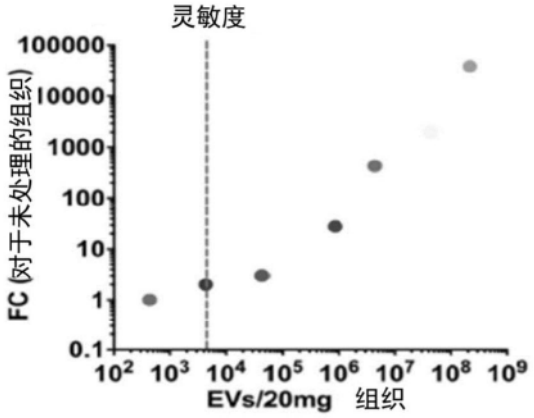


图11B

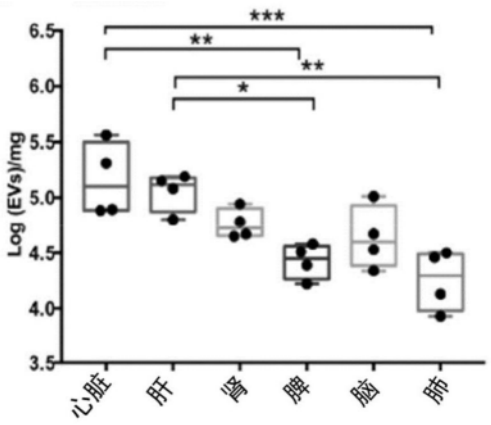


图11C

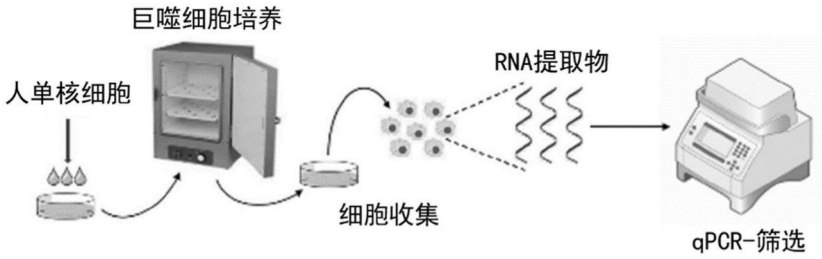


图12A

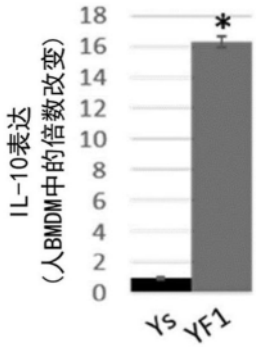


图12B

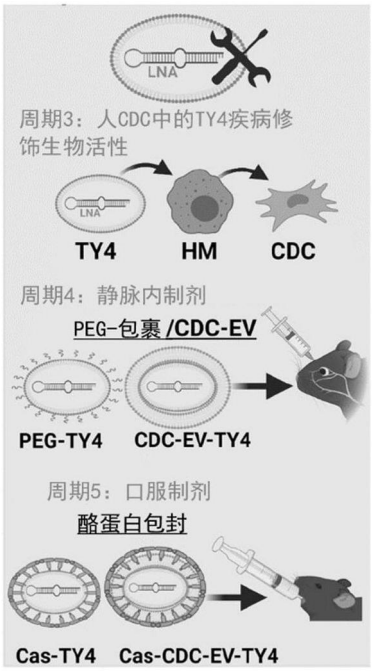


图13

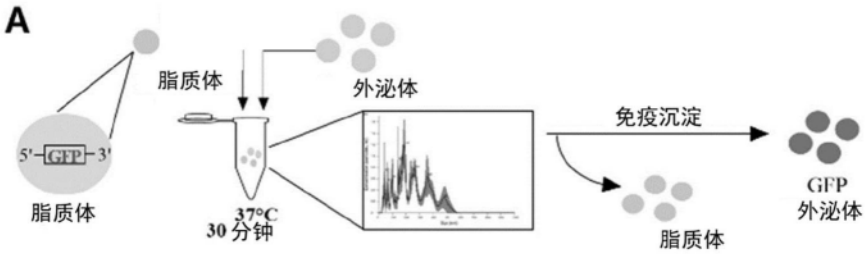


图14A

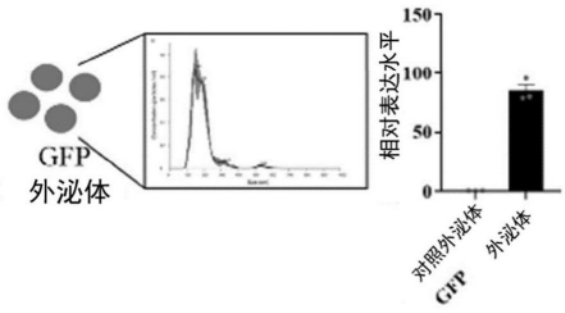


图14B

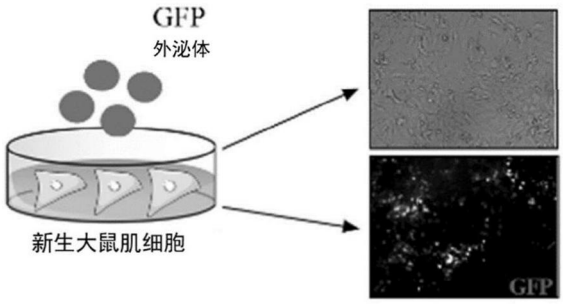

GFP
外泌体
新生大鼠肌细胞
GFP

图14C

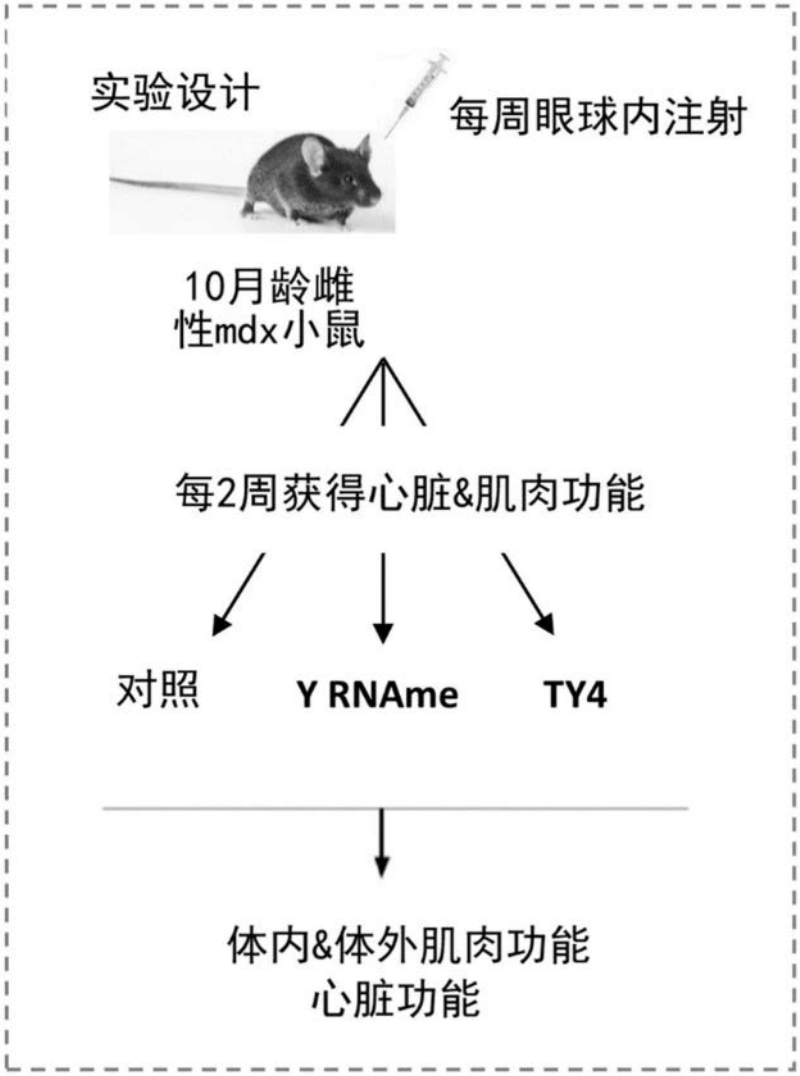

实验设计
每周眼球内注射
10月龄雌
性mdx小鼠
每2周获得心脏&肌肉功能
对照
Y RNAme
TY4
体内&体外肌肉功能
心脏功能

图15

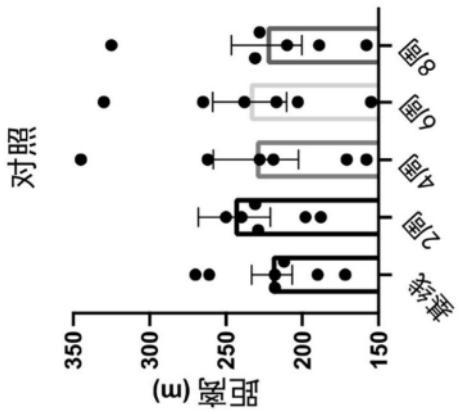


图16A

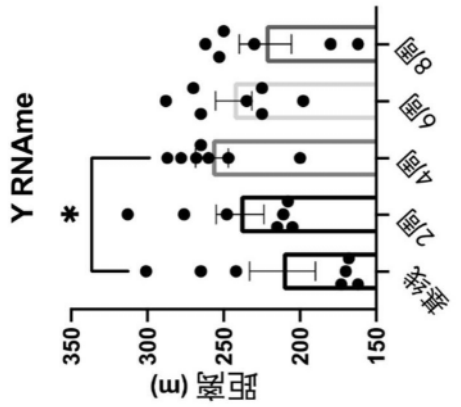


图16B

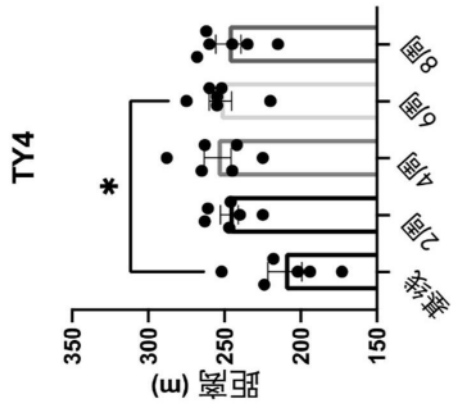


图16C

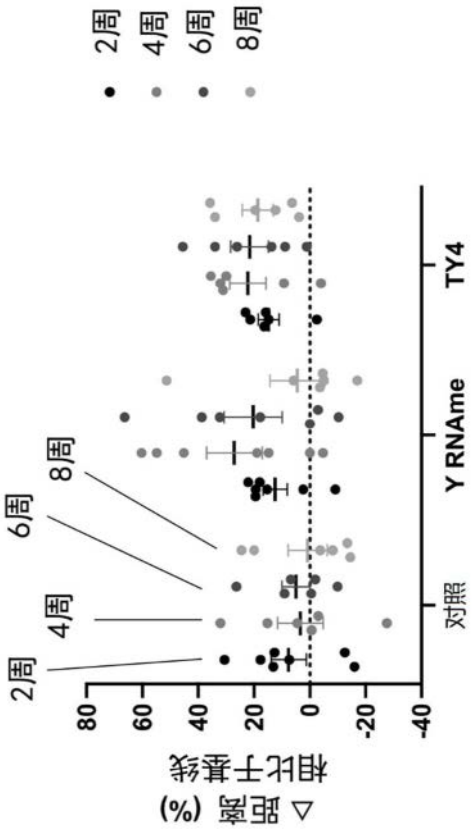

2周
4周
6周
8周
△ 距离 (%)
相比于基线
80
60
40
20
0
-20
-40
2周
4周
6周
8周
对照
Y RNAme
TY4

图16D

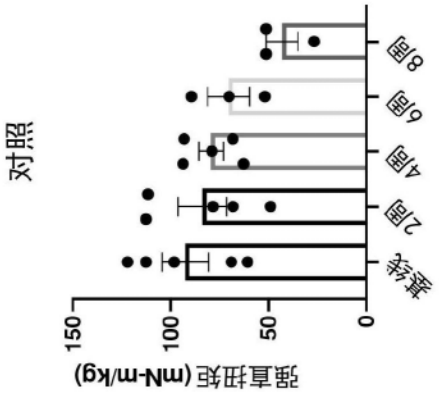

强直扭矩 (mN-m/kg)
150
100
50
0
基线
2周
4周
6周
8周
对照

图17A

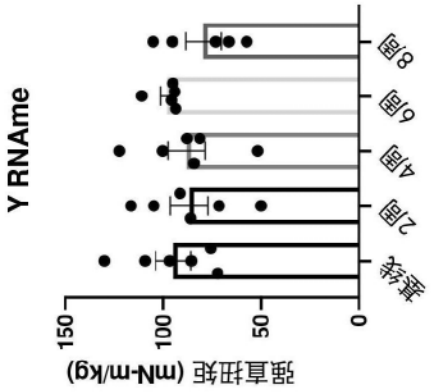


图17B

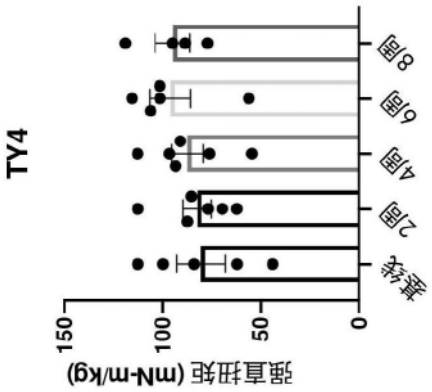


图17C

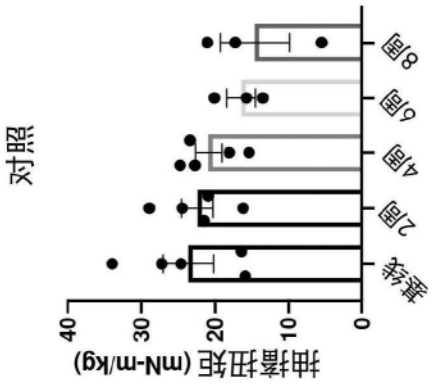


图17D

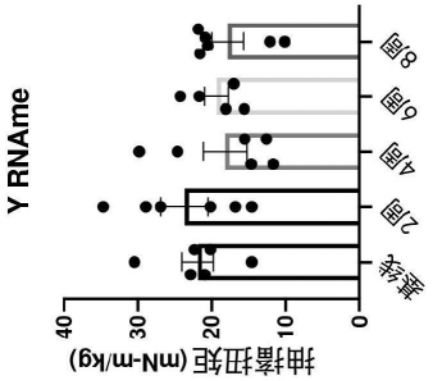


图17E

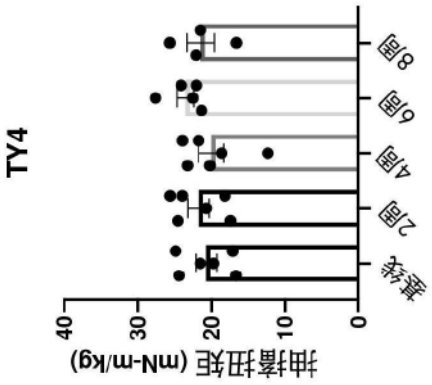


图17F

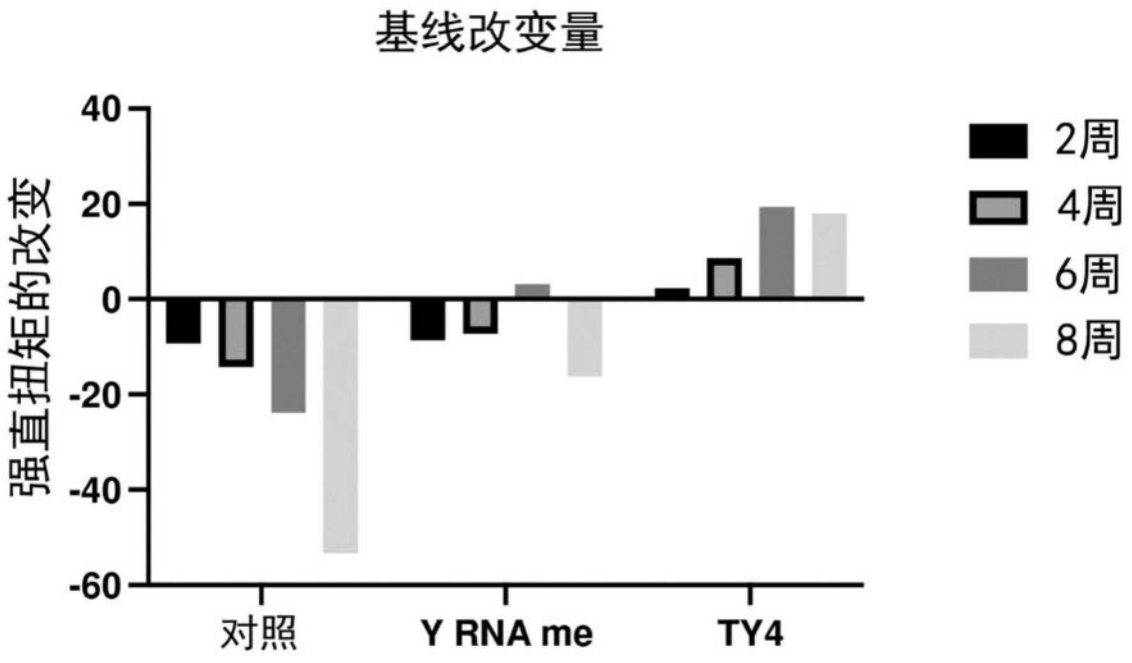


图18A

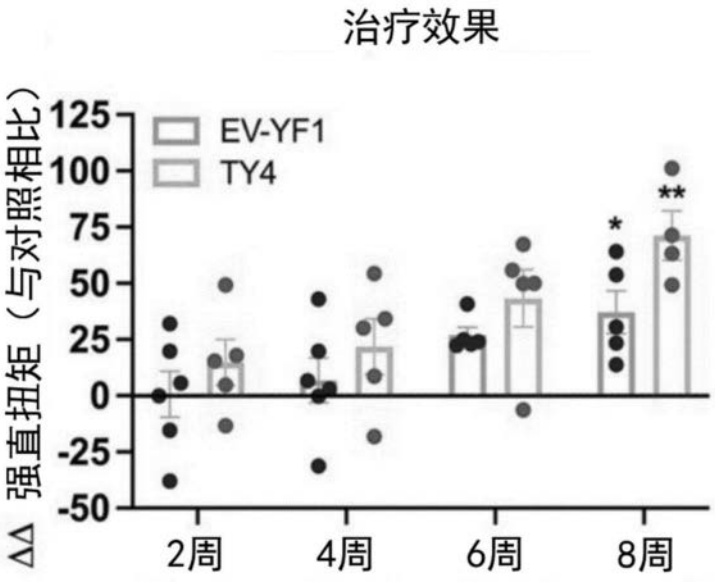
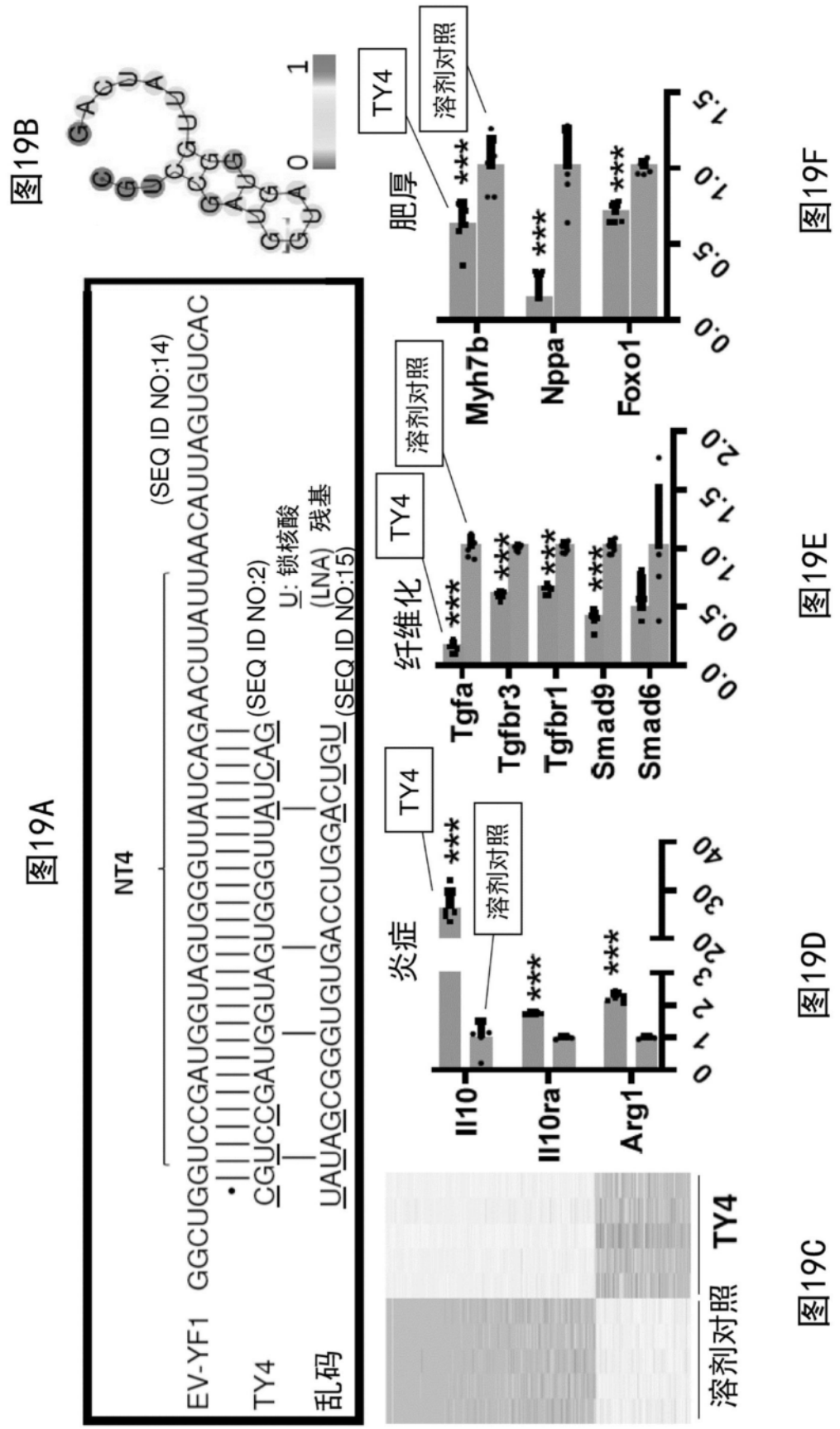
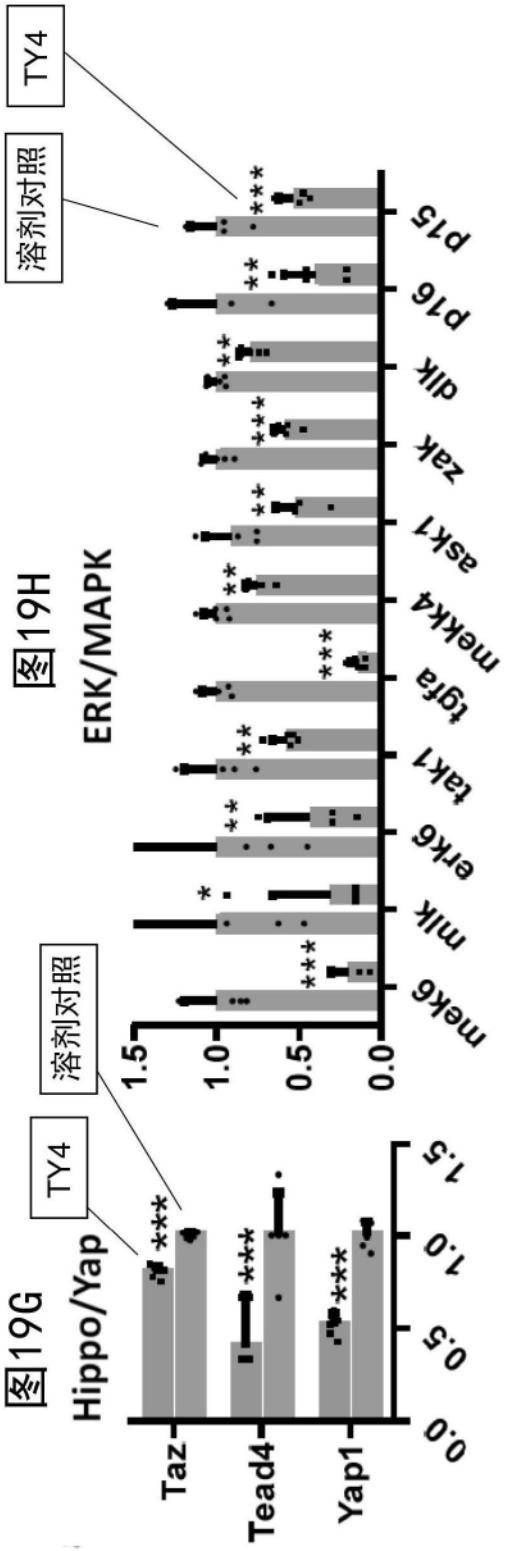


图18B


图19A
NT4
(SEQ ID NO:14)
EV-YF1 GGCUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAACAUUAGUGUCAC
TY4 CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:2)
乱码 UAUAGCGGGUGUGACCUGGACUGU (SEQ ID NO:15)
U: 锁核酸 (LNA) 残基
图19B
1
0
图19C
溶剂对照
TY4
炎症
TY4
溶剂对照
Il10
Il10ra
Arg1
图19D
纤维化
TY4
溶剂对照
Tgfa
Tgfbr3
Tgfbr1
Smad9
Smad6
图19E
肥厚
TY4
溶剂对照
Myh7b
Nppa
Foxo1
图19F


图19G
Hippo/Yap
TY4
溶剂对照
Taz
Tead4
Yap1
0.0
0.5
1.0
1.5
图19H
ERK/MAPK
溶剂对照
TY4
mekk6
mlk
erk6
tak1
tgfa
mekk4
ask1
zak
dlk
p16
p15

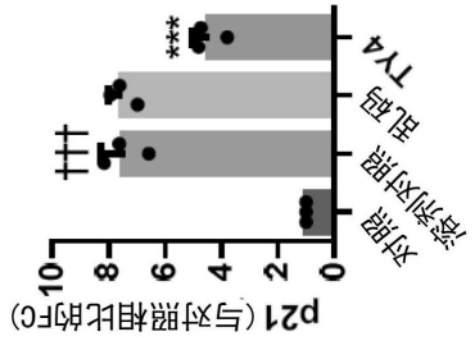


图19I

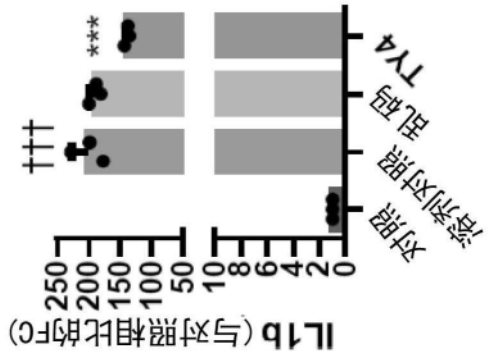


图19J

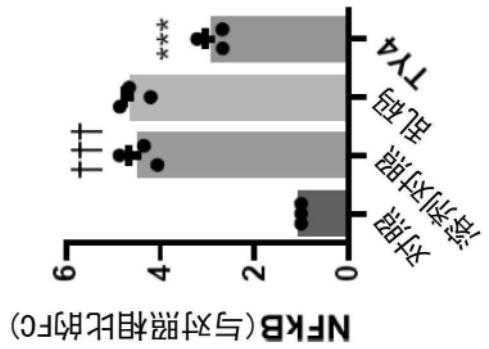


图19K

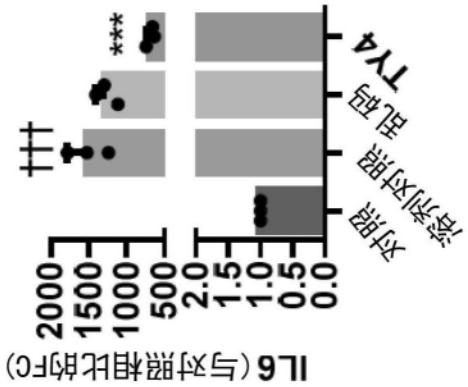
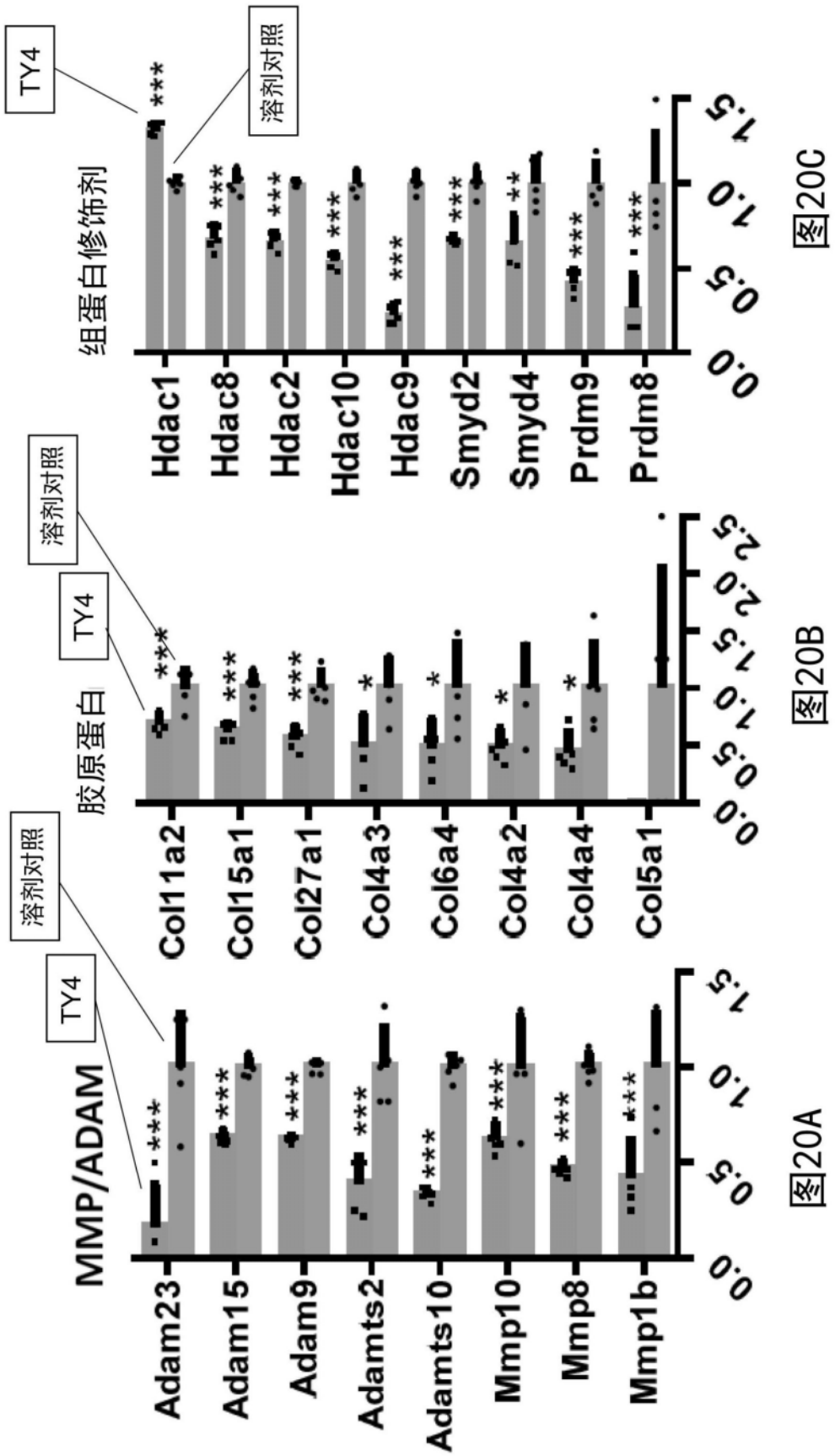


图19L


MMP/ADAM
TY4
溶剂对照
Adam23
Adam15
Adam9
Adamts2
Adamts10
Mmp10
Mmp8
Mmp1b
0.0
0.5
1.0
1.5
图20A
胶原蛋白
TY4
溶剂对照
Col11a2
Col15a1
Col27a1
Col4a3
Col6a4
Col4a2
Col4a4
Col5a1
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
图20B
组蛋白修饰剂
TY4
溶剂对照
Hdac1
Hdac8
Hdac2
Hdac10
Hdac9
Smyd2
Smyd4
Prdm9
Prdm8
0.0
0.5
1.0
1.5
图20C

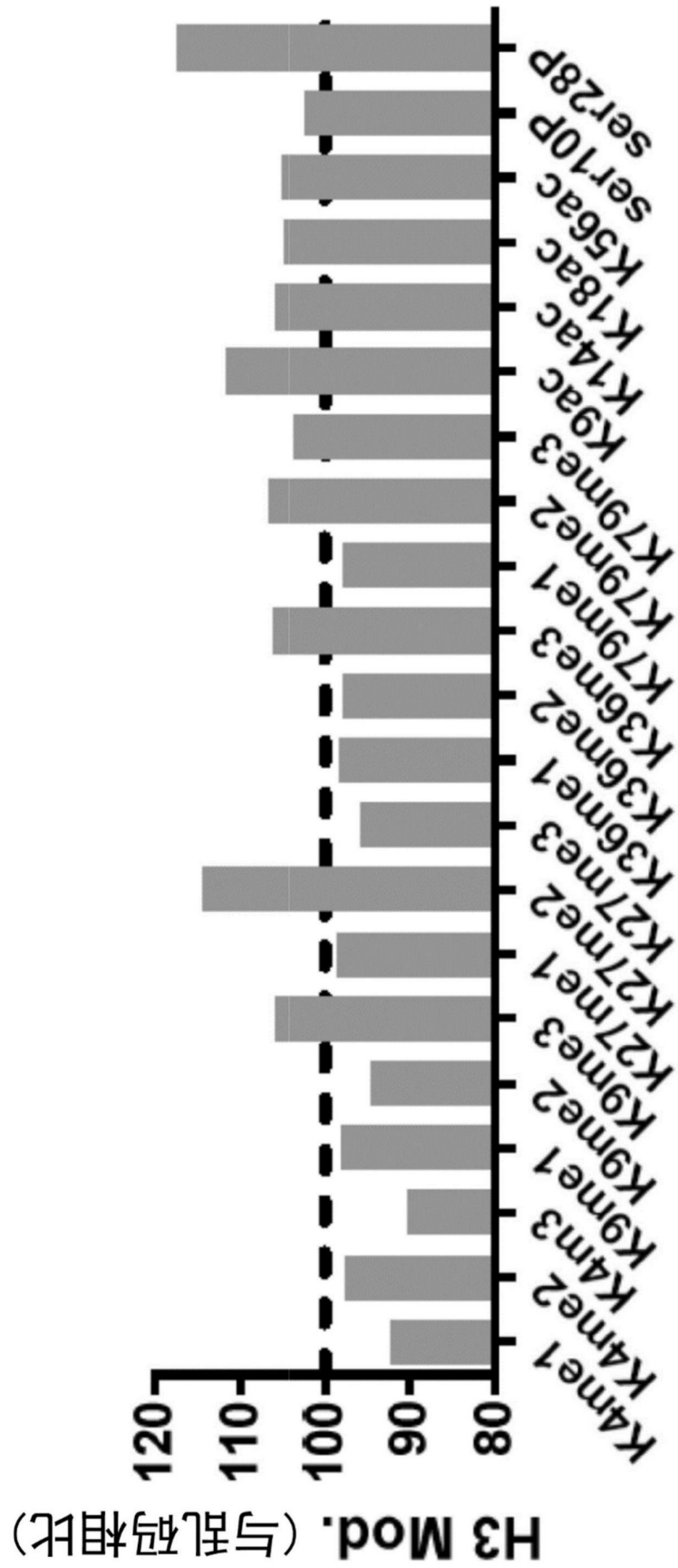

H3 Mod. (与乱码相比)
120
110
100
90
80
K4me1
K4me2
K4me3
K9me1
K9me2
K9me3
K27me1
K27me2
K27me3
K36me1
K36me2
K36me3
K79me1
K79me2
K79me3
K9ac
K14ac
K18ac
K56ac
ser10P
ser28P

图20D

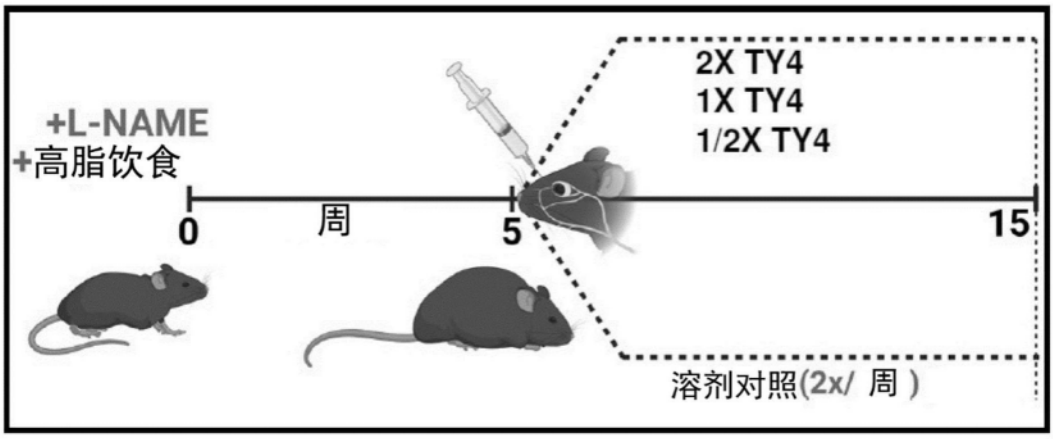


图21A

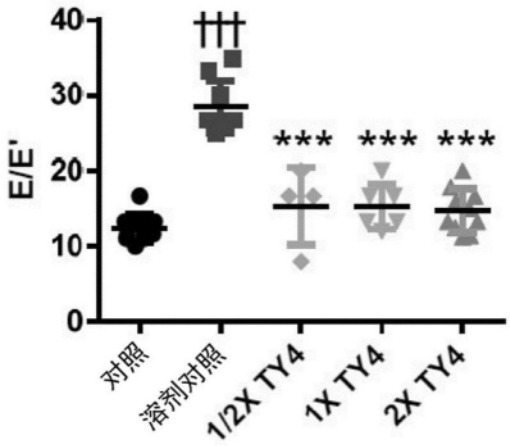


图21B

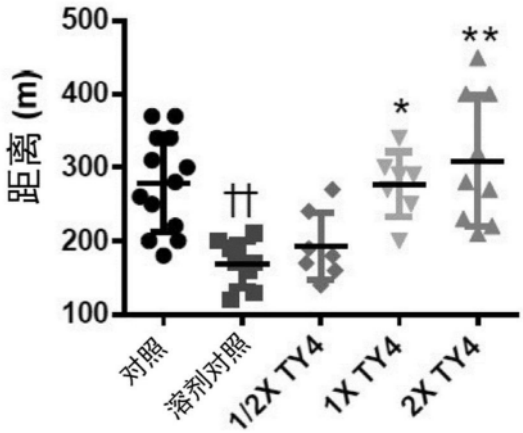


图21C

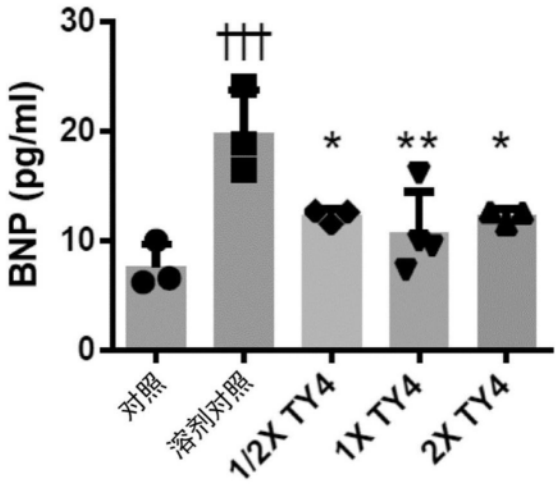

BNP (pg/ml)
30
20
10
0
†††
*
**
*
对照
溶剂对照
1/2X TY4
1X TY4
2X TY4

图21D

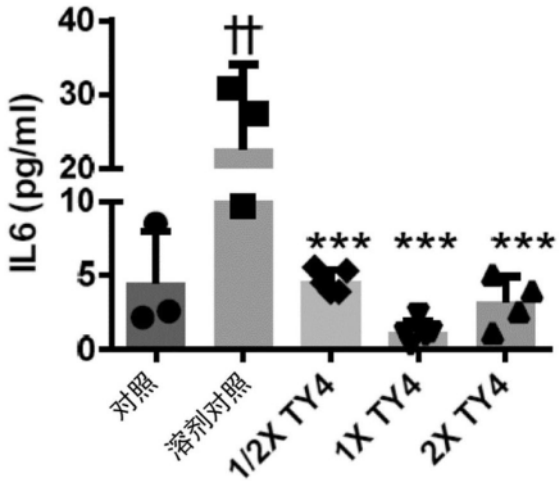
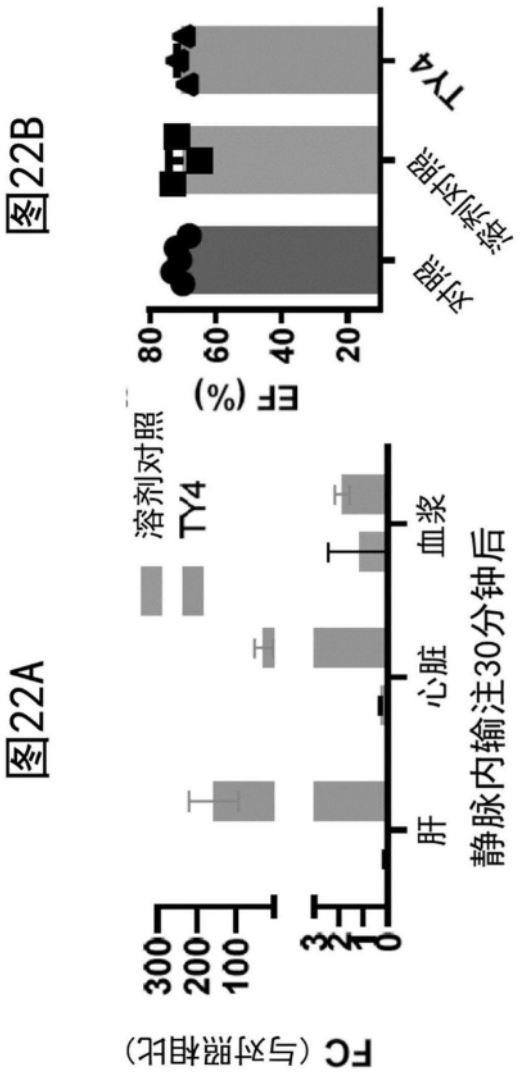

IL6 (pg/ml)
40
30
20
10
5
0
††
***
***
***
对照
溶剂对照
1/2X TY4
1X TY4
2X TY4

图21E


图22A
溶剂对照
TY4
FC（与对照相比）
300
200
100
3
2
1
0
肝
心脏
血浆
静脉内输注30分钟后
图22B
EF (%)
80
60
40
20
对照
溶剂对照
TY4

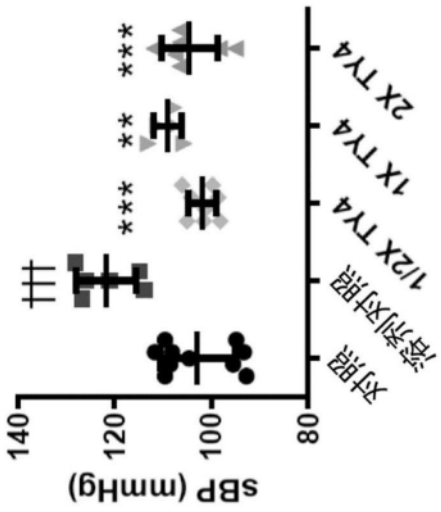

sBP (mmHg)
140
120
100
80
****
**
****
对照
溶剂对照
1/2X TY4
1X TY4
2X TY4

图22C

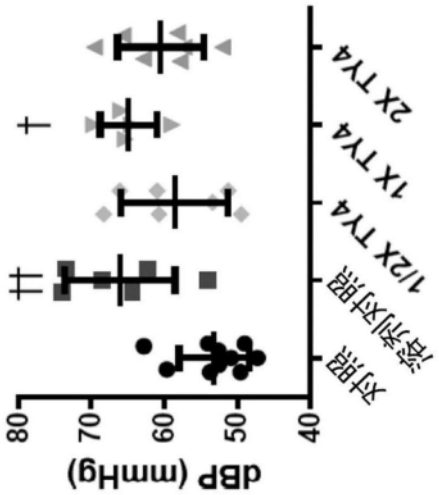


图22D

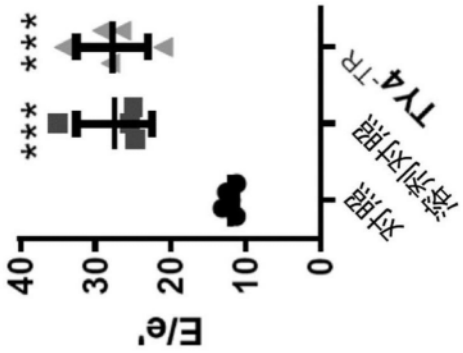


图22E

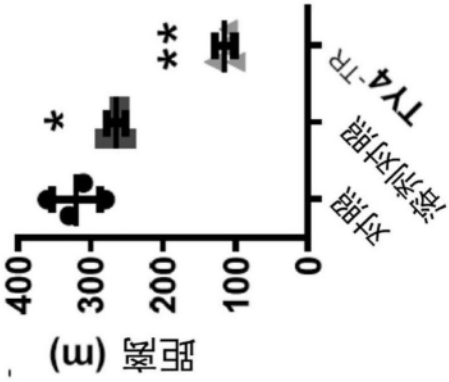


图22F

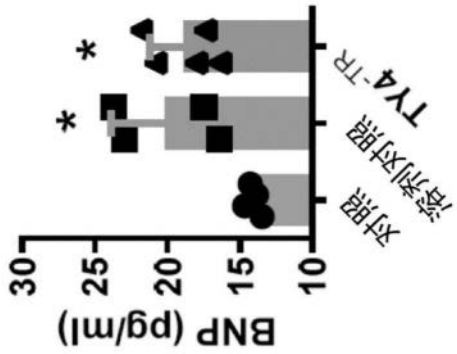


图22G

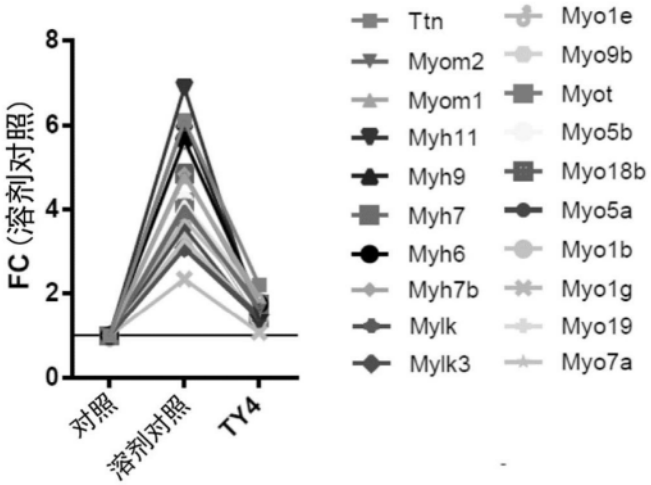


图23A

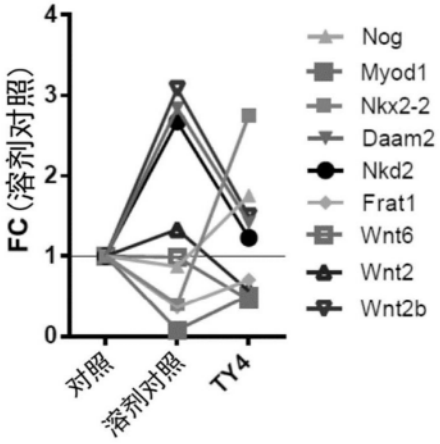


图23B

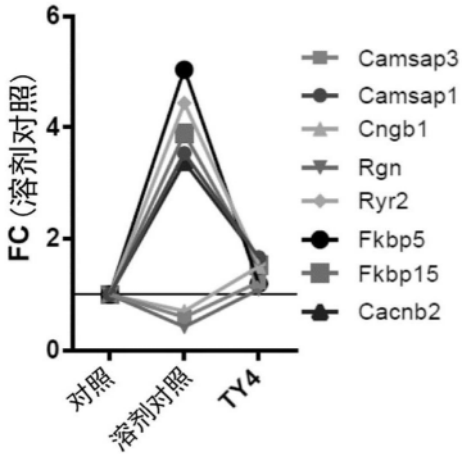


图23C

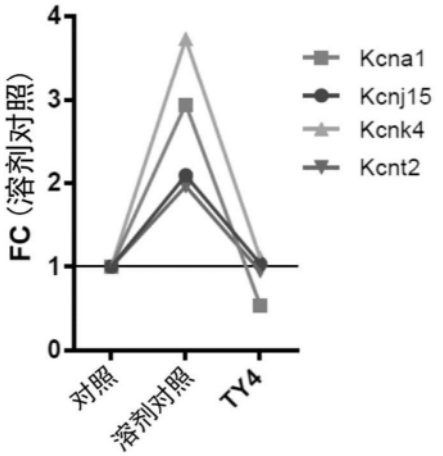


图23D

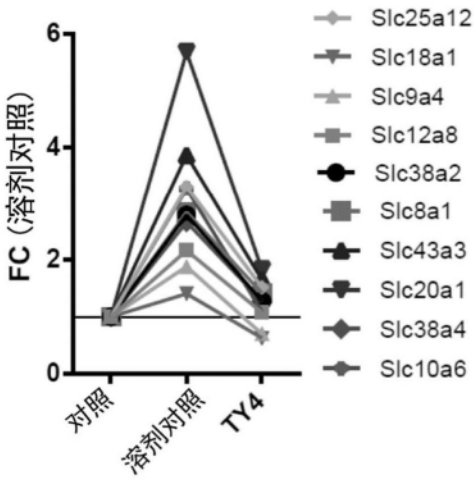


图23E

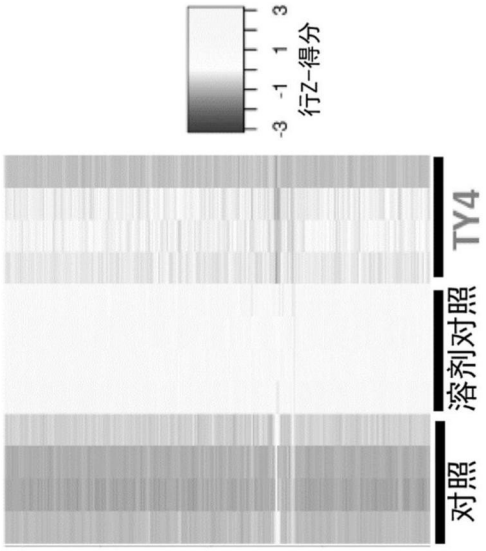

行Z-得分
-3
-1
1
3
对照
溶剂对照
TY4

图24A

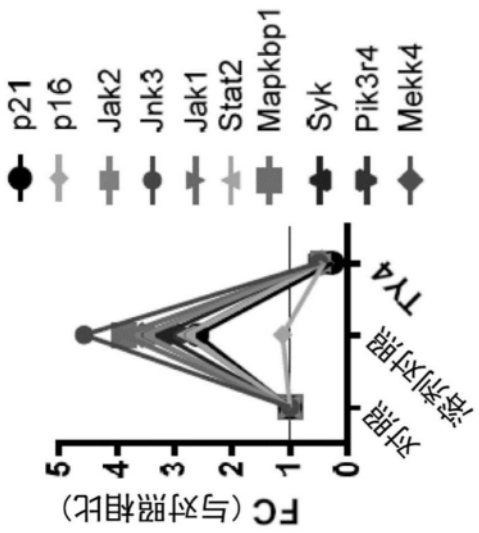

p21
p16
Jak2
Jnk3
Jak1
Stat2
Mapkbp1
Syk
Pik3r4
Mekk4
FC（与对照相比）
0
1
2
3
4
5
对照
溶剂对照
TY4

图24B

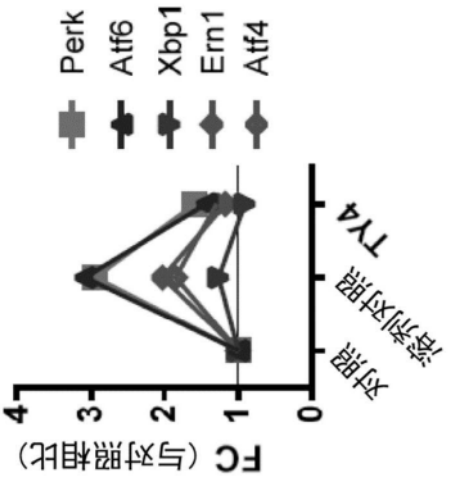


图24C

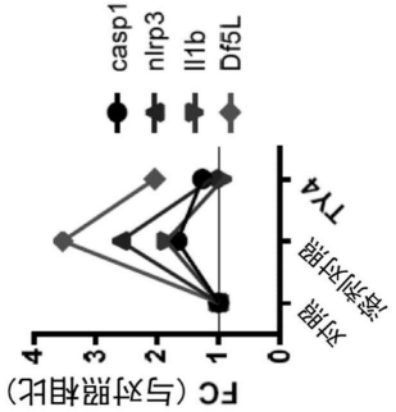


图24D

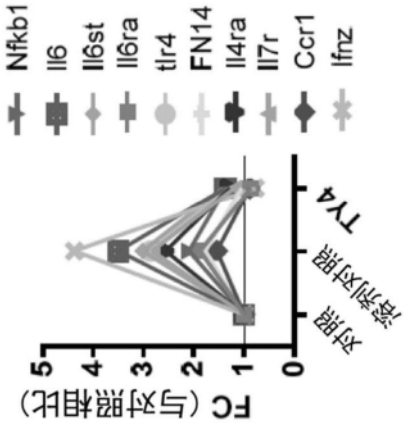
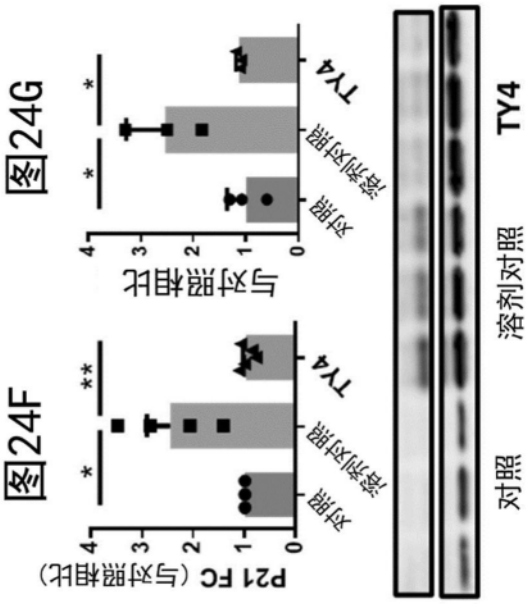


图24E


图24G
与对照相比
对照
溶剂对照
TY4
图24F
P21 FC（与对照相比）
对照
溶剂对照
TY4
对照
溶剂对照
TY4

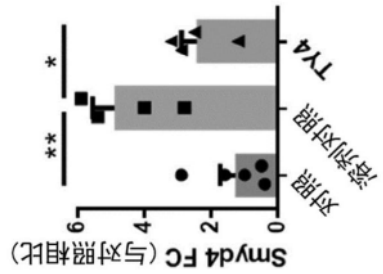

Smyd4 FC（与对照相比）
对照
溶剂对照
TY4

图24H

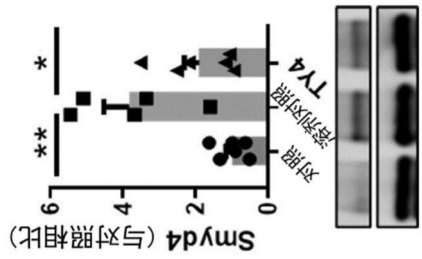

Smyd4（与对照相比）
对照
溶剂对照
TY4

图24I

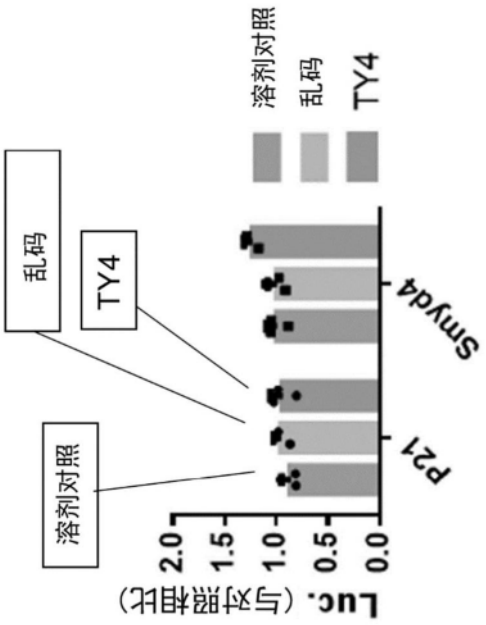


图24J

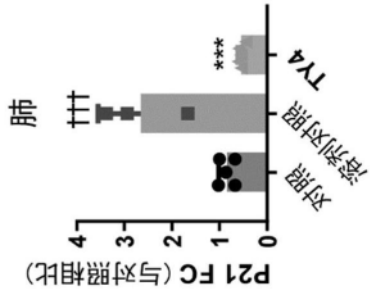


图25A

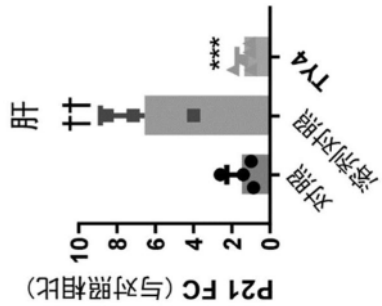


图25B

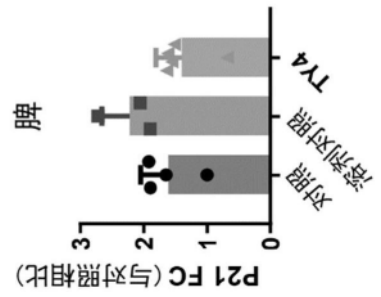


图25C

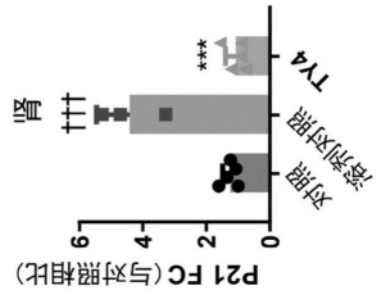


图25D

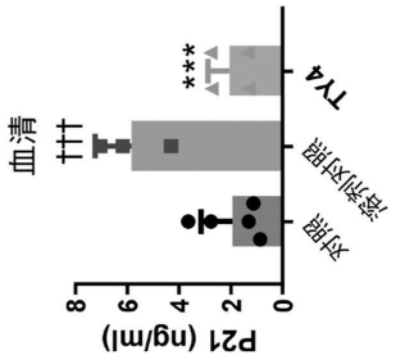


图25E

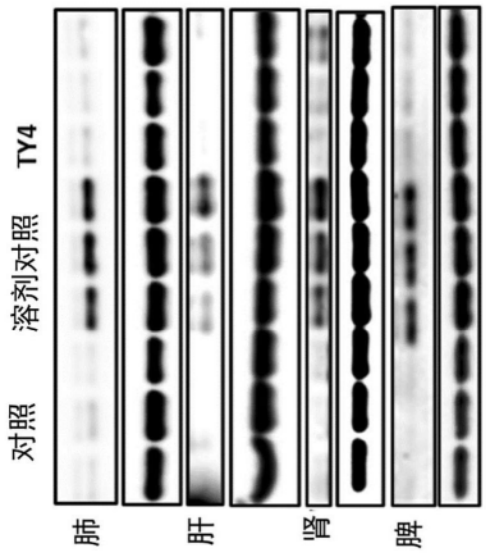


图25F

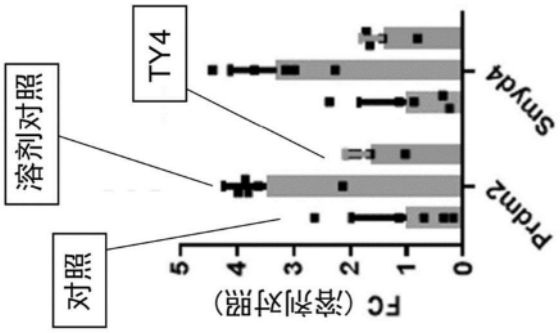


图25G

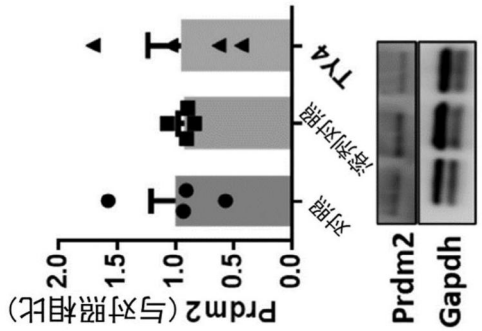


图25H

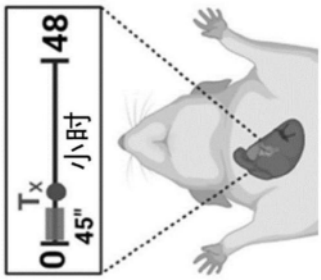


图26A

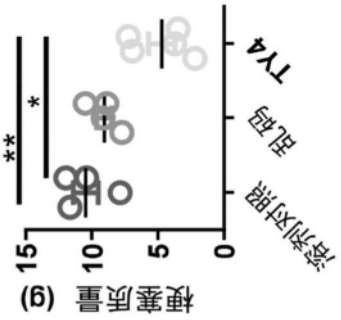


图26B

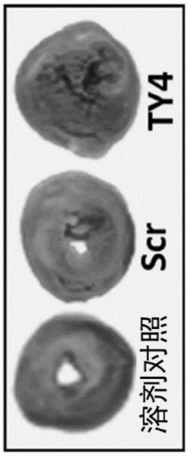


图26C

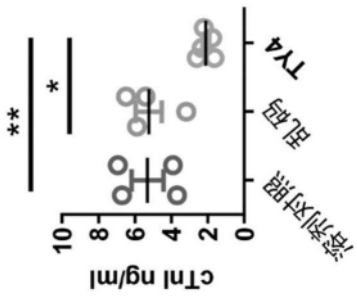


图26D

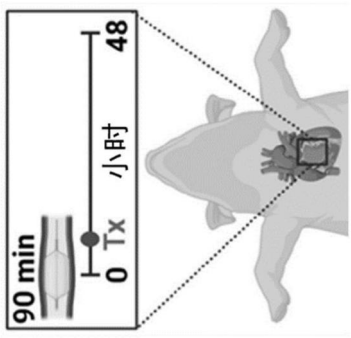


图27A

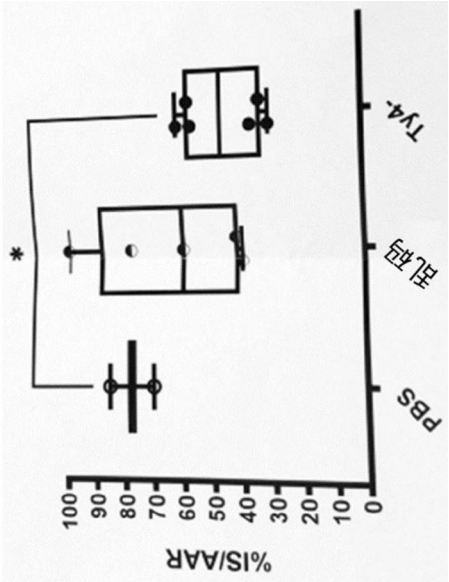


图27B

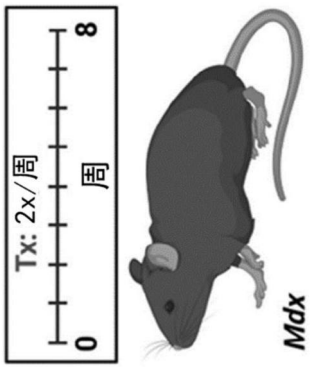


图28A

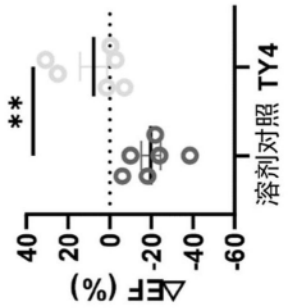


图28B

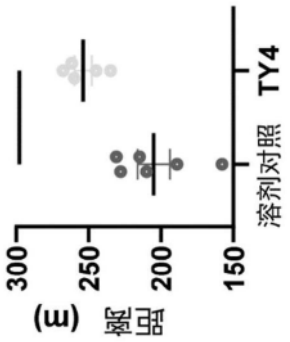


图28C

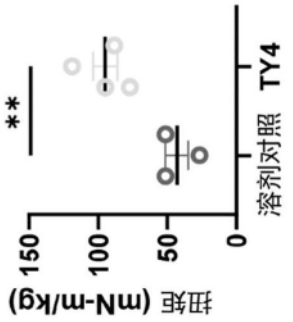


图28D

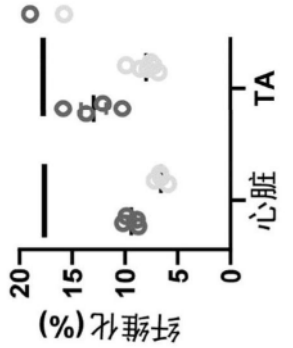


图28E

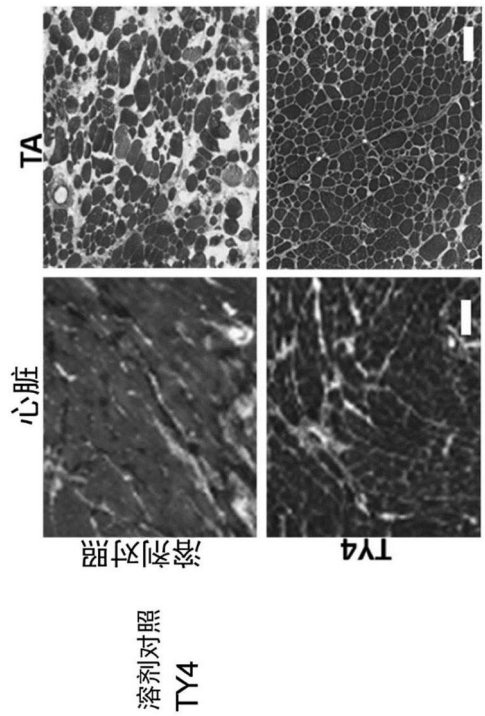


图28F

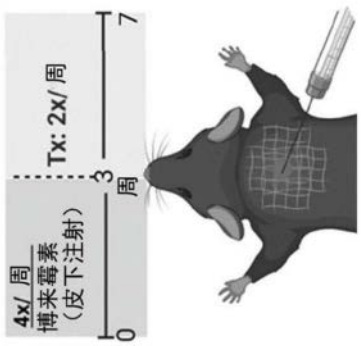


图29A

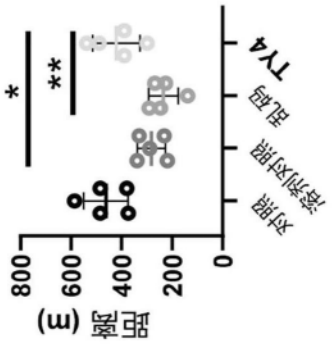


图29B

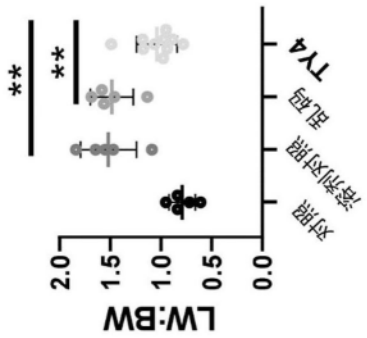


图29C

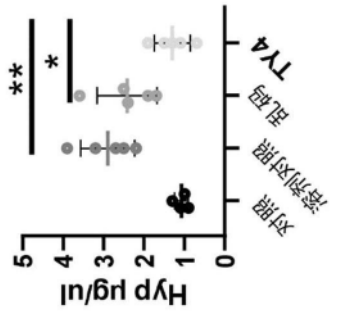

Hyp μg/ul
0
1
2
3
4
5
对照
落利对照
乳酪
TY4
*
**

图29D

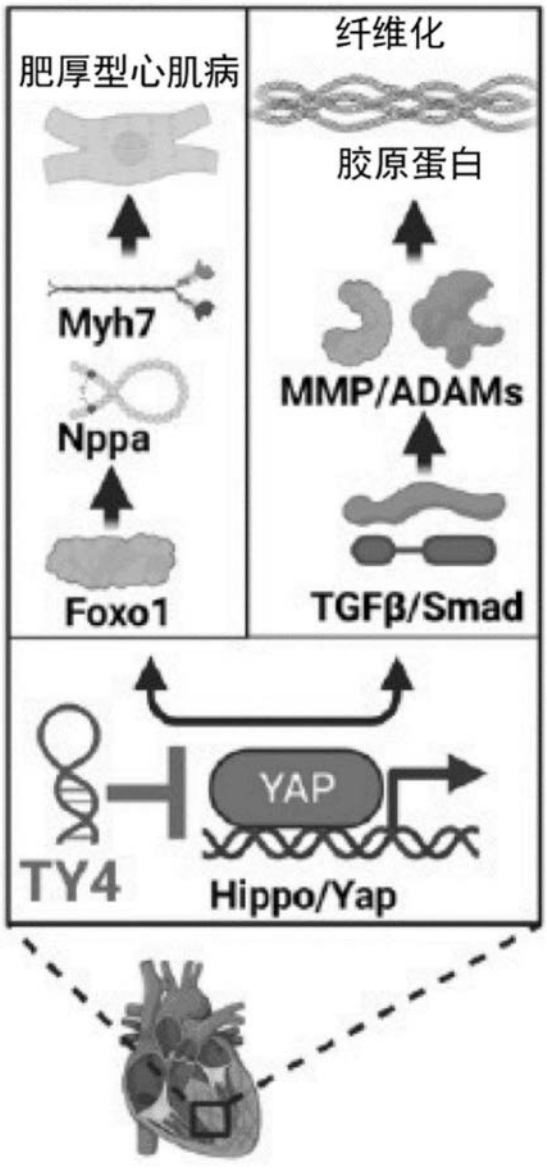

肥厚型心肌病
纤维化
胶原蛋白
Myh7
MMP/ADAMs
Nppa
TGFβ/Smad
Foxo1
YAP
TY4
Hippo/Yap

图30

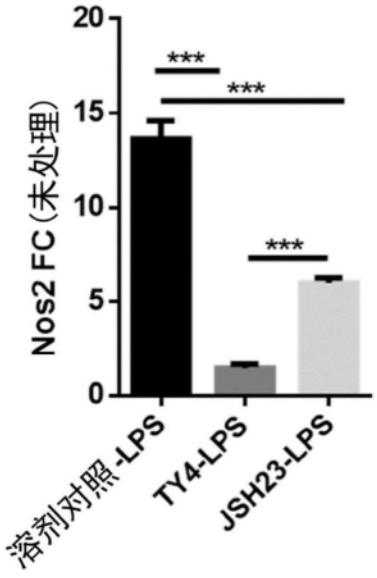

20
15
10
5
0
Nos2 FC(未处理)
***
***
***
溶剂对照-LPS
TY4-LPS
JSH23-LPS

图31A

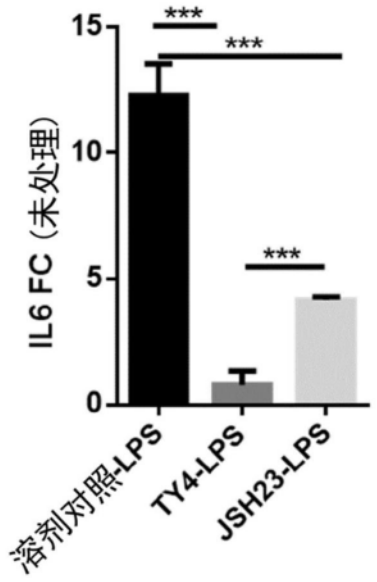

15
10
5
0
IL6 FC (未处理)
***
***
***
溶剂对照-LPS
TY4-LPS
JSH23-LPS

图31B

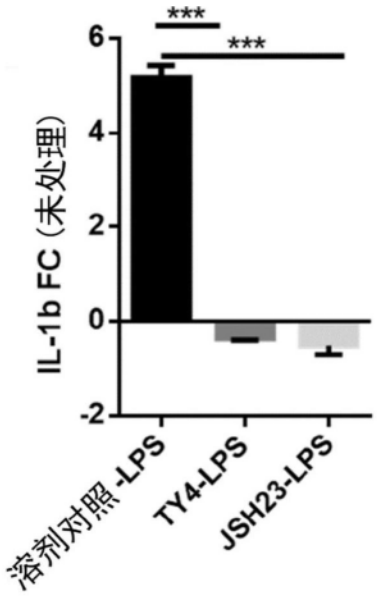

***
***
6
4
2
0
-2
IL-1b FC (未处理)
溶剂对照-LPS
TY4-LPS
JSH23-LPS

图31C

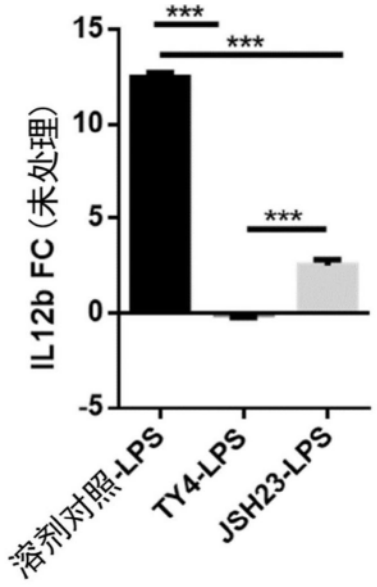

***
***
***
15
10
5
0
-5
IL12b FC (未处理)
溶剂对照-LPS
TY4-LPS
JSH23-LPS

图31D

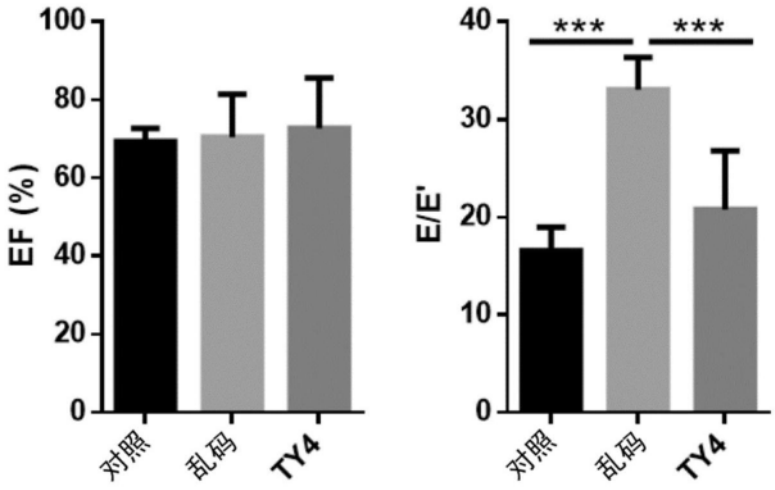


图32

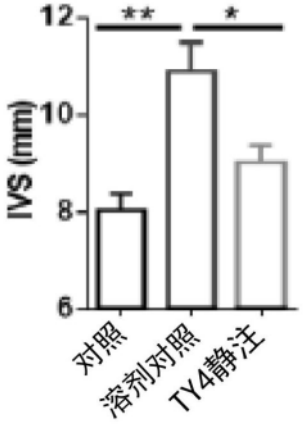


图33A

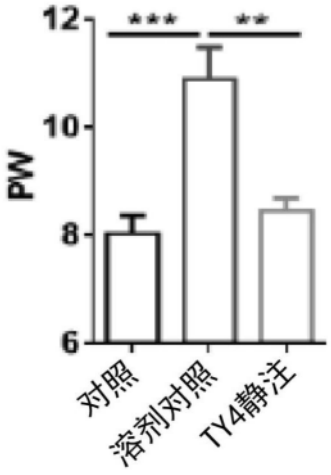


图33B

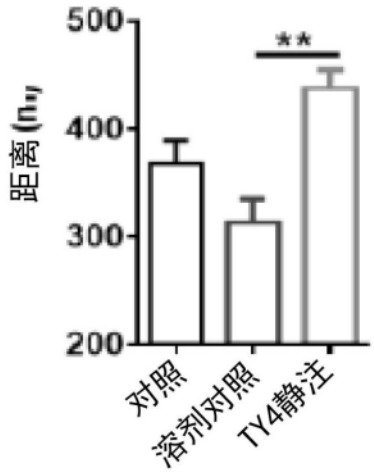


图33C

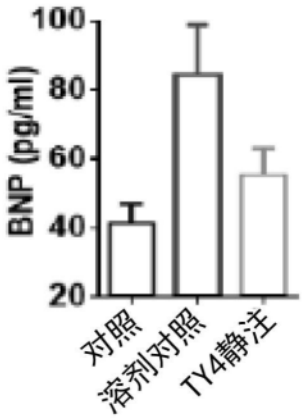


图33D

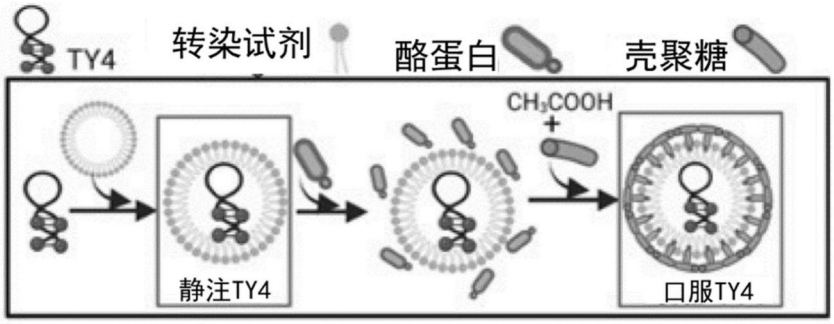


图34

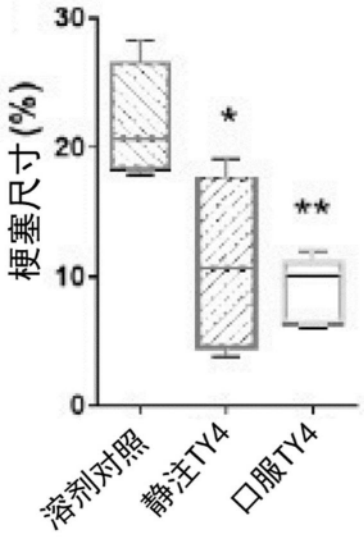


图35A

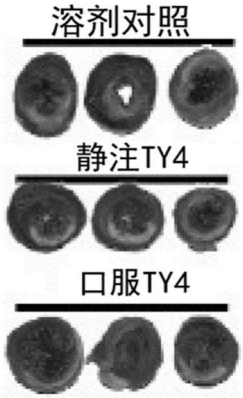


图35B

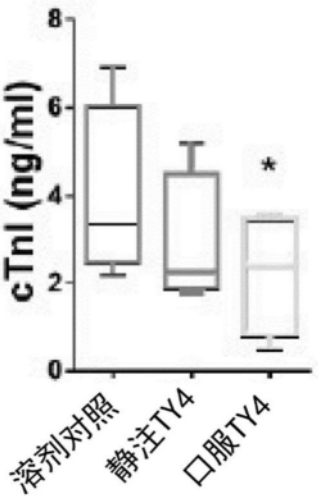

cTnI (ng/ml)
8
6
4
2
0
*
溶剂对照
静注TY4
口服TY4

图35C

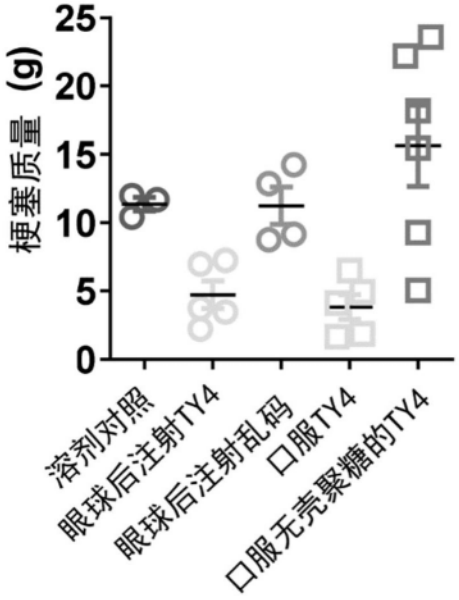

梗塞质量 (g)
25
20
15
10
5
0
溶剂对照
眼球后注射TY4
眼球后注射乱码
口服TY4
口服无壳聚糖的TY4

图35D

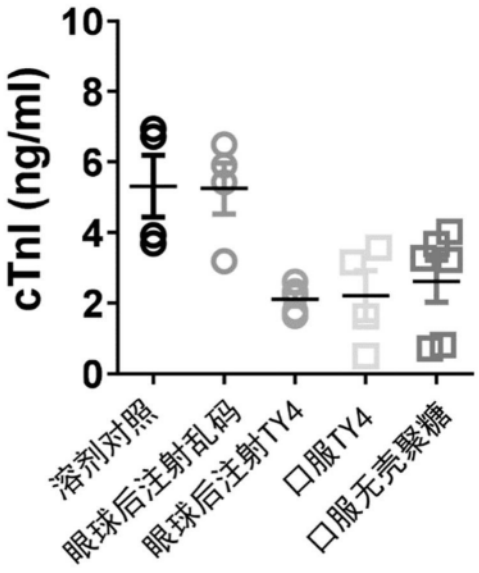

cTnI (ng/ml)
10
8
6
4
2
0
溶剂对照
眼球后注射乱码
眼球后注射TY4
口服TY4
口服无壳聚糖

图35E

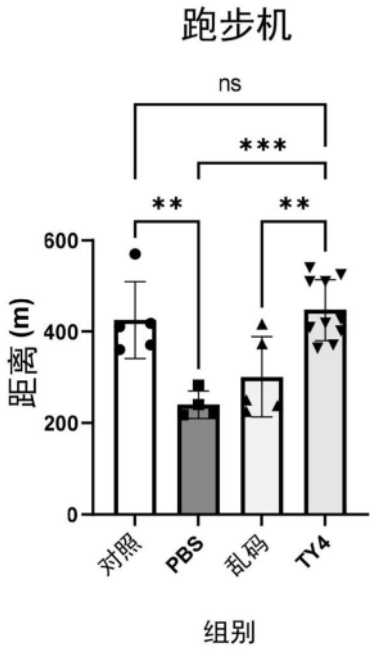

跑步机
ns
***
**
**
600
400
200
0
距离 (m)
对照
PBS
乱码
TY4
组别

图36A

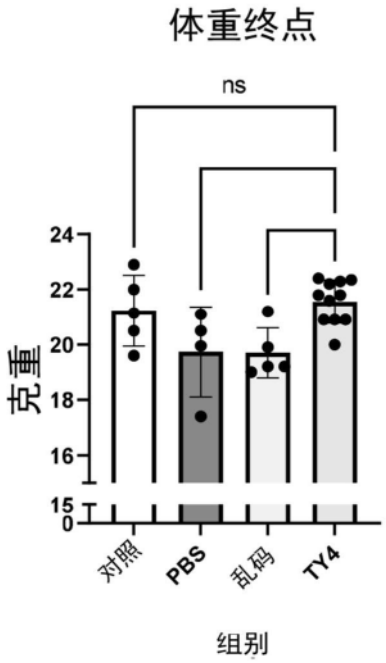

体重终点
ns
克重
24
22
20
18
16
15
0
对照
PBS
乱码
TY4
组别

图36B

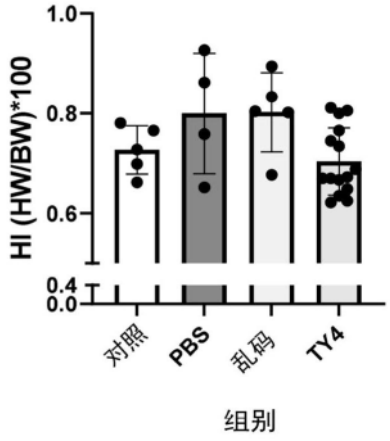

HI (HW/BW)*100
1.0
0.8
0.6
0.4
0.0
对照
PBS
乱码
TY4
组别

图36C

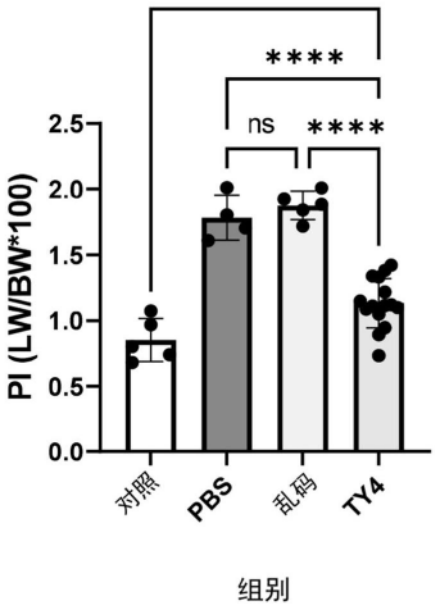

****
ns
****
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PI (LW/BW*100)
对照
PBS
乱码
TY4
组别

图36D

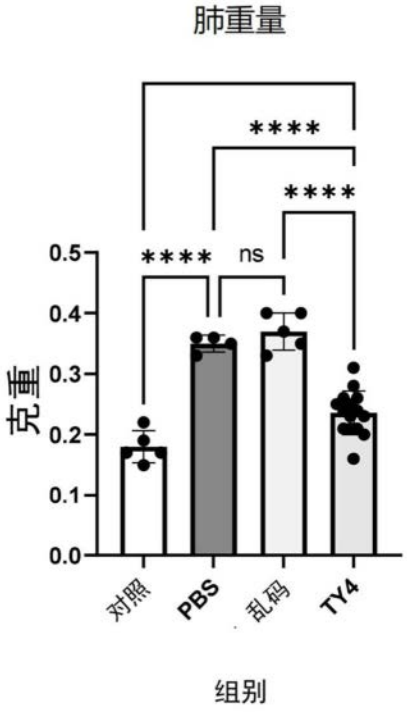

肺重量
****
****
****
ns
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
克重
对照
PBS
乱码
TY4
组别

图36E

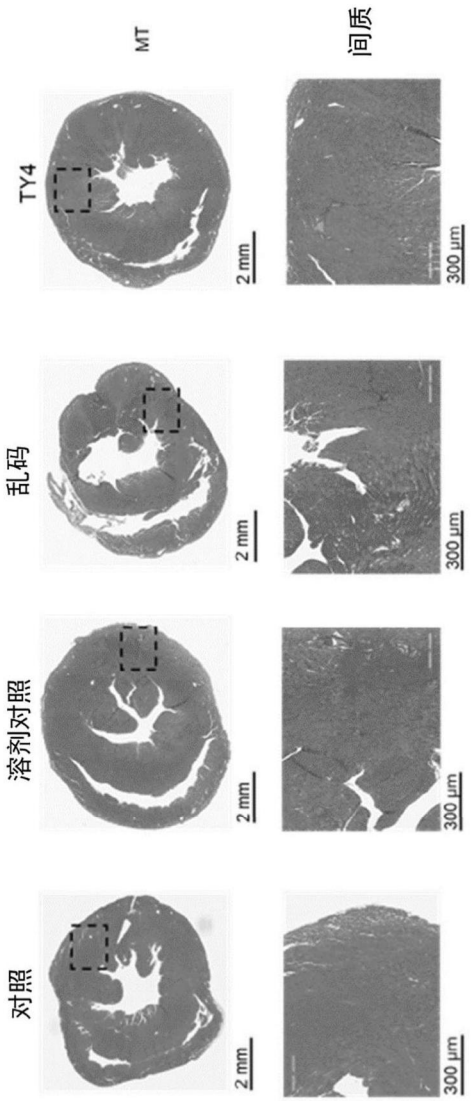

MT
间质
TY4
乱码
溶剂对照
对照
2 mm
300 μm

图37A

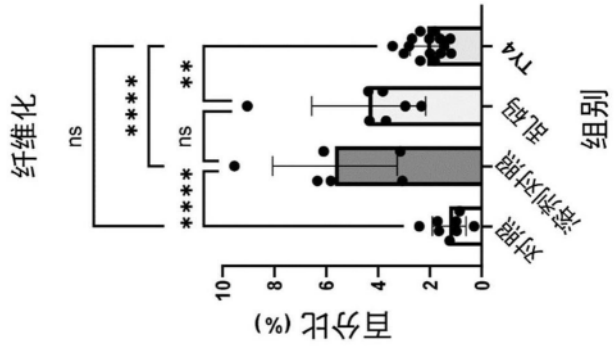

纤维化
ns
****
****
ns
**
百分比 (%)
0
2
4
6
8
10
对照
溶剂对照
乱码
TY4
组别

图37B

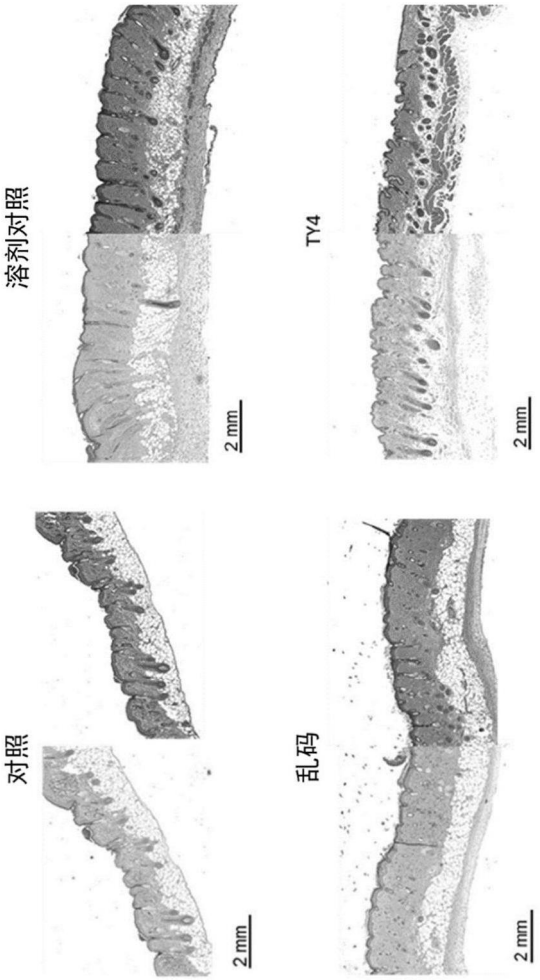

溶剂对照
TY4
对照
乱码
2 mm
2 mm
2 mm
2 mm

图37C

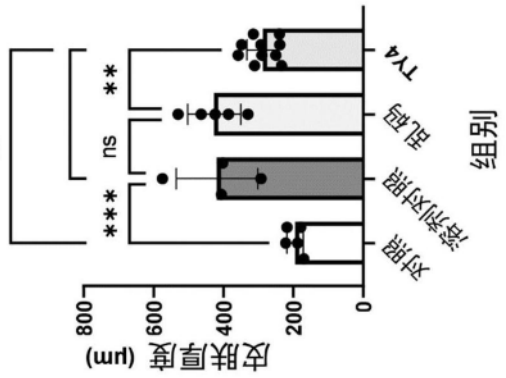

皮肤厚度 (μm)
0
200
400
600
800
对照
溶剂对照
乱码
TY4
组别
***
ns
ns
**

图37D

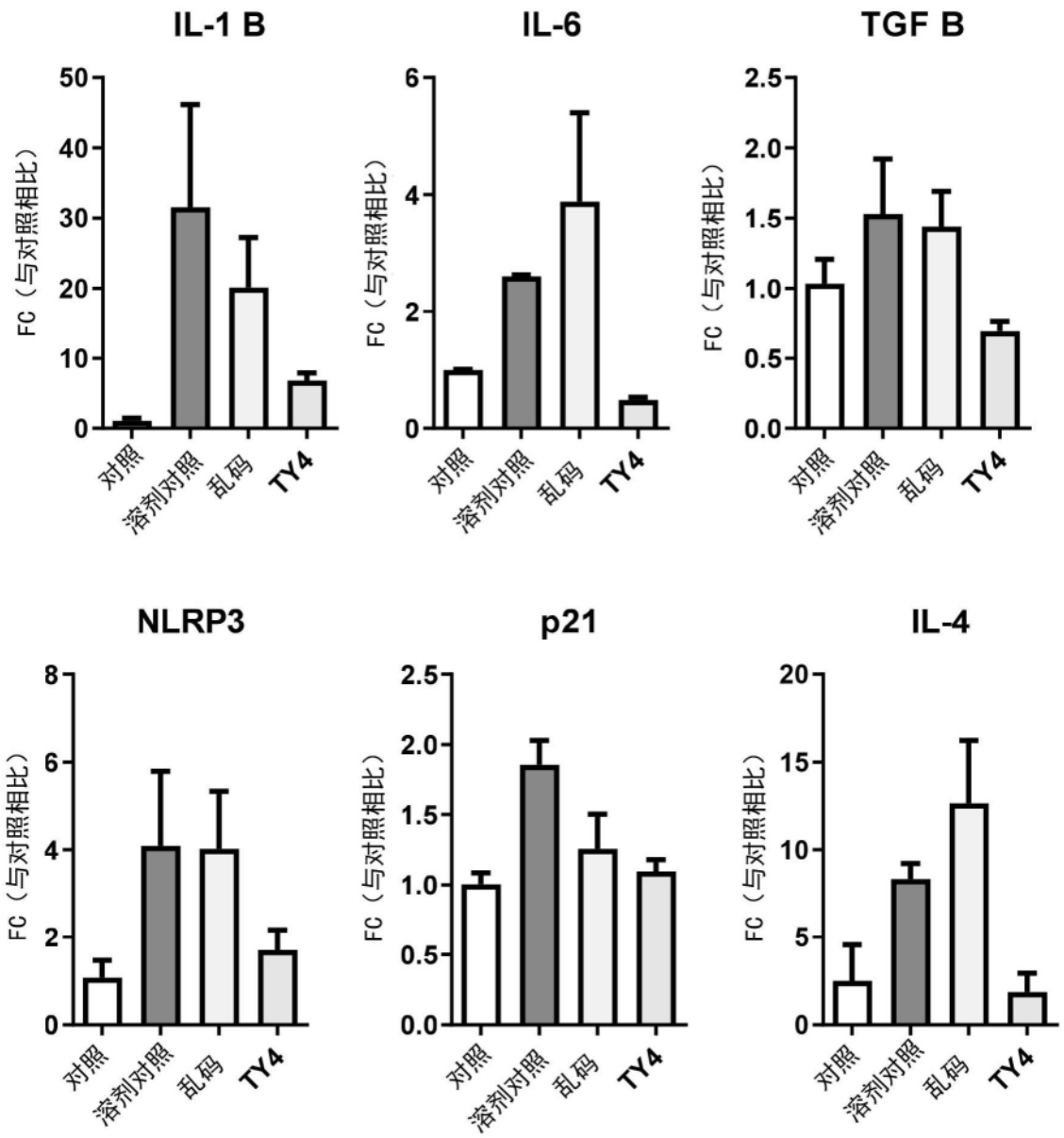


图38

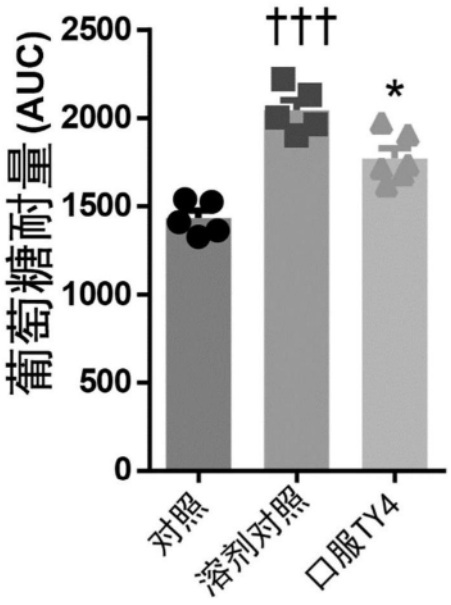

葡萄糖耐量(AUC)
2500
2000
1500
1000
500
0
†††
*
对照
溶剂对照
口服TY4

图39A

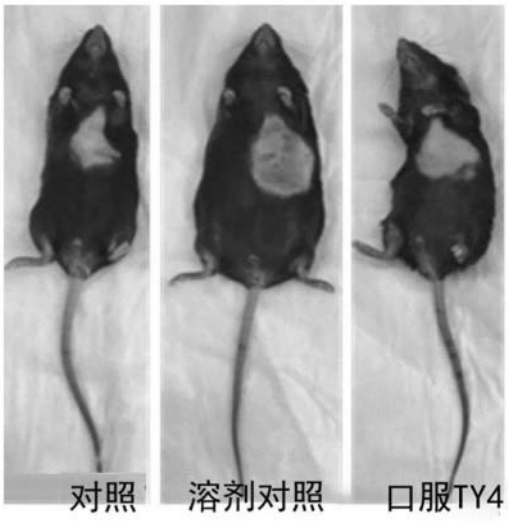

对照
溶剂对照
口服TY4

图39B

图40A

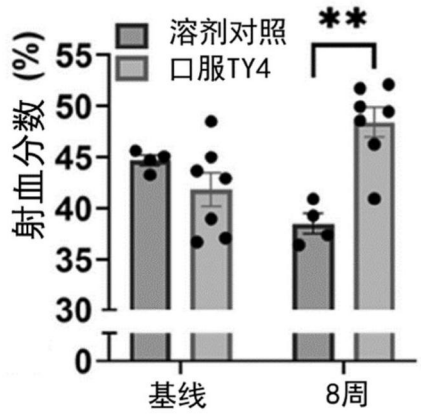
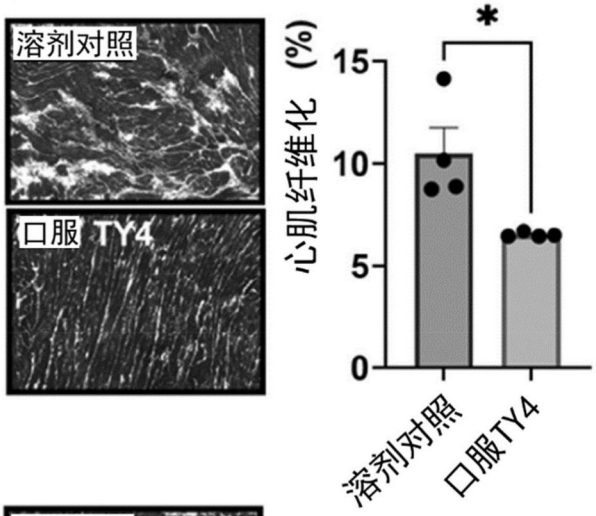


图40B



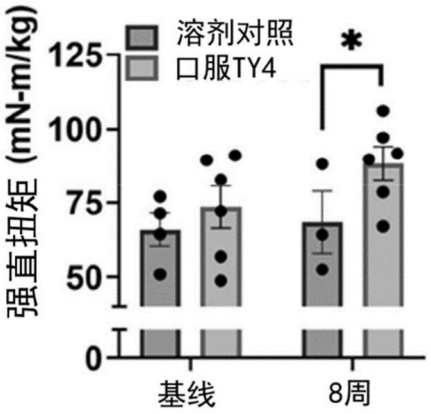


图40C

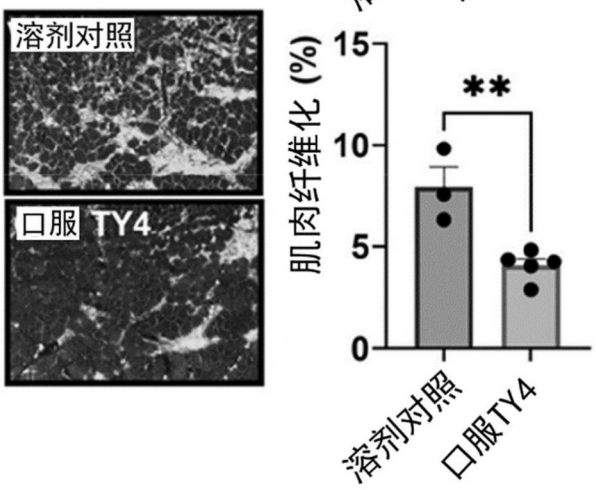


图40D

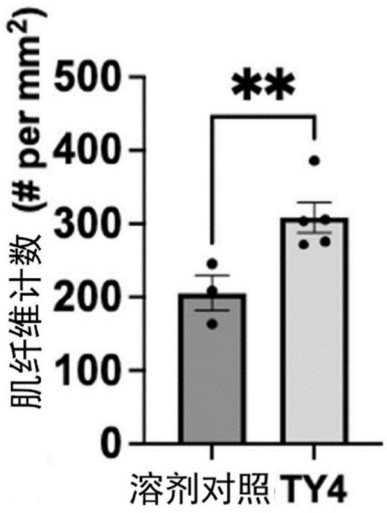

肌纤维计数 (# per mm²)
500
400
300
200
100
0
**
溶剂对照
TY4

图40E

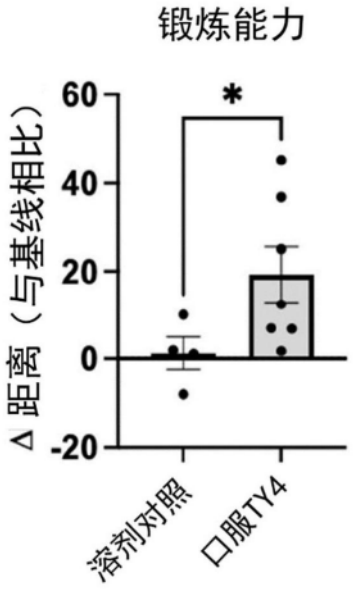

锻炼能力
Δ 距离（与基线相比）
60
40
20
0
-20
*
溶剂对照
口服TY4

图40F

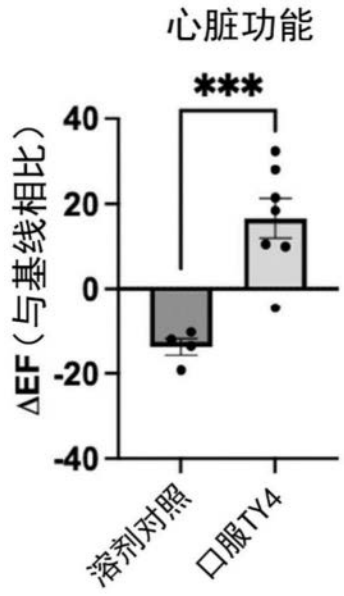

心脏功能
***
ΔEF（与基线相比）
40
20
0
-20
-40
溶剂对照
口服TY4

图40G

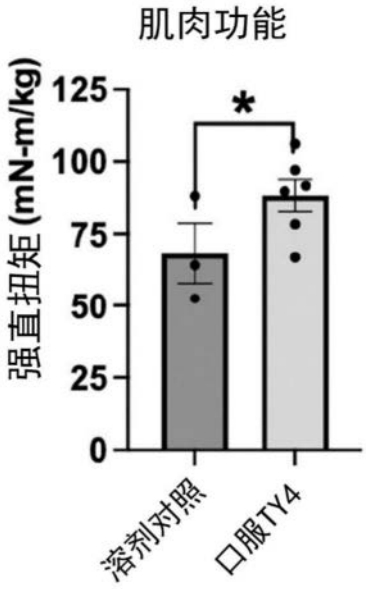

肌肉功能
*
强直扭矩 (mN-m/kg)
125
100
75
50
25
0
溶剂对照
口服TY4

图40H

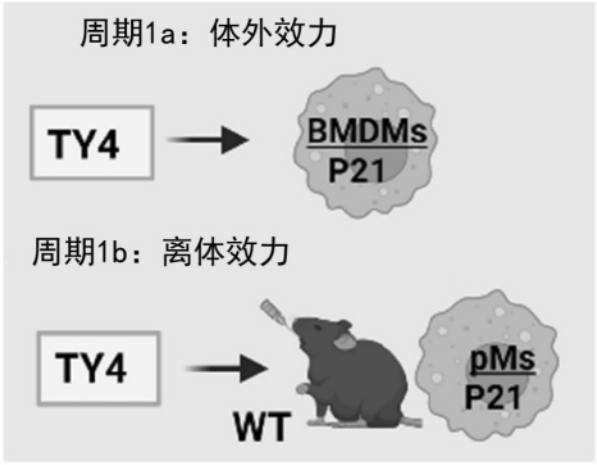


图41A

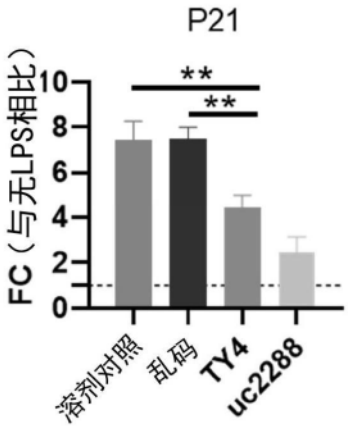


图41B

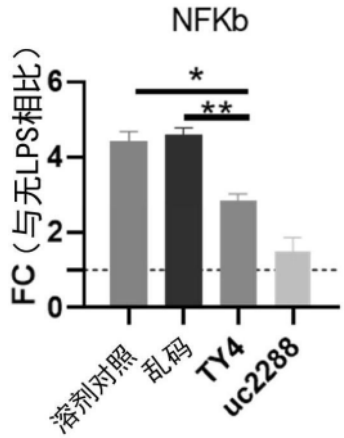


图41C

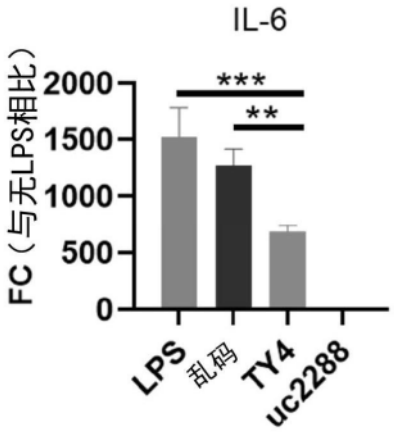


图41D

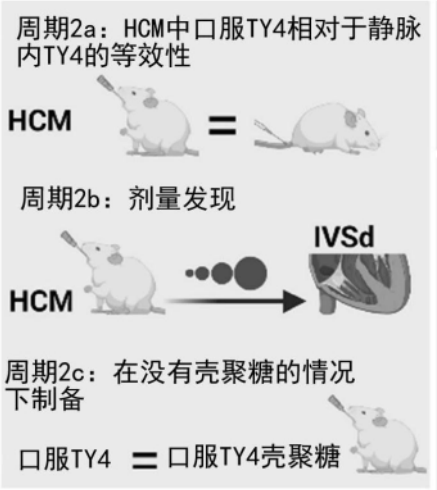


图42

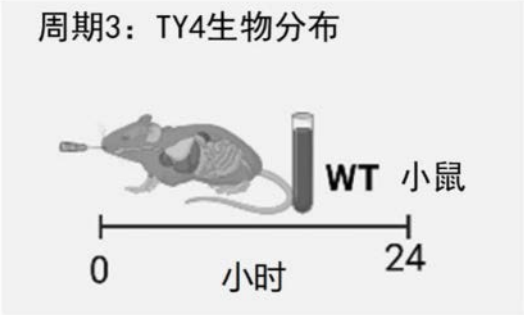


图43A

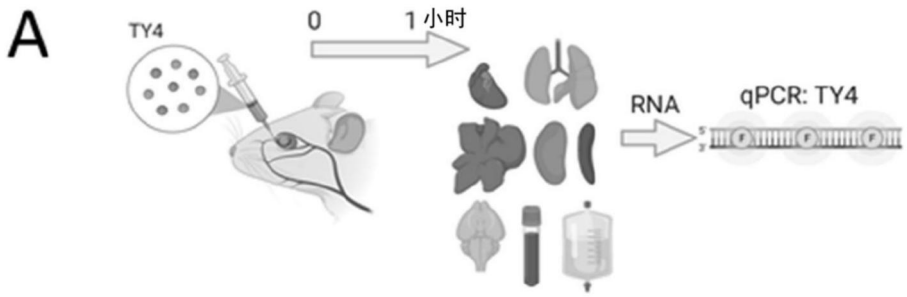


图43B

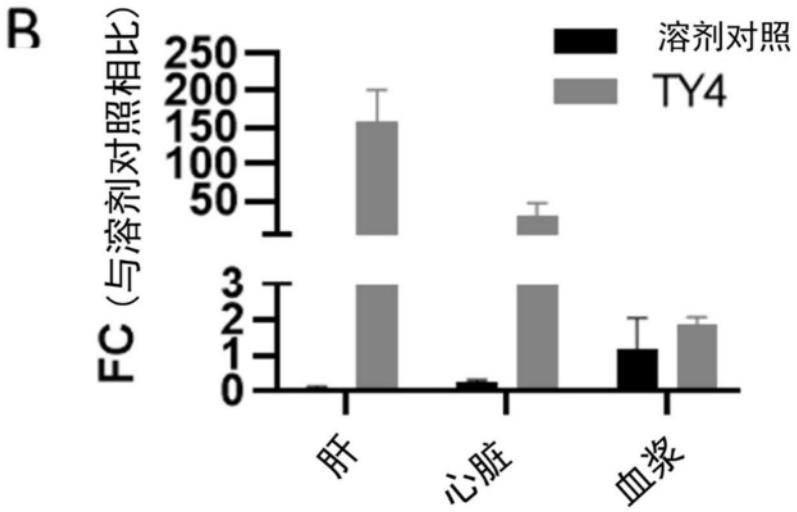


图43C

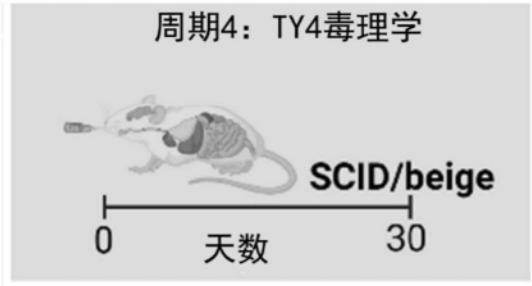


图44

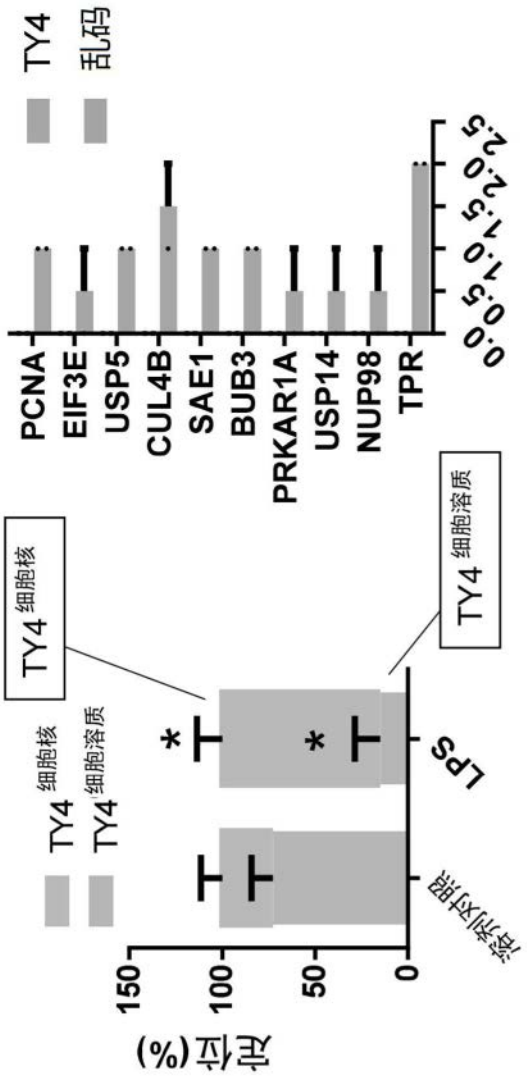


图45B

图45A

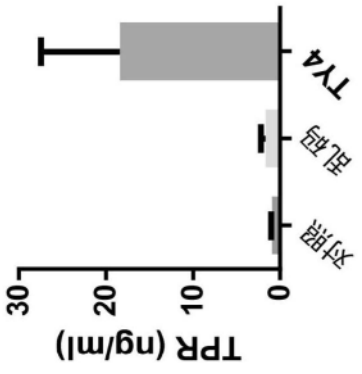


图45C

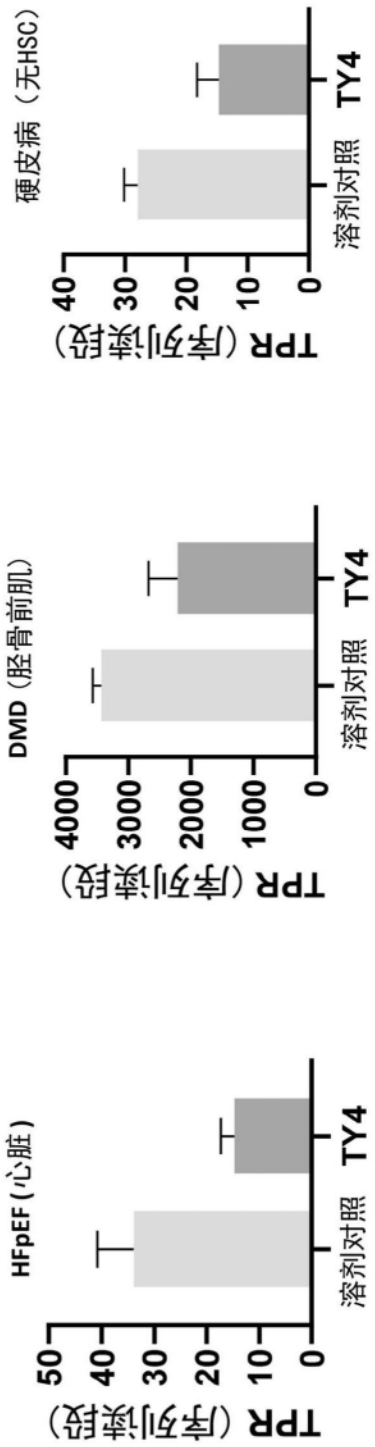

硬皮病（无HSC）
TPR（序列读段）
0
10
20
30
40
溶剂对照
TY4
DMD（胫骨前肌）
TPR（序列读段）
0
1000
2000
3000
4000
溶剂对照
TY4
HFpEF（心脏）
TPR（序列读段）
0
10
20
30
40
50
溶剂对照
TY4

图45D

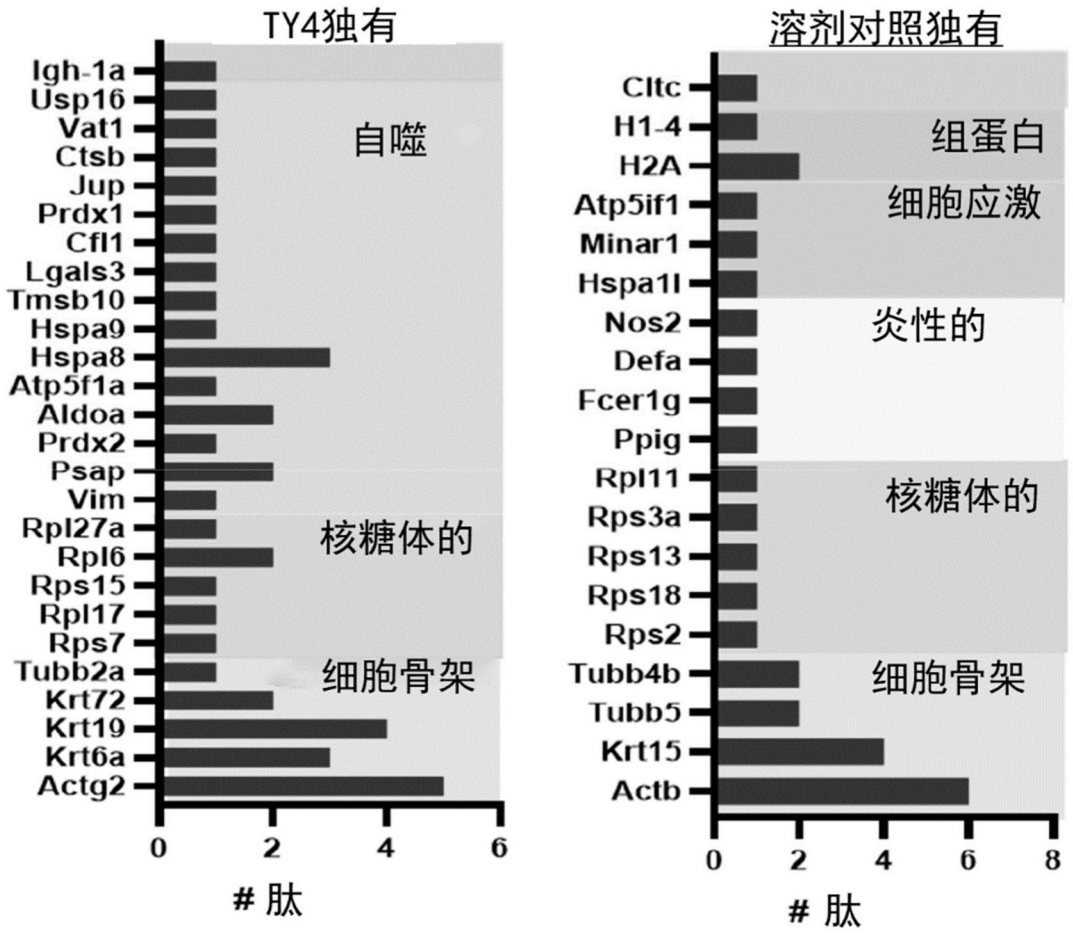

TY4独有
Igh-1a
Usp16
Vat1
Ctsb
Jup
Prdx1
Cfl1
Lgals3
Tmsb10
Hspa9
Hspa8
Atp5f1a
Aldoa
Prdx2
Psap
Vim
Rpl27a
Rpl6
Rps15
Rpl17
Rps7
Tubb2a
Krt72
Krt19
Krt6a
Actg2
自噬
核糖体的
细胞骨架
0
2
4
6
肽
溶剂对照独有
Cltc
H1-4
H2A
Atp5if1
Minar1
Hspa1l
Nos2
Defa
Fcer1g
Ppig
Rpl11
Rps3a
Rps13
Rps18
Rps2
Tubb4b
Tubb5
Krt15
Actb
组蛋白
细胞应激
炎性的
核糖体的
细胞骨架
0
2
4
6
8
肽

图45E

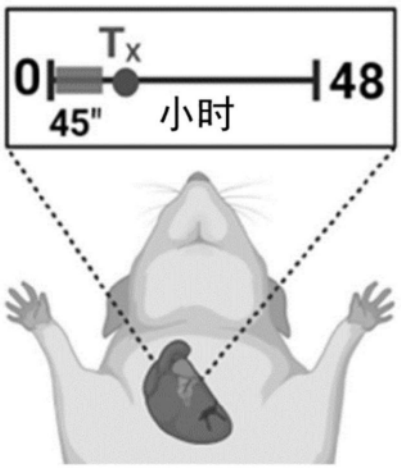

Tx
0
48
45"
小时

图46A

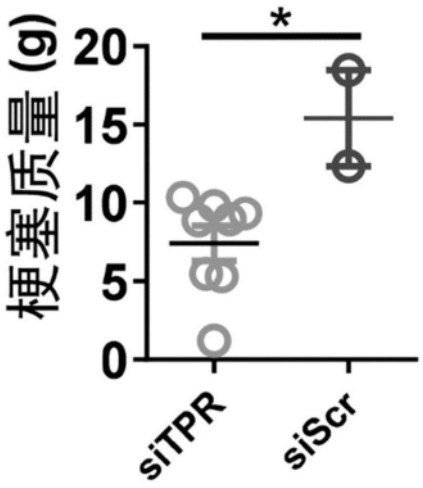


图46B