



(10) 授权公告号 CN 112654705 B

(45) 授权公告日 2024.07.02

(21) 申请号 201980058818.X

T·斯查弗梅尔

(22) 申请日 2019.09.10

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11382

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112654705 A

专利代理师 曹津燕 丁磊

(43) 申请公布日 2021.04.13

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

(30) 优先权数据

LU100927 2018.09.11 LU

(56) 对比文件

CN 112004923 A, 2020.11.27

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.09

戴睿等.miR-541-3p靶向SPOCD1基因通过  
Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路抑制乳腺癌细胞增殖,  
迁移和侵袭.《中国免疫学杂志》.2021,第37卷  
(第6期),第694-699页.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/074056 2019.09.10

Yang H等.Alterred microRNA expression  
profiles in lung damage induced by  
nanosized SiO<sub>2</sub>.《Bioengineered》.2018,第8卷  
(第1期),第45-54页.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/053186 EN 2020.03.19

审查员 吴静

(73) 专利权人 德国亥姆霍兹慕尼黑中心健康与  
环境研究中心(有限公司)

地址 德国纽伦堡

(72) 发明人 S·赫兹格 M·G·洛扎诺

权利要求书1页 说明书14页

序列表2页 附图14页

(54) 发明名称

用于治疗代谢疾病中的微小RNA抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及一种组合物,其包含miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段的抑制剂,和/或miR-379或其部分或片段的靶点的抑制剂和miR-541或其部分或片段的靶点的抑制剂,和/或miR-379或其部分或片段的抑制剂与miR-541或其部分或片段的靶点的抑制剂的组合,或miR-379或其部分或片段的靶点的抑制剂与miR-541或其部分或片段的抑制剂的组合。本发明还涉及将相应的组合物用于治疗或预防代谢疾病、与代谢障碍相关的疾病和/或癌症中。

1. 一种组合物,其包含miR-379的抑制剂和miR-541的抑制剂,其中,所述抑制剂为强诱饵RNA (TuD)。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述miR-379的抑制剂包含与miR-379互补或杂交的核苷酸序列,和所述miR-541的抑制剂包含与miR-541互补或杂交的核苷酸序列。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中  
所述miR-379的抑制剂包含根据SEQ ID NO: 1的核苷酸序列,和  
所述miR-541的抑制剂包含根据SEQ ID NO: 2的核苷酸序列。
4. 根据权利要求1所述的组合物,其中至少一种抑制剂包含含有至少10个核苷酸的核苷酸序列。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其中至少一种抑制剂包含至少一种选自以下的化学修饰:N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc)、硫代磷酸酯DNA (PS)、2'-O-甲基RNA (OMe)、2'-O-甲氧基-乙基RNA (MOE)、肽核酸 (PNA)、N3'-P5'-氨基磷酸酯 (NP)、2'-氟-阿拉伯糖核酸 (FANA)、吗啉代氨基磷酸酯 (MF)、环己烯核酸 (CeNA) 和三环DNA (tc-DNA)。
6. 根据权利要求1所述的组合物,其中使至少一种抑制剂由选自腺相关病毒 (AAV)、慢病毒载体、聚乙烯亚胺 (PEI)、阳离子脂质体、二氧化硅纳米颗粒、PEG化的PLGA和中性脂质的递送载体包含。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其中使至少一种抑制剂由腺相关病毒 (AAV) 包含。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述miR-379的抑制剂包含SEQ ID NO: 3的核苷酸序列,和/或所述miR-541的抑制剂包含SEQ ID NO: 4的核苷酸序列。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其包含在同一分子上的miR-379的抑制剂和miR-541的抑制剂,其中所述分子包含与miR-379互补或杂交的核苷酸序列和与miR-541互补或杂交的核苷酸序列。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述抑制剂包含SEQ ID NO: 5的核苷酸序列。
11. 根据权利要求1所述的组合物,其是药物组合物。
12. 根据权利要求1所述的组合物在制备用于治疗代谢疾病的药物中的用途,其中所述代谢疾病选自肥胖、糖尿病、代谢综合征和高血糖症。
13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述代谢疾病为肥糖病。

## 用于治疗代谢疾病中的微小RNA抑制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种组合物,其包含miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段的抑制剂,和/或miR-379或其部分或片段的靶点的抑制剂和miR-541或其部分或片段的靶点的抑制剂,和/或miR-379或其部分或片段的抑制剂与miR-541或其部分或片段的靶点的抑制剂的组合,或miR-379或其部分或片段的靶点的抑制剂与miR-541或其部分或片段的抑制剂的组合。本发明进一步涉及将此类组合物用于治疗或预防代谢疾病、与代谢障碍相关的疾病和/或癌症中。

### 背景技术

[0002] 代谢功能障碍和疾病通常与糖皮质激素水平失衡有关,并与诸如空腹、癌症恶病质、衰老、库兴氏综合征(Cushing's syndrome)、GC疗法、肥胖、胰岛素抵抗、1型和2型糖尿病,高血糖症、血脂异常、HCC(肝细胞癌)等相关。例如,代谢综合症(均由原发性胰岛素抵抗引起或与之相关的一系列代谢障碍)的特征在于一组代谢风险因子,所述代谢风险因子包括腹部肥胖、甘油三酯水平升高、高密度脂蛋白(HDL)胆固醇水平降低、高血压和空腹血糖受损(一种胰岛素敏感性降低和患糖尿病风险增加的衡量方式)。患有此类病症和疾病的患者处于罹患冠心病和其他动脉粥样硬化疾病(比如中风和周围性血管疾病)以及2型糖尿病的增加的风险中。

[0003] 下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)内分泌轴是在各种情况下,比如创伤、锻炼或营养缺乏时,维持机体稳态的关键生理应激回路。在代谢控制中,GC信号传导是针对胰岛素作用的主要反调节系统,并且异常升高的GC活性与代谢综合症的主要成分密切相关,所述主要成分包括肥胖、胰岛素抵抗、高血糖症和系统性血脂异常。事实上,已经发现在胰岛素抵抗患者中GC水平升高,并且GC水平与通过糖皮质激素受体(GR)(核受体转录因子家族的成员)介导的高血糖症和脂肪肝表型密切相关。同样,肥胖的特征在于局部GC作用增强,以及内源性或外源性GC缺乏或过量的状态,如爱迪生氏病、库兴氏综合征或GC疗法分别以系统性能量代谢的严重扰动为特征,所述严重扰动与代谢综合症的某些方面非常相似。

[0004] 一类小的非编码RNA(微小RNA(microRNA),在本文中也称为miRNA或miR)已经成为代谢控制的关键层。微小RNA(miRNA,miR)是一类小的(如18-24个核苷酸)非编码RNA,其存在于包括哺乳动物的多种生物中,并在进化中为保守的。miRNA是由约70个核苷酸的发夹前体加工而成的,这些前体自经由RNase III酶的顺序切割从初级转录本衍生而来。许多微小RNA可以在位于前-mRNA的内含子中或非编码RNA基因中的基因间隔区域中编码。许多miRNA也倾向于聚簇并转录为多顺反子,并且通常具有类似的空间时序表达模式。已发现miR在多种生物学过程,包括发育时序、分化、凋亡、细胞增殖、器官发育和代谢中均具有作用。事实上,已发现单个miRNA调节能量稳态的各个方面,包括胰腺 $\beta$ 细胞胰岛素分泌、脂肪组织脂质储存以及肝脏中胆固醇和脂质处理。而且,已经识别了一些miRNA(比如miR-379)参与糖皮质激素(GC)信号传导(WO 2015/063081)。例如,已经证明对miR-379活性的抑制会降低循环甘油三酯(TG)的水平(de Guia等,EMBO J(2015),34(3):344-360)。然而,代谢功能障碍和

疾病仍不能以足够的方式治疗,因此需要针对此类疾病(包括1型和2型糖尿病)的合适疗法。

### 发明内容

[0005] 本发明通过提供如本文所述的和如权利要求中所限定的方案来解决这些需求和目标。

[0006] 如先前的动物实验所示,对miR-379活性的抑制导致了更低的循环甘油三酯(TG)水平(de Guia等,EMBO J(2015),34(3):344-360)。如在本发明的上下文中进一步发现的,在肥胖患者中发现过表达另一miRNA,即miRNA-541(miR-541),从而识别了miR-541与胰岛素敏感性的相关性(参见表1)。然而,miR-541的抑制或敲低不会导致实质性的代谢表型(数据未示出)。但是,如在本发明的上下文中令人惊讶地发现和在本文中所示的,同时抑制miR-379和miR-541通过降低TG和葡萄糖水平而同时改善了葡萄糖和脂质代谢。该惊人的发现得到了本发明,其中抑制miR-379和miR-541允许了治疗与葡萄糖和脂质代谢相关的障碍和疾病,所述与葡萄糖和脂质代谢相关的障碍和疾病包括、但不限于,糖皮质激素驱动的代谢功能障碍、肥胖、糖尿病(包括1型和2型糖尿病)、肥糖病(diabesity)、代谢综合征、胰岛素抵抗、高血糖症、(系统性)血脂异常、库兴氏综合征、与糖皮质激素(GC)治疗或过量相关的或由其引起的不良反应或副反应、动脉粥样硬化、心脏病、中风、(癌症)恶病质、和生长缺陷、肝脂肪变性、NASH和肝纤维化,特别是1型和2型糖尿病,包括1型和2型糖尿病的个性化治疗。

[0007] 因此,本发明涉及一种组合物,其包含

[0008] (a)miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段的抑制剂,和/或

[0009] (b)miR-379或其部分或片段的靶点的抑制剂和miR-541或其部分或片段的靶点的抑制剂,和/或

[0010] (c)miR-379或其部分或片段的抑制剂与miR-541或其部分或片段的靶点的抑制剂的组合,或miR-379或其部分或片段的靶点的抑制剂与miR-541或其部分或片段的抑制剂的组合。

[0011] 如本文所用,术语“靶点”是细胞的mRNA中的位点,其是通常为了压制或抑制该mRNA的转录而被miRNA靶向的位点,从而允许该mRNA的裂解,或使该mRNA不稳定以加速降解(也被技术人员称为mRNA的“沉默”)。因此,术语“靶点的抑制剂”在本发明的上下文中意指如上定义的这种“靶点”的抑制剂。因此,在本发明的上下文中描述并提供的组合物可包含miR-379或其部分或片段和miR-541或其部分或片段和/或所述miR的相应靶点的抑制剂,由此阻止miR停靠(docking)在靶点以沉默相应的mRNA。如技术人员容易理解地,miR-379或其部分或片段或miR-541或其部分或片段的靶点的此类抑制剂不干扰相应mRNA的正确翻译,且不使所述mRNA裂解或不稳定,或与相应的miR-379或其部分或片段或miR-541或其部分或片段本身相比,至少在较低程度上。

[0012] 此外,如本文所用,术语“微小RNA”、“miRNA”或“miR”可互换使用并通常包括长度为18-26个核碱基的非编码RNA,其可以是酶Dicer裂解前体-miRNA的产物。成熟miRNA的实例可见于本领域已知的miRNA数据库,比如miRBase(<http://microma.sanger.ac.uk/>)中。

[0013] 另外,如本文所用,术语“抑制”miR-379或miR-541或其部分或片段(或miR-379或

miR-541或其部分或片段的靶点)或miR-379或miR-541或其部分或片段(或miR-379或miR-541或其部分或片段的靶点)的“抑制剂”分别包含如分别通过直接结合相应miR或其靶点,或通过支持或诱导miR-379或miR-541的切割或降解,或者损坏miR-379或其部分或片段或miR-541或其部分或片段的功能和/或表达,抑制或压制miR-379或其部分或片段或miR-541或其部分或片段向其相应靶点的结合或停靠。例如,所述抑制剂可以是或包含核酸分子。在本发明的一个方面,miR-379或其部分或片段和/或miR-541或其部分或片段的抑制剂可以用作相应miR的反义分子。

[0014] 在本发明的上下文中,如由本文描述并提供的组合物所包含的miR-379或其部分或片段的抑制剂以及miR-541或其部分或片段的抑制剂可以在同一分子上或在不同的分子上。例如,本发明的组合物可包含一种核酸分子,该核酸分子包含作为miR-379或其部分或片段的抑制剂的序列和作为miR-541或其部分或片段的抑制剂的序列两者,或者该核酸分子包含两种不同的核酸分子,一种核酸分子包含作为miR-379或其部分或片段的抑制剂的序列,另一种核酸分子包含作为miR-541或其部分或片段的抑制剂的序列。在本发明的一个实施方案中,所述组合物包含在同一分子上的miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段的抑制剂,其中所述分子包含如本文所述与miR-379或其部分或片段互补或杂交(如在严格条件下)的核苷酸序列和如本文所述与miR-541或其部分或片段互补或杂交(如在严格条件下)的核苷酸序列两者。

[0015] 通常,如本文所用,术语“多核苷酸”、“核酸”或“核酸分子”是以同义理解的。一般而言,核酸分子,除其它外可以包括DNA分子、RNA分子、寡核苷酸硫代磷酸酯、取代的核糖寡核苷酸或PNA分子。此外,术语“核酸分子”可以指本领域已知的DNA或RNA或其杂合体或其任何修饰形式(对于修饰形式的实例,参见如,US 5525711、US 471 1955、US 5792608或EP 302175)。多核苷酸序列可以是单链或双链的、线性或环状的、天然或合成的,且无任何尺寸限制。例如,多核苷酸序列可以是基因组DNA、cDNA、线粒体的DNA、mRNA、反义RNA、核糖体的RNA或编码此类RNA或嵌合体(chimeroplast)的DNA(Gamper, Nucleic Acids Research, 2000, 28, 4332-4339)。所述多核苷酸序列可以是载体、质粒的形式或病毒DNA或RNA的形式。本文还描述了与上述核酸分子互补的核酸分子以及能够与本文描述的核酸分子杂交的核酸分子。本文描述的核酸分子也可以是本发明的上下文中的核酸分子的片段。特别地,此类片段是功能片段。此类功能片段的实例是可以作为引物的核酸分子。

[0016] 如本文所用,核酸分子可包含不同类型的核苷酸,包括天然存在的核苷酸、修饰的核苷酸和人工核苷酸。本文所用的核苷酸通常包含核苷、天然存在的核苷、修饰的核苷和人工核苷。本领域已知,天然存在的核苷包含嘌呤碱基或嘧啶碱基。天然存在的核苷的实例包括(脱氧)腺嘌呤核苷、(脱氧)鸟嘌呤核苷、(脱氧)尿嘧啶核苷、胸腺嘧啶核苷和(脱氧)胞嘧啶核苷。如本文所述的作为核苷酸(以及因此的核酸分子)的一部分的核苷通常可涵盖包含任何嘌呤或嘧啶核苷及其衍生物或类似物的结构。换言之,在本发明的上下文中使用的“嘌呤核苷”或“嘧啶核苷”通常包含任何种类的嘌呤或嘧啶以及分别如本文所述的其衍生物或类似物,以及糖(比如戊糖)。在本发明的一个实施方案中,嘌呤核苷可以选自(脱氧)腺嘌呤核苷、肌苷和(脱氧)鸟嘌呤核苷及其衍生物或类似物。衍生物可以是如具有嘌呤的核苷,所述嘌呤选自去氮嘌呤、叠氮嘌呤、烷基嘌呤、硫代嘌呤、溴代嘌呤、0-烷基嘌呤和异嘌呤,例如,比如如7-去氮嘌呤的去氮嘌呤。换言之,在本发明的一个方面,所述嘌呤核苷可以是具

有嘌呤的核苷,所述嘌呤选自去氮嘌呤、叠氮嘌呤、烷基嘌呤、硫代嘌呤、溴代嘌呤、0-烷基嘌呤和异嘌呤,例如,比如如7-去氮嘌呤的去氮嘌呤。在本发明的另一方面,嘌呤核苷可选自1-甲基-(脱氧)腺嘌呤核苷、2-甲基-(脱氧)腺嘌呤核苷、N<sup>6</sup>-甲基-(脱氧)腺嘌呤核苷、N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-二甲基-(脱氧)腺嘌呤核苷、7-去氮-(脱氧)腺嘌呤核苷、7-去氮-8-氮(脱氧)腺嘌呤核苷、7-去氮-7-溴(脱氧)腺嘌呤核苷、7-去氮-7-碘(脱氧)腺嘌呤核苷、8-叠氮(脱氧)腺嘌呤核苷、8-溴(脱氧)腺嘌呤核苷、8-碘(脱氧)腺嘌呤核苷、8-溴-2'-脱氧(脱氧)腺嘌呤核苷、2'-0-甲基腺嘌呤核苷、肌苷、1-甲基肌苷、2'-0-甲基肌苷、1-甲基(脱氧)鸟嘌呤核苷、7-甲基(脱氧)鸟嘌呤核苷、N<sup>2</sup>-甲基(脱氧)鸟嘌呤核苷、N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>-二甲基-鸟嘌呤核苷、异鸟嘌呤核苷、7-去氮(脱氧)鸟嘌呤核苷、7-去氮-8-氮(脱氧)鸟嘌呤核苷、7-去氮-7-溴(脱氧)鸟嘌呤核苷、7-去氮-7-碘(脱氧)鸟嘌呤核苷、6-硫代(脱氧)鸟嘌呤核苷、0<sup>6</sup>-甲基(脱氧)鸟嘌呤核苷、8-叠氮(脱氧)鸟嘌呤核苷、8-溴(脱氧)鸟嘌呤核苷、8-碘(脱氧)鸟嘌呤核苷、2'-0-甲基鸟嘌呤核苷、8-叠氮肌苷、7-氮肌苷、8-溴肌苷、8-碘肌苷、1-甲基肌苷和4-甲基肌苷。在本发明的进一步方面,嘌呤核苷可选自薊苷(queuosine)、古嘌呤(archaeosine)、怀俄苷(wyosine)和N<sup>6</sup>-苏氨酰氨基甲酰腺嘌呤核苷。在本发明的一个方面,嘧啶核苷可选自(脱氧)胞嘧啶核苷、(脱氧)胸腺嘧啶核苷、(脱氧)核糖胸腺嘧啶核苷、(脱氧)尿嘧啶核苷和它们的衍生物。衍生物可以是如具有嘧啶的核苷,所述嘧啶选自烷基嘧啶、硫代嘧啶、溴嘧啶、0-烷基嘧啶、异嘧啶、乙酰嘧啶、氢嘧啶和假嘧啶。换言之,在本发明的一个方面,嘧啶核苷可以是具有嘧啶的核苷,所述嘧啶选自烷基嘧啶、硫代嘧啶、溴嘧啶、0-烷基嘧啶、异嘧啶、乙酰嘧啶、氢嘧啶和假嘧啶。在本发明的另一方面,嘧啶核苷可选自3-甲基-(脱氧)胞嘧啶核苷、N<sup>4</sup>-甲基(脱氧)胞嘧啶核苷、N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-二甲基(脱氧)胞嘧啶核苷、异(脱氧)胞嘧啶核苷、假(脱氧)胞嘧啶核苷、假异(脱氧)胞嘧啶核苷、2-硫代(脱氧)胞嘧啶核苷、N<sup>4</sup>-乙酰(脱氧)胞嘧啶核苷、3-甲基(脱氧)尿嘧啶核苷、假(脱氧)尿嘧啶核苷、1-甲基-假(脱氧)尿嘧啶核苷、5,6-二氢(脱氧)尿嘧啶核苷、2-硫代(脱氧)尿嘧啶核苷、4-硫代(脱氧)尿嘧啶核苷、5-溴脱氧(脱氧)尿嘧啶核苷、2'-脱氧尿嘧啶核苷、4-硫代(脱氧)胸腺嘧啶核苷、5,6-二氢(脱氧)胸腺嘧啶核苷、0<sup>4</sup>-甲基胸腺嘧啶核苷、二氟甲苯和其它核碱基替代物。如上所述,本文描述并提供的核苷通常包括本文所述的嘌呤或嘧啶或它们的衍生物或类似物以及糖部分,如戊糖。通常,作为如本文所述的嘌呤或嘧啶核苷或其衍生物或类似物的一部分的戊糖可以是核糖、脱氧核糖、阿拉伯糖或甲基核糖(2-0-甲基核糖),例如核糖或脱氧核糖。换言之,核苷可以是,如(核糖)核苷、脱氧(核糖)核苷、阿拉伯糖核苷或(甲基核糖)核苷,例如(核糖)核苷或脱氧(核糖)核苷。

[0017] 如本文所用,术语“脱氧(desoxy)”和“脱氧(deoxy)”作为分子术语的前缀被同义地使用,并表示如在给定的戊糖(比如核糖或其他)中不存在氧原子或羟基。

[0018] 在本发明的一个方面,miR-379和/或miR-541或其部分或片段的抑制剂可分别作为相应miR的反义分子。在本发明的一个实施方案中,miR-379或其部分或片段的至少一种(或全部)抑制剂包含与miR-379或其部分或片段互补或杂交(如在严格条件下)的核苷酸序列和miR-541或其部分或片段的至少一种(或全部)抑制剂包含与miR-541或其部分或片段互补或杂交(如在严格条件下)的核苷酸序列。在本上下文中,可以使miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段的抑制剂位于不同的分子上,或者它们可以位于单一分子上,即一个分子包含miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段

的抑制剂二者。在本发明的一个实施方案中,miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段的抑制剂位于单一的分子上。

[0019] 如本文中在抑制剂和核酸分子/DNA序列(包括miR或其部分或片段)的上下文中使用的术语“杂交(hybridization/hybridize)”可涉及在严格、低严格或非严格条件下的杂交。在一个实施方案中,优选地所述条件是严格的。可以根据例如Sambrook,Russell“Molecular Cloning,A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.(2001);Current Protocols in Molecular Biology,Update May 9,2012,Print ISSN:1934-3639,Online ISSN:1934-3647;Ausubel,“Current Protocols in Molecular Biology”,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.(1989)或Higgins和Hames(Eds.),“Nucleic acid hybridization,a practical approach”,IRL Press Oxford,Washington DC,(1985)中所述的常规方案建立所述杂交条件。所述条件的设置完全在本领域技术人员的能力范围内,并且可以根据本领域中描述的方案来确定。因此,仅特异性杂交序列的检测通常需要严格的杂交和洗涤条件,比如在65°C下的 $0.1 \times \text{SSC}$ ,0.1%SDS(本文所用的“严格条件”)。可以将用于检测同源或未精确互补的序列的非严格杂交条件设置为65°C下的 $6 \times \text{SSC}$ ,1%SDS(本文所用的“非严格条件”)。众所周知,探针的长度和待测定的核酸的组成构成了杂交条件的其他参数。上述条件的变化可以通过包涵和/或取代用于抑制杂交实验中的背景的可选封闭剂来实现。典型的封闭剂包括Denhardt试剂、BLOTTO、肝素、变性鲑鱼精子DNA和高购可获得的专有配方。由于相容性的问题,特定封闭剂的包涵可能需要调整上述杂交条件。根据本文所述的发明,可以将用于检测同源或未精确互补的序列的低严格杂交条件,例如设置为65°C下的 $6 \times \text{SSC}$ ,0.5%SDS(本文所用的“低严格条件”)。众所周知,探针的长度和待测定的核酸的组成构成了杂交条件的其他参数。

[0020] 杂交的核酸分子还包含上述分子的片段。此类片段可以代表用作本文所述抑制剂或其功能片段的核酸分子。此外,与任何上述核酸分子杂交的核酸分子还包括这些分子的互补片段、衍生物和变体。另外,杂交复合物是指由于互补的G和C碱基之间以及互补的A和T(或者如技术人员已知的,对RNA来说的U)碱基之间的氢键形成,两个核酸序列之间的复合物;可通过碱基堆积相互作用(base stacking interaction)使这些氢键进一步稳定。氢键可以是反平行结构的。杂交复合物可以在溶液中形成(如,Cot或Rot分析),或在溶液中存在的一种核酸序列与固定在固相支持体(如,其上固定了如细胞的膜、滤膜、芯片、针(pin)或载玻片)上的另一种核酸序列之间形成。术语“互补的”或“互补性”是指多核苷酸在允许的盐和温度条件下通过碱基配对的天然结合。例如,序列“A-G-U”与互补序列“U-C-A”结合。两个单链分子之间的互补性可以是“部分的”,其中仅核酸中的一些结合,或者当单链分子之间存在完全互补性时所述互补性可以是完全的。核酸链之间的互补程度对核酸链之间的杂交效率和强度具有显著影响。这在依赖于核酸链之间的结合的扩增反应中特别重要。优选地,术语“杂交的序列”是指这样的序列,该种序列与本文描述的作为本文描述并提供的抑制剂的核酸序列展示出至少45%、更优选地至少50%、更优选地至少55%、更优选地至少60%、更优选地至少65%、更优选地至少70%、更优选地至少75%、更优选地至少80%、更优选地至少85%、更优选地至少90%、更优选地至少95%、更优选地至少96%、更优选地至少97%、更优选地至少98%、更优选地至少99%、更优选地至少99.5%和最优选地100%同一性的序列同一性。

[0021] 如本文所用,给定微小RNA(miRNA)的“部分”或“片段”可以是微小RNA的任何部分且可特别地包括微小RNA或其前体(如原-或前体-微小RNA)的部分,其包含相应微小RNA或其前体的至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个连续核苷酸,或者由相应微小RNA或其前体的至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个连续核苷酸组成。在一个实施方案中,给定微小RNA的部分或片段是在微小RNA(如原-或前体-微小RNA)(如相应miR的5p-臂(也称为5p-链)或3p-臂(也称为3p-链))的(核和/或细胞质)加工后在细胞中占优势的部分或片段。在本发明的一个实施方案中,微小RNA的部分或片段为微小RNA或其前体的5p-臂。例如,根据本发明,miR-379的部分或片段可以是miR-379-5p,和/或miR-541的部分或片段可以是miR-541-5p。在本发明的一个实施方案中,微小RNA的部分或片段是微小RNA或其前体的3p-臂。例如,根据本发明,miR-379的部分或片段可以是miR-379-3p,和/或miR-541的部分或片段可以是miR-541-3p。

[0022] 在本上下文中,本领域技术人员将容易地理解,并且根据本发明,给定微小RNA的部分或片段的抑制剂也是微小RNA本身或其前体的抑制剂,因为抑制本文定义的部分或片段也抑制了整个微小RNA的本文定义的功能。

[0023] 因此,如本文所用,如果微小RNA(如,miR-379或miR-541)或其前体的抑制剂与该微小RNA(如,miR-379或miR-541)的部分或片段结合或互补或杂交(如在严格条件下),则所述微小RNA(如,miR-379或miR-541)或其前体的抑制剂还可分别包含该微小RNA(如,miR-379或miR-541)的部分或片段的抑制剂。类似地,根据本发明,该微小RNA(如,miR-379或miR-541)的部分或片段的抑制剂还包含该相应微小RNA(如,miR-379或miR-541)或其前体的抑制剂。

[0024] 在本发明的一个实施方案中,miR-379的部分或片段为miR-379-5p并具有根据SEQ ID NO:1的核苷酸序列,其中不超过6、5、4、3、2或1个核苷酸被置换。例如,与SEQ ID NO:1相比被置换的核苷酸可以是任何其它核苷酸,该种任何其它核苷酸允许如本文所述的相应抑制剂的杂交。在本发明的一个实施方案中,所述置换可以位于SEQ ID NO:1的3'-末端的最后6、5、4、3、2或1个核苷酸内和/或SEQ ID NO:1的5'-末端的第一个核苷酸处。在本发明的一个具体实施方案中,miR-379的部分或片段为miR-379-5p并具有根据SEQ ID NO:1的核苷酸序列。

[0025] 在本发明的进一步实施方案中,miR-541的部分或片段为miR-541-5p并具有根据SEQ ID NO:2的核苷酸序列,其中不超过8、7、6、5、4、3、2或1个核苷酸被置换。例如,与SEQ ID NO:2相比被置换的核苷酸可以是任何其它核苷酸,该种任何其它核苷酸允许如本文所述的相应抑制剂的杂交。在本发明的一个实施方案中,所述置换可以位于SEQ ID NO:2的3'-末端的最后8、7、6、5、4、3、2或1个核苷酸内和/或SEQ ID NO:2的5'-末端的第一个核苷酸处。在本发明的一个具体实施方案中,miR-541的部分或片段为miR-541-5p并具有根据SEQ ID NO:2的核苷酸序列。

[0026] 在本发明的组合物的一个实施方案中,miR-379的部分具有根据SEQ ID NO:1的核苷酸序列,其中不超过6个核苷酸被置换,并且miR-541的部分具有根据SEQ ID NO:2的核苷酸序列,其中不超过8个核苷酸被置换。

[0027] 由本发明描述并提供的组合物所包含的抑制剂可以是任何抑制剂,优选地,所述抑制剂能够,如通过直接结合相应的miR或其靶点,或通过支持或诱导miR-379(或其部分或

片段)或miR-541(或其部分或片段)的切割或降解,或者分别损坏miR-379(或其部分或片段)或miR-541(或其部分或片段)的功能和/或表达,抑制或压制miR-379(或其部分或片段)或miR-541(或其部分或片段)向其相应靶点结合或停靠。例如,所述抑制剂可以是或包含核酸分子。

[0028] 在本发明的一个实施方案中,至少一种抑制剂包含一种核酸序列,所述核酸序列包含至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸,例如至少15或16个核苷酸。在本发明的进一步实施方案中,所述抑制剂不超过250、200、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、45、40、35、30或25个核苷酸的长度。

[0029] 在本发明的上下文中,miR-379(或其部分或片段)和/或miR-541(或其部分或片段)的抑制剂可直接靶向本文所述的相应miR或其部分或其片段。本领域已知能够抑制miR的一般抑制分子。在本发明的一个实施方案中,针对miR-379(或其部分或片段)和/或miR-541(或其部分或片段)的抑制剂可选自:强诱饵(Tough Decoy, TuD)(如强诱饵RNA)、诱饵(Decoy)、反义寡核苷酸(反义RNA或DNA,嵌合反义分子)、反义-miR、阻断-miR、核酶、外部指导序列(EGS)、寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、小时序RNA(stRNA)、短发夹RNA(shRNA)、诱导基因活化的小RNA(small RNA-induced gene activation, RNAa)、小活化RNA(saRNA)、锁核酸(LNA)、antagomir和肽核酸(PNA)以及其它寡聚核酸分子,它们能够(如通过与相应miR的靶点的至少部分杂交)抑制或压制本文所述的相应miR的功能。在本发明的具体实施方案中,所述至少一种抑制剂为强诱饵RNA(TuD)。强诱饵在本领域中通常是已知的并且可以从如SignaGen® Laboratories (USA)获得。在本发明的上下文中,本发明的组合物可,如包含一种TuD,所述TuD包含在同一TuD-分子上的一种抑制miR-379(或其部分或片段)的序列和另一种抑制miR-541(或其部分或片段)的序列,或者本发明的组合物可包含两种不同的TuD,一种TuD包含抑制miR-379(或其部分或片段)的序列和另一种TuD包含抑制miR-541(或其部分或片段)的序列。例如,本发明的组合物包含一种TuD,所述TuD包含在同一TuD-分子上的一种抑制miR-379(或其部分或片段)的序列和另一种抑制miR-541(或其部分或片段)的序列两者。在本发明的具体实施方案中,所述抑制剂包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列,其中与SEQ ID NO:5相比,不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个核苷酸被置换。在本发明的进一步具体实施方案中,所述抑制剂为包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列的核酸分子。

[0030] 此外,由本文描述并提供的组合物所包含的抑制剂还可包含化学修饰,从而如,提高稳定性或允许向有此需要的受试者适当给药。在本发明的一个实施方案中,至少一种抑制剂包含核酸序列的化学修饰,所述化学修饰选自包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、硫代磷酸酯DNA(PS)、2'-O-甲基RNA(OMe)、2'-O-甲氧基-乙基RNA(MOE)、肽核酸(PNA)、N3'-P5'-氨基磷酸酯(NP)、2'-氟-阿拉伯糖核酸(FANA)、吗啉代氨基磷酸酯(MF)、环己烯核酸(CeNA)和三环DNA(tc-DNA)的核酸类似物。

[0031] 在本发明的另一个实施方案中,还可使抑制剂由合适的载体(vehicle)或媒介(carrier)包含。因此,本发明还涉及包含含有本文描述并提供的抑制剂的组合物的载体或媒介。例如,在本发明的上下文中,可以使至少一种抑制剂由选自腺相关病毒(AAV)、慢病毒载体、聚乙烯亚胺(PEI)、阳离子脂质体(如脂质纳米颗粒)、二氧化硅纳米颗粒、PEG化的PLGA和中性脂质的递送载体包含。本发明的载体可以用于确保本发明的组合物在需要采用这种组合物治疗的受试者中的预期靶点处摄取的目的。在本发明的上下文中,用于本文所

述的抑制剂的进一步的示例性递送载体包括包含脂质(如阳离子脂质)的载体(如脂质体)、包含病毒的载体(如载体(vector))、包含聚合物的载体(如生物可降解的聚合物或树状大分子)和包含肽的载体(如渗透(penetration)肽)、外来体和细菌衍生的完整小细胞。在本发明的具体实施方案中,递送载体包括大于一种的化合物。例如,递送载体可包括一种或多种脂质部分、一种或多种肽、一种或多种聚合物、一种或多种病毒载体或它们的组合。具体的实施方案涉及一种递送载体,该递送载体为缔合络合物,比如脂质体。脂质体通常包括多种组分,比如阳离子脂质(如氨基脂质)、靶向部分、融合(fusogenic)脂质、PEG化的脂质中的一种或多种。在一些实施方案中,PEG-脂质可以是靶向的PEG-脂质。例如,脂质体可以包括核酸以及胺-脂质和PEG化的脂质。在本发明的一些实施方案中,PEG-脂质是靶向的PEG-脂质。在进一步的实施方案中,所述制剂还包含比如胆固醇的结构部分。在本发明的上下文中最优选的是病毒递送载体。病毒载体可以是,如逆转录病毒,比如慢病毒,或腺病毒,优选腺相关病毒(如,AAV)。因此,本发明还提供一种包含本文所述的miR-379(或其部分或片段)和miR-541(或其部分或片段)的抑制剂的病毒载体,和/或一种包含含有本文所述的miR-379(或其部分或片段)的抑制剂的病毒载体和一种含有本文所述的miR-541(或其部分或片段)的抑制剂的病毒载体的组合物。当抑制剂为核酸分子时,它们的序列可以如插入基因的非翻译区,该基因是随后由载体递送的构建体或盒的一部分。当被转导时,宿主细胞可以表达本发明的序列并因此沉默或表达本发明的任何miR。载体可以是病毒衣壳,并且除了本发明的构建体之外,可以不包含任何病毒或其他多核苷酸。

[0032] 如上所述,本文描述并提供的组合物的抑制剂可以是核酸分子。例如miR-379(或其部分或片段)的至少一种(或全部)抑制剂包含与miR-379(或其部分或片段)互补或杂交(如在严格条件下)的核苷酸序列,和miR-541(或其部分或片段)的至少一种(或全部)抑制剂包含与miR-541(或其部分或片段)互补或杂交(如在严格条件下)的核苷酸序列。在本发明的一个实施方案中,miR-379的抑制剂包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列,其中不超过5、4、3、2或1个核苷酸被置换。此外,在进一步的实施方案中,与SEQ ID NO:3相比,添加了不超过30、25、20、15、10、6或5个核苷酸。例如,与SEQ ID NO:3相比添加或置换的核苷酸可以是任何其它核苷酸,该种任何其它核苷酸允许所述抑制剂与如本文所述的miR-379杂交。在一个实施方案中,当将核苷酸添加至SEQ ID NO:3时,此类添加的核苷酸以进一步增加与根据SEQ ID NO:1的核酸序列的杂交的方式添加。例如,将最多5、4、3、2或1个核苷酸添加到SEQ ID NO:3的5'-末端,如5'-CCUTC-3'或其核苷酸的任何子集。在本发明的具体实施方案中,miR-379的抑制剂是具有SEQ ID NO:3的序列的核酸分子。

[0033] 在本发明的进一步实施方案中,miR-541的抑制剂包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列,其中不超过5、4、3、2或1个核苷酸被取代。此外,在进一步的实施方案中,与SEQ ID NO:4相比,添加了不超过30、25、20、15、10、9或8个核苷酸。例如,与SEQ ID NO:4相比添加或置换的核苷酸可以是任何其它核苷酸,该种任何其它核苷酸允许所述抑制剂与如本文所述的miR-541杂交。在一个实施方案中,当将核苷酸添加至SEQ ID NO:4时,此类添加的核苷酸以进一步增加与根据SEQ ID NO:2的核酸序列的杂交的方式添加。例如,将最多8、7、6、5、4、3、2或1个核苷酸添加到SEQ ID NO:4的5'-末端,如5'-TGUGUGC-3'或其核苷酸的任何子集。在本发明的具体实施方案中,miR-541的抑制剂是具有SEQ ID NO:4的序列的核酸分子。

[0034] 在本发明组合物的另一个实施方案中,miR-379或其部分或片段的抑制剂包含SEQ

ID NO:3的核苷酸序列,其中不超过5个核苷酸被置换,和/或miR-541或其部分或片段的抑制剂包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列,其中不超过5个核苷酸被置换。

[0035] 本发明还涉及药物组合物,其包含本文描述并提供的组合物和/或含有此类组合物的载体或媒介。

[0036] 本发明还涉及本文描述并提供的组合物、载体或媒介和/或药物组合物,将其用在治疗或预防代谢功能障碍、与脂质(如甘油三酯)和糖(如葡萄糖)代谢相关和/或与癌症相关的疾病或障碍中。在本发明的一个实施方案中,此类代谢功能障碍、疾病或障碍可包括糖皮质激素驱动的代谢功能障碍、肥胖、糖尿病(1型和2型)、肥糖病(diabesity)、代谢综合征、胰岛素抵抗、高血糖症、(系统性)血脂异常、库兴氏综合征、与糖皮质激素(GC)治疗或过量相关的或由其引起的不良反应或副反应、动脉粥样硬化、心脏病、中风、(癌症)恶病质、生长缺陷、脂肪肝变性、NASH和肝纤维化。在本发明的上下文中,本文描述并提供的组合物、载体或媒介和/或药物组合物也可用在(个人)1型和/或2型糖尿病治疗中。在本发明的进一步实施方案中,本文所述的待治疗的此类癌症可包括肝细胞癌HCC和已被证明与代谢功能障碍例如肥胖相关的肿瘤,包括胰腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、乳腺癌、食道癌和胃癌。

[0037] 在本文中描述了、在附图中示出了、在实施例证明了和在权利要求中反映了表征本发明的实施方案。

[0038] 应当注意的是,如本文所用的单数形式“一个/一种”和“所述/该”包括复数指代,除非上下文另有清楚说明。因此,例如,提到的“试剂”包括一种或多种这样的不同试剂,而提到的“该方法”包括提到的本领域普通技术人员已知的可以改进或替代本文所述方法的等同的步骤和方法。

[0039] 除非另有说明,在一系列要素前面的术语“至少”应当理解为是指该系列中的每个要素。本领域技术人员将会意识到或者能够使用不超过常规实验而确定,许多与本文描述的本发明的具体实施方案的等同物。预期这类等同物被本发明涵盖。

[0040] 术语“和/或”无论在本文何处使用均包括“和”、“或”以及“所述术语所连接的元素的全部或任何其它组合”。

[0041] 本文所用术语“约”或“大约”意指在给定值或范围的20%内,优选地在10%内,更优选地在5%内和最优选地在3%内。

[0042] 贯穿本说明书和随后的权利要求,除非上下文另有要求,词语“包括/包含(comprise)”以及变形词语比如“包括/包含(comprises)”和“包括/包含(comprising)”将被理解为意指包括陈述的整数或步骤、或整数或步骤的集合,但并不排除任何其它的整数或步骤、或整数或步骤的集合。当本文使用时,术语“包括/包含(comprising)”能够被术语“含有(containing)”或“包括(including)”替代,或有时本文使用时会以术语“具有”替代。

[0043] 当在本文使用时,“由……组成”排除了未在声称的要素中规定的任何要素、步骤或整数。当本文使用时,“本质上由...组成”并不排除实质上不影响声称的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0044] 除非另有具体说明,否则本文的每一个实例中,术语“包括/包含”、“本质上由...组成”和“由...组成”中任意一个可被其它两个术语中的任意一个替代。例如,当将一个给定特征、化合物或范围表示为由相应的更宽的术语“包含”时,此类更宽的术语还可由此类特征、化合物或范围“组成”。

[0045] 应该理解的是,本发明并不限于本文所述的具体的方法学、方案和试剂等,因为这些能够改变。本文所使用的术语只用于描述特定实施方案的目的而并不意在限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求限定。

[0046] 本说明书全文所引用的所有出版物(包括所有的专利、专利申请、科学出版物、制造商的规格、说明书等),无论在前还是在后,其以全文通过引用并入本文。本文的任何内容均不能被解释为承认本发明无权凭借在先发明而早于这样的公开物。在通过引入方式并入的材料与本说明书矛盾或不一致时,本说明书将取代任何这样的材料。

## 附图说明

[0047] 图1:通过在小鼠中TuD抑制剂的rAAV介导的递送,miR-541和miR-379活性的肝特异性抑制的实验方案。

[0048] 图2:与阴性对照(AAV-NC,黑条)相比,在具有miR-541和miR-379活性的肝特异性抑制(AAV-TuD,白条)的动物中观察到的HOMA-IR(胰岛素抵抗的替代测量)的降低。

[0049] 图3:与阴性对照(AAV-NC,黑条)相比,在具有miR-541和miR-379活性的肝特异性抑制(AAV-TuD,白条)的动物中甘油三酯的循环水平降低。

[0050] 图4:与阴性对照(AAV-NC,实心方块和黑条)相比,在具有miR-541和miR-379活性的肝特异性抑制(AAV-TuD,空心圆和白条)的小鼠中腹膜内葡萄糖负荷(2g/kg)后葡萄糖清除的改善。葡萄糖图谱(A)和曲线下面积(B)。

[0051] 图5:与阴性对照(AAV-NC,各图的上方小图中为实心方块和下方小图中为黑条)相比,在具有miR-541和miR-379活性的组合肝特异性抑制(图5A,与图4所示的图谱相同)、miR-379活性的肝特异性抑制(图5B)或miR-541活性的肝特异性抑制(图5C)(AAV-TuD,各图的上方小图中为空心圆和下方小图中为白条)的野生型小鼠的治疗第4周进行腹膜内葡萄糖负荷(ipGTT,2g葡萄糖/kg)后葡萄糖耐受的改善。在各图的上方小图中示出了葡萄糖随时间变化的图谱,而在下方小图中示出了相应的曲线下面积。观察到了响应于对miR-541和miR-379活性的组合抑制的葡萄糖清除的协同改善。

[0052] 图6:与阴性对照(AAV-NC,在图6A-C的各图中为实心方块)相比,响应于在治疗第3周向具有miR-541和miR-379活性的组合肝特异性抑制(图6A)、miR-379活性的肝特异性抑制(图6B)或miR-541活性的肝特异性抑制(图6C)(AAV-TuD,在图6A-C的各图中为空心圆)的野生型小鼠腹膜内施用外源胰岛素推注(0.7IU胰岛素/kg)的血糖水平。与阴性对照动物相比,仅在携带miR-541和miR-379活性的肝特异性抑制的动物中发现葡萄糖水平在所有研究的时间点均显著降低。

[0053] 图7:与阴性对照(AAV-NC,黑条)相比,在具有miR-541和miR-379活性的组合肝特异性抑制(图7A)、miR-379活性的肝特异性抑制(图7B)和miR-541活性的肝特异性抑制(图7C)(AAV-TuD,白条)的野生型小鼠治疗后2、3和4周的血浆甘油三酯水平(禁食5-6小时)。观察到了响应于对miR-541和miR-379活性的组合肝特异性抑制的循环甘油三酯的稳健(robust)降低作用。

[0054] 本文提供了以下序列:

[0055] SEQ ID NO:1

[0056] RNA智人

- [0057] miR-379-5p
- [0058] 粗体:抑制剂SEQ ID NO:3的互补序列
- [0059] 5'-UGGUAGACUAUGGAACGUAGG-3'
- [0060] SEQ ID NO:2
- [0061] RNA智人
- [0062] miR-541-5p
- [0063] 粗体:抑制剂SEQ ID NO:4的互补序列
- [0064] 5'-AAAGGAUUCUGCUGUCGGUCCCACU-3'
- [0065] SEQ ID NO:3
- [0066] DNA人工
- [0067] miR-379的抑制剂
- [0068] 5'-GTTCCATAGTCTACC-3'
- [0069] SEQ ID NO:4
- [0070] DNA人工
- [0071] miR-541的抑制剂
- [0072] 5'-CGACAGCAGAATCCTT-3'
- [0073] SEQ ID NO:5
- [0074] RNA人工
- [0075] 由TuD包含的miR-379和miR-541的抑制序列
- [0076] 5'-GACGGCGCUA GGAUCAUCA CAGUGGGACC GACAGCAUCU AGAAUCCUUU CAAGUAUUCU GGUCACAGAA UACAACCCUA CGUCCAAUC UUAGUCUACC ACAAGAUGAU CCUAGCGCCGUC-3'
- [0077] 通过以下实施例进一步阐述了本发明,然而本发明不限于所述实施例或受所述实施例的任何具体实施方案的限制。

## 实施例

[0078] 在健康志愿者(n=10)和未服用糖尿病药物的肥胖受试者(n=37)的肝活检中,通过采用TaqMan微小RNA分析的半定量实时PCR测定属于Dlk1-Dio3基因座的不同微小RNA的表达水平。在肥胖受试者的肝样品中观察到了检验的微小RNA(miR-127、miR-337、miR-379、miR-382、miR-134、miR-541、miR-409)的一致上调。表达上显示出最高增量的两个微小RNA为miR-379和miR-541。如表1中针对miR-541所示,检测到了这些转录本的表达水平与不同代谢指标的显著相关性。

[0079] 通过处于肝脏-特异性LP1启动子控制下的强诱饵(TuD)抑制剂的rAAV-递送,在体内研究了肝脏miR-541和miR-379活性抑制对代谢的影响。根据Rose AJ等,Cell Metab 2011,14(1):123-30实施由AAV递送的构建体的产生。简言之,为了将这些抑制剂克隆到由rAAV载体递送的构建体中,采用BglIII和SalI限制酶将原始载体的阴性对照序列替换为强诱饵序列。先前已证明这些抑制剂类型在体外强烈抑制其靶标微小RNA的活性(未公开的观察结果)。在本发明的发明人进行的三组独立研究中,向C57BL/6J小鼠(每组12只动物)施用表达阴性对照序列或针对miR-541和miR-379的强诱饵抑制剂(研究1,根据SEQ ID NO:5的序列)、阴性对照序列或针对miR-379的强诱饵抑制剂(研究2)和阴性对照序列或针对miR-

541的强诱饵抑制剂(研究3)的AAV(每只小鼠 $5 \times 10^{11}$ 个病毒基因组)。定期监测体重以及食物和水的摄取量,在施用病毒后2周和4周进行ipGTT(2g葡萄糖/kg),而在研究开始后3周进行ITT(0.7IU/kg),在这两种情况下,在测试前将动物禁食6小时,禁食从14:00-15:00h开始(图1描绘了实验方案的示意图)。此外,在2.5周和4.5周于23:00h采集餐后血液样品。在施用病毒载体后5周终止实验,在禁食5-6小时后于14:00h处死一半的动物(每组n=6只小鼠),而另一半在餐后状态下于23:00h处死。在研究1中,在接受阴性对照序列的动物和携带miR-541和miR-379活性的组合肝特异性抑制(AAV-TuD)的动物之间未检测到体重、食物或水的摄取量的差异。从第2周至研究结束,AAV-TuD组的空腹血糖显著降低,同时从第3周开始空腹胰岛素浓度显著下降,并且从第2周到结束,AAV-TuD组的肝胰岛素抵抗显著降低(图2),所述肝胰岛素抵抗通过稳态模型评估(HOMA-IR)指数估算,该指数由空腹血浆胰岛素(FPI)和空腹血糖(FPG)浓度 $[FPI(mU/l) \times FPG(mmol/l) / 22.5]$ 计算得出。此外,不考虑动物的喂养条件,该组的血浆甘油三酯水平也显著降低(图3和7A)。AAV-TuD组的葡萄糖清除也明显更好(第4周60%改善, $p < 0.001$ ;图4A、4B和5A)。尽管在接受其他两种测试的强诱饵抑制剂的动物中也观察到了葡萄糖清除的显著改善,但效果并不明显(响应于针对miR-379活性(图5B)和miR-541活性(图5C)的单一强诱饵,分别14%和36%改善),表明响应于两种微小RNA的同时抑制的协同作用。此外,两种微小RNA的组合抑制响应于外源胰岛素推注还诱导了显著增强的降糖作用,与阴性对照相比,具有持续两小时的显著降低的葡萄糖水平( $p < 0.001$ ) (图6A)。再次,两种微小RNA中的任何一种的单一抑制(图6B和6C)都比不过这一效果。通过血糖仪(Accu-Check)测定血糖水平。通过酶学测定(Sigma-Aldrich)测量甘油三酯水平,通过ELISA(Alpco)定量胰岛素水平。将响应于腹膜内葡萄糖负荷(2g/kg)的葡萄糖图谱曲线下面积用于计算葡萄糖清除的改善。

[0080] 表1:示出了在健康志愿者和未服用糖尿病药物的肥胖受试者中miR-541的肝表达水平与不同代谢参数之间的相关性。

	<b>miR-541</b>	<b>miR-541</b>	<b>miR-541</b>	<b>miR-541</b>	<b>miR-541</b>	<b>miR-541</b>
	<b>vs.</b>	<b>vs.</b>	<b>vs.</b>	<b>vs.</b>	<b>vs.</b>	<b>vs.</b>
	<b>胰岛素</b>	<b>HOMA-IR</b>	<b>甘油三酯</b>	<b>ASAT</b>	<b>胆红素</b>	<b>HDL</b>
[0081]	r=0,5495	r=0,5353	r=0,6975	r=0,5485	r=0,6469	r=-0,4721
	p=0,0275	p=0,0326	p=0,0038	p=0,0278	p=0,0068	ns

[0082] 本发明的特征还在于以下项目:

[0083] 1.一种组合物,其包含

[0084] (a)miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段的抑制剂,和/或

[0085] (b)miR-379或其部分或片段的靶点的抑制剂和miR-541或其部分或片段的靶点的抑制剂,和/或

[0086] (c)miR-379或其部分或片段的抑制剂与miR-541或其部分或片段的靶点的抑制剂的组合,或miR-379或其部分或片段的靶点的抑制剂与miR-541或其部分或片段的抑制剂的组合。

[0087] 2.根据项目1所述的组合物,其中miR-379或其部分或片段的至少一种抑制剂包含与miR-379或其部分或片段互补或杂交的核苷酸序列,和miR-541或其部分或片段的至少一种抑制剂包含与miR-541或其部分或片段互补或杂交的核苷酸序列。

[0088] 3.根据项目1或2所述的组合物,其中

[0089] miR-379的部分具有根据SEQ ID NO:1的核苷酸序列,其中不超过6个核苷酸被置换,和

[0090] miR-541的部分具有根据SEQ ID NO:2的核苷酸序列,其中不超过8个核苷酸被置换。

[0091] 4.根据项目1至3中任一项所述的组合物,其中至少一种抑制剂包含含有至少10个核苷酸的核酸序列。

[0092] 5.根据项目1至4中任一项所述的组合物,其中至少一种抑制剂选自:强诱饵(TuD)、诱饵、反义寡核苷酸、反义(anti)-miR、阻断-miR、核酶、外部指导序列(EGS)、寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、小时序RNA(stRNA)、短发夹RNA(shRNA)、诱导基因活化的小RNA(RNAa)、小活化RNA(saRNA)、锁核酸(LNA)、antagomir和肽核酸(PNA)。

[0093] 6.根据项目5所述的组合物,其中至少一种抑制剂为强诱饵RNA(TuD)。

[0094] 7.根据项目1至6中任一项所述的组合物,其中至少一种抑制剂包含所述核酸序列的化学修饰,所述化学修饰选自包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、硫代磷酸酯DNA(PS)、2'-O-甲基RNA(OMe)、2'-O-甲氧基-乙基RNA(MOE)、肽核酸(PNA)、N<sup>3'</sup>-P<sup>5'</sup>-氨基磷酸酯(NP)、2'-氟-阿拉伯糖核酸(FANA)、吗啉代氨基磷酸酯(MF)、环己烯核酸(CeNA)和三环DNA(tc-DNA)的核酸类似物。

[0095] 8.根据项目1至7中任一项所述的组合物,其中使至少一种抑制剂由选自腺相关病毒(AAV)、慢病毒载体、聚乙烯亚胺(PEI)、阳离子脂质体、二氧化硅纳米颗粒、PEG化的PLGA和中性脂质的递送载体包含。

[0096] 9.根据项目1至8中任一项所述的组合物,其中使至少一种抑制剂由腺相关病毒(AAV)包含。

[0097] 10.根据项目1至9中任一项所述的组合物,其中

[0098] miR-379或其部分或片段的抑制剂包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列,其中不超过5个核苷酸被置换,和/或

[0099] miR-541或其部分或片段的抑制剂包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列,其中不超过5个核苷酸被置换。

[0100] 11.根据项目1至10中任一项所述的组合物,其包含在同一分子上的miR-379或其部分或片段的抑制剂和miR-541或其部分或片段的抑制剂,其中所述分子包含与miR-379或其部分或片段互补或杂交的核苷酸序列和与miR-541或其部分或片段互补或杂交的核苷酸序列。

[0101] 12.根据项目11所述的组合物,其中所述抑制剂包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列,其中不超过10个核苷酸被置换。

[0102] 13. 根据项目1至12中任一项所述的组合物,其是药物组合物。

[0103] 14. 根据项目1至13中任一项所述的组合物,将其用在治疗或预防代谢疾病、与代谢障碍相关的疾病和/或癌症中。

[0104] 15. 根据项目14所述的组合物,其中所述代谢疾病或与代谢障碍相关的疾病选自糖皮质激素驱动的代谢功能障碍、肥胖、糖尿病、肥糖病、代谢综合征、胰岛素抵抗、高血糖症、(系统性)血脂异常、库兴氏综合征、与糖皮质激素(GC)治疗或过量相关的或由其引起的不良反应或副反应、动脉粥样硬化、心脏病、中风、(癌症)恶病质、生长缺陷、肝脂肪变性、NASH和肝纤维化。

[0001] 序列表		
[0002]	<110> 德国亥姆霍兹慕尼黑中心健康与环境研究中心(有限公司)	
[0003]	<120> 用在治疗代谢疾病中的微小RNA抑制剂	
[0004]	<130> LC20310012P	
[0005]	<150> LU100927	
[0006]	<151> 2018-09-11	
[0007]	<160> 5	
[0008]	<170> PatentIn version 3.5	
[0009]	<210> 1	
[0010]	<211> 21	
[0011]	<212> RNA	
[0012]	<213> 智人	
[0013]	<400> 1	
[0014]	ugguagacua uggaacguag g	21
[0015]	<210> 2	
[0016]	<211> 25	
[0017]	<212> RNA	
[0018]	<213> 智人	
[0019]	<400> 2	
[0020]	aagggauucu gauguugguc acacu	25
[0021]	<210> 3	
[0022]	<211> 15	
[0023]	<212> DNA	
[0024]	<213> 人工序列	
[0025]	<220>	
[0026]	<223> miR-379的抑制剂	
[0027]	<400> 3	
[0028]	gttccatagt ctacc	15
[0029]	<210> 4	
[0030]	<211> 16	
[0031]	<212> DNA	
[0032]	<213> 人工序列	
[0033]	<220>	
[0034]	<223> miR-541的抑制剂	
[0035]	<400> 4	
[0036]	caacatcaga atccct	16
[0037]	<210> 5	
[0038]	<211> 122	

---

[0039]	<212>	RNA	
[0040]	<213>	人工序列	
[0041]	<220>		
[0042]	<223>	由强诱饵包含的miR-379和miR-541的抑制序列	
[0043]	<400>	5	
[0044]		gacggcgcu a ggaucauca cagugugacc acaucaucu agaauccuu caaguauucu	60
[0045]		ggucacagaa uacaaccua cguuccauc uuagucuacc acaaugau ccuagcgccg	120
[0046]		uc	122

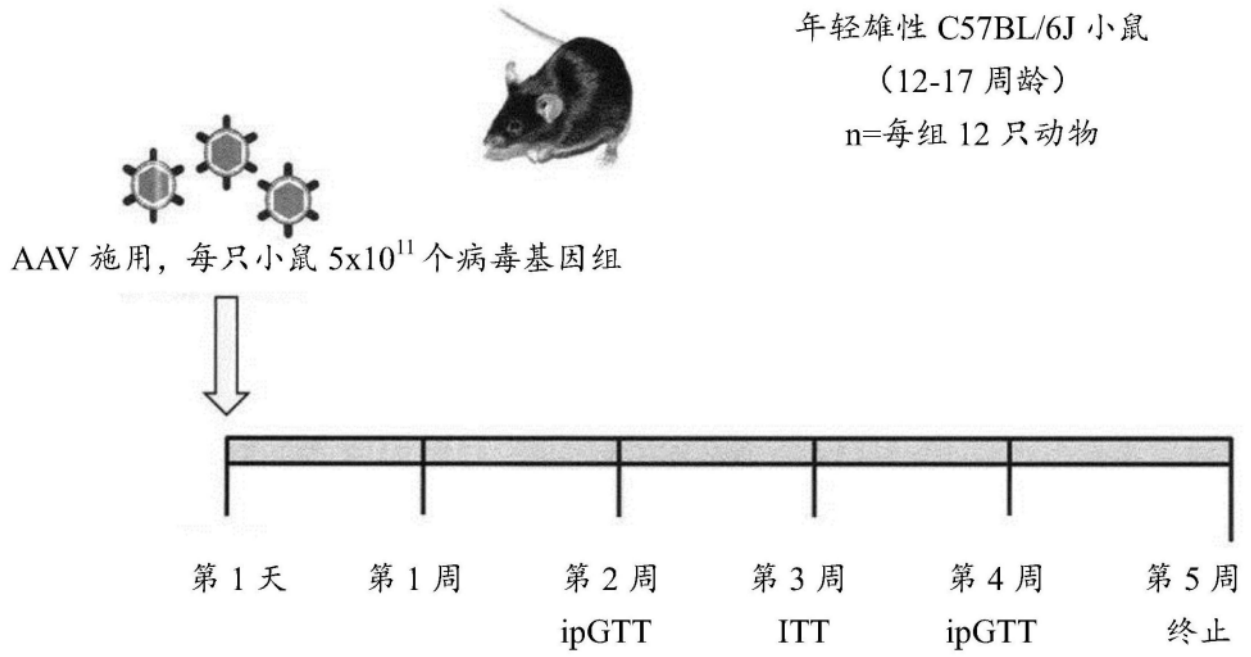


图1

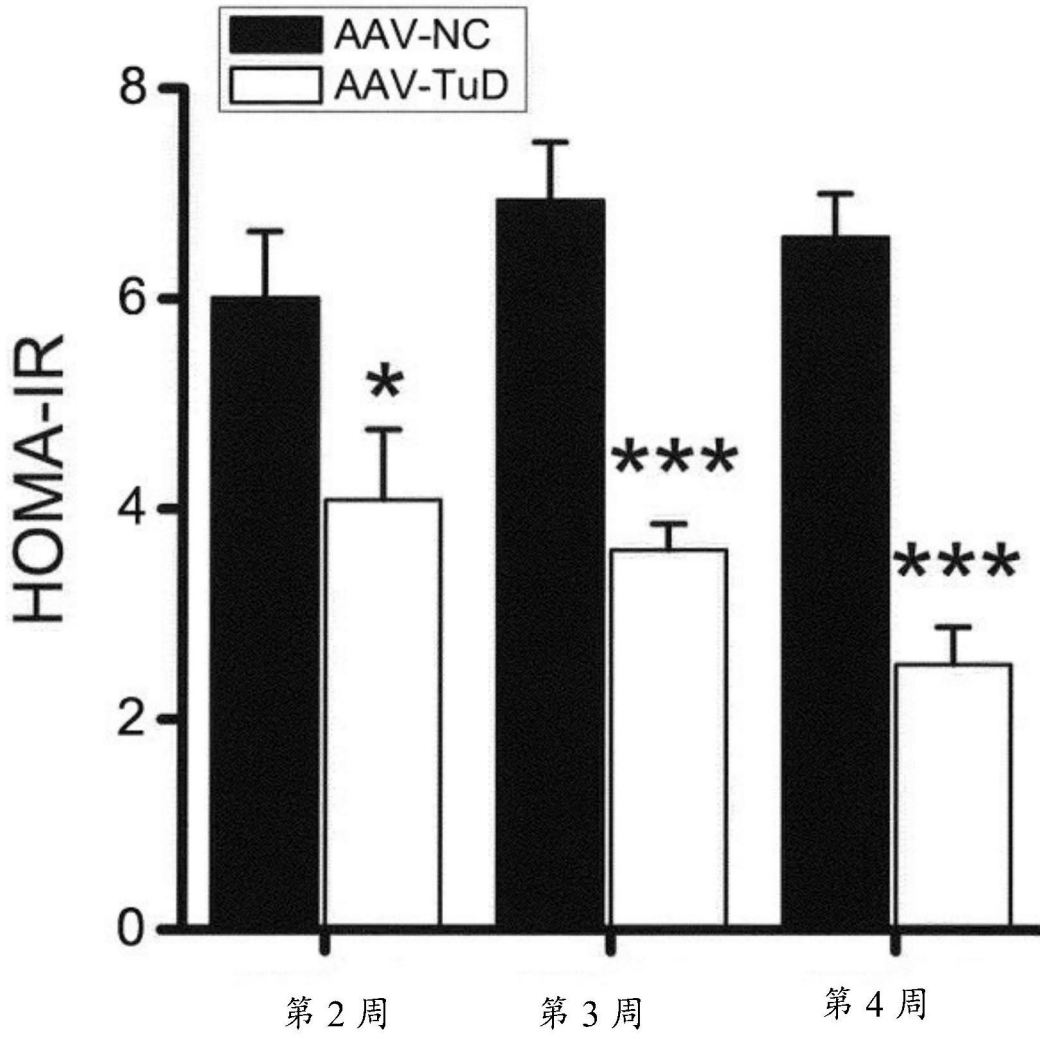


图2

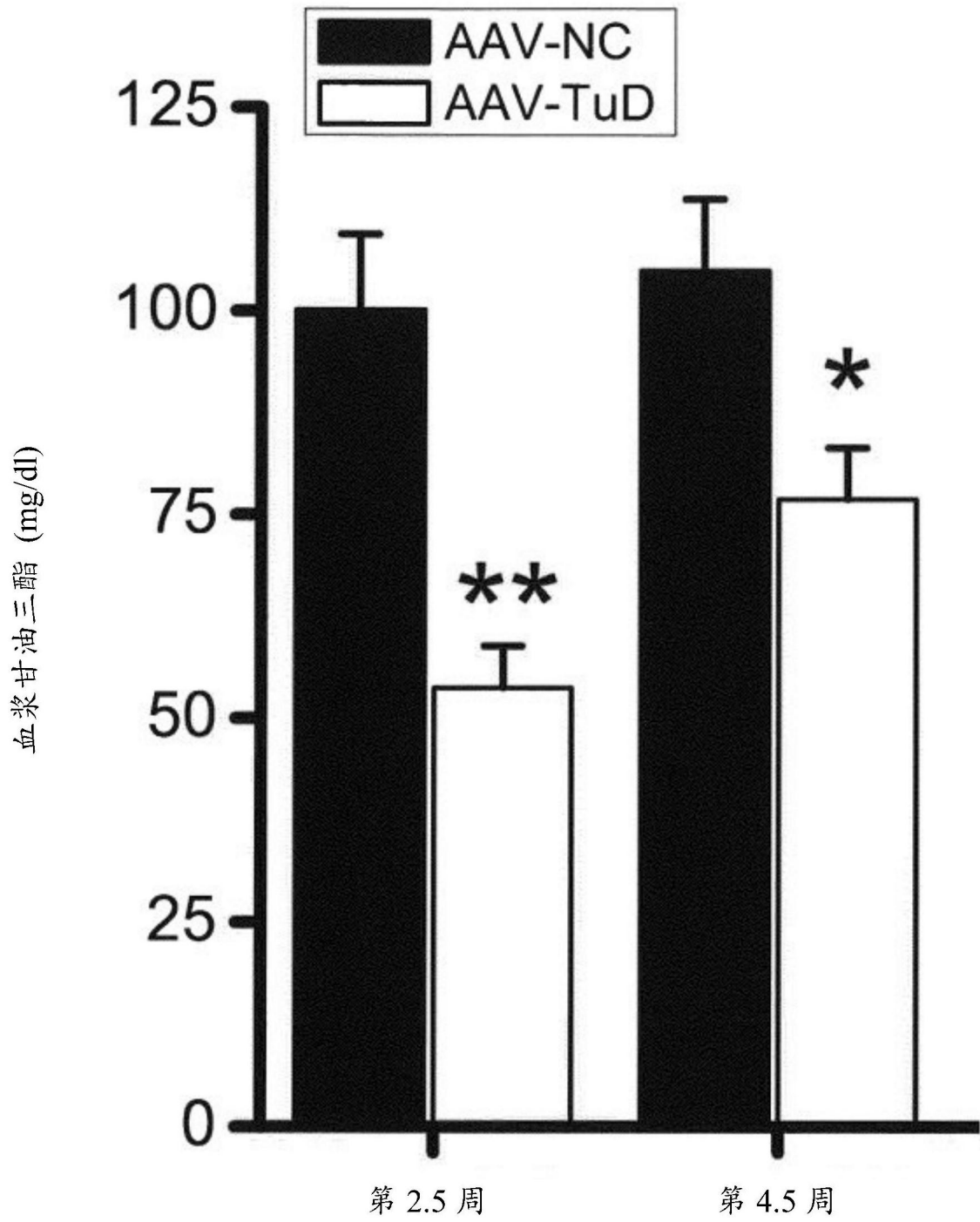


图3

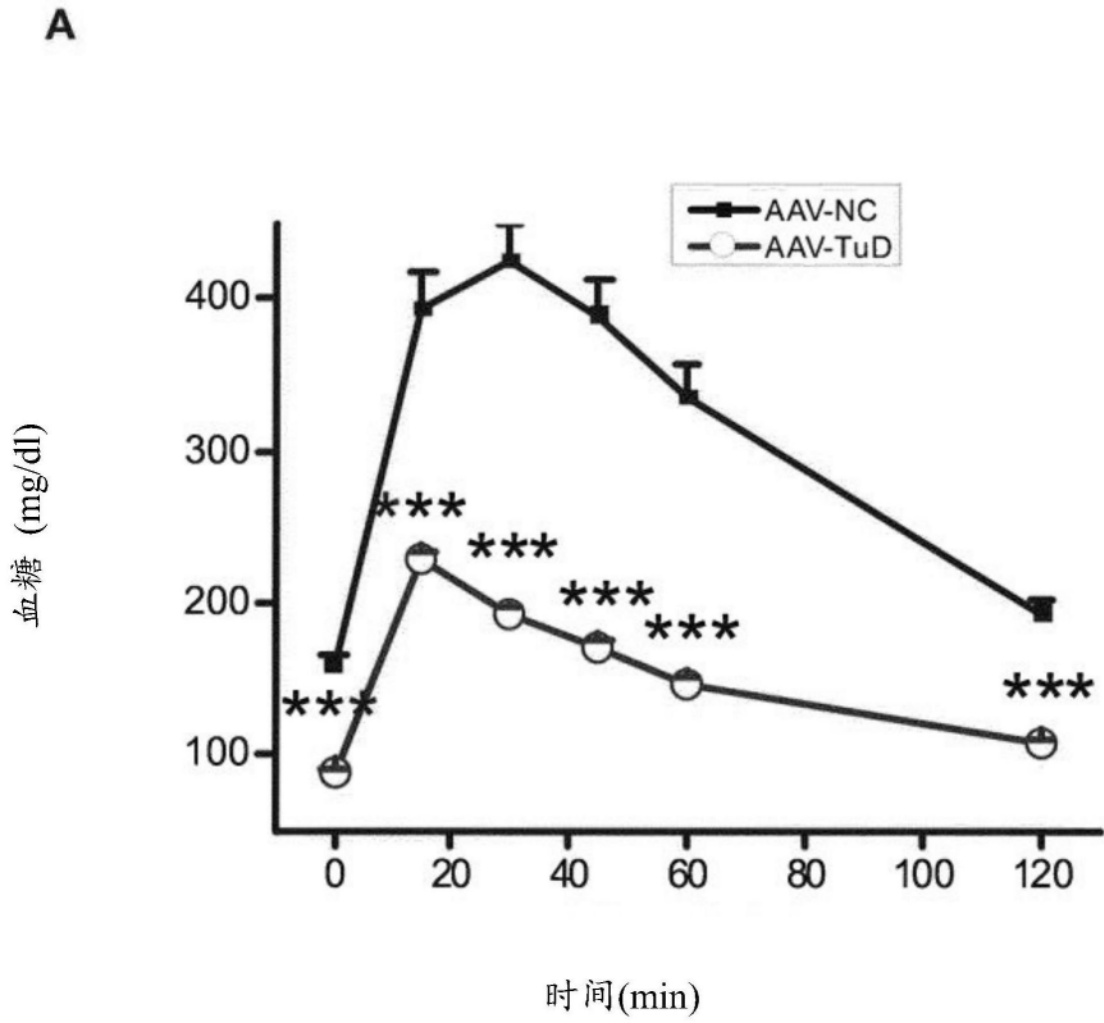


图4

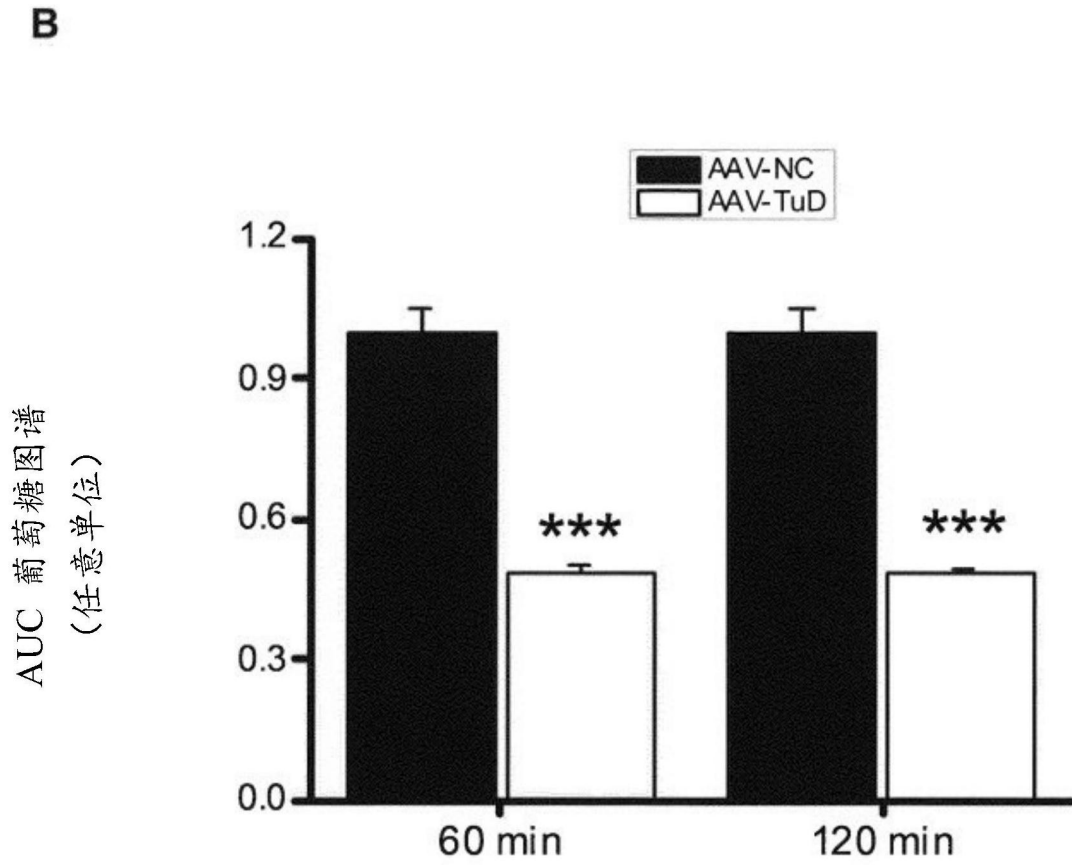


图4(续)

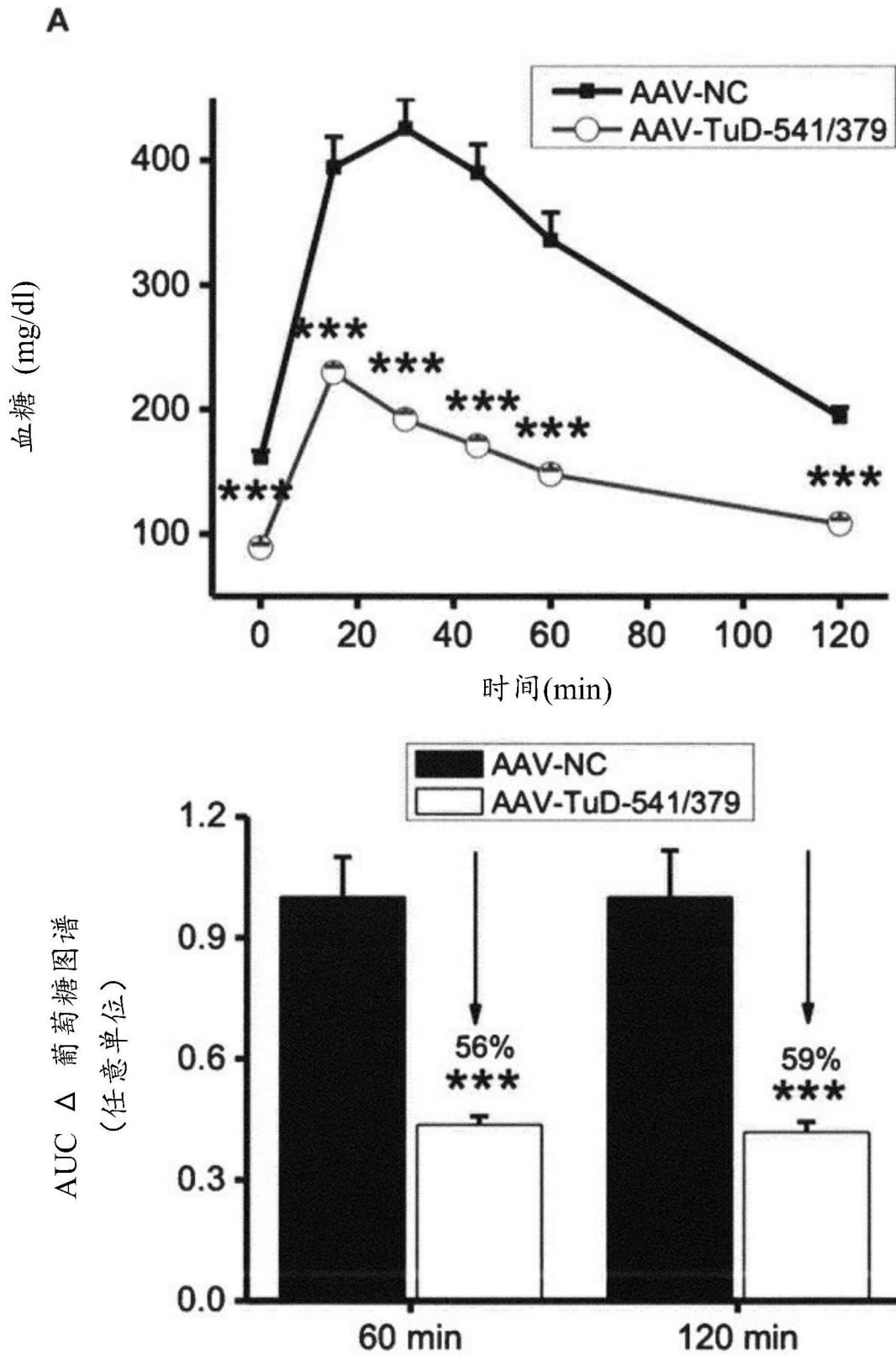


图5

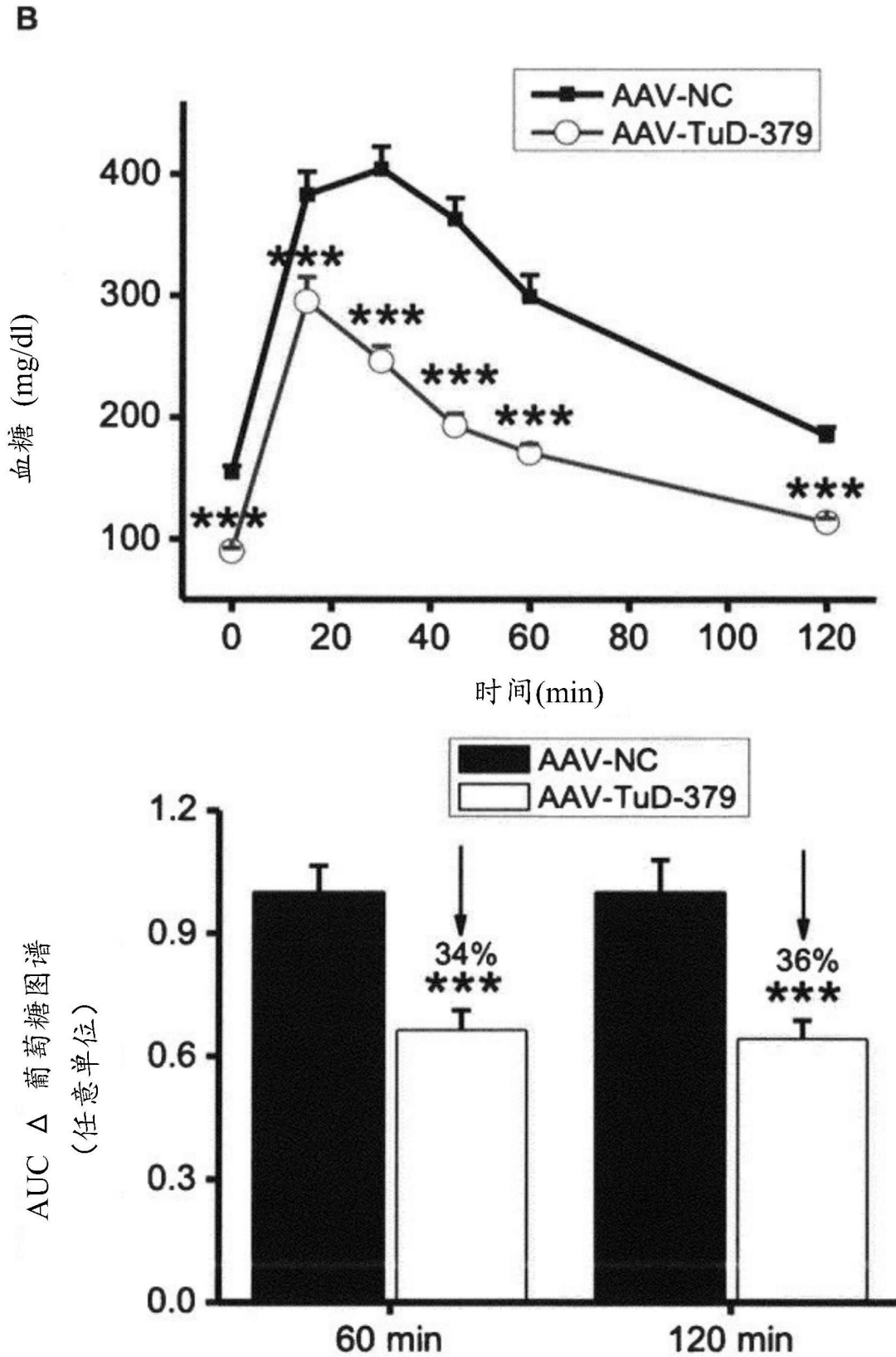


图5(续)

C

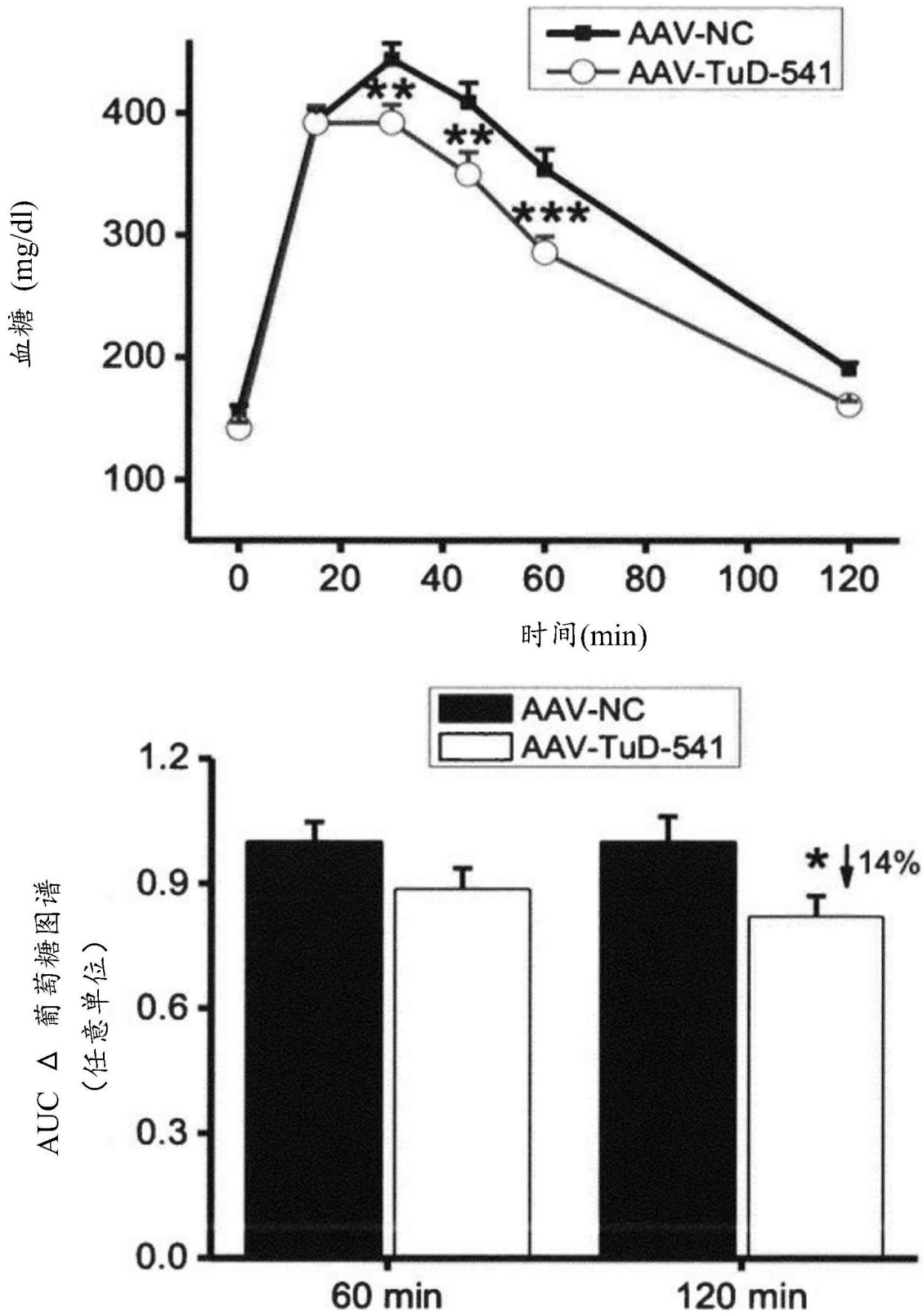


图5(续)

A

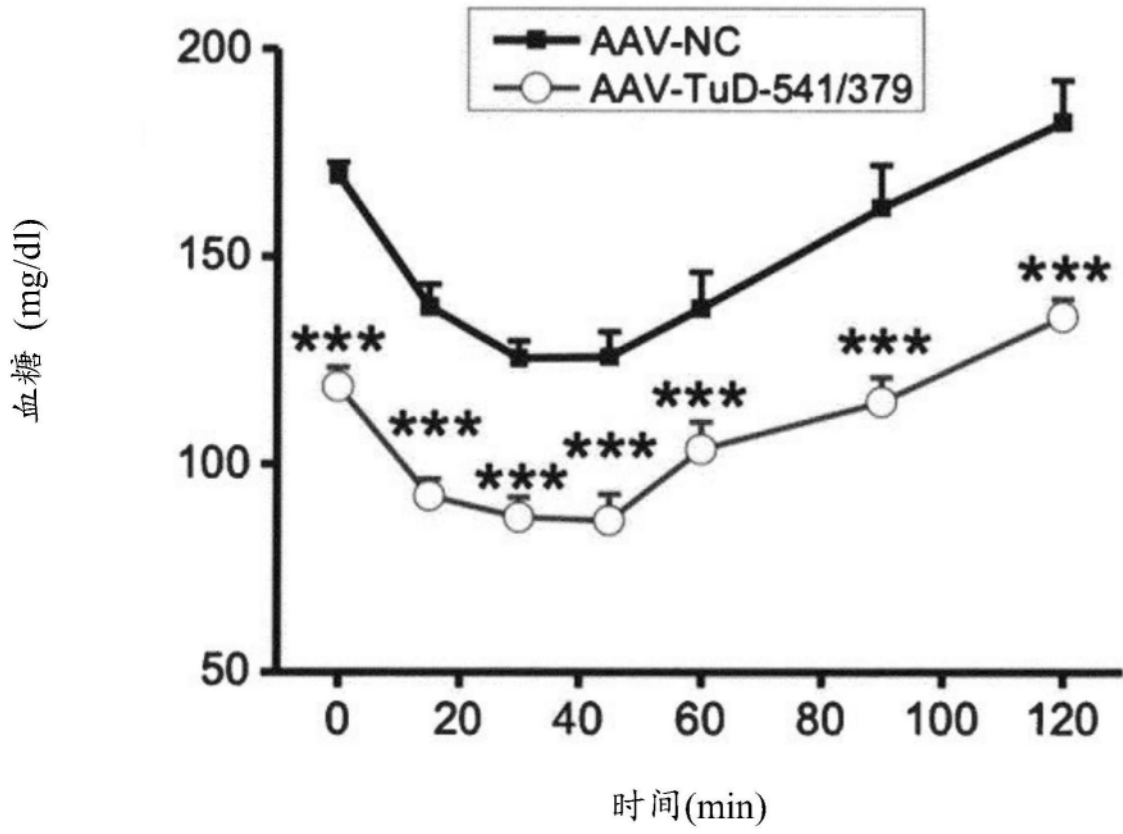


图6

B

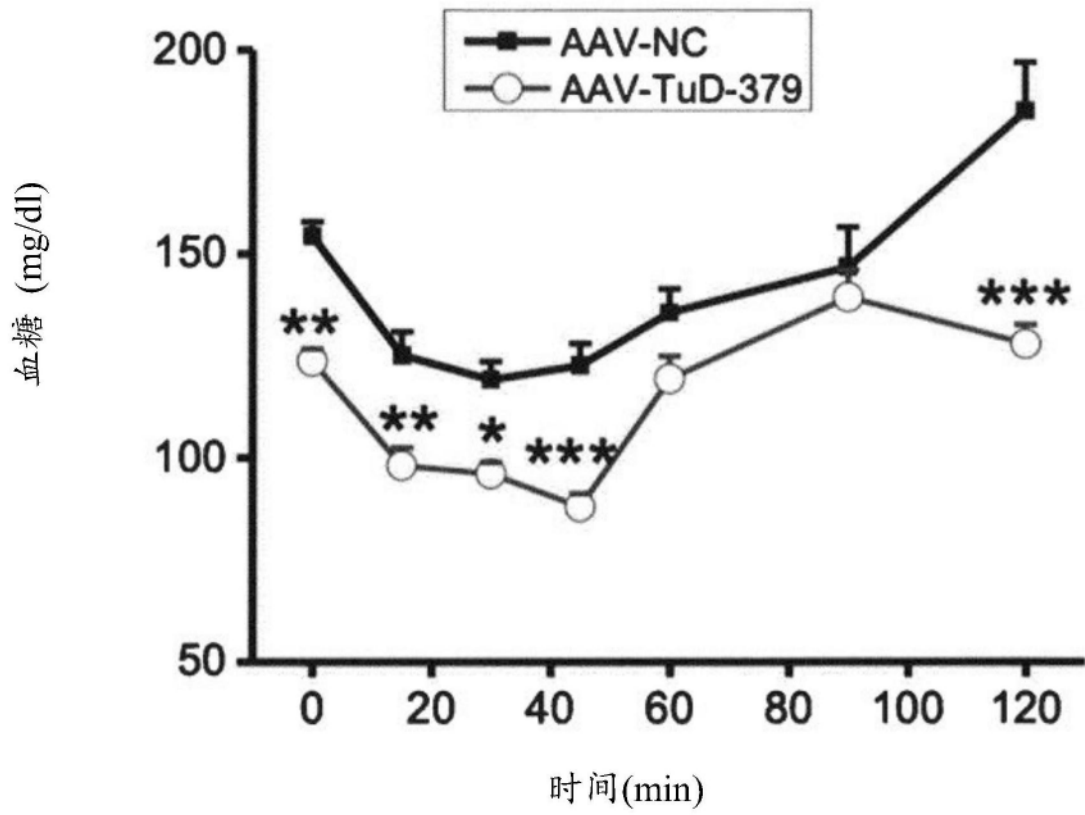


图6(续)

C

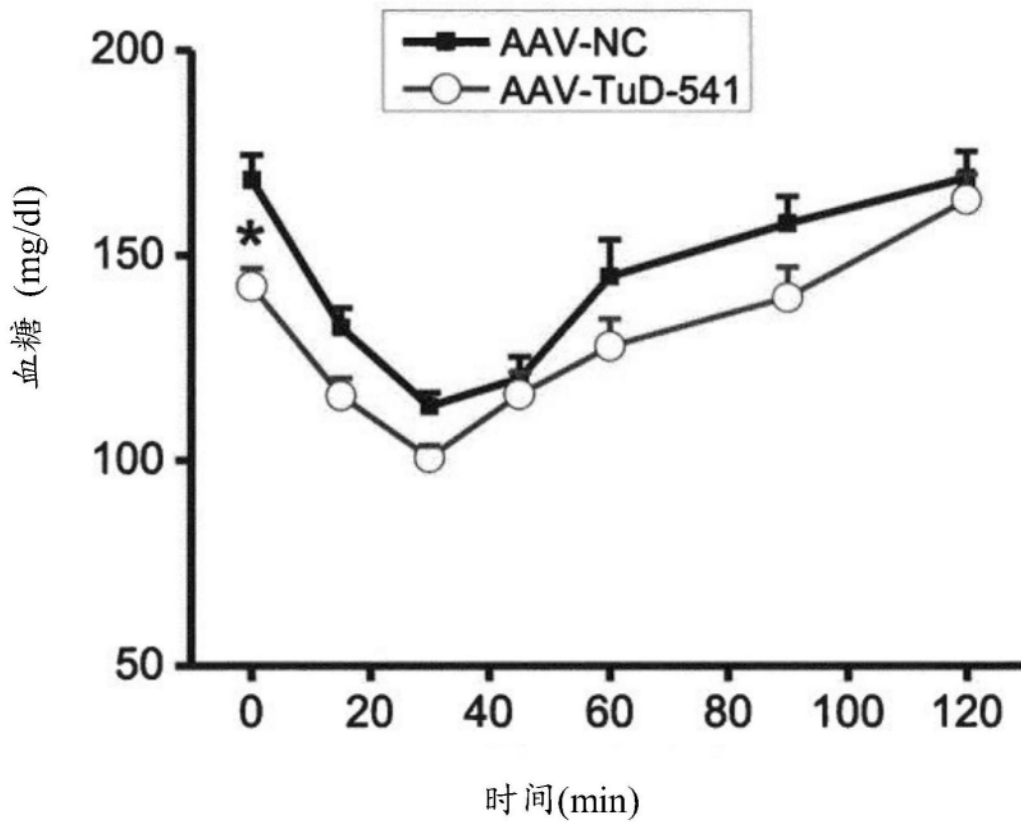


图6(续)

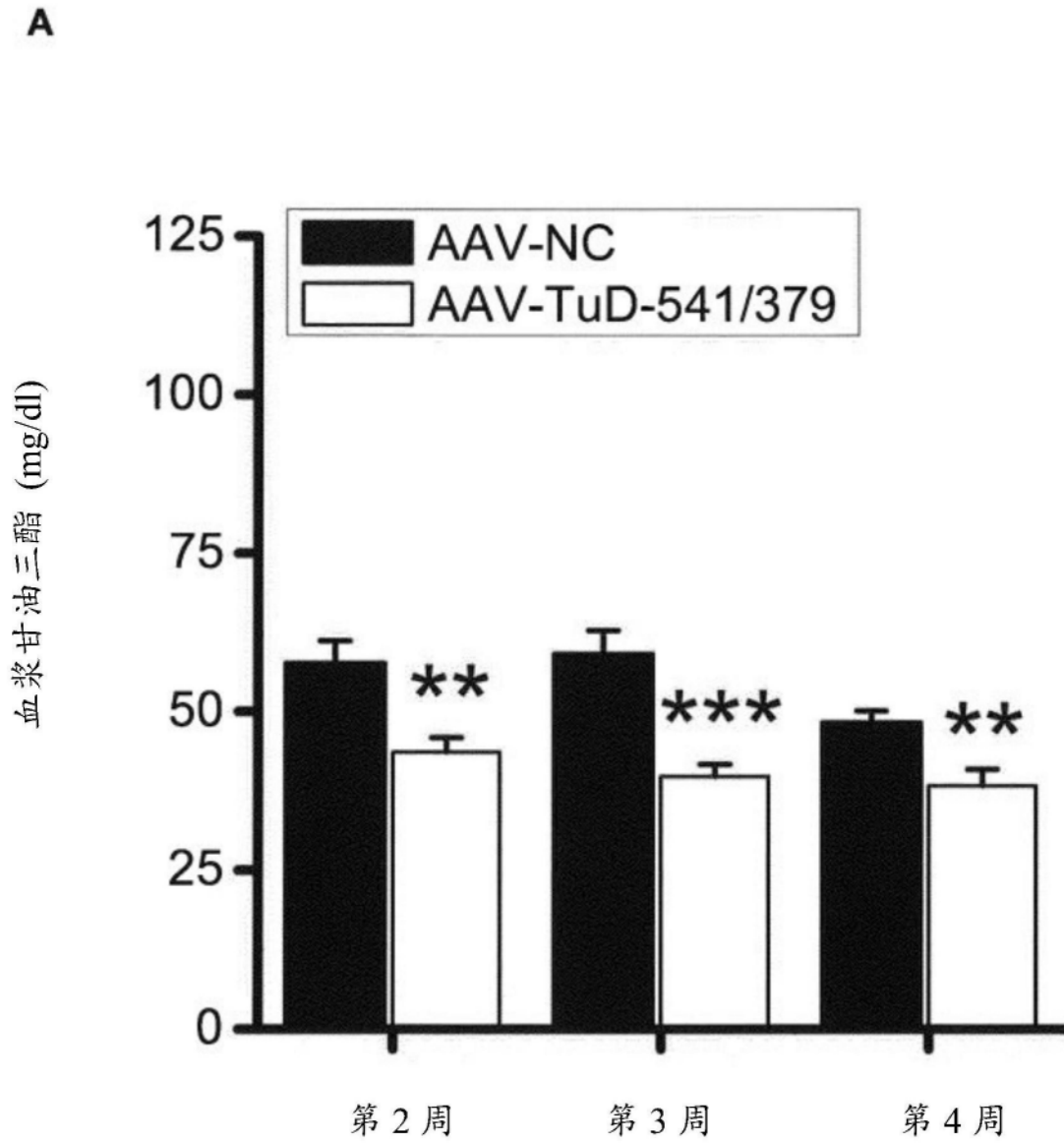


图7

**B**

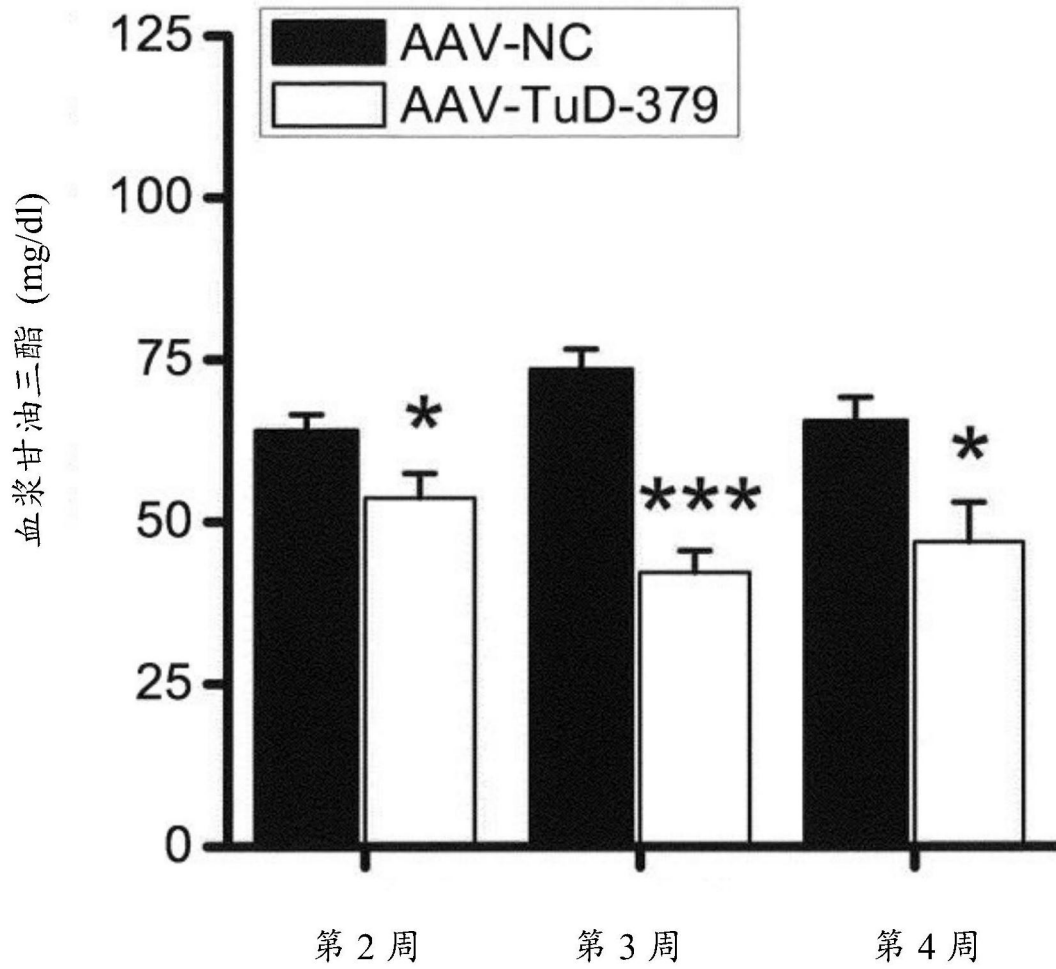


图7(续)

**C**

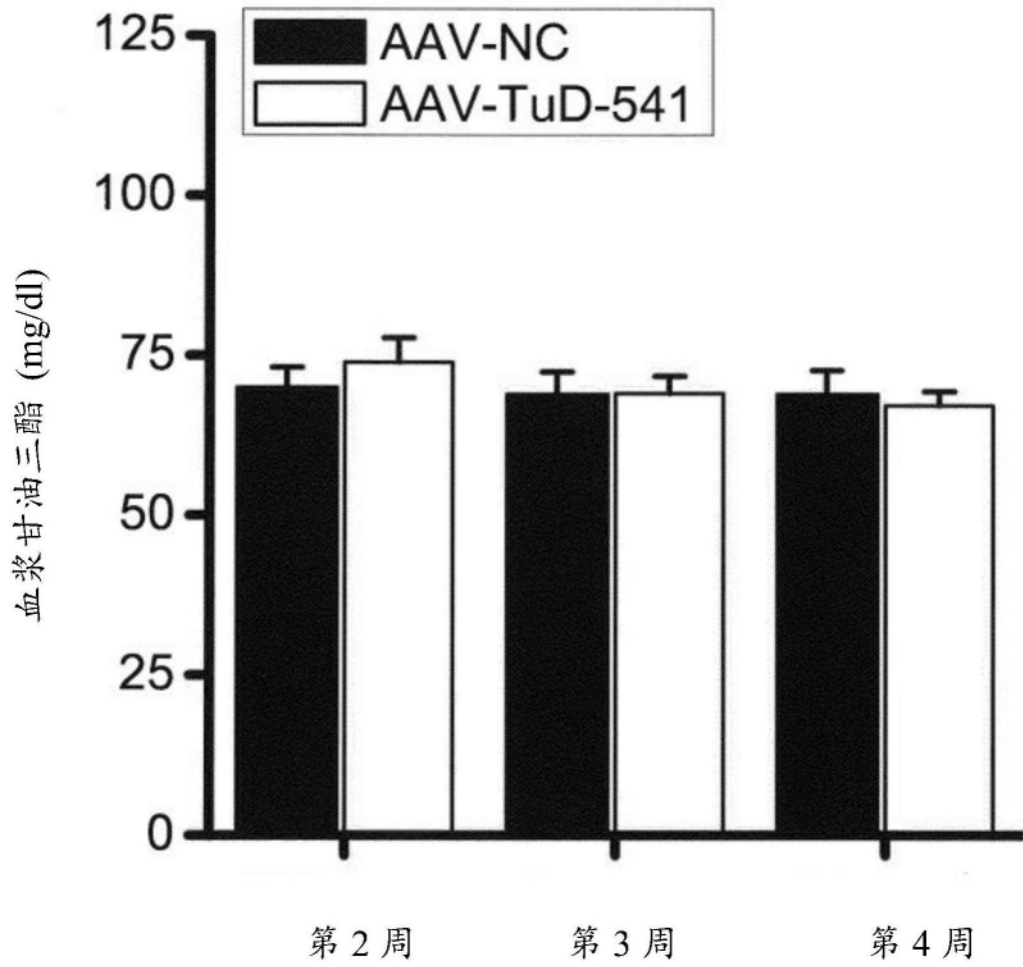


图7(续)