(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114404440 A
(43)申请公布日 2022.04.29

(21)申请号 202111177217.6
(22)申请日 2016.08.25
(30)优先权数据
62/210,031 2015.08.26 US
(62)分案原申请数据
201680049290.6 2016.08.25
(71)申请人 莱古路斯治疗法股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 得克萨斯州大学系统董事会
(72)发明人 J·R·安德罗萨维奇 B·N·周
V·D·帕特尔
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 31/7088(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)

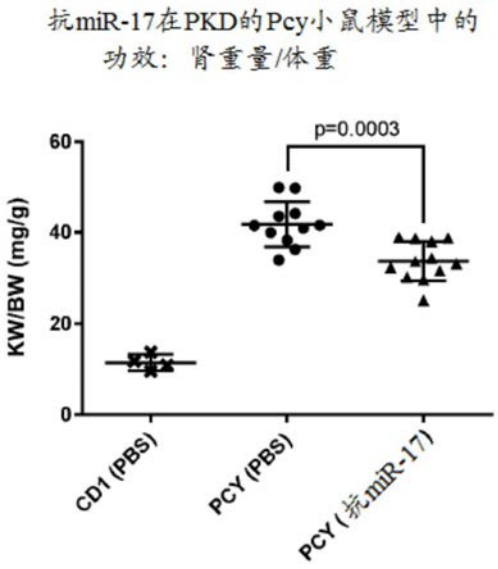
权利要求书1页 说明书33页
序列表8页 附图2页

(54)发明名称

用于治疗多囊肾病的方法

(57)摘要

本文提供了使用靶向miR-17的修饰的寡核苷酸来治疗多囊肾病,包括常染色体显性多囊肾病的方法。



CN 114404440 A

1.一种治疗多囊肾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包含由8至25个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与miR-17互补。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有多囊肾病。

3.如权利要求1所述的方法,其中所述受试者疑似患有多囊肾病。

4.如权利要求1所述的方法,其中所述受试者在施用所述修饰的寡核苷酸之前已被诊断为患有多囊肾病。

5.如权利要求1所述的方法,其中所述受试者在施用所述修饰的寡核苷酸之前被确定为在所述受试者的肾、尿液或血液中具有升高的miR-17水平。

6.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多囊肾病是常染色体隐性多囊肾病或常染色体显性多囊肾病。

7.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多囊肾病是常染色体显性多囊肾病。

8.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者具有选自PKD1基因中的突变或PKD2基因中的突变的突变。

9.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者具有增加的肾脏总体积。

10.一种由8至25个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸的用途,其用于治疗多囊肾病,其中所述修饰的寡核苷酸的所述核碱基序列与miR-17互补。

用于治疗多囊肾病的方法

[0001] 本申请是申请日为201680049290.6(申请日:2016年8月25日,发明名称:用于治疗多囊肾病的方法)的中国专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2015年8月26日提交的美国临时申请号62/210,031的优先权权益,所述美国临时申请出于任何目的以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供用于治疗多囊肾病的方法和组合物。

[0004] 背景

[0005] 多囊肾病是一种遗传病症,其中多个充满流体的囊肿在肾以及身体中的其他部位发展。多囊肾病可作为常染色体隐性多囊肾病(ARPKD)或常染色体显性多囊肾病(ADPKD)遗传。常染色体显性多囊肾病是由PKD1或PKD2基因中的突变引起的。ADPKD是一种进行性疾病,其中囊肿形成和肾肿大导致肾功能不全,并且最终在50%到60岁的患者中导致终末期肾病。ADPKD患者可能需要终身透析和/或肾移植。目前不存在批准的治疗剂用于治疗ADPKD。

[0006] 发明概述

[0007] 在此提供用于治疗多囊肾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含由8至25个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸的化合物,其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与miR-17互补。在某些实施方案中,所述受试者患有多囊肾病。在某些实施方案中,所述受试者疑似患有多囊肾病。

[0008] 在某些实施方案中,所述受试者在施用包含所述修饰的寡核苷酸的化合物之前已被诊断为患有多囊肾病。在一些实施方案中,所述受试者在施用包含所述修饰的寡核苷酸的化合物之前被确定为在所述受试者的肾、尿液或血液中具有升高的miR-17水平。

[0009] 在某些实施方案中,多囊肾病是常染色体显性多囊肾病(ADPKD)。在一些实施方案中,多囊肾病是常染色体隐性多囊肾病(ARPKD)。在一些实施方案中,所述受试者具有PKD1基因中的突变。在一些实施方案中,所述受试者具有PKD2基因中的突变。

[0010] 在某些实施方案中,所述受试者具有增加的肾脏总体积。在一些实施方案中,所述受试者患有高血压。在一些实施方案中,所述受试者的肾功能受损。在一些实施方案中,所述受试者需要改善的肾功能。

[0011] 在本文提供的任何实施方案中,向患有多囊肾病的受试者施用包含与miR-17互补的修饰的寡核苷酸的化合物可改善所述受试者的肾功能;延迟所述受试者的肾功能的恶化;减小所述受试者的肾脏总体积;减缓所述受试者的肾脏总体积的增加;抑制所述受试者的囊肿生长;减缓所述受试者的囊肿生长的增加;减轻所述受试者的肾痛;减缓所述受试者的肾痛的增加;延迟所述受试者的肾痛的发作;降低所述受试者的高血压;减缓所述受试者的高血压的恶化;延迟所述受试者的高血压的发作;减轻所述受试者的肾的纤维化;减缓所述受试者的肾的纤维化的恶化;延迟所述受试者的终末期肾病的发作;延迟所述受试者进行透析的时间;延迟所述受试者进行肾移植的时间;和/或提高所述受试者的预期寿命。

[0012] 在本文提供的任何实施方案中,向患有多囊肾病的受试者施用包含与miR-17互补的修饰的寡核苷酸的化合物可减轻所述受试者的白蛋白尿;减缓所述受试者的白蛋白尿的恶化;延迟所述受试者的白蛋白尿的发作;减轻所述受试者的血尿;减缓所述受试者的血尿的恶化;延迟所述受试者的血尿的发作;降低所述受试者的血尿素氮;降低所述受试者的血液中的肌酸酐;提高所述受试者的肌酸酐清除率;降低所述受试者的白蛋白:肌酸酐比率;提高所述受试者的肾小球滤过率;减缓所述受试者的肾小球滤过率的恶化;降低所述受试者的尿液中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL);和/或减少所述受试者的尿液中的肾损伤分子-1(KIM-1)蛋白。

[0013] 本文提供的任何实施方案可包括测量所述受试者的肾脏总体积;测量所述受试者的高血压;测量所述受试者的肾痛;测量所述受试者的肾的纤维化;测量所述受试者的血液中的血尿素氮;测量所述受试者的血液中的肌酸酐;测量所述受试者的肌酸酐清除率;测量所述受试者的白蛋白尿;测量所述受试者的白蛋白:肌酸酐比率;测量所述受试者的肾小球滤过率;测量所述受试者的尿液中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL);和/或测量所述受试者的尿液中的肾损伤分子-1(KIM-1)蛋白。

[0014] 在某些实施方案中,所述肾脏总体积是高度经过调整的肾脏体积。

[0015] 在某些实施方案中,囊肿存在于受试者的肾中。在一些实施方案中,囊肿存在于受试者的肾和肝中。

[0016] 本文提供的任何实施方案可包括施用至少一种为抗高血压剂的另外的疗法。

[0017] 本文提供的任何实施方案可包括施用至少一种选自以下的另外的疗法:血管紧张素II转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)、利尿剂、钙通道阻滞剂、激酶抑制剂、肾上腺素能受体拮抗剂、血管舒张剂、苯并二氮杂卓、肾素抑制剂、醛固酮受体拮抗剂、内皮素受体阻滞剂、哺乳动物雷帕霉素(mTOR)靶蛋白抑制剂、激素类似物、加压素受体2拮抗剂、醛固酮受体拮抗剂、透析以及肾移植。

[0018] 在某些实施方案中,加压素受体2拮抗剂是托伐普坦。

[0019] 在某些实施方案中,血管紧张素II转化酶(ACE)抑制剂是选自卡托普利、依那普利、赖诺普利、贝那普利、喹那普利、福辛普利、雷米普利、西拉普利、培哚普利以及群多普利。

[0020] 在某些实施方案中,所述血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)是选自坎地沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、氯沙坦、缬沙坦、替米沙坦以及依普罗沙坦。

[0021] 在某些实施方案中,ACE抑制剂以0.5至1mg/m^2/天、1至6mg/m^2/天、1至2mg/m^2/天、2至4mg/m^2/天或4至8mg/m^2/天范围内的剂量施用。

[0022] 在某些实施方案中,ARB以6.25至150mg/m2/天范围内的剂量施用。在任何这些实施方案中,ARB以6.25mg/m^2/天、10mg/m^2/天、12.5mg/m^2/天、18.75mg/m^2/天、37.5mg/m^2/天、50mg/m^2/天或150mg/m^2/天的剂量施用。

[0023] 在某些实施方案中,所述至少一种另外的疗法是醛固酮受体拮抗剂。在某些实施方案中,醛固酮受体拮抗剂是螺内酯。在某些实施方案中,螺内酯以每天10-35mg范围内的剂量施用。在某些实施方案中,螺内酯以每天25mg的剂量施用。

[0024] 在某些实施方案中,激酶抑制剂是选自博舒替尼和KD019。

[0025] 在某些实施方案中,mTOR抑制剂是选自依维莫司、雷帕霉素和西罗莫司。

[0026] 在某些实施方案中,激素类似物是选自生长抑素和促肾上腺皮质激素。

[0027] 在本文提供的任何实施方案中,所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与miR-17的核碱基序列(SEQ ID NO:1)至少90%互补、至少95%互补或100%互补。

[0028] 在本文提供的任何实施方案中,所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列包含核碱基序列5′-GCACTTTG-3′(SEQ ID NO:3),其中所述核碱基序列中的每个T独立地选自T和U。

[0029] 在本文提供的任何实施方案中,所述修饰的寡核苷酸由8至25、8至12、12至25、15至25或17至23个连接的核苷组成。在本文提供的任何实施方案中,所述修饰的寡核苷酸由8个、9个、10个、11个或12个连接的核苷组成。在本文提供的任何实施方案中,所述修饰的寡核苷酸由12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个连接的核苷组成。在本文提供的任何实施方案中,所述修饰的寡核苷酸由15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个连接的核苷组成。在本文提供的任何实施方案中,所述修饰的寡核苷酸由17个、18个、19个、20个、21个、22个或23个连接的核苷组成。

[0030] 在本文提供的任何实施方案中,所述修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷。所述修饰的核苷可选自S-cEt核苷、2′-O-甲氧基乙基核苷和LNA核苷。所述修饰的寡核苷酸可包含至少一个修饰的核苷间键联。所述修饰的寡核苷酸的每个核苷间键联可以是修饰的核苷间键联。在某些实施方案中,所述修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0031] 在本文提供的任何实施方案中,所述化合物由修饰的寡核苷酸组成。

[0032] 在本文提供的任何实施方案中,向所述受试者施用治疗有效量的包含与miR-17互补的修饰的寡核苷酸的化合物。

[0033] 本文提供了包含由8至25个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸的化合物用于治疗多囊肾病的用途,其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与miR-17互补。

[0034] 附图简述

[0035] 图1A-1B.(A)miR-17至92及其旁系同源簇miR-106a至363和miR-106b至25的基因组结构;(B)miR-17、miR-18、miR-19和miR-92微小RNA家族。

[0036] 图2A-2B.用抗-miR-17处理Pcy小鼠导致(A)肾重量与体重比和(B)囊性指数的降低。

[0037] 详述

[0038] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。除非提供具体定义,否则关于本文所述的分析化学、合成有机化学和医学和药物化学所用的命名以及本文所述的分析化学、合成有机化学和医学和药物化学的工序和技术为本领域中熟知且常用的。在针对本文的术语存在多个定义的情况下,则以本章节中的定义为准。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及治疗受试者。某些此类技术和程序可见于例如“Carbohydrate Modifications in Antisense Research”,Sangvi和Cook编辑,美国化学学会,Washington D.C.,1994;和“Remington′s Pharmaceutical Sciences”,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,第18版,1990;并且所述文献出于任何目的以引用的方式特此并入。除非另外说明,在允许的情况下,否则在本文的整个公开中提到的所有专利、专利申请、公布的申请和出版物、GENBANKank序列、网站及其他公开的材料以引用的方式整体并入。在提及URL或其他此类标

识符或地址的情况下，应了解此类标识符可变化，并且互联网上的具体信息可变化，但是等效信息可通过搜索互联网来找到。如此提及证明了这种信息的可用性和公众传播。

[0039] 在公开和描述本发明的组合物和方法之前，应了解本文所使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的并且不意图限制。必须指出，除非上下文另外清楚地指明，否则如在说明书和所附权利要求书中所使用，单数形式“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”包括复数个指示物。

[0040] 定义

[0041] “多囊肾病”或“PKD”是肾病的遗传形式，其中多个囊肿在至少一个肾脏中形成，从而导致受影响的肾脏肿大和肾功能逐渐丧失。

[0042] “常染色体显性多囊肾病”或“ADPKD”通常由PKD1和/或PKD2基因中的一个或多个基因突变引起。85％的ADPKD由位于染色体16上的PKD1中的突变引起，大部分剩余的ADPKD病例由位于染色体4上的PKD2中的突变引起。

[0043] “常染色体隐性多囊肾病”或“ARPKD”通常由位于染色体6上的PKHD1基因中的一个或多个基因突变引起。高达50％的患有ARPKD的新生儿死于子宫内肾病的并发症，并且约三分一的存活的患者在10年内发展终末期肾病(ESRD)。

[0044] “肾脏总体积”或“TKV”是可通过磁共振成像(MRI)、计算机断层摄影术(CT)扫描或超声(US)成像测定的肾脏总体积的量度，并且通过标准方法计算体积，如椭球体体积等式(对于超声)或者通过定量体视学或边界追踪(对于CT/MRI)。TKV通常在ADPKD患者中稳定增加，其中增加与肾功能下降相关。

[0045] “高度经过调整的肾脏总体积”或“HtTKV”是每单位高度的肾脏总体积的量度。预测HtTKV值≥600ml/m的患者在8年内发展3期慢性肾病。

[0046] “肾痛”是指需要医疗假期、药物治疗(麻醉或最后手段镇痛剂)或侵入性介入的临床上显著的肾痛。

[0047] “高血压恶化”是指需要高血压治疗的增加的血压变化。

[0048] “纤维化”是指器官或组织中过量纤维结缔组织的形成或发展。在某些实施方案中，纤维化作为修复或反应过程发生。在某些实施方案中，纤维化响应于损害或损伤而发生。术语“纤维化”应理解为作为修复或反应过程在器官或组织中形成或发展过量纤维结缔组织，而不是形成作为器官或组织的正常成分的纤维组织

[0049] “血尿”是指尿液中存在红细胞。

[0050] “白蛋白尿”是指尿液中存在过量白蛋白，并且包括但不限于正常白蛋白尿、高正常白蛋白尿、微量白蛋白尿和大量白蛋白尿。正常地，由足细胞、肾小球基底膜和内皮细胞组成的肾小球滤过渗透屏障可防止血清蛋白渗漏到尿液中。白蛋白尿可反映肾小球滤过渗透屏障的损伤。白蛋白尿可从24小时尿样、过夜尿样或点尿样计算。

[0051] “高正常白蛋白尿”是指白蛋白尿升高，其特征在于(i)每24小时15至＜30mg白蛋白排泄到尿液中和/或(ii)白蛋白/肌酸酐比率在男性中为1.25至＜2.5mg/mmol(或10至＜20mg/g)，或在女性中为1.75至＜3.5mg/mmol(或15至＜30mg/g)。

[0052] “微量白蛋白尿”是指白蛋白尿升高，其特征在于(i)每24小时30至300mg白蛋白排泄到尿液中和/或(ii)白蛋白/肌酸酐比率在男性中为2.5至＜25mg/mmol(或20至＜200mg/g)，或在女性中为3.5至＜35mg/mmol(或30至＜300mg/g)。

[0053] “大量白蛋白尿”是指白蛋白尿升高，其特征在于每24小时多于300mg白蛋白排泄到尿液中和/或(ii)白蛋白/肌酸酐比率在男性中为＞25mg/mmol(或＞200mg/g)，或在女性中为＞35mg/mmol(或＞300mg/g)。

[0054] “白蛋白/肌酸酐比率”是指尿白蛋白(mg/dL)/尿肌酸酐(g/dL)的比率且以mg/g表示。在某些实施方案中，白蛋白/肌酸酐比率可从点尿样计算并且可用作24小时时间内白蛋白排泄的估计。

[0055] “估计的肾小球滤过率(eGFR)”或“肾小球滤过率(GFR)”是指肾脏过滤肌酸酐的程度的量度，并且用作每分钟通过肾小球的血液的量的估计。正常结果可在90-120mL/min/1.73m^{2}的范围内。低于60mL/min/1.73m^{2}的水平持续3个或更多个月可以是慢性肾病的指标。低于15mL/min/1.73m^{2}的水平可以是肾衰竭的指标。

[0056] “蛋白尿”是指尿液中存在过量的血清蛋白。蛋白尿的特征可在于每24小时＞250mg蛋白质排泄到尿液中和/或尿蛋白与肌酸酐比率≥0.20mg/mg。与蛋白尿联合升高的血清蛋白包括但不限于白蛋白。

[0057] “血尿素氮”或“BUN”是指血液中呈尿素形式的氮的量的量度。肝在尿素循环中产生尿素作为蛋白质消化的废物，并且尿素通过肾从血液中除去。正常成年人血液可含有7至21mg之间的尿素氮/100ml(7-21mg/dL)血液。血尿素氮的量度用作肾健康的指标。如果肾不能正常地从血液中除去尿素，则受试者的BUN升高。

[0058] “终末期肾病(ESRD)”是指肾功能完全或几乎完全衰竭。

[0059] “肾功能受损”是指相对于正常肾功能，肾功能降低。

[0060] “减缓.....的恶化”和“减缓恶化”是指降低医疗病状朝向晚期状态转移的速率。

[0061] “延迟进行透析的时间”是指维持足够的肾功能，以使得延迟对透析治疗的需求。

[0062] “延迟进行肾移植的时间”是指维持足够的肾功能，以使得延迟对肾移植的需求。

[0063] “提高预期寿命”是指通过治疗受试者的疾病的一种或多种症状来延长受试者的生命。

[0064] “受试者”是指选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0065] “有需要的受试者”是指被鉴定需要疗法或治疗的受试者。

[0066] “疑似患有.....的受试者”是指展现出疾病的一个或多个临床指标的受试者。

[0067] “施用”是指向受试者提供药剂或组合物，并且包括但不限于由医学专家施用和自施用。

[0068] “胃肠外施用”是指通过注射或输注施用。胃肠外施用包括但不限于皮下施用、静脉内施用和肌肉内施用。

[0069] “皮下施用”是指刚好在皮肤下方施用。

[0070] “静脉内施用”是指施用到静脉中。

[0071] “伴随施用”是指在相同时间以任何方式共同施用两种或更多种药剂，其中两种药剂的药理作用均在患者中显现。伴随施用不要求以单一药物组合物、以相同剂型或通过相同的施用途径来施用两种药剂。两种药剂的作用本身不需要同时显现出来。所述作用仅需要重叠一段时间并且不需要共延。

[0072] “持续时间”是指活性或事件持续的一段时间。在某些实施方案中，治疗的持续时间是施用多个剂量的药剂或药物组合物的一段时间。

[0073] “疗法”是指疾病治疗方法。在某些实施方案中，疗法包括但不限于向患有疾病的受试者施用一种或多种药剂。

[0074] “治疗”是指施加一种或多种用于治愈疾病或改善疾病的至少一种指标的特定程序。在某些实施方案中，所述特定程序是施用一种或多种药剂。在某些实施方案中，治疗PKD包括但不限于减小肾脏总体积、改善肾功能、降低高血压和/或减轻肾痛。

[0075] “改善”是指减轻病状或疾病的至少一个指标的严重程度。在某些实施方案中，改善包括延迟或减缓病状或疾病的一个或多个指标的进展。可通过本领域的技术人员已知的主观测量或客观测量来确定指标的严重程度。

[0076] “处于发展的风险”是指受试者易于发展病状或疾病的状态。在某些实施方案中，处于发展病状或疾病的风险的受试者展现出所述病状或疾病的一种或多种症状，但是没有展现出诊断患有所述病状或疾病的足够数量的症状。在某些实施方案中，处于发展病状或疾病的风险的受试者展现出所述病状或疾病的一种或多种症状，但达到诊断所述病状或疾病所要求的较低程度。

[0077] “预防.....的发作”是指在处于发展疾病或病状的风险的受试者中预防所述病状或疾病的发展。在某些实施方案中，处于发展疾病或病状的风险的受试者接受与已经患有所述疾病或病状的受试者所接受的治疗类似的治疗。

[0078] “延迟.....的发作”是指在处于发展疾病或病状的风险的受试者中延迟所述病状或疾病的发展。在某些实施方案中，处于发展疾病或病状的风险的受试者接受与已经患有所述疾病或病状的受试者所接受的治疗类似的治疗。

[0079] “治疗剂”是指用于治愈、改善或预防疾病的药剂。

[0080] “剂量”是指在单次施用中提供的药剂的指定量。在某些实施方案中，剂量可以两个或更多个大丸剂、片剂或注射剂形式施用。例如，在某些实施方案中，在希望皮下施用的情况下，所希望的剂量要求不是通过单次注射容易地提供的体积。在此类实施方案中，可使用两次或更多次注射来达到所需剂量。在某些实施方案中，剂量可以两次或更多次注射施用以使个体体内的注射部位反应减到最小。在某些实施方案中，剂量作为缓慢输注施用。

[0081] “剂量单位”是指提供药剂的形式。在某些实施方案中，剂量单位是含有冻干寡核苷酸的小瓶。在某些实施方案中，剂量单位是含有复原的寡核苷酸的小瓶。

[0082] “治疗有效量”是指对动物提供治疗益处的药剂的量。

[0083] “药物组合物”是指包括药剂的适合用于向个体施用的物质的混合物。例如，药物组合物可包含无菌水溶液。

[0084] “药剂”是指当向受试者施用时提供治疗作用的物质。

[0085] “活性药物成分”是指药物组合物中提供所需作用的物质。

[0086] “药学上可接受的盐”是指本文提供的化合物的生理学上和药学上可接受的盐，即保留所述化合物的所需生物活性并且当施用于受试者时不具有不希望的毒理学作用的盐。本文提供的化合物的非限制性示例性药学上可接受的盐包括钠盐形式和钾盐形式。除非另外具体地指出，否则如本文使用的术语“化合物”包括其药学上可接受的盐。

[0087] “改善的器官功能”是指器官功能趋向于正常限制的变化。在某些实施方案中，通过测量存在于受试者的血液或尿液中的分子来评定器官功能。例如，在某些实施方案中，通过血尿素氮的减少、蛋白尿的减少、白蛋白尿的减少等来测量改善的肾功能。

[0088] “可接受的安全性概况”是指处于临床上可接受的限制之内的副作用的型态。

[0089] “副作用”是指除所需的作用以外的可归因于治疗的生理反应。在某些实施方案中，副作用包括但不限于注射部位反应、肝功能测试异常、肾功能异常、肝毒性、肾毒性、中枢神经系统异常和肌病。此类副作用可被直接或间接检测。例如，血清中的转氨酶水平升高可指示肝毒性或肝功能异常。例如，胆红素增加可指示肝毒性或肝功能异常。

[0090] “受试者依从性”是指受试者对建议或规定的疗法的顺从性。

[0091] “遵从”是指受试者顺从建议的疗法。

[0092] “建议的疗法”是指医学专家针对治疗、改善或预防疾病所建议的治疗。

[0093] 如本文所用的术语“血液”包括全血和血液级分，如血清和血浆。

[0094] “抗miR”是指具有与微小RNA互补的核碱基序列的寡核苷酸。在某些实施方案中，抗miR是修饰的寡核苷酸。

[0095] “抗miR-X”(其中“miR-X”表示特定微小RNA)是指具有与miR-X互补的核碱基序列的寡核苷酸。在某些实施方案中，抗miR-X与miR-X完全互补(即，100％互补)在某些实施方案中，抗miR-X与miR-X至少80％、至少85％、至少90％或至少95％互补。在某些实施方案中，抗miR-X是修饰的寡核苷酸。

[0096] “miR-17”是指具有核碱基序列CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG(SEQ ID NO:1)的成熟miRNA。

[0097] “miR-17茎环序列”是指具有核碱基序列GUCAGAAUAAUGUCAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGUGAUAUGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGCACUUGUAGCAUUAUGGUGAC(SEQ ID NO:2)的茎环序列。

[0098] “miR-17 2-7种子序列”是指从SEQ ID NO:1的2位至7位的核碱基序列，AAAGUG。

[0099] “miR-17家族成员”是指具有包含miR-17 2-7种子序列的核碱基序列的成熟miRNA。

[0100] “miR-17家族”是指各自具有包含miR-17 2-7种子序列的核碱基序列的一组miRNA。

[0101] “靶核酸”是指低聚化合物被设计与其进行杂交的核酸。

[0102] “靶向”是指将与靶核酸杂交的核碱基序列的设计和选择过程。

[0103] “对.....靶向”是指具有将允许与靶核酸杂交的核碱基序列。

[0104] “调节”是指干扰功能、量或活性。在某些实施方案中，调节是指功能、量或活性增加。在某些实施方案中，调节是指功能、量或活性减少。

[0105] “表达”是指基因的编码信息转变成存在于细胞中并且在细胞中起作用的结构所借助的任何功能和步骤。

[0106] “核碱基序列”是指无关任何糖、键联和/或核碱基修饰，典型地以5′至3′方向列出的低聚化合物或核酸中的连续核碱基的顺序。

[0107] “连续核碱基”是指在核酸中彼此紧邻的核碱基。

[0108] “核碱基互补性”是指两个核碱基经由氢键结非共价配对的能力。

[0109] “互补”是指一个核酸能够与另一个核酸或寡核苷酸杂交。在某些实施方案中，互补是指寡核苷酸能够与靶核酸杂交。

[0110] “完全互补”是指寡核苷酸的每个核碱基能够与靶核酸中的每个对应位置处的核碱基配对。在某些实施方案中，寡核苷酸与微小RNA完全互补，即，所述寡核苷酸的每个核碱

基与所述微小RNA中的对应位置处的核碱基互补。修饰的寡核苷酸可与微小RNA完全互补，并且具有小于微小RNA的长度的多个连接的核苷。例如，具有16个连接的核苷的寡核苷酸与微小RNA完全互补，其中寡核苷酸的每个核碱基与微小RNA中的对应位置处的核碱基互补。在某些实施方案中，每个核碱基与微小RNA茎环序列的区内的核碱基具有互补性的寡核苷酸与所述微小RNA茎环序列完全互补。

[0111] “互补性百分比”是指寡核苷酸中与靶核酸的等长部分互补的核碱基百分比。通过将所述寡核苷酸中与所述靶核酸中的对应位置处的核碱基互补的核碱基数除以所述寡核苷酸中的核碱基总数来计算互补性百分比。

[0112] “同一性百分比”是指第一核酸中与第二核酸中的对应位置处的核碱基相同的核碱基数除以所述第一核酸中的核碱基总数。在某些实施方案中，第一核酸是微小RNA并且第二核酸是微小RNA。在某些实施方案中，第一核酸是寡核苷酸并且第二核酸是寡核苷酸。

[0113] “杂交”是指通过核碱基互补性发生的互补核酸的退火。

[0114] “错配”是指第一核酸中不能够与第二核酸的对应位置处的核碱基发生沃森-克里克(Watson-Crick)配对的碱基。

[0115] 在核碱基序列背景下的“相同”是指无关糖、键联和/或核碱基修饰和无关存在的任何嘧啶的甲基状态，具有相同的核碱基序列。

[0116] “微小RNA”是指长度介于18与25个之间的核碱基的内源性非编码RNA，所述内源性非编码RNA是由酶Dicer裂解前体微小RNA的产物。成熟的微小RNA的实例可在称为miRBase(http://microrna.sanger.ac.uk/)的微小RNA数据库中找到。在某些实施方案中，微小RNA缩写为“微小RNA”或“miR”。

[0117] “前体微小RNA”或“前体miR”是指具有发夹结构的非编码RNA，所述非编码RNA是由称为Drosha的双链RNA特异性核糖核酸酶裂解前体miR的产物。

[0118] “茎环序列”是指具有发夹结构并且含有成熟微小RNA序列的RNA。前体微小RNA序列和茎环序列可重叠。茎环序列的实例可在称为miRBase(http://microrna.sanger.ac.uk/)的微小RNA数据库中找到。

[0119] “Pri-微小RNA”或“pri-miR”是指具有发夹结构的非编码RNA，所述非编码RNA是双链RNA特异性核糖核酸酶Drosha的底物。

[0120] “微小RNA前体”是指起源于基因组DNA并且包含含有一个或多个微小RNA序列的非编码结构RNA的转录物。例如，在某些实施方案中，微小RNA前体是前体微小RNA。在某些实施方案中，微小RNA前体是pri-微小RNA。

[0121] “微小RNA调控的转录物”是指由微小RNA调控的转录物。

[0122] “种子序列”是指包含成熟微小RNA序列的5’-末端的核碱基1至9的6至8个连续核碱基的核碱基序列。

[0123] “种子匹配序列”是指与种子序列互补并且长度与所述种子序列相同的核碱基序列。

[0124] “低聚化合物”是指包含多个连接的单体亚单元的化合物。低聚化合物包括寡核苷酸。

[0125] “寡核苷酸”是指包含多个连接的核苷的化合物，所述连接的核苷各自可彼此独立地是修饰或未修饰的。

[0126] “天然存在的核苷间键联”是指核苷之间的3′至5′磷酸二酯键联。

[0127] “天然糖”是指在DNA(2′-H)或RNA(2′-OH)中发现的糖。

[0128] “核苷间键联”是指相邻核苷之间的共价键联。

[0129] “连接的核苷”是指通过共价键联连接的核苷。

[0130] “核碱基”是指能够与另一个核碱基非共价配对的杂环部分。

[0131] “核苷”是指连接至糖部分的核碱基。

[0132] “核苷酸”是指具有共价连接至核苷的糖部分的磷酸酯基团的核苷。

[0133] “包含由许多连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸的化合物”是指包含具有指定数目的连接的核苷的修饰的寡核苷酸的化合物。因此,所述化合物可包含另外的取代基或缀合物。除非另外指明,否则所述化合物不包含除那些修饰的寡核苷酸以外的任何另外的核苷。例如,除非另外指明,否则包含修饰的寡核苷酸的化合物不包含与修饰的寡核苷酸杂交的互补链(即,修饰的寡核苷酸是单链修饰的寡核苷酸)。

[0134] “修饰的寡核苷酸”是指相对于天然存在的末端、糖、核碱基和/或核苷间键联具有一个或多个修饰的寡核苷酸。修饰的寡核苷酸可包含未修饰的核苷。

[0135] “单链修饰的寡核苷酸”是指不与互补链杂交的修饰的寡核苷酸。

[0136] “修饰的核苷”是指与天然存在的核苷相比具有任何变化的核苷。修饰的核苷可具有修饰的糖和未修饰的核碱基。修饰的核苷可具有修饰的糖和修饰的核碱基。修饰的核苷可具有天然糖和修饰的核碱基。在某些实施方案中,修饰的核苷是双环核苷。在某些实施方案中,修饰的核苷是非双环核苷。

[0137] “修饰的核苷间键联”是指与天然存在的核苷间键联相比的任何变化。

[0138] “硫代磷酸酯核苷间键联”是指其中非桥联原子之一是硫原子的核苷之间的键联。

[0139] “修饰的糖部分”是指与天然糖相比的取代和/或任何变化。

[0140] “未修饰的核碱基”是指RNA或DNA的天然存在的杂环碱基:嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G);以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)(包括5-甲基胞嘧啶)和尿嘧啶(U)。

[0141] “5-甲基胞嘧啶”是指包含连接至5位置的甲基的胞嘧啶。

[0142] “非甲基化的胞嘧啶”是指不具有连接至5位置的甲基的胞嘧啶。

[0143] “修饰的核碱基”是指不是未修饰的核碱基的任何核碱基。

[0144] “糖部分”是指天然存在的呋喃糖基或修饰的糖部分。

[0145] “修饰的糖部分”是指取代的糖部分或糖替代物。

[0146] “2′-O-甲基糖”或“2′-OMe糖”是指在2′位置处具有O-甲基修饰的糖。

[0147] “2′-O-甲氧基乙基糖”或“2′-MOE糖”是指在2′位置处具有O-甲氧基乙基修饰的糖。

[0148] “2′-氟”或“2′-F”是指具有2′位置的氟修饰的糖。

[0149] “双环糖部分”是指包含4至7元环的修饰的糖部分(包括但不限于呋喃糖基),所述修饰的糖部分包含连接所述4至7元环的两个原子的桥联以形成第二环,从而产生双环结构。在某些实施方案中,所述4至7元环是糖环。在某些实施方案中,所述4至7元环是呋喃糖基。在某些此类实施方案中,所述桥联连接呋喃糖基的2′-碳和4′-碳。非限制的示例性双环糖部分包括LNA、ENA、cEt、S-cEt和R-cEt。

[0150] “锁核酸(LNA)糖部分”是指在4′呋喃糖环原子与2′呋喃糖环原子之间包含(CH_2)-

O桥联的取代的糖部分。

[0151] “ENA糖部分”是指在4′呋喃糖环原子与2′呋喃糖环原子之间包含$(CH_2)_2$-O桥联的取代的糖部分。

[0152] “约束乙基(cEt)糖部分”是指在4′呋喃糖环原子与2′呋喃糖环原子之间包含CH(CH_3)-O桥联的取代的糖部分。在某些实施方案中,CH(CH_3)-O桥联被约束为S取向。在某些实施方案中,$(CH_2)_2$-O被约束为R取向。

[0153] “S-cEt糖部分”是指在4′呋喃糖环原子与2′呋喃糖环原子之间包含S-约束的CH(CH_3)-O桥联的取代的糖部分。

[0154] “R-cEt糖部分”是指在4′呋喃糖环原子与2′呋喃糖环原子之间包含R-约束的CH(CH_3)-O桥联的取代的糖部分。

[0155] “2′-O-甲基核苷”是指具有2′-O-甲基糖修饰的2′-修饰的核苷。

[0156] “2′-O-甲氧基乙基核苷”是指具有2′-O-甲氧基乙基糖修饰的2′-修饰核苷。2′-O-甲氧基乙基核苷可包含修饰的或未修饰的核碱基。

[0157] “2′-氟核苷”是指具有2′-氟糖修饰的2′-修饰的核苷。2′-氟核苷可包含修饰的或未修饰的核碱基。

[0158] “双环核苷”是指具有双环糖部分的2′-修饰的核苷。双环核苷可具有修饰的或未修饰的核碱基。

[0159] “cEt核苷”是指包含cEt糖部分的核苷。cEt核苷可包含修饰的或未修饰的核碱基。

[0160] “S-cEt核苷”是指包含S-cEt糖部分的核苷。

[0161] “R-cEt核苷”是指包含R-cEt糖部分的核苷。

[0162] “β-D-脱氧核糖核苷”是指天然存在的DNA核苷。

[0163] “β-D-核糖核苷”是指天然存在的RNA核苷。

[0164] “LNA核苷”是指包含LNA糖部分的核苷。

[0165] “ENA核苷”是指包含ENA糖部分的核苷。

[0166] 综述

[0167] 多囊肾病(PKD)是肾病的遗传形式,其中充满流体的囊肿在肾中发展,从而导致肾脏肿大、肾功能不全,并且通常导致终末期肾病。囊肿的过度增殖是PKD的标志性病理特征。在PKD的管理中,治疗的主要目标是维持肾功能并预防终末期肾病(ESRD)的发作,这进而提高PKD患者的预期寿命。

[0168] 微小RNA的miR-17至92簇的多个成员在PKD的小鼠模型中上调。PKD的小鼠模型中miR-17至92簇的遗传缺失减轻肾囊肿生长,改善肾功能并延长存活(Patel等人,PNAS,2013;110(26):10765-10770)。miR-17至92簇含有6种不同的微小RNA,各自具有不同的序列:miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19-b-1和miR-92a-1。因此,整个簇的遗传缺失缺失六种不同的微小RNA基因。这种遗传缺失实验没有证实的是,抑制所述簇中的微小RNA的子集是否将在PKD的临床标志物中产生相同的改善。

[0169] 本文证明,靶向miR-17的修饰的寡核苷酸在PKD的实验模型中改善肾功能并降低肾重量。此外,miR-17抑制还抑制源自人供体的囊肿的原代培养物的增殖和囊肿生长。这些数据表明靶向miR-17的修饰的寡核苷酸适用于治疗PKD。

[0170] 本发明的某些用途

[0171] 本文提供用于治疗多囊肾病(PKD)的方法,所述方法包括向患有或疑似患有PKD的受试者施用包含与miR-17互补的修饰的寡核苷酸的化合物。

[0172] 在某些实施方案中,所述受试者在施用包含修饰的寡核苷酸的化合物之前已被诊断患有PKD。PKD的诊断可通过评价参数(包括但不限于受试者的家族史、临床特征(包括但不限于高血压、白蛋白尿、血尿和GFR受损)和肾成像研究(包括但不限于MRI、超声和CT扫描)来实现。PKD的诊断还可包括筛选PKD1、PKD2或PKHD1基因中的一种或多种中的突变。

[0173] 患有或疑似患有ADPKD的受试者可具有PKD1基因中的突变或PKD2基因中的突变。患有或疑似患有ARPKD的受试者可具有PKHD1基因中的突变。

[0174] 在某些实施方案中,所述受试者具有增加的肾脏总体积。在某些实施方案中,所述肾脏总体积是高度经过调整的肾脏总体积(HtTKV)。在某些实施方案中,所述受试者患有高血压。在某些实施方案中,所述受试者的肾功能受损。在某些实施方案中,所述受试者需要改善的肾功能。在某些实施方案中,所述受试者被鉴定为肾功能受损。

[0175] 在某些实施方案中,miR-17的水平在患有PKD的受试者的肾中增加。在某些实施方案中,在施用之前,受试者被确定为在肾中具有增加的miR-17水平。可从肾活检材料测量miR-17水平。在某些实施方案中,在施用之前,受试者被确定为在受试者的尿液或血液中具有增加的miR-17水平。

[0176] 在某些实施方案中,施用包含与miR-17互补的修饰的寡核苷酸的化合物导致一种或多种临床上有益结果。在某些实施方案中,所述施用改善受试者的肾功能。在某些实施方案中,所述施用延迟受试者的肾功能的恶化。在某些实施方案中,所述施用减小受试者的肾脏总体积。在某些实施方案中,所述施用减缓受试者的肾脏总体积的增加。在某些实施方案中,所述施用减小高度经过调整的肾脏总体积(HtTKV)。在某些实施方案中,所述施用减缓HtTKV的增加。

[0177] 在某些实施方案中,所述施用抑制受试者的囊肿生长。在某些实施方案中,所述施用减缓受试者的囊肿生长的增加。在一些实施方案中,囊肿存在于受试者的肾中。在一些实施方案中,囊肿存在于受试者的肝和肾两者中。

[0178] 在某些实施方案中,所述施用减轻受试者的肾痛。在某些实施方案中,所述施用减缓受试者的肾痛的增加。在某些实施方案中,所述施用延迟受试者的肾痛的发作。

[0179] 在某些实施方案中,所述施用降低受试者的高血压。在某些实施方案中,所述施用减缓受试者的高血压的恶化。在某些实施方案中,所述施用延迟受试者的高血压的发作。

[0180] 在某些实施方案中,所述施用减轻受试者的肾的纤维化。在某些实施方案中,所述施用减缓受试者的肾的纤维化。

[0181] 在某些实施方案中,所述施用延迟受试者的终末期肾病的发作。在某些实施方案中,所述施用延迟受试者进行透析的时间。在某些实施方案中,所述施用延迟受试者进行肾移植的时间。在某些实施方案中,所述施用提高受试者的预期寿命。

[0182] 在某些实施方案中,所述施用减轻受试者的白蛋白尿。在某些实施方案中,所述施用减缓受试者的白蛋白尿的恶化。在某些实施方案中,所述施用延迟受试者的白蛋白尿的发作。在某些实施方案中,所述施用减轻受试者的血尿。在某些实施方案中,所述施用减缓受试者的血尿的恶化。在某些实施方案中,所述施用延迟受试者的血尿的发作。在某些实施方案中,所述施用降低受试者的血尿素氮。在某些实施方案中,所述施用降低受试者的血液

中的肌酸酐。在某些实施方案中，所述施用提高受试者的肌酸酐清除率。在某些实施方案中，所述施用降低受试者的白蛋白:肌酸酐比率。在某些实施方案中，所述施用提高受试者的肾小球滤过率。在某些实施方案中，所述施用减缓受试者的肾小球滤过率的恶化。在一些实施方案中，通过计算肾小球滤过率的下降速率来评定肾小球滤过率的恶化。在某些实施方案中，所述施用降低受试者的尿液中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)。在某些实施方案中，所述施用减少受试者的尿液中的肾损伤分子-1(KIM-1)蛋白。

[0183] 在本文提供的任何实施方案中，可使受试者经受某些测试以评价受试者的疾病的程度。此类测试包括但不限于测量受试者的肾脏总体积;测量受试者的高血压;测量受试者的肾痛;测量受试者的肾的纤维化;测量受试者的血尿素氮;测量受试者的血液中的肌酸酐;测量受试者的血液中的肌酸酐清除率;测量受试者的白蛋白尿;测量受试者的白蛋白:肌酸酐比率;测量受试者的肾小球滤过率;测量受试者的尿液中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL);和/或测量受试者的尿液中的肾损伤分子-1(KIM-1)蛋白。

[0184] 某些另外的疗法

[0185] 用于多囊肾病或本文列出的任何病状的治疗可包括多于一种疗法。如此，在某些实施方案中，本文提供用于治疗患有或疑似患有多囊肾病的受试者的方法，所述方法包括除了施用包含具有与miR-17互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸的化合物之外还施用至少一种疗法。

[0186] 在某些实施方案中，所述至少一种另外的疗法包含药剂。

[0187] 在某些实施方案中，所述至少一种另外的疗法是抗高血压剂。使用抗高血压剂来控制受试者的血压。

[0188] 在某些实施方案中，药剂是加压素受体2拮抗剂。在某些实施方案中，加压素受体2拮抗剂是托伐普坦。

[0189] 在某些实施方案中，药剂包括血管紧张素II受体阻断剂(ARB)。在某些实施方案中，血管紧张素II受体阻滞剂是坎地沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、氯沙坦、缬沙坦、替米沙坦或依普罗沙坦。在某些实施方案中，ARB以6.25至150mg/m2/天范围内的剂量施用。在任何这些实施方案中，ARB以6.25mg/m^2/天、10mg/m^2/天、12.5mg/m^2/天、18.75mg/m^2/天、37.5mg/m^2/天、50mg/m^2/天或150mg/m^2/天的剂量施用。

[0190] 在某些实施方案中，药剂包括血管紧张素II转化酶(ACE)抑制剂。在某些实施方案中，ACE抑制剂是卡托普利、依那普利、赖诺普利、贝那普利、喹那普利、福辛普利或雷米普利。在某些实施方案中，ACE抑制剂以0.5至1mg/m2/天、1至6mg/m2/天、1至2mg/m2/天、2至4mg/m2/天或4至8mg/m2/天范围内的剂量施用。

[0191] 在某些实施方案中，药剂是利尿剂。在某些实施方案中，药剂是钙通道阻滞剂。

[0192] 在某些实施方案中，药剂是激酶抑制剂。在某些实施方案中，激酶抑制剂是博舒替尼或KD019。

[0193] 在某些实施方案中，药剂是肾上腺素能受体拮抗剂。

[0194] 在某些实施方案中，药剂是醛固酮受体拮抗剂。在某些实施方案中，醛固酮受体拮抗剂是螺内酯。在某些实施方案中，螺内酯以每天10-35mg范围内的剂量施用。在某些实施方案中，螺内酯以每天25mg的剂量施用。

[0195] 在某些实施方案中，药剂是哺乳动物雷帕霉素(mTOR)靶蛋白抑制剂。在某些实施

方案中,mTOR抑制剂是依维莫司、雷帕霉素或西罗莫司。

[0196] 在某些实施方案中,药剂是激素类似物。在某些实施方案中,激素类似物是生长抑素或促肾上腺皮质激素。

[0197] 在某些实施方案中,另外的疗法是抗纤维化剂。在某些实施方案中,抗纤维化剂是与miR-21互补的修饰的寡核苷酸。

[0198] 在某些实施方案中,另外的疗法是透析。在某些实施方案中,另外的疗法是肾移植。

[0199] 在某些实施方案中,药剂包括抗炎剂。在某些实施方案中,抗炎剂是类固醇抗炎剂。在某些实施方案中,类固醇抗炎剂是皮质类固醇。在某些实施方案中,皮质类固醇是泼尼松。在某些实施方案中,抗炎剂是非类固醇抗炎药物。在某些实施方案中,非类固醇抗炎剂是布洛芬、COX-I抑制剂或COX-2抑制剂。

[0200] 在某些实施方案中,药剂是阻断对纤维发生信号的一种或多种反应的药剂。

[0201] 在某些实施方案中,另外的疗法可以是增强身体的免疫系统的药剂,包括低剂量环磷酰胺、胸腺刺激素、维生素和营养补充剂(例如,抗氧化剂,包括维生素A、维生素C、维生素E、β-胡萝卜素、锌、硒、谷胱甘肽、辅酶Q-10以及松果菊)以及疫苗,例如包含组合多聚体形式的抗原和佐剂的疫苗制剂的免疫刺激性复合物(ISCOM)。

[0202] 在某些实施方案中,选择另外的疗法来治疗或改善本发明的一种或多种药物组合物的副作用。此类副作用包括但不限于:注射部位反应、肝功能测试异常、肾功能异常、肝毒性、肾毒性、中枢神经系统异常以及肌病。例如,血清中的转氨酶水平升高可指示肝毒性或肝功能异常。例如,胆红素增加可指示肝毒性或肝功能异常。

[0203] 某些微小RNA核碱基序列

[0204] 本文所述的修饰的寡核苷酸具有与miR-17(SEQ ID NO:1)或其前体(SEQ ID NO:2)互补的核碱基序列。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的每个核碱基能够经受与miR-17或其前体的核碱基序列中的对应位置处的核碱基进行碱基配对。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的核碱基序列可相对于miR-17的核碱基序列或前体序列具有一个或多个错配的碱基对,并且仍能够与它的靶序列杂交。

[0205] 当miR-17序列被包含在miR-17前体序列内时,具有与miR-17互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸也与miR-17前体的区互补。

[0206] 在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸由许多连接的核苷组成,所述核苷等于miR-17的长度。

[0207] 在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的连接的核苷数小于miR-17的长度。具有小于miR-17的长度的许多连接的核苷的修饰的寡核苷酸(其中修饰的寡核苷酸的每个核碱基都与miR-17的对应位置处的每个核碱基互补)被认为具有与miR-17序列的区完全互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸。例如,由19个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸(其中每个核碱基与长度为22个核碱基的miR-17的对应位置互补)与miR-17的19个核碱基区完全互补。这种修饰的寡核苷酸与miR-17的19个核碱基区段100%互补(或完全互补),并被认为与miR-17100%互补(或完全互补)。

[0208] 在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸包含与种子序列互补的核碱基序列,即修饰的寡核苷酸包含种子匹配序列。在某些实施方案中,种子序列是六聚体种子序列。在某些此

类实施方案中，种子序列是miR-17的核碱基1-6。在某些此类实施方案中，种子序列是miR-17的核碱基2-7。在某些此类实施方案中，种子序列是miR-17的核碱基3-8。在某些实施方案中，种子序列是七聚体种子序列。在某些此类实施方案中，七聚体种子序列是miR-17的核碱基1-7。在某些此类实施方案中，七聚体种子序列是miR-17的核碱基2-8。在某些实施方案中，所述种子序列是八聚体种子序列。在某些此类实施方案中，八聚体种子序列是miR-17的核碱基1-8。在某些实施方案中，八聚体种子序列是miR-17的核碱基2-9。

[0209] miR-17是被称为miR-17家族的微小RNA家族的成员。miR-17家族包括miR-17、miR-20a、miR-20b、miR-93、miR-106a以及miR-106b。miR-17家族的每个成员具有包含核碱基序列5′-AAAGUG-3′或miR-17种子区的核碱基序列，所述miR-17种子区是SEQ ID NO:1的2至7位的核碱基序列。另外，miR-17家族的每个成员在种子区之外共享一些核碱基序列同一性。因此，与miR-17互补的修饰的寡核苷酸可靶向除miR-17之外的miR-17家族的微小RNA。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸靶向miR-17家族的两种或更多种微小RNA。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸靶向miR-17家族的三种或更多种微小RNA。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸靶向miR-17家族的四种或更多种微小RNA。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸靶向miR-17家族的五种或更多种微小RNA。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸靶向miR-17家族的六种微小RNA。

[0210] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-GCACTTTG-3′(SEQ ID NO:3)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-AGCACTTT-3′(SEQ ID NO:4)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-AGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:5)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-AAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:6)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-TAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:7)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-GTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:8)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-TGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:9)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-CTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:10)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-ACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:11)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-CACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:12)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-GCACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:13)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-TGCACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:14)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-CTGCACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:15)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-CCTGCACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:16)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-ACCTGCACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:17)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-CACCTGCACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:18)。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含核碱基序列5′-CTACCTGCACTGTAAGCACTTTG-3′(SEQ ID NO:19)。在这些实施方案中的任一个中，修饰的寡核苷酸由选自SEQ ID No 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17以及18中的任一个的核碱基序列组成。在每个核碱基序列中，T独立地选自T和U。

[0211] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸具有相对于miR-17或其前体的核碱基序列具有一个错配的核碱基序列。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸具有相对于miR-17或其前

体的核碱基序列具有两个错配的核碱基序列。在某些此类实施方案中，修饰的寡核苷酸具有相对于miR-17或其前体的核碱基序列具有不多于两个错配的核碱基序列。在某些此类实施方案中，错配的核碱基是连续的。在某些此类实施方案中，错配的核碱基是不连续的。

[0212] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸的连接的核苷数大于miR-17的长度。在某些此类实施方案中，另外的核苷的核碱基与miR-17茎环序列的核苷碱基互补。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸的连接的核苷数比miR-17的长度大1。在某些此类实施方案中，另外的核苷是在寡核苷酸的5′末端处。在某些此类实施方案中，另外的核苷是在寡核苷酸的3′末端处。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸的连接的核苷数比miR-17的长度大2。在某些此类实施方案中，两个另外的核苷是在寡核苷酸的5′末端处。在某些此类实施方案中，两个另外的核苷是在寡核苷酸的3′末端处。在某些此类实施方案中，一个另外的核苷位于寡核苷酸的5′末端，并且一个另外的核苷位于3′末端。在某些实施方案中，寡核苷酸的区可与miR-17的核碱基序列完全互补，但是整个修饰的寡核苷酸不与miR-17完全互补。例如，由24个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸(其中核苷1至22的核碱基各自与长度为22个核碱基的miR-17的相应位置互补)具有与miR-17的核碱基序列完全互补的22个核苷部分，并且具有与miR-17的核碱基序列大约92％的整体互补性。

[0213] 某些修饰的寡核苷酸

[0214] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由8至25个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由8至12个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由12至25个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由15至25个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由15至19个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由15至16个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由17至23个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由19至23个连接的核苷组成。

[0215] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由8个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由9个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由10个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由11个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由12个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由13个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由14个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由15个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由16个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由17个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由18个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由19个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由20个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由21个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由22个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由23个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由24个连接的核苷组成。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸由25个连接的核苷组成。

[0216] 在某些实施方案中，经修饰的寡核苷酸包含一个或多个5-甲基胞嘧啶。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸的每个胞嘧啶包含5-甲基胞嘧啶。

[0217] 某些修饰

[0218] 在某些实施方案中，本文提供的寡核苷酸可包含对核碱基、糖和/或核苷间键联的

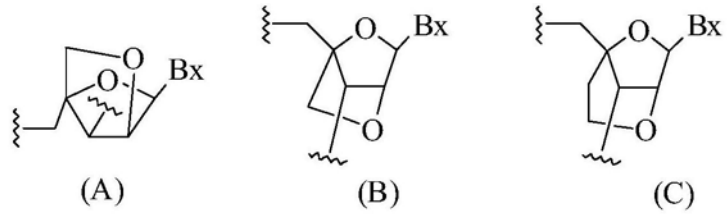
一个或多个修饰，并由此为修饰的寡核苷酸。修饰的核碱基、糖和/或核苷间键联可由于合乎需要的特性(例如像细胞摄取增强、对其他寡核苷酸或核酸靶标的亲和力增强以及在核酸酶存在下的稳定性增加)而优先于未修饰的形式被选择。

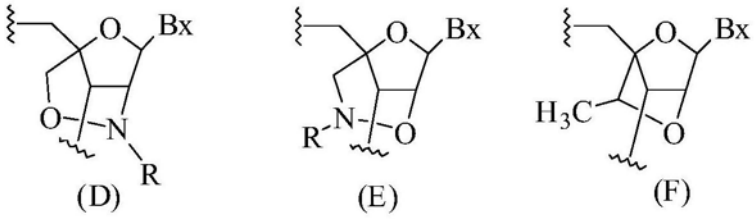
[0219] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含一个或多个修饰的核苷。在某些此类实施方案中，修饰的核苷是稳定化核苷。稳定化核苷的一个实例是糖修饰的核苷。

[0220] 在某些实施方案中，修饰的核苷是糖修饰的核苷。在某些此类实施方案中，糖修饰的核苷可进一步包含天然或修饰的杂环碱基部分和/或天然或修饰的核苷间键联，并且可包含与糖修饰无关的进一步修饰。在某些实施方案中，糖修饰的核苷是2′-修饰的核苷，其中糖环在来自天然核糖或2′-脱氧核糖的2′碳处修饰。

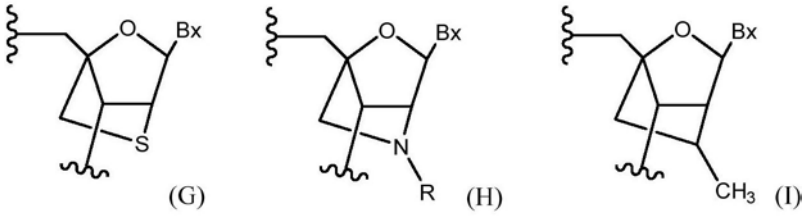
[0221] 在某些实施方案中，2′-修饰的核苷具有双环糖部分。在某些此类实施方案中，所述双环糖部分是呈α构型的D糖。在某些此类实施方案中，所述双环糖部分是呈β构型的D糖。在某些此类实施方案中，所述双环糖部分是呈α构型的L糖。在某些此类实施方案中，所述双环糖部分是呈β构型的L糖。

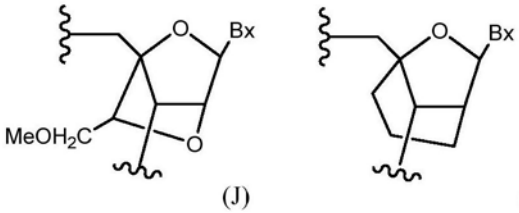
[0222] 包含此类双环糖部分的核苷被称为双环核苷或BNA。在某些实施方案中，双环核苷包括但不限于如下文所描绘的(A)α-L-亚甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)BNA；(B)β-D-亚甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)BNA；(C)亚乙基氧基(4′-$(CH_2)_2$-O-2′)BNA；(D)氨基氧基(4′-CH_2-O-N(R)-2′)BNA；(E)氧基氨基(4′-CH_2-N(R)-O-2′)BNA；(F)甲基(亚甲基氧基)(4′-CH(CH_3)-O-2′)BNA(又称为约束的乙基或cEt)；(G)亚甲基-硫代(4′-CH_2-S-2′)BNA；(H)亚甲基-氨基(4′-CH2-N(R)-2′)BNA；(I)甲基碳环(4′-CH_2-CH(CH_3)-2′)BNA；(J)c-MOE(4′-CH(CH_2-OMe)-O-2′)BNA以及(K)亚丙基碳环(4′-$(CH_2)_3$-2′)BNA。





[0223]





[0224] 其中Bx是核碱基部分，并且R独立地是H、保护基团或C_1-C_{12}烷基。

[0225] 在某些实施方案中，2′-修饰的核苷包含选自以下的2′-取代基：F、OCF_3、O-CH_3、$OCH_2CH_2OCH_3$、2′-O$(CH_2)_2SCH_3$、O-$(CH_2)_2$-O-N$(CH_3)_2$、--O$(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$以及O-$CH_2$-C(=O)-N(H)$CH_3$。

[0226] 在某些实施方案中，2′-修饰的核苷包含选自以下的2′-取代基：F、O-CH_3和$OCH_2CH_2OCH_3$。

[0227] 在某些实施方案中，糖修饰的核苷是4′-硫代修饰的核苷。在某些实施方案中，糖修饰的核苷是4′-硫代-2′-修饰的核苷。4′-硫代修饰的核苷具有β-D-核糖核苷，其中4′-O被4′-S置换。4′-硫代-2′-修饰的核苷是2′-OH被2′-取代基置换的4′-硫代修饰的核苷。适合的2′-取代基包括2′-OCH_3、′-O-$(CH_2)_2$-OCH_3和2′-F。

[0228] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含一个或多个核苷间修饰。在某些此类实施方案中，修饰的寡核苷酸的每个核苷间键联是修饰的核苷间键联。在某些实施方案中，修饰的核苷间键联包含磷原子。

[0229] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸的每个核苷间键联都是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0230] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸包含一个或多个修饰的核碱基。在某些实施方案中，修饰的核碱基是选自：5-羟基甲基胞嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤。在某些实施方案中，修饰的核碱基是选自：7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟苷、2-氨基吡啶以及2-吡啶

酮。在某些实施方案中，修饰的核碱基是选自：5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤，包括2氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。

[0231] 在某些实施方案中，修饰的核碱基包含多环杂环。在某些实施方案中，修饰的核碱基包含三环杂环。在某些实施方案中，修饰的核碱基包含吩嗪衍生物。在某些实施方案中，所述吩嗪可被进一步修饰以形成本领域中称为G-夹的核碱基。

[0232] 在某些实施方案中，修饰的寡核苷酸被缀合至一个或多个增强所产生的反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的部分。在某些此类实施方案中，所述部分是胆固醇部分。在某些实施方案中，所述部分是脂质部分。用于缀合的另外的部分包括碳水化合物、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、蒽醌、吖啶、荧光素、若丹明、香豆素和染料。在某些实施方案中，碳水化合物部分是N-乙酰基-D-半乳糖胺(GalNac)。在某些实施方案中，缀合基团直接连接至寡核苷酸。在某些实施方案中，缀合基团通过选自以下的连接部分而连接至修饰的寡核苷酸：氨基、羟基、羧酸、巯基、不饱和部分(例如，双或三键)、8-氨基-3,6-二氧杂辛酸(ADO)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、6-氨基己酸(AHEX或AHA)、取代的C1-C10烷基、取代的或未取代的C2-C10烯基以及取代的或未取代的C2-C10炔基。在某些此类实施方案中，取代基是选自羟基、氨基、烷氧基、羧基、苯甲基、苯基、硝基、巯基、硫代烷氧基、卤素、烷基、芳基、烯基以及炔基。

[0233] 在某些此类实施方案中，所述化合物包含具有一个或多个稳定化基团的修饰的寡核苷酸，所述一个或多个稳定化基团连接至修饰的寡核苷酸的一个或两个末端以增强例如像核酸酶稳定性的性质。稳定化基团中包括帽结构。这些末端修饰保护修饰的寡核苷酸免受核酸外切酶降解，并且可帮助递送和/或定位在细胞内。所述帽可存在于5′-末端(5′-帽)或3′-末端(3′-帽)，或可存在于两个末端上。帽结构包括例如反向脱氧无碱基帽。

[0234] 某些药物组合物

[0235] 本文提供药物组合物。在某些实施方案中，本文提供的药物组合物包含化合物，所述化合物包含由8至25个连接的核苷组成并具有与miR-17互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中，本文提供的药物组合物包含化合物，所述化合物由修饰的寡核苷酸组成，所述修饰的寡核苷酸由8至12个连接的核苷组成并具有与miR-17互补的核碱基序列。在某些实施方案中，本文提供的药物组合物包含化合物，所述化合物包含由15至25个连接的核苷组成并具有与miR-17互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中，本文提供的药物组合物包含化合物，所述化合物包含由17至23个连接的核苷组成并具有与miR-17互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸。

[0236] 合适的施用途径包括但不限于口腔、直肠、经粘膜、肠、肠内、局部、栓剂、通过吸入、鞘内、心脏内、心室内、腹膜内、鼻内、眼内、瘤内和胃肠外(例如静脉内、肌内、髓内和皮下)。在某些实施方案中，施用鞘内药物(pharmaceutical intrathecal)以实现局部暴露而非全身暴露。例如，可将药物组合物直接注射在所需作用的区域中(例如，到肾脏中)。

[0237] 在某些实施方案中，以剂量单位(例如，片剂、胶囊、大丸剂等)的形式施用药物组合物。在一些实施方案中，药物组合物包含选自以下的范围内的剂量的修饰的寡核苷酸：25mg至800mg、25mg至700mg、25mg至600mg、25mg至500mg、25mg至400mg、25mg至300mg、25mg至200mg、25mg至100mg、100mg至800mg、200mg至800mg、300mg至800mg、400mg至800mg、500mg至800mg、600mg至800mg、100mg至700mg、150mg至650mg、200mg至600mg、250mg至550mg、

300mg至500mg、300mg至400mg以及400mg至600mg。在某些实施方案中，此类药物组合物包含选自以下的剂量的修饰的寡核苷酸：25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、55mg、60mg、65mg、70mg、75mg、80mg、85mg、90mg、95mg、100mg、105mg、110mg、115mg、120mg、125mg、130mg、135mg、140mg、145mg、150mg、155mg、160mg、165mg、170mg、175mg、180mg、185mg、190mg、195mg、200mg、205mg、210mg、215mg、220mg、225mg、230mg、235mg、240mg、245mg、250mg、255mg、260mg、265mg、270mg、270mg、280mg、285mg、290mg、295mg、300mg、305mg、310mg、315mg、320mg、325mg、330mg、335mg、340mg、345mg、350mg、355mg、360mg、365mg、370mg、375mg、380mg、385mg、390mg、395mg、400mg、405mg、410mg、415mg、420mg、425mg、430mg、435mg、440mg、445mg、450mg、455mg、460mg、465mg、470mg、475mg、480mg、485mg、490mg、495mg、500mg、505mg、510mg、515mg、520mg、525mg、530mg、535mg、540mg、545mg、550mg、555mg、560mg、565mg、570mg、575mg、580mg、585mg、590mg、595mg、600mg、605mg、610mg、615mg、620mg、625mg、630mg、635mg、640mg、645mg、650mg、655mg、660mg、665mg、670mg、675mg、680mg、685mg、690mg、695mg、700mg、705mg、710mg、715mg、720mg、725mg、730mg、735mg、740mg、745mg、750mg、755mg、760mg、765mg、770mg、775mg、780mg、785mg、790mg、795mg以及800mg。在某些此类实施方案中，本发明的药物组合物包含选自以下的剂量的修饰的寡核苷酸：25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、500mg、600mg、700mg以及800mg。

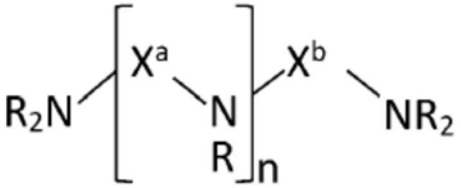
[0238] 某些实施方案中，药剂是无菌冻干的修饰的寡核苷酸，其用合适的稀释剂(例如，注射用无菌水或注射用无菌盐水)复原。在稀释到盐水中之后，复原的产品以皮下注射或静脉内输注形式施用。冻干药物产品由修饰的寡核苷酸组成，在制备过程中，在用酸或碱调节至pH7.0-9.0的注射用水或注射用盐水中制备所述修饰的寡核苷酸，然后将其冻干。冻干的修饰的寡核苷酸可以是25-800mg的寡核苷酸。应当理解，这涵盖了25mg、50mg、75mg、100mg、125mg、150mg、175mg、200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、425mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg以及800mg的修饰的冻干寡核苷酸。此外，在一些实施方案中，冻干的修饰的寡核苷酸是在选自以下的范围内的量的寡核苷酸：25mg至800mg、25mg至700mg、25mg至600mg、25mg至500mg、25mg至400mg、25mg至300mg、25mg至200mg、25mg至100mg、100mg至800mg、200mg至800mg、300mg至800mg、400mg至800mg、500mg至800mg、600mg至800mg、100mg至700mg、150mg至650mg、200mg至600mg、250mg至550mg、300mg至500mg、300mg至400mg以及400mg至600mg。冻干的药物产品可被包装在2mL I型(经硫酸铵处理的)透明玻璃小瓶中，用溴丁基橡胶塞塞住并且用铝FLIP-OFF®顶封件密封。

[0239] 在某些实施方案中，本文提供的药物组合物可另外含有通常存在于药物组合物中的其他辅助组分，其具有本领域中确定的使用量。因此，举例来说，所述组合物可包含另外的相容性药学活性材料，例如像，止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或消炎剂或可包含适用于物理配制本发明组合物的各种剂型的另外的材料，如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂以及稳定剂。然而，当添加此类材料时，它们不应当过度干扰本发明的组合物的组分的生物活性。可对制剂进行灭菌并且必要时与助剂例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色物质、芳香物质和/或芬芳物质等进行混合，所述助剂不与制剂中的寡核苷酸发生有害的相互作用。

[0240] 脂质部分已用于各种方法中的核酸疗法中。在一种方法中，核酸被引入到预形成的脂质体或由阳离子性脂质与中性脂质的混合物制成的脂质复合物中。在另一种方法中，在无中性脂质存在的情况下形成与单阳离子性脂质或聚阳离子性脂质的DNA复合物。在某些实施方案中，选择脂质部分以增加药剂至特定细胞或组织的分布。在某些实施方案中，选择脂质部分以增加药剂至脂肪组织的分布。在某些实施方案中，选择脂质部分以增加药剂至肌肉组织的分布。

[0241] 在某些实施方案中，使用INTRALIPID来制备包含寡核苷酸的药物组合物。英脱利匹特是制备用于静脉内施用的脂肪乳液。它由10％大豆油、1.2％蛋黄磷脂、2.25％甘油以及注射用水组成。另外，已经添加氢氧化钠来调节pH，以使得最终产品pH范围是6至8.9。

[0242] 在某些实施方案中，本文提供的药物组合物包含与核酸复合的多胺化合物或脂质部分。在某些实施方案中，此类制剂包含一种或多种各自单独地具有由式(Z)所定义的结构的化合物或其药学上可接受的盐，

[0243] 

[0244] 其中每个X^a和X^b在每次出现时独立地是C_{1-6}亚烷基；n是0、1、2、3、4或5；每个R独立地是H，其中制剂中的至少约80％的式(Z)化合物分子中的至少n+2个R部分不是H；m是1、2、3或4；Y是O、NR^2或S；R^1是烷基、烯基或炔基；其各自任选地被一个或多个取代基取代；并且R^2是H、烷基、烯基或炔基；其各自任选地被一个或多个取代基取代；条件是，如果n＝0，那么至少n+3个R部分不是H。此类制剂描述于PCT公布WO/2008/042973中，所述公布出于公开脂质制剂以引用的方式整体并入本文。某些另外的制剂描述于Akinc等人，Nature Biotechnology 26,561-569(2008年5月1日)中，所述文献出于公开脂质制剂以引用的方式整体并入本文。

[0245] 在某些实施方案中，本文提供的药物组合物包含一种或多种修饰的寡核苷酸和一种或多种赋形剂。在某些此类实施方案中，赋形剂是选自水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、淀粉酶、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素以及聚乙烯吡咯烷酮。

[0246] 在某些实施方案中，本文提供的药物组合物使用已知的技术，包括但不限于混合、溶解、制粒、制糖丸、粉碎、乳化、封装、包埋或压片工艺来制备。

[0247] 在某些实施方案中，本文提供的药物组合物是液体(例如，悬浮液、酏剂和/或溶液)。在某些此类实施方案中，液体药物组合物使用本领域中已知的成分，包括但不限于水、二醇、油、醇、调味剂、防腐剂以及着色剂来制备。

[0248] 在某些实施方案中，本文提供的药物组合物是固体(例如，粉末、片剂和/或胶囊)。在某些此类实施方案中，包含一种或多种寡核苷酸的固体药物组合物使用本领域中已知的成分，包括但不限于淀粉、糖、稀释剂、制粒剂、润滑剂、粘合剂以及崩解剂来制备。

[0249] 在某些实施方案中，本文提供的药物组合物制备为储库(depot)制剂。某些此类储库制剂典型地比非储库制剂作用更长。在某些实施方案中，此类制剂通过植入(例如，皮下或肌肉内)或通过肌肉内注射来施用。在某些实施方案中，储库制剂使用合适的聚合材料或疏水性材料(例如，可接受的油中的乳液)或离子交换树脂或作为微溶性衍生物(例如作为

微溶性盐)来制备。

[0250] 在某些实施方案中,本文提供的药物组合物包含递送系统。递送系统的实例包括但不限于脂质体和乳液。某些递送系统适用于制备某些药物组合物,包括包含疏水性化合物的那些。在某些实施方案中,使用了某些有机溶剂,如二甲亚砜。

[0251] 在某些实施方案中,本文提供的药物组合物包含一种或多种被设计用来将一种或多种本发明的药剂递送至特定组织或细胞类型的组织特异性递送分子。例如,在某些实施方案中,药物组合物包含涂覆有组织特异性抗体的脂质体。

[0252] 在某些实施方案中,本文提供的药物组合物包含持续释放系统。这种持续释放系统的一个非限制性实例是固体疏水性聚合物的半渗透基质。在某些实施方案中,持续释放系统可取决于它们的化学性质在数小时、数天、数周或数月的时间内释放药剂。

[0253] 在某些实施方案中,药物组合物被制备用于通过注射(例如,静脉内、皮下、肌肉内等)施用。在某些此类实施方案中,药物组合物包含载体并且被配制在水溶液中,如水或生理上相容的缓冲液如汉克斯溶液(Hanks's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水缓冲液。在某些实施方案中,包括其他成分(例如,帮助溶解或充当防腐剂的成分)。在某些实施方案中,使用适当的液体载体、悬浮剂等来制备可注射悬浮液。某些注射用药物组合物以单位剂型存在,例如在安瓿中或在多剂量容器中。某些注射用药物组合物是油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液,并且可包含配制剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。适合用于注射用药物组合物的某些溶剂包括但不限于:亲脂性溶剂和脂肪油,如芝麻油;合成脂肪酸酯,如油酸乙酯或甘油三酯;以及脂质体。水性注射悬浮液可包含增加悬浮液的粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,此类悬浮液还可包含合适的稳定剂或增加药剂溶解性以允许制备高浓度溶液的药剂。

[0254] 在某些实施方案中,本文提供的药物组合物包含治疗有效量的修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,治疗有效量足以预防、减轻或改善疾病的症状或延长正在治疗的受试者的存活。确定治疗有效量完全处于本领域技术人员的能力之内。

[0255] 在某些实施方案中,本文提供的一种或多种修饰的寡核苷酸被配制为前药。在某些实施方案中,当体内施用时,前药化学转化为寡核苷酸的生物学、药学或治疗学上更具活性的形式。在某些实施方案中,前药是有用的,因为它们比对应的活性形式更容易施用。例如,在某些情况下,前药可比对应的活性形式生物利用度更高(例如,通过口服施用)。在某些情况下,与对应的活性形式相比,前药可具有改进的溶解度。在某些实施方案中,前药比对应的活性形式的水溶性低。在某些情况下,此类前药具有优异的跨越细胞膜传输的能力,其中水溶性不利于迁移性。在某些实施方案中,前药是酯。在某些此类实施方案中,当施用时,所述酯被代谢水解成羧酸。在某些情况下,含有羧酸的化合物是对应的活性形式。在某些实施方案中,前药包含结合至酸基团的短肽(聚氨基酸)。在某些此类实施方案中,当施用时,所述肽裂解以形成对应的活性形式。

[0256] 在某些实施方案中,通过修饰药物活性化合物来产生前药,以使得所述活性化合物在体内施用时将再生。所述前药可被设计成改变药物的代谢稳定性或运输特征,掩蔽副作用或毒性,改进药物的香味或改变药物的其他特征或特性。凭借药效学过程和体内药物代谢的知识,本领域的技术人员一旦了解药学活性化合物,即可设计出化合物的前药(参见,例如,Nogrady(1985)Medicinal ChemistryA Biochemical Approach,Oxford

University Press,New York,第388-392页)。

[0257] 某些试剂盒

[0258] 本发明还提供了试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒包括包含修饰的寡核苷酸的本发明的一种或多种化合物,其中所述寡核苷酸的核碱基序列与miR-17的核碱基序列互补。所述化合物可具有本文所述的任何核苷模式。在一些实施方案中,所述化合物可存在于小瓶内。在例如分配包装中可存在多个小瓶,如10个。在一些实施方案中,小瓶经制造以便于注射器进入。所述试剂盒还可包括关于使用所述化合物的说明书。

[0259] 在一些实施方案中,所述试剂盒可用于向受试者施用所述化合物。在此类情况下,除了包含与miR-17互补的修饰的寡核苷酸的化合物以外,所述试剂盒可进一步包括以下中的一种或多种:注射器、酒精棉签、棉球和/或纱布垫。在一些实施方案中,所述化合物可存在于预填充注射器(如具有例如带针保护器的27号、1/2英寸针头的单次剂量注射器)中,而不是小瓶中。在例如分配包装中可存在多个预填充注射器,如10个。所述试剂盒还可包括施用包含与miR-17互补的修饰的寡核苷酸的化合物的说明书。

[0260] 某些实验模型

[0261] 在某些实施方案中,本发明提供在实验模型中使用和/或测试本发明的修饰的寡核苷酸的方法。本领域技术人员能够选择和修改用于此类实验模型的方案以评价本发明的药剂。

[0262] 一般来说,修饰的寡核苷酸首先在培养细胞中测试。合适的细胞类型包括与需要在体内向其递送修饰的寡核苷酸的细胞类型有关的细胞类型。例如,用于研究本文所述的方法的合适细胞类型包括原代细胞或培养的细胞。

[0263] 在某些实施方案中,在培养的细胞中评定修饰的寡核苷酸干扰miR-17的活性的程度。在某些实施方案中,可通过测量微小RNA的水平来评定微小RNA活性的抑制。可替代地,可测量经预测或经验证的微小RNA调控的转录物的水平。微小RNA活性的抑制可导致miR-17调控的转录物和/或由miR-17调控的转录物编码的蛋白质增加。此外,在某些实施方案中,可测量某些表型结果。

[0264] 本领域的技术人员可使用若干动物模型来研究人疾病模型中的miR-17。多囊肾病的模型包括但不限于具有Pkd1和/或Pkd2中的突变和/或缺失的模型;和包含其他基因中的突变的模型。包含Pkd1和/或Pkd2中的突变和/或缺失的PKD的非限制性示例性模型包括亚效等位基因模型,如包含Pkd1中的错义突变的模型和Pkd2的表达降低或不稳定的模型;诱导型条件敲除模型;以及有条件的敲除模型。包含除Pkd1和Pkd2以外的基因中的突变的非限制性示例性PKD模型包括具有Pkhd1、Nek8、Kif3a和/或Nphp3中的突变的模型。PKD模型综述于例如Shibazaki等人,Human Mol.Genet.,2008;17(11):1505-1516;Happe和Peters,Nat Rev Nephrol.,2014;10(10):587-601;以及Patel等人,PNAS,2013;110(26):10765-10770中。

[0265] 某些定量测定

[0266] 在某些实施方案中,在体外或体内细胞或组织中定量微小RNA水平。在某些实施方案中,通过微阵列分析来测量微小RNA水平的变化。在某些实施方案中,微小RNA水平的变化通过若干可商购的PCR测定中的一种,如TaqMan®微小RNA测定(Applied Biosystems)来测量。

[0267] 可通过mRNA的微阵列谱分析来评定用抗miR或微小RNA模拟物对微小RNA活性的调节。针对微小RNA种子序列搜索通过抗miR或微小RNA模拟物调节(增加或减少)的mRNA的序列,以比较为微小RNA的靶标的mRNA的调节与不为微小RNA的靶标的mRNA的调节。以此方式,可评估抗miR与miR-17或miR-17模拟物与其靶标的相互作用。在抗miR的情况下,筛选表达水平增加的mRNA的mRNA序列,所述mRNA序列包含与抗-miR互补的微小RNA的种子匹配。

[0268] 用抗miR-17化合物调节微小RNA活性可通过测量miR-17的mRNA靶标的水平(通过测量mRNA本身抑或从其转录的蛋白质的水平)来评定。微小RNA的反义抑制通常导致微小RNA的mRNA靶标的mRNA和/或蛋白质水平的增加。

实施例

[0269] 提出以下实施例以便更完全地说明本发明的一些实施方案。然而,所述实施例决不应当解释为限制本发明的广泛范围。本领域的普通技术人员将易于在不背离本发明的精神的情况下,采用本发现的基本原理来设计各种化合物。

[0270] 实施例1:多囊肾病的模型中的抗miR-17

[0271] Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠自发地发展多囊肾病,并被用作ADPKD的模型。参见Patel等人,PNAS,2013;110(26):10765-10770。

[0272] 在ADPKD的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠模型中测试了与miR-17互补的修饰的寡核苷酸(抗miR-17化合物)。使用野生型小鼠作为对照小鼠。互补于与miR-17无关的miRNA的寡核苷酸用作特异性的治疗对照(抗miR-对照)。抗miR-17化合物是完全硫代磷酸酯化的长度为19个连接的核苷的寡核苷酸(5'-CTGCACTGTAAGCACTTTG-3';SEQ ID NO:15),其具有DNA、2′-MOE和S-cEt糖部分。

[0273] 从10日龄至12日龄,用抗miR-17(20mg/kg)或PBS处理小鼠的性别匹配的同窝出生小鼠,总共三次每日剂量。在19日龄时,用第四剂量的抗miR-17(20mg/kg)或PBS处理小鼠。皮下施用抗miR-17。(1)Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠,PBS施用,n=8;(2)Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠,抗miR-对照施用,n=8;(3)Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠,抗miR-17施用,n=8。将小鼠在28天时处死,并且测量肾重量、囊肿指数、肾功能和肾标志物。通过韦尔奇氏t检验(Welch's t-test)计算统计学显著性。

[0274] 用抗miR-17处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠中肾重量与体重的平均比率比施用抗miR对照或仅PBS的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠中肾重量与体重的平均比率低17%(p=0.017)。与施用抗miR对照或PBS的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠相比,用抗miR-17处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠显示出囊肿指数的平均6%降低,但差异不是统计上显著的(p=0.072)。囊肿指数是相对于总肾区域的囊性区域的组织学测量。用抗miR-17处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠中的平均血清肌酸酐水平比施用抗miR对照或PBS的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠低25%,但是结果不是统计上显著的(p=0.069)。Kiml表达在用抗miR-17处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠中相对于用抗miR对照或PBS处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠降低33%(p=0.024),并且Ngal表达在用抗miR-17处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠中相对于用抗miR对照或PBS处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠降低36%(p=0.028)。最后,血尿素氮(BUN)水平在用抗miR-17处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠中相对于用抗miR对照或PBS处理的Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠降低20%(p=0.006)。BUN是肾功能的血液标志物。较高的BUN与较差的肾功能相关。BUN的减少

是肾损伤和损害减少和功能改善的指标。

[0275] 这些结果证明,抗miR-17处理导致Pkhd1/cre;Pkd2$^{F/F}$小鼠在主要治疗终点肾脏体积方面的阳性结果。抗miR-17治疗还显著减少Pkhd1/cre;Pkd2$^{F/F}$小鼠中的BUN和肾损伤mRNA生物标志物Kiml和Ngal的表达。最后,抗miR-17治疗导致Pkhd1/cre;Pkd2$^{F/F}$小鼠中朝向血清肌酸酐降低和囊肿指数降低的趋势。这些结果在抗miR对照的情况下未观察到,从而表明它们由于miR-17抑制而是特异性的。

[0276] 实施例3:Pkhd1/cre;Pkd2$^{F/F}$小鼠的肾中的抗miR分布

[0277] 已知寡核苷酸(包括抗miR化合物)分布至肾内的几种细胞类型。如Chau等人,Sci Transl Med.,2012,121ra18所报道,在将Cy3标记的抗miR施用至正常小鼠或经受肾损伤的小鼠(单侧输尿管梗阻,间质纤维化的模型)后,肾中的最大荧光强度是在近端小管上皮中。内皮、周细胞、肌成纤维细胞以及巨噬细胞也都含有可检测量的Cy3标记的抗miR。然而,肾小球(特别是足细胞)似乎没有吸收与化学修饰的寡核苷酸的已知分布一致的显著量的抗miR(Masarjian等人,Oligonucleotides,2004,14,299-310)。

[0278] 为了研究多囊肾病的小鼠模型中抗miR的分布,将抗miR-17化合物施用至两组不同的Pkhd1/cre;Pkd2$^{F/F}$小鼠,其中一组在10日龄开始(n=4;考虑为囊前)并且一组在21日龄开始(n=4;视为囊性);并且施用至一组在21日龄开始的野生型小鼠(n=4)。在每组中,化合物以20mg/kg每天施用三个剂量。在最后一个剂量三天后将小鼠处死,并且收集肾脏并处理用于组织学分析。使用识别硫代磷酸酯化寡核苷酸的抗体检测抗miR-17。

[0279] 将肾脏组织的切片用作为抗miR-17化合物的标志物的识别硫代磷酸酯化寡核苷酸的抗体或作为集合管的标志物的双花扁豆凝集素(DBA)进行染色。在所有组中,大部分染色集合管外部发现,可能在近端小管上皮中。即使在许多囊肿已经在肾脏中形成后施用,抗miR-17也被递送至集合管囊肿。与正常集合管相比,集合管中的染色似乎在囊肿中更大,从而表明化合物的递送可随着疾病状态而增加。

[0280] 为了确认功能性递送,使用RT-qPCR来测量由抗let-7化合物诱导的基因表达变化。一组36种let-7靶基因显示施用抗let-7的Pkhd1/cre;Pkd2$^{F/F}$小鼠以及野生型小鼠的囊前和囊性肾脏两者中表达的显著增加。

[0281] 这些结果证明抗miR化合物可成功地递送至囊性肾脏以抑制miRNA。

[0282] 实施例3:miR-17家族成员的抑制

[0283] 许多微小RNA共享种子序列同一性,且因此是微小RNA家族的成员。由于微小RNA的种子区域是靶标特异性的决定因素,所以微小RNA家族成员通常调控类似组的信使RNA靶标。在种子区域之外,微小RNA家族成员共享不同程度的序列同一性。

[0284] 一种这样的家族是miR-17家族,其包括miR-17、miR-20a、miR-20b、miR-93、miR-106a和miR-106b。此微小RNA家族的各个微小RNA位于三个不同的微小RNA簇内的三个不同的染色体上。miR-17和miR-20a位于人染色体13上的miR-17至92簇内;miR-20b和miR-106a位于人X染色体上的miR-106a至363簇内,并且miR-93和miR-106b位于人染色体7上的miR-106b至25簇内(图1A)。这三个簇各自含有不是miR-17家族成员的其他微校RNA,且因此不包含miR-17 2-7种子序列。然而,这些微小RNA是其他miR家族的成员,如图1B中所示。miR-17家族成员在图1B中示出,其中miR-17 2-7种子序列呈粗体文本。miR-18家族成员(miR-18a和miR-18b)的种子序列相对于miR-17 2-7种子序列含有一个核碱基差异,但是在种子区域

之外,序列是不相似的。

[0285] 由于微小RNA家族成员之间的序列同一性,并且因为与微小RNA序列具有少于100%互补性的修饰的寡核苷酸仍然可抑制所述微小RNA的活性,所以具有与所述家族的第一成员的核碱基序列100%互补并且与所述家族的一个或多个其他成员少于100%互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸除了抑制微小RNA家族的第一成员的活性外,还可抑制所述家族的那些一个或多个其他成员。例如,具有与miR-17(5′-CTGCACTGTAAGCACTTTG-3′;SEQ ID NO:15)100%互补并且与miR-17家族的其他成员(表1)少于100%互补性的核苷碱基序列的修饰的寡核苷酸预期抑制miR-17家族的那些其他成员。

[0286] 表1:抗miR-17与miR-17家族的成员的互补性%

[0287]

微小 RNA	序列(5'至3') miR-17 2-7种子呈粗体	互补核碱基的 #	互补性%	SEQ ID NO:
miR-17	C**AAAGUG**CUUACAG UGCAGGUAG	19	100%	1
miR-20a	U**AAAGUG**CUUAUAG UGCAGGUAG	17	89.5%	21
miR-20b	C**AAAGUG**CUCAUAG UGCAGGUAG	17	89.5%	22
miR-93	C**AAAGUG**CUGUUCG UGCAGGUAG	14	73.7%	23
miR-106a	A**AAAGUG**CUUACAG UGCAGGUAG	17	89.5%	24
miR-106b	U**AAAGUG**CUGACAG UGCAGAU	16	84.2%	25

[0288] 为了测试对miR-17家族成员的抑制,使用荧光素酶报道基因测定。构建了针对miR-17、miR-20a、miR-20b、miR-93以及miR-106b中的每个的荧光素酶报道质粒,所述质粒具有荧光素酶基因的3′-UTR中的完全互补的微小RNA结合位点。对于每种微小RNA,用微小RNA模拟物及其同源荧光素酶报道基因转染HeLa细胞,然后用抗miR-17转染。miR-17、miR-20a、miR-20b、miR-93和miR-106b各自被抗miR-17化合物抑制,从而表明即使在抗miR-17序列与微小RNA序列之间存在错配时,抗miR-17化合物也抑制miR-17家族的多个成员。

[0289] 单独的测定(微小RNA多核糖体迁移测定(miPSA))证实抗miR-17化合物直接与miR-17家族的三个成员miR-17、miR-20b和miR-106a接合(Androsavich等人,Nucleic

Acids Research,2015,44:e13)。miPSA依赖于以下原理:活性miRNA在翻译活性高分子量(HMW)多核糖体中与其mRNA靶标结合,而受抑制的miRNA存在于低MW(LMW)多核糖体中。用抗miR处理导致微小RNA从HMW多核糖体迁移至LMW多核糖体。因此,miPSA通过互补抗miR提供微小RNA靶标接合的直接测量。Androsavich等人进一步证实,另一方面,非miR-17家族miRNA相比之下无反应,但有一个例外:miR-18a出人意料地在较高剂量下显示出强烈的交叉反应性(其可通过仅具有单核苷酸A/G差异的miR-17和miR-18种子序列解释(图1)。

[0290] 因此,即使在抗miR-17序列与微小RNA序列之间存在错配的情况下,用抗miR-17化合物处理也抑制miR-17家族的所有成员。

[0291] 实施例4:人ADPKD囊肿中的miR-17抑制

[0292] 在源自人ADPKD囊肿的原代培养物中研究miR-17抑制的作用。由堪萨斯大学医学中心(KUMC)的PKD研究生物材料和细胞模型核心提供冷冻的人原代ADPKD细胞。如先前所述(Yamaguchi等人,Am JPhysiol Renal Physiol,2010,299:F944-951),使人原代ADPKD细胞在补充有5%FBS、5ug/ml胰岛素、5ug/ml转铁蛋白和5ng/ml亚硒酸钠(ITS)(Lonza)的DMEM:F12培养基(Gibco)中生长。

[0293] 增殖测定

[0294] 在80%汇合时,将人ADPKD细胞使用在不含Ca^{+2}和Mg^{+2}的PBS中1:10稀释的胰蛋白酶进行胰蛋白酶化。将细胞用RNAiMAX(Life Technologies)按照制造商的方案以2500个细胞/孔的密度在96孔板中转染。处理如下:

[0295] • 抗miR-17(以3nM、10nM或30nM的剂量;对于每种处理n=5)

[0296] • 对照寡核苷酸(以表3中所示的剂量;对于每种处理n=5)。为了改变对照处理,使用两个不同的对照组。对于源自供体1-4、3或5的培养物,测试对照寡核苷酸,各自以30nM的单一剂量。对于源自供体5的细胞,以三种不同的剂量测试单个对照寡核苷酸。

[0297] • 用RNAiMAX模拟转染(n=5)

[0298] • PBS(n=5)

[0299] 按照制造商的方案在第三天使用MTT测定(Promega)来测量细胞活力。结果在表2中示出。将每个抗miR-17处理组或对照寡核苷酸处理组的平均值标准化至模拟处理组的平均值。示出平均值的标准误差。使用用于成对比较或方差分析(ANOVA)的学生t检验、随后用于多重比较的杜凯氏事后检验进行统计学分析。P值如下:*表示P<0.05,**表示P<0.01,***表示P<0.005,并且****表示P<0.001。对于抗miR-17处理,P值表示相对于模拟处理的显著性。对于对照寡核苷酸处理,示出两个不同的P值,一个表示相对于模拟处理的显著性(表2中的P值1),另一个表示相对于抗miR-1730nM处理的显著性(表2中的P值2)。N.t.表示未测试。

[0300] 相对于模拟转染处理,用抗miR-17处理产生囊肿上皮细胞增殖的剂量依赖性降低。与用抗miR-17处理不同,大多数对照寡核苷酸处理不能一致地使增殖降低统计上显著的量。

[0301] 作为实例,相对于模拟转染,用30nM抗miR-17处理来自供体1的囊肿上皮培养物使细胞增殖降低47%(P<0.0001),而用对照寡核苷酸处理不能使细胞增殖降低统计上显著的量。此外,对于来自同一供体的囊肿上皮培养物,抗miR-1730nM处理与三种对照处理中的每一种的比较也揭示通过抗miR-17处理,细胞增殖的统计上显著的降低(P<0.0001)。

[0302] 表2:囊肿上皮细胞的增殖

平均值/供体	处理									
	PBS	模拟	抗 miR-17			对照寡核苷酸				
			3 nM	10 nM	30 nM	#1 30 nM	#2 30 nM	#3 30 nM	#4 30 nM	#5 30 nM
供体 1 平均值	1.94	1.00	0.98	0.89	0.53	1.09	0.94	1.15	n.t.	n.t.
SEM	0.03	0.05	0.03	0.02	0.01	0.04	0.06	0.04		
p 值 1			ns	ns	****	ns	ns	ns		
p 值 2						****	****	****		
供体 2 平均值	1.00	1.00	1.00	0.94	0.78	0.97	0.91	0.83	0.64	0.97
SEM	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.05	0.04	0.01
p 值 1			ns	ns	***	ns	ns	*	****	ns
p 值 2						**	ns	ns	ns	**
供体 3 平均值	1.01	1.00	0.65	0.58	0.27	0.59	0.68	0.63	0.23	0.63
SEM	0.03	0.02	0.04	0.02	0.06	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04
p 值 1			****	****	****	****	****	****	****	****
p 值 2						****	****	****	ns	****
供体 4 平均值	1.36	1.00	0.75	0.62	0.17	0.74	0.67	0.57	0.40	0.29
SEM	0.05	0.07	0.03	0.05	0.01	0.04	0.03	0.02	0.02	0.02
p 值 1			**	****	****	***	****	****	****	****
p 值 2						****	****	****	**	ns

[0303]

	处理									
平均值/供体	PBS	模拟	抗 miR-17			对照寡核苷酸				
			3 nM	10 nM	30 nM	# 1 3 nM	#1 10 nM	#1 30 nM		
供体 5 平均值	1.00	0.99	0.89	0.64	0.42	1.11	0.92	0.88		
SEM	0.09	0.10	0.06	0.06	0.04	0.12	0.07	0.05		

[0304]

p值1			ns	ns	***	ns	ns	ns		
p值2						****	**	**		

[0305] 体外囊肿形成

[0306] 将人原代ADPKD细胞生长至80％汇合，并在不含Ca^{+2}和Mg^{+2}的PBS中使用1:10稀释的胰蛋白酶进行胰蛋白酶化。在第一天，使用RNAiMAX以六孔板格式转染细胞。处理组是如下：

[0307] • 1nM、5nM或20nM剂量下的抗miR-17(对于每种剂量n＝3)

[0308] • 五种对照寡核苷酸，各自在20nM的剂量下(对于每种对照寡核苷酸n＝3)

[0309] • 用RNAiMAX模拟转染(n＝3)

[0310] • PBS

[0311] 在转染24小时后，将细胞胰蛋白酶化为单细胞悬浮液，计数并以4000个细胞/孔密度在96孔板中接种于4:5的比例的130μl培养基加基质胶中。在基质胶凝固后，将完全生长培养基添加至孔中。每72小时补充培养基，直到接种后8天，此时测量囊肿的大小和数量。

[0312] 使用Olympus D8光学显微镜检查每个孔的囊肿增殖。用Olympus DP26照相机(Olympus Corporation)从相距150μm直至孔中的28个焦平面(在z轴上)将图像记录为二十八个在72dpi下的2448×1920像素的24位彩色TIFF图像。使用定制R脚本(R核心团队2015R：A language and environment for statistical computing.R Foundationfor Statistical Computing,Vienna,Austria,found at www.R-project.org.)处理来自每个孔的每个焦平面的图像，所述脚本使用EBImage Bioconductor软件包15。此脚本以自动和可重复的方式检测囊肿，并应用于所有供体的所有基质胶测定。简言之，每个图像都被伪影掩蔽，通过高通拉普拉斯滤波器进行滤波，并用自适应阈值进行分割。将分割图像中的检测到的对象通过像素扩张、填孔和像素侵蚀进一步处理。收集关于每个分割对象的大小、半径和偏心率统计资料。如果物体的平均半径小于或等于15像素、或平均物体半径大于200像素、或半径的变化系数大于0.2或者如果检测到的对象的偏心率大于0.75，则过滤掉所述对象。由于囊肿常常大于焦平面之间的距离，所以避免了多次计数此类囊肿。如果一个图像中的囊肿对象落在相邻图像的相同x和y坐标内(例如，z轴上方的一个焦平面)，则将其计数为相同的囊肿。每个孔中的所有图像都以这种方式在z轴上顺序处理。最后，假设每个囊肿均是球体，则通过将最大对象的平均半径乘以$4/3\pi r^3$来估计每个囊肿的体积。

[0313] 结果在表3中示出。将每个抗miR-17处理组或对照寡核苷酸处理组的平均值标准化至模拟处理组的平均值。示出平均值的标准误差。使用用于成对比较或方差分析(ANOVA)的学生t检验、随后用于多重比较的杜凯氏事后检验进行统计学分析。P值如下：*表示P＜0.05，**表示P＜0.01，***表示P＜0.005，并且****表示P＜0.001。对于抗miR-17处理，P值表示相对于模拟处理的显著性。对于对照寡核苷酸处理，示出两个不同的P值，一个表示相对于模拟处理的显著性(表3中的P值1)，另一个表示相对于抗miR-1730nM处理的显著性(表3中的P值2)。

[0314] 相对于模拟转染处理，用抗miR-17处理产生囊肿计数的剂量依赖性降低。与用抗miR-17处理不同，大多数对照寡核苷酸处理不能一致地使囊肿计数降低统计上显著的量。

[0315] 作为实例，相对于模拟转染，用30nM抗miR-17处理来自供体3的囊肿上皮培养物使

细胞增殖降低63％(P＜0.0001)，而用对照寡核苷酸处理不能一致地使囊肿计数降低统计上显著的量。此外，对于来自同一供体的囊肿计数，抗miR-1730nM处理与三种对照处理中的每一种的比较也揭示通过抗miR-17处理，细胞增殖的统计上显著的降低(P＜0.0001)。

[0316] 表3:囊肿计数

[0317]

平均囊肿计数/供体	处理									
	PBS	模拟	抗 miR-17			对照寡核苷酸				
			1 nM	5 nM	20 nM	#1 30 nM	#2 30 nM	#3 30 nM	#4 30 nM	#5 30 nM
供体 3 平均值	0.85	1.00	0.86	0.65	0.37	0.79	1.11	0.90	0.53	0.86
SEM	0.04	0.02	0.04	0.03	0.05	0.05	0.02	0.06	0.03	0.05
p 值 1			ns	***	****	*	ns	ns	****	ns
p 值 2						****	****	****	ns	****
供体 4 平均值	1.22	1.00	0.69	0.46	0.24	1.08	1.02	0.88	0.44	0.75
SEM	0.04	0.07	0.01	0.06	0.03	0.06	0.09	0.07	0.05	0.04
p 值 1			*	****	****	ns	ns	ns	****	ns
p 值 2						****	****	****	ns	***

[0318] 这些数据证明用抗miR-17处理抑制源自人ADPKD患者的囊肿的增殖。

[0319] 实施例5:PKD的Pcy模型中的抗miR-17

[0320] 携带Nphp3中的突变的Pcy小鼠自发地发展多囊肾病，其中疾病进展比在Pkhd1/cre;$Pkd2^{F/F}$小鼠中观察到的慢。Pcy模型被用作人PKD的模型，以及肾结核/髓质囊性肾病(NPH/MCD)复合体的模型。在Pcy小鼠模型中对与miR-17互补的修饰的寡核苷酸(抗miR-17化合物)进行了测试。使用野生型小鼠作为对照小鼠。互补于与miR-17无关的miRNA的寡核苷酸用作特异性的治疗对照(抗miR-对照)。抗miR-17化合物是完全硫代磷酸酯化的长度为19个连接的核苷的寡核苷酸(5'-CTGCACTGTAAGCACTTTG-3';SEQ ID NO:15)，其具有DNA、2′-MOE和S-cEt糖部分。

[0321] Pcy小鼠(CD1-pcylusm)获自PreClinOmic。从四周龄起，将Pcy小鼠每周用抗miR-17(50mg/kg经由皮下注射)或PBS处理一次，共计26个剂量。抗miR-17组含有12只小鼠，并且PBS对照组含有11只小鼠。

[0322] 另一个对照组包括从Charles River实验室获得的年龄匹配的CD1小鼠。将CD1小鼠皮下注射PBS每周一次，总计26周。

[0323] 在26周处理期结束时，处死小鼠，并且提取一个肾并称重，且另一只肾进行处理以用于组织学分析。测量血尿素氮(BUN)和血清肌酸酐。

[0324] 对于组织学分析，用冷PBS和4％(wt/vol)多聚甲醛灌注一个肾，且然后收获。将肾

脏用4％多聚甲醛固定2小时，且然后包埋在石蜡中以用于切片。将肾脏的矢状切片用苏木精和曙红(H&E)进行染色。所有的图像处理步骤都是自动化的，并且发生在自由获得且开源软件中：使用来自EBImage Bioconductor软件包2和ImageMagick3图像处理工具套件中的功能的R1脚本。将Aperio SVS格式的肾脏H&E图像转换为TIFF图像，并保留第一帧以用于图像分析。首先，使用图像分割计算总肾切片面积。图像分割类似地用于发现所有内部结构，包括肾囊肿。施加滤波器以去除小于三个像素的平均半径的所有对象。囊性指数是与囊肿相关的图像面积除以总肾面积。分别计算每个个体动物的纵向和横向肾切片的囊性指数。比较每个处理组的个体动物的组合囊性指数。

[0325] 来自PBS处理的CD1小鼠的结果用于为非疾病模型中的每个参数(肾重量/体重比、囊性指数、血尿素氮和血清肌酸酐)提供基准。如所预期，处理的CD1小鼠未表现出与PKD相关的任何病理学。

[0326] 用抗miR-17处理的Pcy小鼠的肾重量与体重的平均比率比仅施用PBS的Pcy小鼠的肾重量与体重的平均比率低19％(p＝0.0003)(图2A)。与仅施用PBS的Pcy小鼠相比，用抗miR-17处理的Pcy小鼠显示囊肿指数的平均28％降低(p＝0.008)(图2B)。未观察到BUN或血清肌酸酐的显著变化。示出按照Dunnett多重比较校正的单向ANOVA分析的P值。

[0327] 这些数据表明，在另一种PKD模型中，用抗miR-17处理导致肾重量和囊肿指数的降低。

[0328] 综上所述，本申请包括但不限于以下各项：

[0329] 1.一种治疗多囊肾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用包含由8至25个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸的化合物，其中所述修饰的寡核苷酸的核碱基序列与miR-17互补。

[0330] 2.如项1所述的方法，其中所述受试者患有多囊肾病。

[0331] 3.如项1所述的方法，其中所述受试者疑似患有多囊肾病。

[0332] 4.如项1所述的方法，其中所述受试者在施用所述修饰的寡核苷酸之前已被诊断为患有多囊肾病。

[0333] 5.如项1所述的方法，其中所述受试者在施用所述修饰的寡核苷酸之前被确定为在所述受试者的肾、尿液或血液中具有升高的miR-17水平。

[0334] 6.如前述项中任一项所述的方法，其中所述多囊肾病是常染色体隐性多囊肾病或常染色体显性多囊肾病。

[0335] 7.如前述项中任一项所述的方法，其中所述多囊肾病是常染色体显性多囊肾病。

[0336] 8.如前述项中任一项所述的方法，其中所述受试者具有选自PKD1基因中的突变或PKD2基因中的突变的突变。

[0337] 9.如前述项中任一项所述的方法，其中所述受试者具有增加的肾脏总体积。

[0338] 10.如前述项中任一项所述的方法，其中所述受试者患有高血压。

[0339] 11.如前述项中任一项所述的方法，其中所述受试者的肾功能受损。

[0340] 12.如前述项中任一项所述的方法，其中所述受试者需要改善的肾功能。

[0341] 13.如前述项中任一项所述的方法，其中所述施用：

[0342] a)改善所述受试者的肾功能；

[0343] b)延迟所述受试者的肾功能的恶化；

[0344] c)减小所述受试者的肾脏总体积；

[0345] d)减缓所述受试者的肾脏总体积的增加；

[0346] e)抑制所述受试者的囊肿生长；

[0347] f)减缓所述受试者的囊肿生长的增加；

[0348] g)减轻所述受试者的肾痛；

[0349] h)减缓所述受试者的肾痛的增加；

[0350] i)延迟所述受试者的肾痛的发作；

[0351] j)降低所述受试者的高血压；

[0352] k)减缓所述受试者的高血压的恶化；

[0353] l)延迟所述受试者的高血压的发作；

[0354] m)减轻所述受试者的肾的纤维化；

[0355] n)减缓所述受试者的肾的纤维化的恶化；

[0356] o)延迟所述受试者的终末期肾病的发作；

[0357] p)延迟所述受试者进行透析的时间；

[0358] q)延迟所述受试者进行肾移植的时间;和/或

[0359] r)提高所述受试者的预期寿命。

[0360] 14.如前述项中任一项所述的方法,其中所述施用：

[0361] a)减轻所述受试者的白蛋白尿；

[0362] b)减缓所述受试者的白蛋白尿的恶化；

[0363] c)延迟所述受试者的白蛋白尿的发作；

[0364] d)减轻所述受试者的血尿；

[0365] e)减缓所述受试者的血尿的恶化；

[0366] f)延迟所述受试者的血尿的发作；

[0367] g)降低所述受试者的血尿素氮；

[0368] h)降低所述受试者的血液中的肌酸酐；

[0369] i)提高所述受试者的肌酸酐清除率；

[0370] j)降低所述受试者的白蛋白:肌酸酐比率；

[0371] k)提高所述受试者的肾小球滤过率；

[0372] l)减缓所述受试者的肾小球滤过率的恶化；

[0373] m)降低所述受试者的尿液中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)；和/或

[0374] n)减少所述受试者的尿液中的肾损伤分子-1(KIM-1)蛋白。

[0375] 15.如前述项中的一项所述的方法,所述方法包括：

[0376] a)测量所述受试者的肾脏总体积；

[0377] b)测量所述受试者的高血压；

[0378] c)测量所述受试者的肾痛；

[0379] d)测量所述受试者的肾的纤维化；

[0380] e)测量所述受试者的血液中的血尿素氮；

[0381] f)测量所述受试者的血液中的肌酸酐；

[0382] g)测量所述受试者的肌酸酐清除率；

[0383] h)测量所述受试者的白蛋白尿；

[0384] i)测量所述受试者的白蛋白:肌酸酐比率；

[0385] j)测量所述受试者的肾小球滤过率；

[0386] k)测量所述受试者的尿液中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)；和/或

[0387] l)测量所述受试者的尿液中的肾损伤分子-1(KIM-1)蛋白。

[0388] 16.如项9、13和15中任一项所述的方法，其中所述肾脏总体积是高度经过调整的肾脏体积。

[0389] 17.如项13所述的方法，其中所述囊肿存在于所述受试者的一个或多个肾中。

[0390] 18.如项13所述的方法，其中所述囊肿存在于所述受试者的肝中。

[0391] 19.如前述项中任一项所述的方法，所述方法包括施用至少一种为抗高血压剂的另外的疗法。

[0392] 20.如前述项中任一项所述的方法，所述方法包括施用至少一种选自以下的另外的疗法:血管紧张素II转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)、利尿剂、钙通道阻滞剂、激酶抑制剂、肾上腺素能受体拮抗剂、血管舒张剂、苯并二氮杂卓、肾素抑制剂、醛固酮受体拮抗剂、内皮素受体阻滞剂、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制剂、激素类似物、加压素受体2拮抗剂、醛固酮受体拮抗剂、透析以及肾移植。

[0393] 21.如项20所述的方法，其中所述血管紧张素II转化酶(ACE)抑制剂是选自卡托普利、依那普利、赖诺普利、贝那普利、喹那普利、福辛普利以及雷米普利。

[0394] 22.如项20所述的方法，其中所述血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)是选自坎地沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、氯沙坦、缬沙坦、替米沙坦以及依普罗沙坦。

[0395] 23.如项20所述的方法，其中所述加压素受体2拮抗剂是托伐普坦。

[0396] 24.如项20所述的方法，其中所述醛固酮受体拮抗剂是螺内酯。

[0397] 25.如项20所述的方法，其中所述激酶抑制剂是选自博舒替尼和KD019。

[0398] 26.如项20所述的方法，其中所述mTOR抑制剂是选自依维莫司、雷帕霉素和西罗莫司。

[0399] 27.如项20所述的方法，所述激素类似物是选自生长抑素和促肾上腺皮质激素。

[0400] 28.如前述项中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸的所述核碱基序列与miR-17的核碱基序列(SEQ ID NO:1)至少90％互补、至少95％互补或100％互补。

[0401] 29.如前述项中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸的所述核碱基序列包含核碱基序列5′-GCACTTTG-3′(SEQ ID NO:3)，其中所述核碱基序列中的每个T独立地选自T和U。

[0402] 30.如前述项中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸由8至12个连接的核苷组成。

[0403] 31.如项1至29中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸由12至25个连接的核苷组成。

[0404] 32.如项1至29中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸由15至25个连接的核苷组成。

[0405] 33.如项1至29中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸由17至23个连接的核苷组成。

[0406] 34.如项1至29中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸由8个、9个、10个、11个或12个连接的核苷组成。

[0407] 35.如项1至29中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸由12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个连接的核苷组成。

[0408] 36.如项1至29中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸由15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个或22个连接的核苷组成。

[0409] 37.如项1至29中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸由17个、18个、19个、20个、21个、22个或23个连接的核苷组成。

[0410] 38.如前述项中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷。

[0411] 39.如项38所述的方法，其中所述修饰的核苷是选自S-cEt核苷、2′-O-甲氧基乙基核苷和LNA核苷。

[0412] 40.如前述项中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键联。

[0413] 41.如前述项中任一项所述的方法，其中所述修饰的寡核苷酸的每个核苷间键联是修饰的核苷间键联。

[0414] 42.如项40或41所述的方法，其中所述修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0415] 43.如前述项中任一项所述的方法，其中所述化合物由所述修饰的寡核苷酸组成。

[0416] 44.如前述项中任一项所述的方法，其包括施用治疗有效量的所述化合物。

[0417] 45.一种由8至25个连接的核苷组成的修饰的寡核苷酸的用途，其用于治疗多囊肾病，其中所述修饰的寡核苷酸的所述核碱基序列与miR-17互补。

序列表

<110> 莱古路斯治疗法股份有限公司

得克萨斯州大学系统董事会

<120> 用于治疗多囊肾病的方法

<130> 01138-0021-00PCT

<150> US 62/210,031

<151> 2015-08-26

<160> 32

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> 智人

<400> 1

caaagugcuu acagugcagg uag 23

<210> 2

<211> 84

<212> RNA

<213> 智人

<400> 2

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga 60

aggcacuugu agcauuaugg ugac 84

<210> 3

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的寡核苷酸

<220>

<221> misc_特征

<222> (1)..(8)

<223> T独立地选自T和U

<400> 3

gcactttg 8

<210> 4

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(8)
<223> T独立地选自T和U
<400> 4
agcacttt 8
<210> 5
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(9)
<223> T独立地选自T和U
<400> 5
agcactttg 9
<210> 6
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(10)
<223> T独立地选自T和U
<400> 6
aagcactttg 10
<210> 7
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>

<221> misc_特征
<222> (1)..(11)
<223> T独立地选自T和U
<400> 7
taagcacttt g 11
<210> 8
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(12)
<223> T独立地选自T和U
<400> 8
gtaagcactt tg 12
<210> 9
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(13)
<223> T独立地选自T和U
<400> 9
tgtaagcact ttg 13
<210> 10
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(14)
<223> T独立地选自T和U

<400> 10
ctgtaagcac tttg 14
<210> 11
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(15)
<223> T独立地选自T和U
<400> 11
actgtaagca ctttg 15
<210> 12
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(16)
<223> T独立地选自T和U
<400> 12
cactgtaagc actttg 16
<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc-_特征
<222> (1)..(17)
<223> T独立地选自T和U
<400> 13
gcactgtaag cactttg 17
<210> 14

<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(18)
<223> T独立地选自T和U
<400> 14
tgcactgtaa gcactttg 18
<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(19)
<223> T独立地选自T和U
<400> 15
ctgcactgta agcactttg 19
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(20)
<223> T独立地选自T和U
<400> 16
cctgcactgt aagcactttg 20
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(21)
<223> T独立地选自T和U
<400> 17
acctgcactg taagcacttt g 21
<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(22)
<223> T独立地选自T和U
<400> 18
cacctgcact gtaagcactt tg 22
<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的寡核苷酸
<220>
<221> misc_特征
<222> (1)..(23)
<223> T独立地选自T和U
<400> 19
ctacctgcac tgtaagcact ttg 23
<210> 20
<400> 20
000
<210> 21
<211> 23
<212> RNA
<213> 智人

<400> 21
uaaagugcuu auagugcagg uag 23
<210> 22
<211> 23
<212> RNA
<213> 智人
<400> 22
caaagugcuc auagugcagg uag 23
<210> 23
<211> 23
<212> RNA
<213> 智人
<400> 23
caaagugcug uucgugcagg uag 23
<210> 24
<211> 23
<212> RNA
<213> 智人
<400> 24
aaaagugcuu acagugcagg uag 23
<210> 25
<211> 21
<212> RNA
<213> 智人
<400> 25
uaaagugcug acagugcaga u 21
<210> 26
<211> 23
<212> RNA
<213> 智人
<400> 26
uaaggugcau cuagugcaga uag 23
<210> 27
<211> 23
<212> RNA
<213> 智人
<400> 27
uaaggugcau cuagugcagu uag 23
<210> 28

<210> 23
<211> 23
<212> RNA
<213> 智人
<400> 28
ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23
<210> 29
<211> 23
<212> RNA
<213> 智人
<400> 29
ugugcaaauc caugcaaaac uga 23
<210> 30
<211> 22
<212> RNA
<213> 智人
<400> 30
cauugcacuu gucucggucu ga 22
<210> 31
<211> 22
<212> RNA
<213> 智人
<400> 31
uauugcacuu gucccggccu gu 22
<210> 32
<211> 22
<212> RNA
<213> 智人
<400> 32
aauugcacgg uauccaucug ua 22

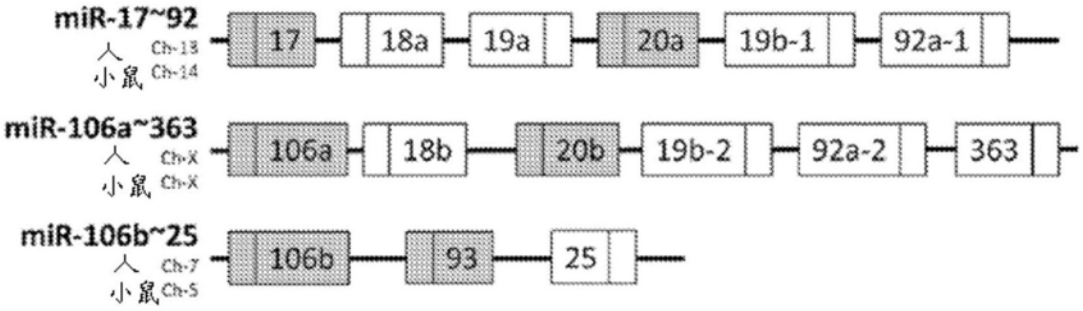


图1A

miR-17 家族	序列(5'至3') 种子呈粗体	SEQ ID NO:
miR-17	5'-**CAAAGUG**CUUACAGUGCAGGUAG-3'	1
miR-20a	5'-**UAAAGUG**CUUAUAGUGCAGGUAG-3'	21
miR-20b	5'-**CAAAGUG**CUCAUAGUGCAGGUAG-3'	22
miR-93	5'-**CAAAGUG**CUCUUCGUGCAGGUAG-3'	23
miR-106a	5'-**AAAAGUG**CUUACAGUGCAGGUAG-3'	24
miR-106b	5'-**UAAAGUG**CUGACAGUGCAGAU-3'	25
miR-18 家族		
miR-18a	5'-**UAAGGUG**CAUCUAGUGCAGAUAG-3'	26
miR-18b	5'-**UAAGGUG**CAUCUAGUGCAGUUAG-3'	27
miR-19 家族		
miR-19a	5'-**UGUGCAA**AUCUAUGCAAAACUGA-3'	28
miR-19b	5'-**UGUGCAA**AUCCAUGCAAAACUGA-3'	29
miR-92 家族		
miR-25	5'-**CAUUGCA**CUUGUCUCGGUCUGA-3'	30
miR-92a	5'-**UAUUGCA**CUUGUCCCGGCCUGU-3'	31
miR-363	5'-**AAUUGCA**CGGUAUCCAUCUGUA-3'	32

图1B

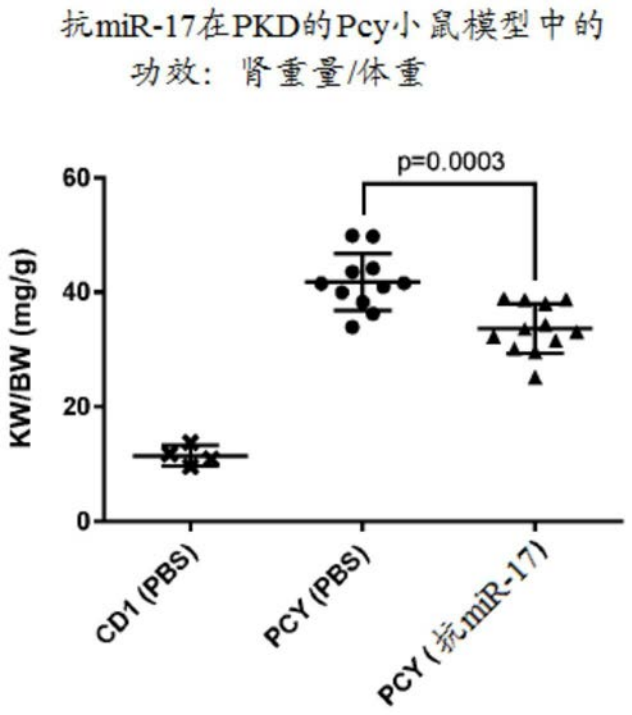

抗miR-17在PKD的Pcy小鼠模型中的
功效：肾重量/体重
p=0.0003
KW/BW (mg/g)
60
40
20
0
CD1 (PBS)
PCY (PBS)
PCY (抗miR-17)

图2A

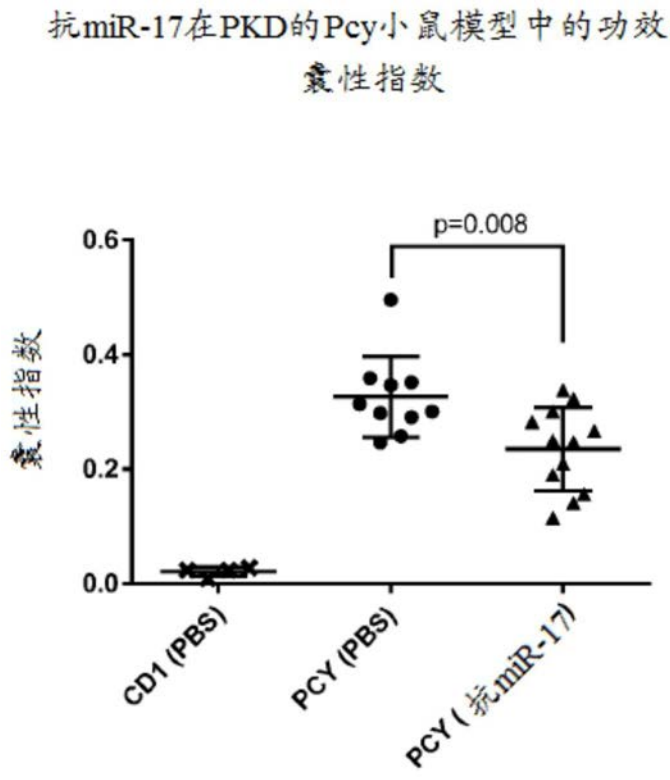

抗miR-17在PKD的Pcy小鼠模型中的功效：
囊性指数
p=0.008
囊性指数
0.6
0.4
0.2
0.0
CD1 (PBS)
PCY (PBS)
PCY (抗miR-17)

图2B