(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111630168 B
(45)授权公告日 2023.09.22

(21)申请号 201880080366.0
(22)申请日 2018.12.14
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111630168 A
(43)申请公布日 2020.09.04
(30)优先权数据
17207738.0 2017.12.15 EP
62/599,050 2017.12.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/085008 2018.12.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/115788 EN 2019.06.20
(73)专利权人 汉诺威医学院
地址 德国汉诺威
(72)发明人 T•图姆 S•巴特凯 A•福因奎诺斯
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 郑天松
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
(56)对比文件
CA 3143100 A1,2020.12.17
CN 103361428 A,2013.10.23
CN 104011208 A,2014.08.27
CN 104039983 A,2014.09.10
CN 106999608 A,2017.08.01
CN 112043721 A,2020.12.08
CN 115068632 A,2022.09.20
WO 2006027776 A1,2006.03.16
WO 2007000668 A2,2007.01.04
WO 2010054386 A2,2010.05.14
WO 2010105096 A2,2010.09.16
WO 2013034653 A1,2013.03.14
WO 2016042561 A2,2016.03.24
WO 2022018269 A1,2022.01.27
Iftach Shaked等.MicroRNA-132 Potentiates Cholinergic Anti-Inflammatory Signaling by Targeting Acetylcholinesterase.《Immunity》.2009,第31卷全文.
Bo Peng等.MicroRNA Delivery for Regenerative Medicine.《Adv Drug Deliv Rev.》.2015,第第88卷卷全文.
Tessa R. Werner等. Blockade of miR-140-3p prevents functional deterioration in afterload-enhanced engineered heart tissue.《Scientific reports》.2019,第第9卷卷全文.
叶思杨;孙维;王若冰;刘斌.外泌体微小RNA在心脏血管生成调控中的研究进展.中华老年心脑血管病杂志.2020,(第04期),全文.
郭威早;佟倩;曹立新;李琳.微小RNA对心肌细胞C反应蛋白功能水平的调节.中国实验诊断学.2010,(第12期),全文.
孙吉;陈小平.microRNA与心血管疾病的关系.分子诊断与治疗杂志.2011,(第03期),全文.
审查员 刘波

权利要求书2页 说明书10页
序列表4页 附图20页

(54)发明名称

治疗心力衰竭的改良化合物

(57)摘要

本发明涉及寡核苷酸,其是微小RNA miR-132的有效抑制剂,并且其在医学中,特别是在预防或治疗心脏和/或纤维化疾病中的用途。

CN 111630168 B

1.具有16个构件的长度的寡核苷酸,其包含式II的序列:

5'-A+TG+GC+TG+TA+GACTG+T+T-3'(II)

其中A、T、G和C是脱氧核糖核苷酸构件,

其中+G和+T是桥接的核苷酸构件,且

其中所述寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键,其中所述核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键,或所有核苷间键均是硫代磷酸酯键。

2.权利要求1的寡核苷酸,其中+G和+T是具有2'-O-CH_2-4'桥的锁核苷酸构件。

3.权利要求1的寡核苷酸,其包含式III的序列:

5'-dA*+T*dG*+G*dC*+T*dG*+T*dA*+G*dA*dC*dT*dG*+T*+T-3'(III)

其中dA是2'脱氧腺苷,dG是2'脱氧鸟苷,dC是2'脱氧胞苷,且T是胸苷,

其中+T为锁核苷酸-T构件,+G为锁核苷酸-G构件,且

其中*为硫代磷酸酯键。

4.权利要求1～3之任一项的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸缀合至异源部分。

5.权利要求4的寡核苷酸,其中所述异源部分是脂质部分、糖或氨基糖部分、肽或多肽部分或者核苷或核苷酸部分。

6.药物组合物,其包含:权利要求1～5之任一项的寡核苷酸、和药学上可接受的载体。

7.权利要求1～5之任一项的寡核苷酸或权利要求6的药物组合物在制造用于医疗的药物中的用途。

8.权利要求1～5之任一项的寡核苷酸或权利要求6的药物组合物在制造用于预防或治疗与miR-132的病理表达有关,伴随和/或引起的疾病的药物中的用途。

9.权利要求1～5之任一项的寡核苷酸或权利要求6的药物组合物在制造用于预防或治疗心脏疾病的药物中的用途。

10.权利要求9的用途,其中所述心脏疾病是与心脏肥大相关的疾病。

11.权利要求1～5之任一项的寡核苷酸或权利要求6的药物组合物在制造用于预防或治疗收缩功能障碍,心脏代偿失调或心力衰竭的药物中的用途。

12.权利要求7～11之任一项的用途,其中将所述药物施用于选自下列的患者:

(i)患心力衰竭的风险增加的患者,

(ii)患充血性心力衰竭的患者,任选地心力衰竭进展风险增加的患者;

(iii)心肌梗塞后患者,和/或

(iv)患与心脏肥大相关的先天性心脏疾病,例如肺静脉狭窄,心房或室间隔缺损的患者。

13.权利要求7～11之任一项的用途,其中所述药物作为单一疗法或与其他药物相组合。

14.权利要求13的用途,其中所述其他药物是选自下列的药物:血管紧张素调节剂,β-阻滞剂,利尿剂,醛固酮拮抗剂,血管扩张药,肌力药或其组合。

15.权利要求1～5之任一项的寡核苷酸或权利要求6的药物组合物在制造用于治疗或预防纤维化疾病的药物中的用途。

16.权利要求15的用途,其中所述纤维化疾病选自:心脏纤维化疾病;肺纤维化疾病或肝纤维化疾病。

17.权利要求16的用途,其中所述心脏纤维化疾病是心房纤维化,心肌内膜纤维化或由先前的心肌梗塞引起的纤维化。

18.权利要求16的用途,其中所述肺纤维化疾病是由职业或环境因素引起的肺纤维化,由放射治疗和/或药物治疗引起的肺纤维化或特发性肺纤维化。

19.权利要求16的用途,其中所述肝纤维化疾病是酒精性肝病或非酒精性脂肪性肝病。

20.权利要求15～19之任一项的用途,其中所述药物作为单一疗法或与其他药物组合。

21.权利要求1～5之任一项的寡核苷酸或权利要求6的药物组合物在制造用于治疗或预防权利要求8～19之任一项中所述的疾病的药物中的用途,所述用途包括在施用所述寡核苷酸或所述药物组合物之前、期间和/或之后,在待治疗患者中确定下列物质的量和/或活性的步骤:

(i)miR-132,

(ii)至少一种心脏标志物,和/或

(iii)至少一种纤维化标志物。

治疗心力衰竭的改良化合物

[0001] 【说明】

[0002] 本发明涉及寡核苷酸,其是微小RNA miR-132的有效抑制剂,及其在医学中,特别是在预防或治疗心脏疾病和/或纤维化疾病中的用途。

[0003] 心力衰竭是世界上导致死亡的主要病理原因之一。心肌梗塞(MI)是心力衰竭的最重要原因,因为MI导致随后的心脏逐步重塑,导致心力衰竭且预后不良。当前用于心力衰竭的治疗药理学选择包括血管紧张素调节剂,β阻滞剂,利尿剂,醛固酮拮抗剂,中性溶酶抑制剂与血管紧张素II受体阻滞剂的组合,血管扩张剂或正性肌力药。尽管一些临床研究表明,所有这些药物导致的心力衰竭引起的死亡率均显著降低,但5年死亡率仍然保持在近50%的水平,仍是无法接受的。因此,非常需要开发用于心力衰竭的新且更有效的治疗方法。

[0004] 心肌的病理性肥厚生长可导致心脏重塑,心力衰竭和心源性猝死的发展。心肌肥大生长是对因心脏容量和/或压力超负荷引起的心脏壁压力增加的反应。最初,心脏肥大是一种旨在减少壁应力并增加心输出量的补偿机制。然而,长时间的心脏肥大会发展为收缩功能障碍,心脏代偿失调,最后是心力衰竭(Hill和Olson,2008年;Barry和Townsend,2010年)。从生理性肥大到病理性肥大的转变可能取决于许多因素,包括通过凋亡或坏死导致的心肌细胞丢失,自噬改变,收缩反应缺陷,钙稳态失调,肾上腺素能受体脱敏或心脏纤维化(Hill和Olson,2008;Barry和Townsend,2010)。肥大信号主要由胰岛素信号途径介导(DeBosch和Muslin,2008;Barry和Townsend,2010)。胰岛素和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)都通过IGF-1受体激活心肌细胞的促肥大途径,后者可激活磷酸肌醇3-激酶(PI3K)(McMullen et al.,2004)。PI3K活性通过其磷酸化作用导致丝氨酸/苏氨酸激酶Akt活化,而活性Akt磷酸化抗肥大的FoxO转录因子导致它们的不稳定和阻止核定位(Datta等,1999;Skurk等,2005;Ronnebaum和Patterson,2010)。相反,sirtuin-1(Sirt-1)对FoxO因子的乙酰化作用导致其稳定和核易位(Frescas et al.,2005)。稳定的FoxO转录因子位于细胞核中,以调节抗肥大基因的表达。FoxO蛋白的抗肥大功能主要是通过Fox因子的抗肥大基因靶标(如atrogin-1)的表达来抑制促肥大的钙调神经磷酸信号通路来介导的(Ni et al.,2006;Ronnebaum and Patterson,2010;格拉斯,2010)。此外,FoxO转录因子还诱导心肌细胞凋亡并调节自噬(Ronnebaum和Patterson,2010年)。

[0005] 已显示微小RNA在不良心脏重塑中具有关键作用。WO 2013/034653描述了miR-132和/或miR-212可诱导心脏肥大,因此构成心力衰竭治疗的潜在治疗靶标。

[0006] WO 2016/042561描述了通过向受试者施用治疗有效量的与人miR-132的核苷酸序列基本互补的多核苷酸试剂来治疗脂质相关病症的方法。

[0007] 本发明人已经鉴定了新型的寡核苷酸类似物,其是心肌细胞中miR-132表达的有效抑制剂。在以下称为CDR132L的寡核苷酸类似物是由具有核苷间硫代磷酸酯键的DNA和LNA构件组成的混聚体。它在人肝细胞系和分离的新生大鼠心肌细胞中没有明显的毒性。此外,显示出,与具有相同核苷酸序列但LNA构件的分布不同的其他寡核苷酸类似物相比,CDR132L表现出优异的作用。

[0008] 在几种动物模型中测试了CDR132L的功效。在心脏肥大的转基因小鼠模型中,

CDR132L导致与miR-132表达减少相关的反向心脏重塑。在心肌梗塞后心力衰竭的小鼠模型中,发现CDR132L治疗可减少心肌梗塞后左心室功能障碍和收缩压收缩功能的负荷独立参数。此外,CDR132L的施用导致心脏功能的改善,并且降低了miR-132表达,心脏应激信号传导和MI后肥大。在MI后心力衰竭的猪模型中,发现CDR132L治疗可避免适应不良重塑并改善左心室功能。此外,CDR132L可将病理性心力衰竭标记(例如BNP、ANP)的组织表达标准化,并改变肌球蛋白的重度变化亚型(MYH7/6比)。

[0009] 在另外的研究中,本发明人已经在心肌梗塞的体内小鼠模型以及肝纤维化和肺纤维化的体外模型中鉴定了寡核苷酸类似物CDR132L的抗纤维化治疗作用。

[0010] 因此,寡核苷酸CDR132L可用作医学中,特别是在预防或治疗心脏疾病和/或纤维化疾病中的活性剂。

[0011] 因此,本发明的第一方面提供了寡核苷酸类似物,其包含式I的序列:

[0012] 5'-ATGGCTGTAGACTGTT-3'

[0013] 其中A、T、G和C是脱氧核糖核苷酸构件,

[0014] 其中至少一个G或T构件是桥接的核苷酸构件和/或吗啉代核苷酸构件。

[0015] 在一个特定的实施方式中,寡核苷酸包含或具有式II的序列:

[0016] 5'-A+TG+GC+TG+TA+GACTG+T+T-3'

[0017] 其中A、T、G和C是脱氧核糖核苷酸构件,

[0018] 其中+G和+T是桥接的核苷酸构件和/或吗啉代核苷酸构件,特别是其中+G和+T是LNA构件。

[0019] 式I或式II的寡核苷酸类似物可包含至少一个修饰的核苷间键,例如对核酸酶消化稳定的核苷间键,例如硫代磷酸酯或二氨基磷酸酯键。在特定的实施方式中,所有核苷间键为经修饰的键,特别是硫代磷酸酯键。

[0020] 在一个更具体的实施方式中,本发明涉及如本文所述的寡核苷酸CDR132L。

[0021] 寡核苷酸CDR132L具有式III的序列:

[0022] 5'-dA*+T*dG*+G*dC*+T*dG*+T*dA*+G*dA*dC*dT*dG*+T*+T-3'

[0023] 其中dA为2'脱氧腺苷,dG为2'脱氧鸟苷,dC为2'脱氧胞苷,且T为胸苷,

[0024] 其中+T是LNA-T构件,+G是LNA-G构件,其中*是硫代磷酸酯键。

[0025] 本发明的另一方面涉及药物组合物,其包含作为活性剂的包含式I、II或III的序列的寡核苷酸类似物和药学上可接受的载体。

[0026] 本发明的另一方面涉及包含式I、II或III的序列的寡核苷酸类似物的医学用途。在某些实施方式中,医学用途涉及用于治疗或预防与miR-132的病理表达有关,伴随和/或由其引起的病症的用途。在某些实施方式中,医学用途涉及心脏疾病,特别是与心脏肥大相关的疾病的治疗或预防。在某些实施方式中,医学用途涉及纤维化疾病,例如与病理性纤维化相关,伴随和/或由其引起的疾病,特别是心脏纤维化疾病,肺纤维化疾病或肝纤维化疾病的治疗。

[0027] 式I、II或III的寡核苷酸可以由脱氧核糖核苷酸DNA构件和桥接的核苷酸构件和/或吗啉代核苷酸构件(DNA)组成。"桥接的核苷酸"是指修饰的核糖核苷酸,其中核糖部分包含连接2'-和4'-碳原子的2或3个原子的桥。例如,桥可以包括结构2'-O-CH_2-4',2'-O-CH_2-CH_2-4',2'-O-CH(CH_3)-4'或O被S或NH取代的相应的结构。在一个特定的实施方式中,至少一

个桥接的核苷酸构件是具有2'-O-CH_2-4'桥的锁核酸(LNA)构件。吗啉代核苷酸构件是指其中核糖或脱氧核糖被吗啉代部分取代的经修饰的核苷酸。

[0028] 式I、II或III的寡核苷酸具有至少16个构件的长度,例如16～20个构件的长度。在一个特定的实施方式中,式I、II或III的寡核苷酸具有16个构件的长度。

[0029] 在一些实施方式中,式I、II或III的寡核苷酸包含5～10个,例如6～8个,特别是7个桥接的核苷酸构件,例如LNA构件和/或吗啉代核苷酸构件。

[0030] 在一些实施方式中,式I、II或III的寡核苷酸是裸寡核苷酸。在一些实施方式中,寡核苷酸可以与至少一个异源部分,例如,不有助于寡核苷酸与miR-132结合的部分缀合。异源部分可以是改善靶向和/或细胞摄取的部分,例如脂质部分,例如胆固醇或脂肪酸,糖或氨基糖部分,例如含有N-半乳糖胺的部分,肽或多肽部分或核苷或核苷酸部分,如适体。异源部分可通过共价键或间隔子与寡核苷酸类似物的5'-和/或3'-末端缀合。

[0031] 本发明的寡核苷酸适用于包括人和兽医学在内的药物。在某些实施方式中,该化合物可用于预防或治疗与病理表达例如miR-132过表达有关,伴随和/或由其引起的疾病。发现化合物的施用在体外和体内显著降低了miR-132表达。

[0032] 在一些实施方式中,可以将化合物施用给与健康受试者相比显示miR-132过表达的患者。在一些实施方式中,可以将化合物施用给与健康受试者相比未显示miR-132过表达但仍需要降低miR-132水平的患者。

[0033] 在本发明的上下文中,术语"预防"涉及将化合物给予已知患某种疾病的风险增加的患者。在本发明的上下文中,术语"治疗"涉及将化合物给予已经发展出某种疾病的体征和/或症状的患者。术语"患者"涉及在人或兽医学领域中需要施用本发明化合物的受试者。在特定的实施方式中,患者是人患者。

[0034] 在某些实施方式中,本发明的化合物可用于预防或治疗心脏疾病,特别是与心脏肥大相关的疾病。例如,该化合物可用于预防或治疗收缩功能障碍,心脏代偿失调,心力衰竭,或用于预防或治疗心肌梗塞,心肌炎,瓣膜性心脏疾病(如主动脉瓣狭窄或二尖瓣关闭不全),具有心脏肥大的遗传性心脏疾病(例如肥厚性非阻塞性和阻塞性心肌病或法布里病)后的心脏重塑。

[0035] 该化合物可用于向选自下列的患者给药

[0036] (i)患心力衰竭的风险增加的患者,

[0037] (ii)患(充血性)心力衰竭的患者,例如心力衰竭进展风险增加的患者,

[0038] (iii)心肌梗塞后患者,和/或

[0039] (iv)患与心脏肥大有关的先天性心脏疾病,例如肺静脉狭窄,心房或心室间隔缺损的患者。

[0040] 在某些实施方式中,本发明的化合物可用于预防或治疗纤维化疾病,特别是与病理性纤维化有关,伴随和/或由其引起的疾病。

[0041] 病理性纤维化是器官或组织中过量的纤维结缔组织的形成,特别是与病理状态相关,伴随和/或由病理状态引起。病理性纤维化可发生在体内的许多不同器官和组织中,通常是炎症或损害的结果。

[0042] 在某个实施方式中,纤维化是心脏纤维化,例如涉及心脏中病理性纤维化的病症。心脏纤维化的示例性类型包括心房纤维化,心肌内膜纤维化或先前的心肌梗塞导致的纤维

化。

[0043] 在另一个实施方式中，纤维化是肺纤维化，例如涉及肺中病理性纤维化的病症。肺纤维化的示例性类型包括由职业或环境因素引起的纤维化疾病，例如由于暴露于毒素和污染物，例如二氧化硅粉尘，石棉纤维，金属粉尘，煤粉尘，谷物粉尘，鸟类和动物粪便而引起的。其他类型的肺纤维化疾病是由放射治疗和/或用诸如化学治疗药物，强心药，抗生素或抗炎药之类的药物治疗引起的。其他类型的肺纤维化疾病是由以下疾病引起的，包括特发性肺纤维化，皮炎，多发性肌炎，混合性结缔组织病，自身免疫性疾病，如类风湿性关节炎，硬皮病，斯耶格伦综合征或系统性红斑狼疮，结节病，肺炎，病毒感染或胃食管回流疾病(GERD)

[0044] 在另一个实施方式中，纤维化可以是肝纤维化，例如涉及肝脏中病理性纤维化的病症。肝纤维化的典型类型是由病毒(例如由乙型和/或丙型肝炎病毒)感染，遗传性代谢失调，自身免疫性肝炎，胆道阻塞，铁超负荷，非酒精性脂肪肝疾病，包括非酒精性脂肪肝(NAFL))以及非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和酒精性肝病引起的。

[0045] 在其他实施方式中，纤维化还可以是血管纤维化，例如动脉僵硬；皮肤纤维化，例如瘢痕疙瘩形成或肾原性系统性纤维化；关节纤维化；某些形式的粘附性囊炎；软组织纤维化，例如纵隔纤维化或腹膜后纤维化或骨髓纤维化如骨髓纤维化。

[0046] 在某些实施方式中，本发明包括在施用本发明的化合物之前、期间和/或之后确定待治疗的受试者中某些生理参数的量和/或活性。这种伴随的诊断程序可以如上所述为医疗用途提供帮助。例如，诊断程序可以在风险评估，患者分层，监测治疗过程和/或治疗后控制方面提供帮助。

[0047] 在某些实施方式中，本发明包括在施用本发明的化合物之前、期间和/或之后确定待治疗的受试者中miR-132的量和/或活性。在另外的实施方式中，本发明包括确定心脏标志物例如BNP，ANP或肌球蛋白重变化亚型，例如MYH7/6比的水平和/或活性和/或Fox03和/或SERCA2的水平。在另外的实施方式中，本发明包括确定纤维化标记物例如胶原蛋白的量和/或活性，例如胶原蛋白的沉积和/或纤维化标记物基因例如胶原蛋白1A1，胶原蛋白1A2，胶原蛋白3A1和/或基质金属肽酶(诸如基质金属肽酶2)的表达。

[0048] 可以根据已知方法在核酸和/或蛋白质水平上在体液样本(例如血液，血浆或血清)或组织样本中进行上述参数的确定，并且可以提供对于例如治疗的过程和/或成功有用的诊断信息。

[0049] 本发明的化合物可以作为包含药理学上可接受的载体的药物组合物施用。可以通过已知方法进行给药，其中将化合物引入待治疗对象的所需靶细胞或器官中。

[0050] 化合物可以本身或作为与上述异源部分的缀合物施用。

[0051] 对于药物应用，组合物可以呈溶液的形式，例如可注射溶液，乳剂，吸入剂，混悬剂等。

[0052] 可以以任何合适的方式，例如肠胃外，特别是通过诸如皮下，肌内，静脉内或动脉内注射的注射，或通过输注，通过口服或吸入的摄取和/或通过皮肤施用的方式来给予组合物。载体可以是任何合适的药物载体。优选地，使用能够增加寡核苷酸分子进入靶细胞的功效的载体。这种载体的合适实例是脂质体，例如阳离子脂质体，或预先设计的外来体。

[0053] 化合物根据给药途径和疾病的类型或严重性以药学上有效的剂量给药。

[0054] 该化合物可以作为单一疗法或与另外的不同药物,特别是适合于如上所述预防或治疗心脏疾病或纤维化疾病的药物组合给药。

[0055] 适用于预防或治疗心脏疾病的其他药物的实例是血管紧张素调节剂,β阻滞剂,利尿剂,醛固酮拮抗剂,血管扩张剂,肌力药,他汀类或中性溶酶抑制剂或其组合(例如中性溶酶抑制剂(例如沙比特利)与血管紧张素II受体阻滞剂(例如缬沙坦)的组合)。

[0056] 适用于预防或治疗纤维化疾病的其他药物的实例是用于预防或治疗心脏纤维化的药物,例如ACE抑制剂,例如赖诺普利,血管紧张素II受体阻滞剂,例如坎地沙坦,氯沙坦或奥美沙坦,醛固酮拮抗剂,例如螺内酯和/或TGFβ抑制剂,例如吡非尼酮或曲尼司特,用于预防或治疗肺纤维化的药物,例如抗纤维化剂,例如尼达尼布或吡非尼酮,消炎药,例如皮质类固醇,硫唑嘌呤,环磷酰胺和霉酚酸酯,抗炎药回流剂,例如蛋白泵抑制剂或H_2阻滞剂和/或抗咳嗽药,用于预防和/或治疗肝纤维化的药物,例如ACE抑制剂,如苯那普利,赖诺普利或雷米普利,抗病毒药或PPARα-激动剂。

[0057] 此外,本发明涉及如本文上文所述的本发明的化合物在制备用于预防或治疗心脏疾病的药物中的用途。

[0058] 此外,本发明涉及如本文上文所述的本发明的化合物在制备用于预防或治疗纤维化疾病的药物中的用途。

[0059] 此外,本发明涉及预防或治疗心脏疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的至少一种本文所述的化合物。

[0060] 此外,本发明涉及预防或治疗纤维化疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的至少一种本文所述的化合物。

[0061] 此外,将通过以下附图和实施例更详细地描述本发明。

[0062] 【实施例1:心肌细胞中miR-132表达的沉默】

[0063] 对源自抗miR-132文库的许多结构类似化合物的miRNA抑制活性进行了定量体外测定。通过分析和定量实时PCR定量检测miRNA表达的沉默。

[0064] 这项研究是在浓度为10μM的去氧肾上腺素/异丙肾上腺素对肥大性刺激后的离体大鼠心肌细胞中进行的。将细胞在标准细胞培养基中孵育48小时。以100nM的浓度单独给予测试化合物。一式三份测试进行。

[0065] 化合物CDR132L是具有硫代磷酸酯主链的LNA-DNA混聚体,从抗miR-132结构类似物文库中被鉴定为最有效的化合物。

[0066] CDR132L的结构如下:

[0067] 5'-dA*+T*dG*+G*dC*+T*dG*+T*dA*+G*dA*dC*dT*dG*+T*+T-3'

[0068] 其中dA为2'脱氧腺苷,dG为2'脱氧鸟苷,dC为2'脱氧胞苷,且T为胸苷,

[0069] 其中+T是LNA-T构件,+G是LNA-G构件,其中*是硫代磷酸酯键。

[0070] 【实施例2:毒理学分析】

[0071] 2.1.研究目的:

[0072] CDR132L的毒性分析。

[0073] 2.2.研究大纲:

[0074] 在人肝细胞系(HepG2)和分离的新生大鼠心肌细胞(NRCM)中进行了体外细胞毒性测定。比色商业MTT测定法用于评估细胞毒性。加入单个化合物后,将细胞在DMEM培养基中

孵育48小时。将CDR132L(红色)的效果与加扰的LNA寡核苷酸(用作对照(蓝色))的剂量范围为0.01～100μM进行了比较。治疗剂量范围以灰色标记。

[0075] 2.3.结果：

[0076] 在治疗剂量范围内，未发现CDR132L在HepG2细胞和NRCM中具有明显的毒性(参见图1A和1B)。

[0077] 【实施例3:通过在转基因小鼠模型中施用CDR132L，对衰竭心脏的左心室反向重塑】

[0078] 3.1.研究目的：

[0079] 在心力衰竭小鼠模型中测试CDR132L在逆转心力衰竭中的功效。

[0080] 3.2.研究大纲：

[0081] 心脏肥大模型:心脏miR-132过表达的转基因(TG)小鼠(Ucar等,2012)。

[0082] 治疗:每周20mg/kg腹腔注射。CDR132L或安慰剂(参见图2A)。

[0083] 组:野生型(WT)同窝幼仔+安慰剂,WT+CDR132L,TG+安慰剂,TG+CDR132L。n＝6/组。

[0084] 通过qPCR检测到miR-132的表达水平。统计检验:未配对t检验(图2B)。

[0085] **p＜0.01,n＝6/组。

[0086] 3.3.结果：

[0087] 心脏的代表性超声心动图图像(图3A)。

[0088] CDR132L可逆转肥大，如通过心脏质量和舒张末期容积(LVEDV)测得(图3B)。

[0089] CDR132L改善了左心室大多数部分的区的收缩功能(AB，前底;AM，中前;AA，前尖;PA，后尖;PM，中后;和PB，后底)(图3C)。

[0090] 【实施例4:在MI后心力衰竭的小鼠模型中给予CDR132L】

[0091] 4.1.研究目的：

[0092] 在MI后心力衰竭的小鼠模型中测试CDR132L的功效。

[0093] 4.2.研究大纲：

[0094] 心肌梗塞(MI)小鼠模型:C57BL/6N小鼠中冠状动脉(LAD)永久结扎(Kolk等，2009)。

[0095] 组:接受CDR132L或安慰剂治疗的MI或假操作的

[0096] 治疗:心肌梗塞后第7天和第14天腹腔注射20mg/kg

[0097] 终点:心肌梗塞后第28天的LV功能。n＝6-7/组(图4)。

[0098] 4.3.结果：

[0099] CDR132L治疗可改善MI后左心室功能障碍(图5A)。

[0100] 心脏收缩功能的独立于负荷的参数也得到改善(图5B)(*p＜0.05)。

[0101] CDR132L治疗还可以改善纵向应变率(LSR)，从而逆转心脏远端区各个心脏节段的MI后收缩功能障碍(*p＜0.05)(图6)。

[0102] CDR123L治疗可有效沉默心脏组织，例如远端(非梗塞)区和梗塞周围区中miR-132的表达(图7A)。

[0103] 在组织学水平上，CDR132L减少了MI后心脏远端区的心肌细胞大小(图7B)。

[0104] 在组织水平，CDR132L降低MI后心脏中心脏应激信号ANP的表达(图7C)。

[0105] 【实施例5:在MI后心力衰竭的猪模型中测试CDR132L】

[0106] 5.1.研究目的：

[0107] 在心肌梗塞的临床相关模型中CDR132L的体内功效证明。

[0108] 5.2.研究设置：

[0109] • 90分钟缺血(LAD闭塞)和随后的再灌注引起的心肌梗塞的猪模型。

[0110] • 组：安慰剂或CDR132L，每组n＝6。

[0111] • 治疗：心肌梗塞后第3天和第28天两次，分别进行0.3mg/kg的冠状动脉内注射和0.5mg/kg的静脉内注射(图8)。

[0112] • 终点：心肌梗塞后8周。主要结局指标：EF和LV重塑。

[0113] 5.3.结果：

[0114] • 通过测量舒张末期容积，收缩期末容积，射血分数和左心室功能来确定，CDR132L治疗可避免适应不良重塑并改善功能(图9A～D)。

[0115] • CDR132L治疗可改善对应于存活/远端心肌的节段的节段收缩性；终点的心脏MRI：n＝6/组，红色区：p＜0.05(图9E)。

[0116] • CDR132L治疗可避免适应不良重塑并提高心尖区的LV活力(由NOGA确定)，终点的电解剖图绘制：n＝6/组，安慰剂与CDR132L相比：p＜0.05(图10)。

[0117] • CDR132L使组织的表达正常化。

[0118] • ANP和BNP中的病理性心力衰竭标志物，并改变了肌球蛋白的重度变化亚型，即MYH7/6比(图11)。

[0119] • 在组织学水平上，CDR132L治疗可有效减少远端LV区的心肌肥大(代表LV区的显微图像(WGA/DAPI染色20×)(图12A)和图示(图12B)，n＝6/组，安慰剂vs CDR132L：p＜0.05。

[0120] 【实施例6：猪中PD132的PD概况/靶标参与】

[0121] 6.1.研究设置：

[0122] • 治疗：1×，第0天，0.5mg/kg或5mg/kg冠状动脉内灌注，n＝3头猪/组，安慰剂vs CDR132L：p＜0.05。

[0123] • 在终点(治疗后24h)进行qPCR组织miRNA分析。

[0124] 6.2.结果：

[0125] • 单剂量的CDR132L治疗剂量依赖性地沉默心脏miR-132的水平(图13)。

[0126] 【实施例7：器官毒理学分析】

[0127] 7.1.研究设置：

[0128] • 治疗：心肌梗塞后第3天和第28天两次，分别进行0.3mg/kg的冠状动脉内注射和0.5mg/kg的静脉内注射。

[0129] • 连续采血，终点：治疗后72h，n＝6头猪/组，安慰剂vs CDR132L：p＜0.05。

[0130] 7.2.结果：

[0131] • 体内CDR132L治疗不会引起猪的任何器官毒性(图14)。

[0132] 【实施例8：心力衰竭小鼠模型中FoxO3和SERCA2 mRNA的心脏水平】

[0133] 每周4次，在腹膜内注射对照加扰寡核苷酸或CDR132L的对照组和miR-132TG小鼠中，测量心脏FoxO3和Serca2 mRNA的水平。所有值代表平均值±SEM。*P＜0.05(图15A和15B)。

[0134] 【实施例9:不同寡核苷酸的比较】

[0135] 该研究的目的是用2个比较寡核苷酸评估根据本发明的新型miR-132-3p抑制剂CDR132L的治疗效果。2个比较寡核苷酸显示出与CDR132L相同的寡核苷酸序列和硫代磷酸酯骨架,但是在LNA构件在分子中的分布上不同。CDR2u1在5'和3'末端带有2个LNA构件,而对于CDR301,每个核苷酸均带有一个LNA构件。

[0136] 为了测试效率,将不同的寡核苷酸施用于新生大鼠心肌细胞(NRCM)。在miR-132-3p及其已知靶基因FoxO3(Forkhead box O3)的表达发生变化后,通过定量实时PCR(qRT-PCR)监测该治疗的效果。

[0137] 实验设计和结果如图16所示:(A)实验设置概述。在第0天接种新生大鼠心肌细胞,并在第1天用寡核苷酸CDR132L,CDR2u1或CDR301(各100nM)处理。在终点,收获细胞用于基因表达分析。(B)用CDR132L,CDR2u1或CDR301处理后,miR-132-3p的表达水平。(C)用CDR132L,CDR2u1或CDR301处理后,miR-132-3p靶基因Forkhead box O3(FoxO3)的表达水平。数据是平均值±SD。通过双尾Student氏t检验确定寡核苷酸相对于安慰剂的P值。

[0138] 用CDR132L和CDR301处理NRCM导致miR-132-3p水平显著降低96%,而CDR2u1将miRNA表达降低30%(图16A-B)。此外,用CDR132L处理导致miR-132-3p靶基因Foxo3的显著降低,而用CDR2u1和CDR301则不能实现(图16C)。

[0139] 总而言之,我们的数据表明,与CDR2u1和CDR301相比,CDR132L具有更好的抑制作用,这通过显著降低miR-132-3p表达水平并显著抑制其靶基因FoxO3来表明。

[0140] 【实施例10:CDR132L在心脏纤维化中的作用】

[0141] 该研究的目的是评估CDR132L在纤维化的体内模型中的抗纤维化治疗作用。

[0142] 为了在体内证明抗纤维化活性,使用了C57BL/6N小鼠中永久左前降支冠状动脉(LAD)结扎的心肌梗塞(MI)小鼠模型。在第7和14天安慰剂(CDR132L的加扰寡核苷酸类似物,20mg/kg)和CDR132L(20mg/kg)进行CDR132L处理。组包括接受安慰剂或CDR132L的对照组(假操作的小鼠)和LAD结扎的小鼠(MI,心肌梗塞):假操作的+安慰剂,假操作的+CDR132L,MI+安慰剂,MI+CDR132L。n=6-7/组。实验设计如图17所示。

[0143] 评估CDR132L在MI后心力衰竭的体内抗纤维化作用的结果如图18所示。MI后通过用CDR132L处理减弱了纤维化(显示为相对于β-肌动蛋白的通过Picro-Sirius红(PSR)染色和III型胶原蛋白α1链(Col3a1)基因表达检测到的胶原蛋白沉积的百分比)。组包括接受安慰剂(黑柱)或CDR132L(白柱)的对照组(假操作的小鼠)和LAD结扎小鼠(MI):假操作的+安慰剂,假操作的+CDR132L,MI+安慰剂,MI+CDR132L。在用安慰剂或CDR132L治疗的MI小鼠之间进行了统计学检验(未配对t检验)。**p<0.01,n=6-7/组。

[0144] 根据组织学结果,在CDR132L治疗后纤维化减弱(图18A)。这在分子水平上得到了证实,纤维化标记物(如III型胶原蛋白α1链(Col3a1))的基因表达降低了(图18B)。

[0145] 【实施例11:CDR132L在肺和肝纤维化中的作用】

[0146] 在肺和肝纤维化的体外模型中测试了CDR132L的抗纤维化作用。为此,用促纤维化剂刺激源自肝脏(人原代肝成纤维细胞,HPLF,PeloBiotech)和肺(正常人原代肺成纤维细胞,NHLF,Lonza)的人原代成纤维细胞,并用CDR132L处理。通过遵循下列在纤维化途径内的关键过程监测CDRL132L的治疗作用,这些过程包括增殖速率和终点处纤维化标记基因表达的改变。另外,评估miR-132-3p的表达以证明有效的CDR132L治疗。

[0147] 为了确定细胞增殖,使用了细胞增殖ELISA(酶联免疫吸附测定)试剂盒(由Roche提供)。该比色测定法可基于对掺入到新合成的增殖细胞DNA中的BrdU(溴脱氧尿嘧啶)的测量来定量细胞增殖。已检测到并定量了BrdU的掺入量。吸光度值直接与DNA的合成量相关,因此与各个微培养物中增殖细胞的数量直接相关。基因表达已使用定量实时PCR(qRT-PCR)评估了miR-132-3p和纤维化标记物(包括胶原1A1(COL1A1),胶原1A2(COL1A2)和基质金属肽酶2(MMP2))的表达水平。

[0148] 图19涉及肝纤维化的体外模型:(A)实验设置的概述。在第0天接种人原代肝成纤维细胞(由PeloBiotech提供),并在第1天用纤维化刺激物(在正常生长培养基(补充有10%的FBS的完全成纤维细胞培养基)中以10ng/ml的TGF-β)和CDR132L(100nM)处理。在终点,已经评估了细胞增殖和纤维化标记物的基因表达。(B)用CDR132L处理后miR-132-3p的表达水平。(C)通过在DNA合成过程中监测BrdU(溴脱氧尿嘧啶)的掺入来评估增殖。在终点前20小时将BrdU试剂添加到培养基中。(D)纤维化标记基因(胶原蛋白1A1(COL1A1),胶原蛋白1A2(COL1A2)和基质金属肽酶2(MMP2))的表达水平。在(B)和(D)中,虚线表示未刺激的对照细胞的表达水平。数据是平均值±SD。通过双尾Student氏t检验确定CDR132L相对于对照的P值。

[0149] 用转化生长因子β(TGF-β)刺激HPLF(图19A)导致miR-132-3p的轻微诱导,其被CDR132L治疗显著降低(图19B)。此外,该化合物减少了成纤维细胞增殖(图19C)和包括COL1A1,COL1A2和MMP2在内的纤维化基因表达(图19D)。

[0150] 图20涉及肺纤维化的体外模型:(A)实验设置的概述。在第0天接种正常人肺成纤维细胞(由Lonza提供),并在第1天用纤维化刺激物(高FBS(在成纤维细胞生长培养基中5%))和CDR132L(100nM)处理。在终点,已评定细胞增殖和基因表达。(B)用CDR132L处理后miR-132-3p的表达水平。(C)通过监测DNA合成过程中BrdU(溴脱氧尿嘧啶)的掺入评估增殖。BrdU试剂已在终点检测前20小时添加到培养基中。在(B)中,虚线表示未刺激的对照细胞的表达水平。数据为平均值±SD。CDR132L相对于对照的P值通过两尾Student氏t检验确定。

[0151] 在NHLF细胞中,在用高FBS(与2%的FBS的正常生长条件相比为5%)进行纤维化刺激后(图20A),未观察到miR-132-3p的升高(图20B)。然而,用CDR132L处理导致靶向的微小RNA的显著减少(图20B)和成纤维细胞增殖(图20C)。

[0152] 总之,我们的数据证明寡核苷酸类似物CDR132L在肝或肺来源的成纤维细胞以及心脏组织中具有显著的抗纤维化作用。我们认为这种作用可能是基于药物的抗增殖能力,和/或其对细胞外基质蛋白表达的影响。

[0153] 【参考文献】

[0154] 1.Barry,S.P.;Townsend,P.A.(2010).What causes a broken heart-Molecular insights into heart failure.Int Rev Cell Mol Biol 284,113-179.

[0155] 2.Datta,S.R.;Brunet,A.;Greenberg,M.E.(1999).Cellular survival:a play in three Akts.Genes Dev.13,2905-2927.

[0156] 3.DeBosch,B.J.;Muslin,A.J.(2008).Insulin signaling pathways and cardiac growth.J Mol Cell Cardiol.44,855-864.

[0157] 4.Frescas,D.;Valenti,L.;Accili,D.(2005).Nuclear trapping of the

forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt1-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes.J Biol Chem.280,20589-20595.

[0158] 5.Glas,D.J.(2010).PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy.Curr Top Microbiol Immunol.346,267-278.

[0159] 6.Gottlieb,R.A.;Gustafsson,A.B.(2011).Mitochondrial turnover in the heart.Biochim Biophys Acta.1813,1295-1301.

[0160] 7.Kolk,M.V.;Meyberg,D.;DenseT.;Tang-Quam,K.R.;Robbins R.C.;Reichenspurner,H.;Schrepfer.S(2009),J.Vis Exp.32,pii:1438.doi:103791/1438

[0161] 8.McMullen,J.R.;Shioi,T.;Huang,W.Y.;Zhang,L.;Tarnavski,O.;Bisping,E.;Schinke,M.;Kong,S.;Sherwood,M.C.;Brown,J.et al.(2004).The insulin-like growth factor 1receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha)pathway.J Biol Chem.279,4782-4793.

[0162] 9.Ni,Y.G.;Berenji,K.;Wang,N.;Oh,M.;Sachan,N.;Dey,A.;Cheng,J.;Lu,G.;Morris,D.J.;Castrillon,D.H.et al.(2006).Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling.Circulation.114,1159-1168.

[0163] 10.Ronnebaum,S.M.;Patterson,C.(2010).The foxO family in cardiac function and dysfunction.Annu Rev Physiol.72,81-94.

[0164] 11.Skurk,C.;Izumiya,Y.;Maatz,H.;Razeghi,P.;Shiojima,I.;Sandri,M.;Sato,K.;Zeng,L.;Schiekofer,S.;Pimentel,D.et al.(2005).The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling.J Biol Chem.280,20814-23.

[0165] 12.Ucar,A.et al.(2012),Nat.Commun.3:1078.doi:10.1038/ncomms2009.

[0001] 序列表

[0002] <110> Medizinische Hochschule Hannover

[0003] <120> 治疗心力衰竭的改良化合物

[0004] <130> 65069PWO

[0005] <140> EP17207738

[0006] <141> 2017-12-15

[0007] <160> 3

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 16

[0011] <212> DNA

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 抑制剂

[0015] <220>

[0016] <221> misc_feature

[0017] <222> (1)..(16)

[0018] <223> G或T中的至少一个是桥接的和/或吗啉代构件

[0019] <400> 1

[0020] atggctgtag actgtt 16

[0021] <210> 2

[0022] <211> 16

[0023] <212> DNA

[0024] <213> 人工序列

[0025] <220>

[0026] <223> 抑制剂

[0027] <220>

[0028] <221> misc_feature

[0029] <222> (2)..(2)

[0030] <223> 桥接的或吗啉代构件

[0031] <220>

[0032] <221> misc_feature

[0033] <222> (4)..(4)

[0034] <223> 桥接的或吗啉代构件

[0035] <220>

[0036] <221> misc_feature

[0037] <222> (6)..(6)

[0038] <223> 桥接的或吗啉代构件

[0039] <220>

[0040] <221> misc_feature

[0041] <222> (8)..(8)

[0042] <223> 桥接的或吗啉代构件

[0043] <220>

[0044] <221> misc_feature

[0045] <222> (10)..(10)

[0046] <223> 桥接的或吗啉代构件

[0047] <220>

[0048] <221> misc_feature

[0049] <222> (15)..(15)

[0050] <223> 桥接的或吗啉代构件

[0051] <220>

[0052] <221> misc_feature

[0053] <222> (16)..(16)

[0054] <223> 桥接的或吗啉代构件

[0055] <400> 2

[0056] atggctgtag actgtt 16

[0057] <210> 3

[0058] <211> 16

[0059] <212> DNA

[0060] <213> 人工序列

[0061] <220>

[0062] <223> CDR132L

[0063] <220>

[0064] <221> misc_feature

[0065] <222> (1)..(1)

[0066] <223> 2'脱氧腺苷

[0067] <220>

[0068] <221> misc_feature

[0069] <222> (1)..(15)

[0070] <223> 硫逐磷酸酯键

[0071] <220>

[0072] <221> misc_feature

[0073] <222> (2)..(2)

[0074] <223> LNA构件

[0075] <220>

[0076] <221> misc_feature

[0077] <222> (3)..(3)

[0078] <223> 2’脱氧鸟苷

[0079] <220>

[0080] <221> misc_feature

[0081] <222> (4)..(4)

[0082] <223> LNA构件

[0083] <220>

[0084] <221> misc_feature

[0085] <222> (5)..(5)

[0086] <223> 2’脱氧胞苷

[0087] <220>

[0088] <221> misc_feature

[0089] <222> (6)..(6)

[0090] <223> LNA构件

[0091] <220>

[0092] <221> misc_feature

[0093] <222> (7)..(7)

[0094] <223> 2’脱氧鸟苷

[0095] <220>

[0096] <221> misc_feature

[0097] <222> (8)..(8)

[0098] <223> LNA构件

[0099] <220>

[0100] <221> misc_feature

[0101] <222> (9)..(9)

[0102] <223> 2’脱氧腺苷

[0103] <220>

[0104] <221> misc_feature

[0105] <222> (10)..(10)

[0106] <223> LNA构件

[0107] <220>

[0108] <221> misc_feature

[0109] <222> (11)..(11)

[0110] <223> 2’脱氧腺苷

[0111] <220>

[0112] <221> misc_feature

[0113] <222> (12)..(12)

[0114] <223> 2’脱氧胞苷

[0115] <220>

[0116] <221> misc_feature

[0117] <222> (13)..(13)

[0118] <223> 胸苷

[0119] <220>

[0120] <221> misc_feature

[0121] <222> (14)..(14)

[0122] <223> 2'脱氧鸟苷

[0123] <220>

[0124] <221> misc_feature

[0125] <222> (15)..(16)

[0126] <223> LNA构件

[0127] <400> 3

[0128] atggctgtag actgtt 16

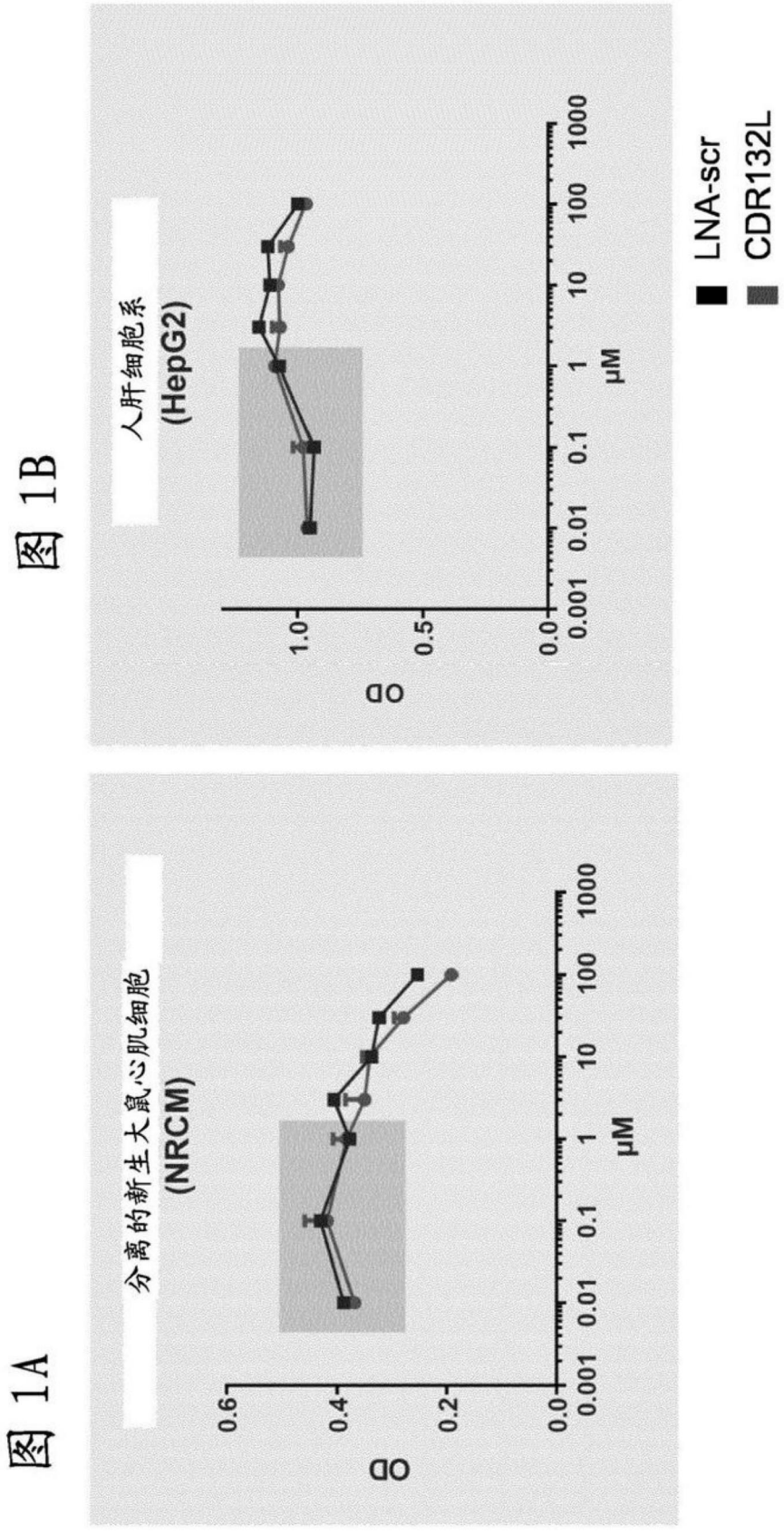

图 1A
分离的新生大鼠心肌细胞
(NRCM)
OD
0.0
0.2
0.4
0.6
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
μM
图 1B
人肝细胞系
(HepG2)
OD
0.0
0.5
1.0
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
μM
LNA-scr
CDR132L

图1

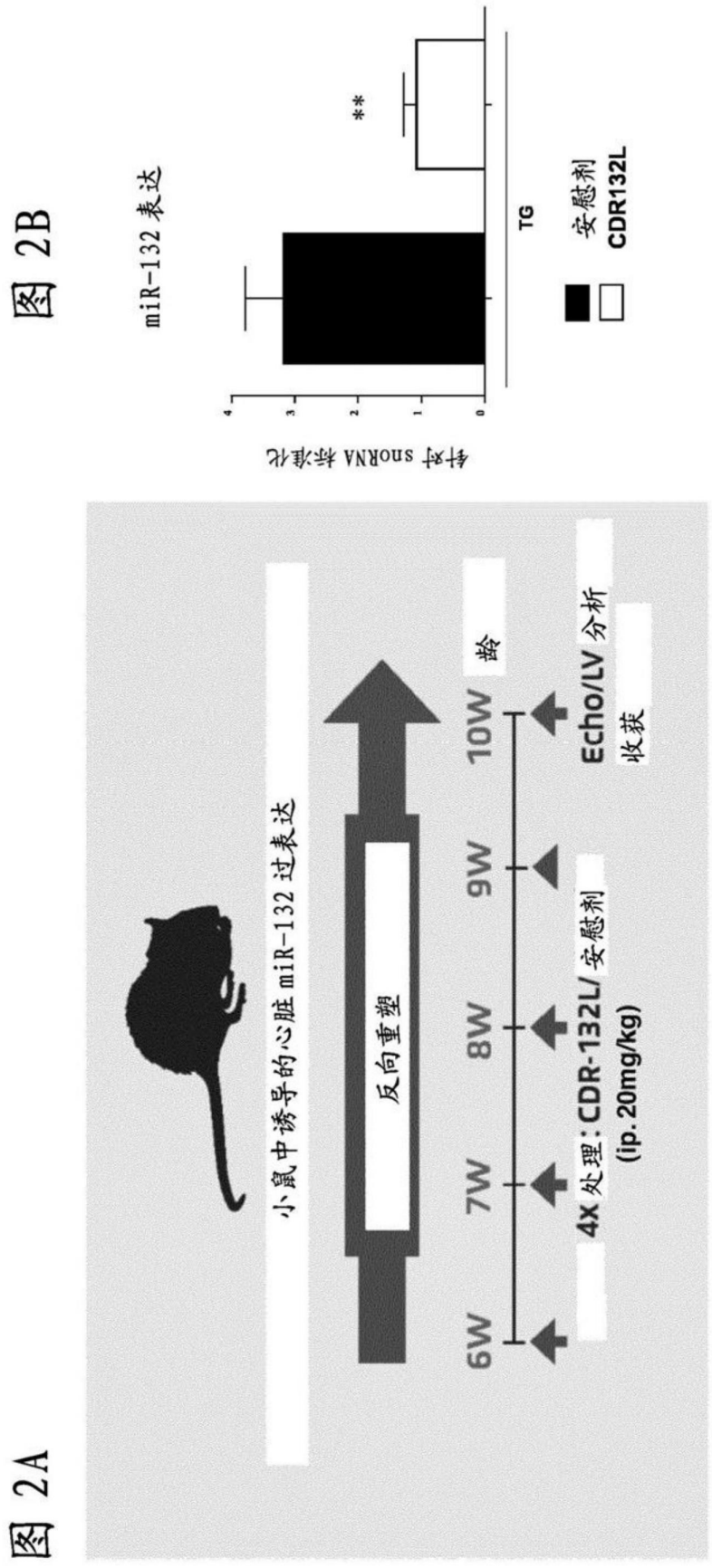

图 2B
miR-132 表达
**
TG
安慰剂
CDR132L
针对 snoRNA 标准化
图 2A
小鼠中诱导的心脏 miR-132 过表达
反向重塑
6W
7W
8W
9W
10W
龄
4X 处理：CDR-132L/ 安慰剂
(ip. 20mg/kg)
Echo/LV 分析
收获

图2

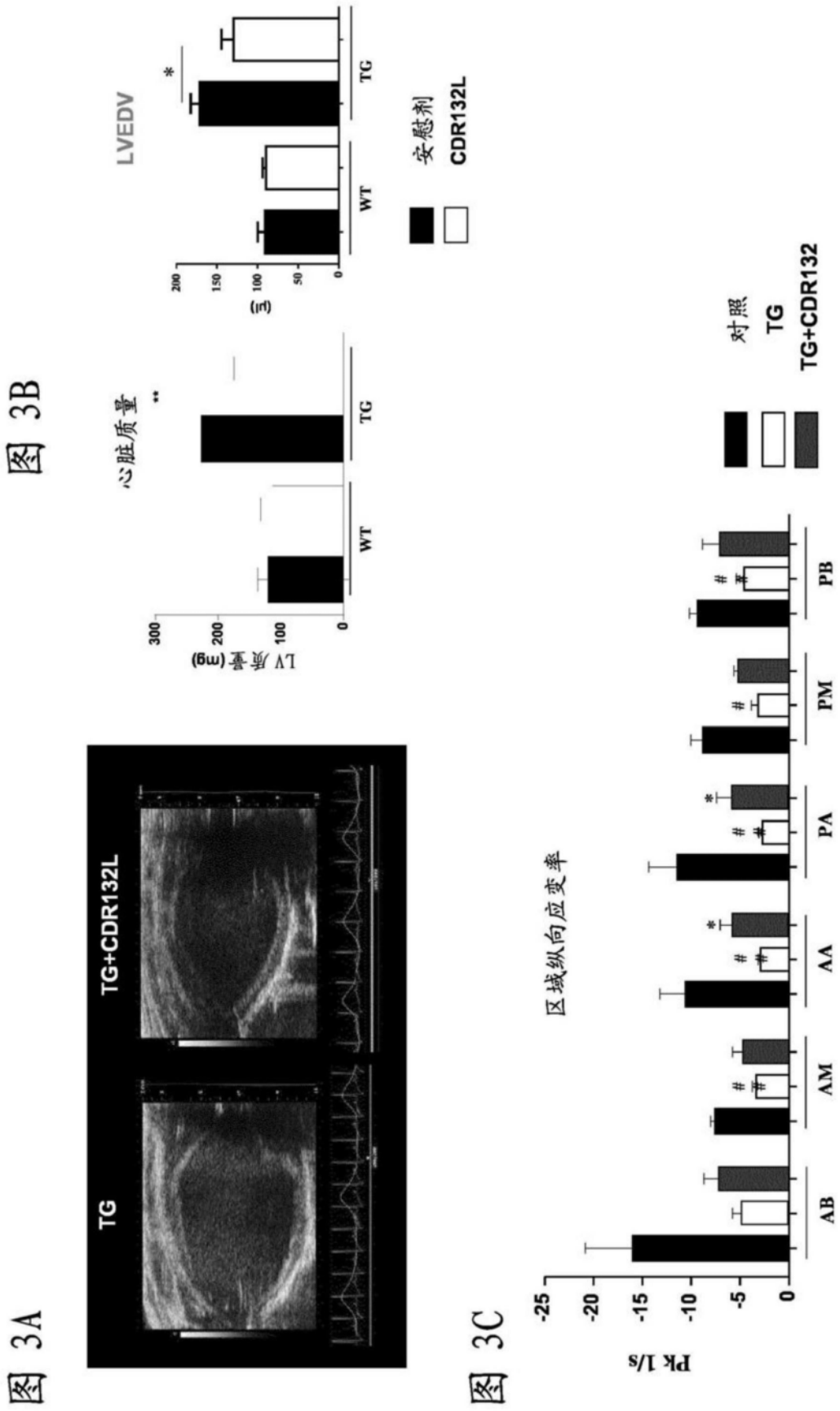

图 3A
TG
TG+CDR132L
图 3B
心脏质量
LV 质量 (mg)
WT
TG
LVEDV
(μl)
安慰剂
CDR132L
图 3C
区域纵向应变率
PK 1/s
对照
TG
TG+CDR132
AB
AM
AA
PA
PM
PB

图3

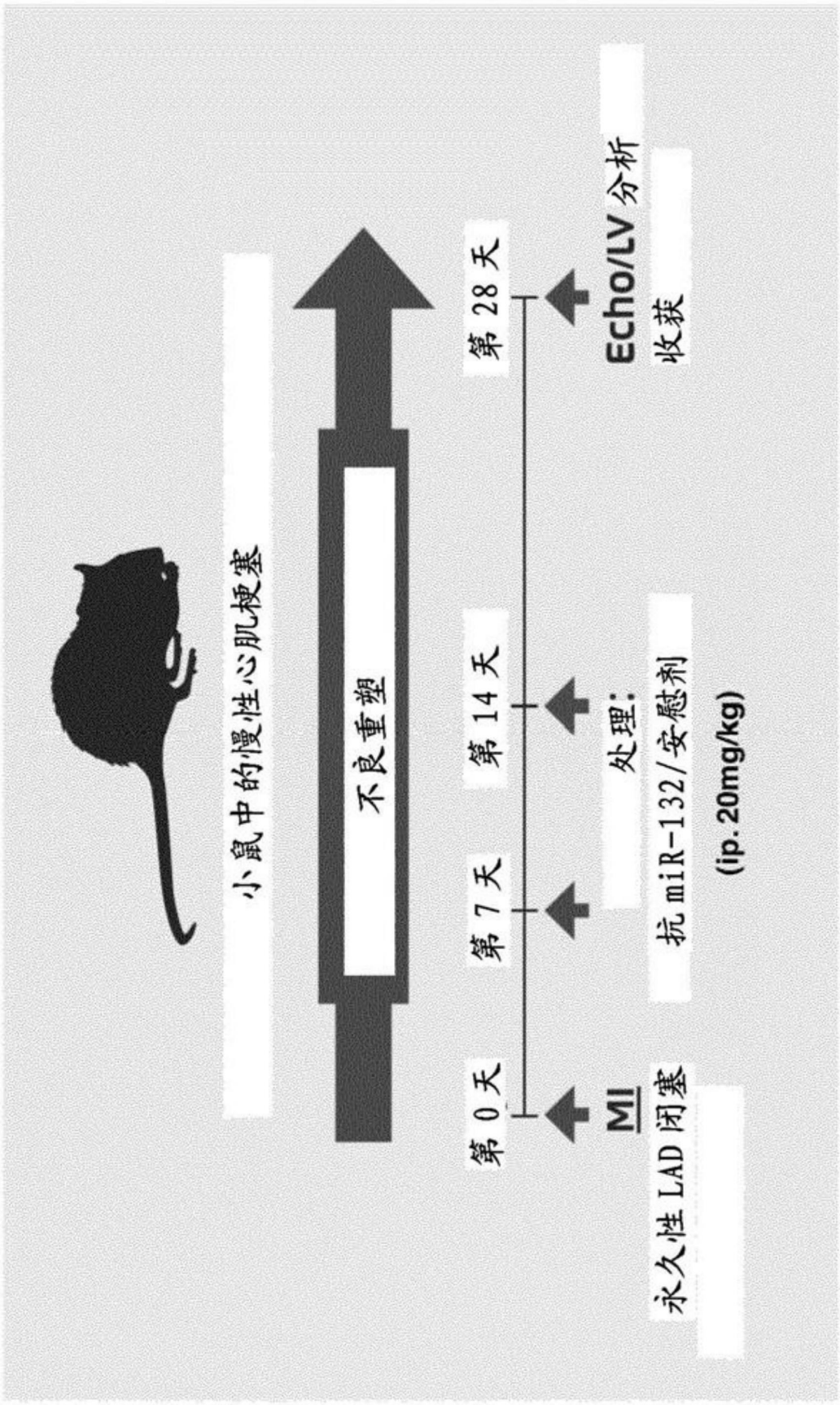

小鼠中的慢性心肌梗塞
不良重塑
第 0 天
第 7 天
第 14 天
第 28 天
MI
处理:
Echo/LV 分析
收获
永久性 LAD 闭塞
抗 miR-132/安慰剂
(ip. 20mg/kg)

图4

图 5A

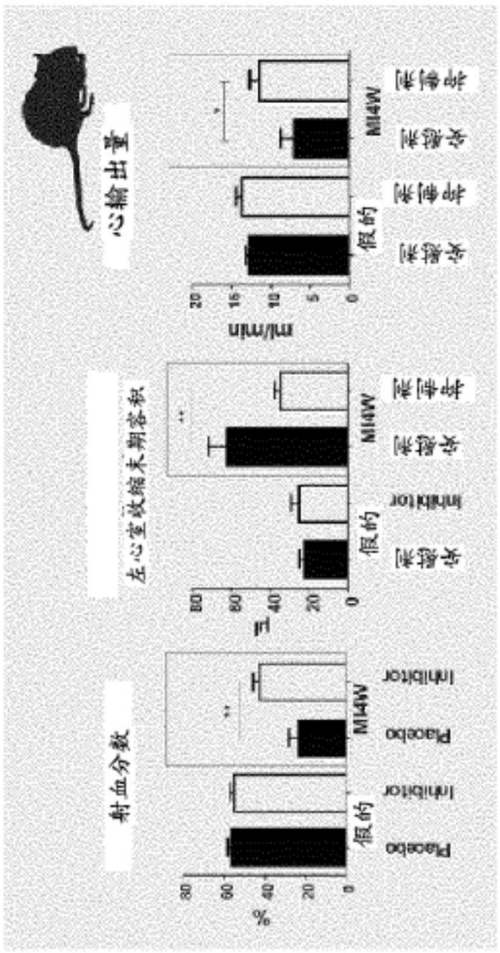
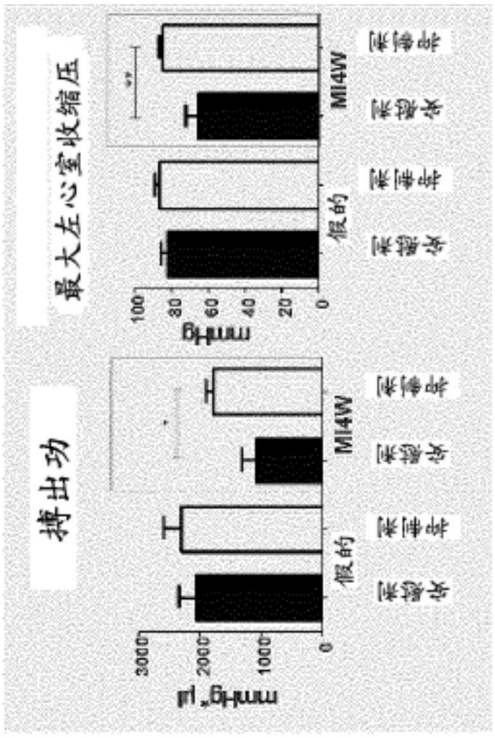

射血分数
%
Placebo
Inhibitor
Placebo
MI4W
Inhibitor
左心室收缩末期容积
ml
假的
Inhibitor
对照剂
MI4W
抑制剂
心输出量
ml/min
假的
对照剂
MI4W
抑制剂

图 5B


搏出功
mmHg*ml
假的
对照剂
MI4W
抑制剂
最大左心室收缩压
mmHg
假的
对照剂
MI4W
抑制剂

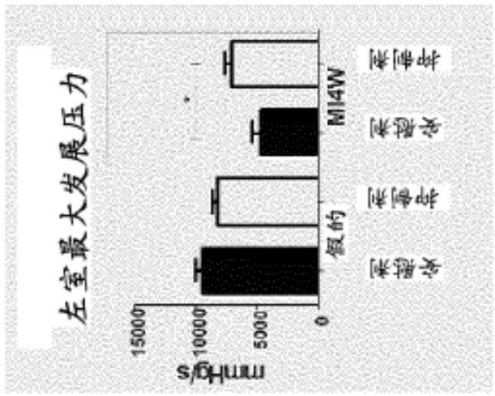

左室最大发展压力
mmHg/s
假的
对照剂
MI4W
抑制剂

图5

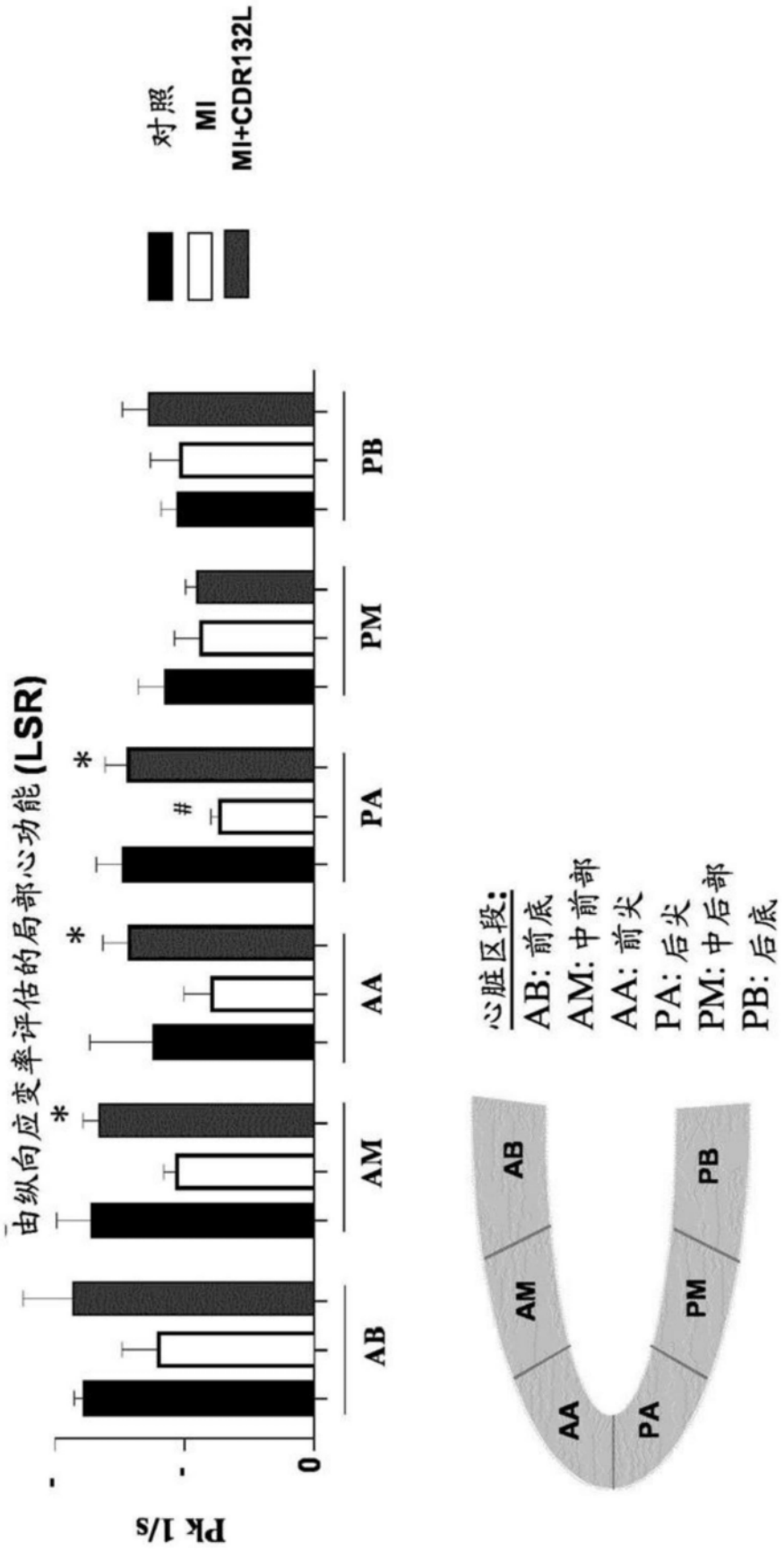

对照
MI
MI+CDR132L
由纵向应变率评估的局部心功能 (LSR)
PK 1/s
0
-
-
AB
AM
AA
PA
PM
PB
*
*
*
#
心脏区段:
AB: 前底
AM: 中前部
AA: 前尖
PA: 后尖
PM: 中后部
PB: 后底

图6

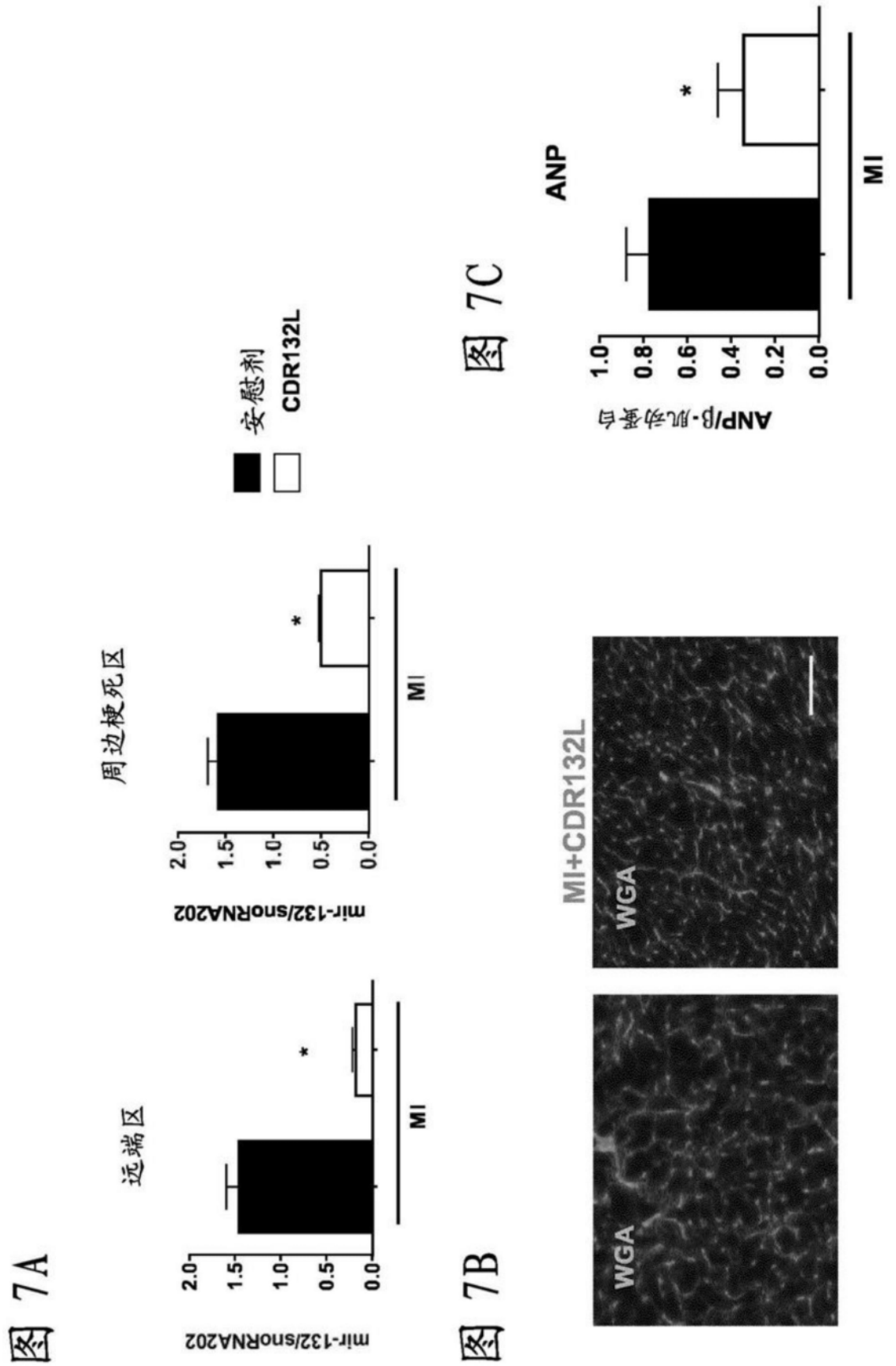

图 7A
远端区
miR-132/snoRNA202
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
MI
周边梗死区
miR-132/snoRNA202
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
MI
安慰剂
CDR132L
图 7B
WGA
MI+CDR132L
WGA
图 7C
ANP
ANP/β-肌动蛋白
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
MI

图7

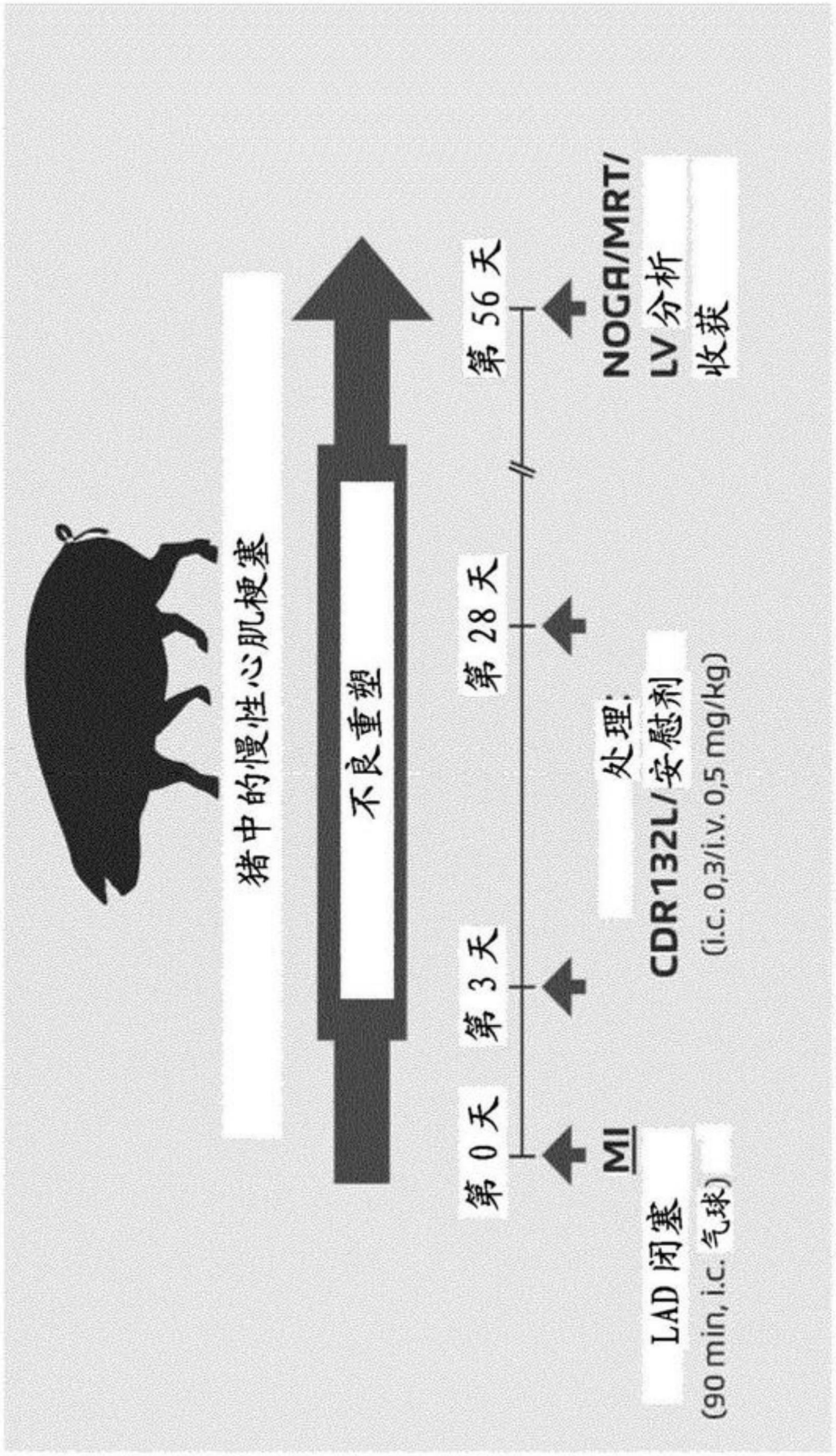

猪中的慢性心肌梗塞
不良重塑
第 0 天
第 3 天
第 28 天
第 56 天
MI
LAD 闭塞
(90 min, i.c. 气球)
处理:
CDR132L/安慰剂
(i.c. 0,3/i.v. 0,5 mg/kg)
NOGA/MRT/
LV分析
收获

图8

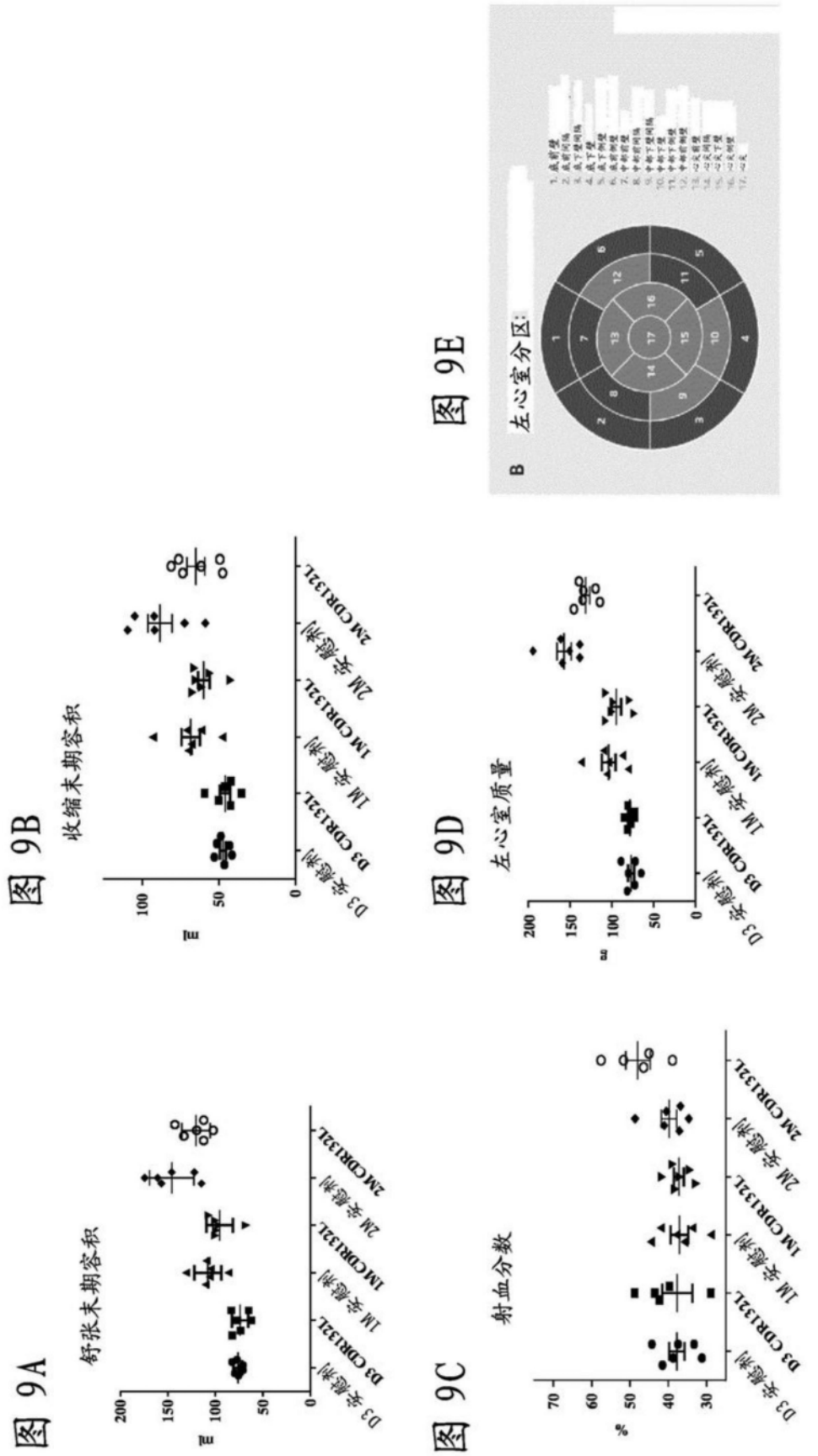

图 9A
舒张末期容积
D3 安慰剂
D3 CDR132L
1M 安慰剂
1M CDR132L
2M 安慰剂
2M CDR132L
图 9B
收缩末期容积
图 9C
射血分数
图 9D
左心室质量
图 9E
B 左心室分区:

图9

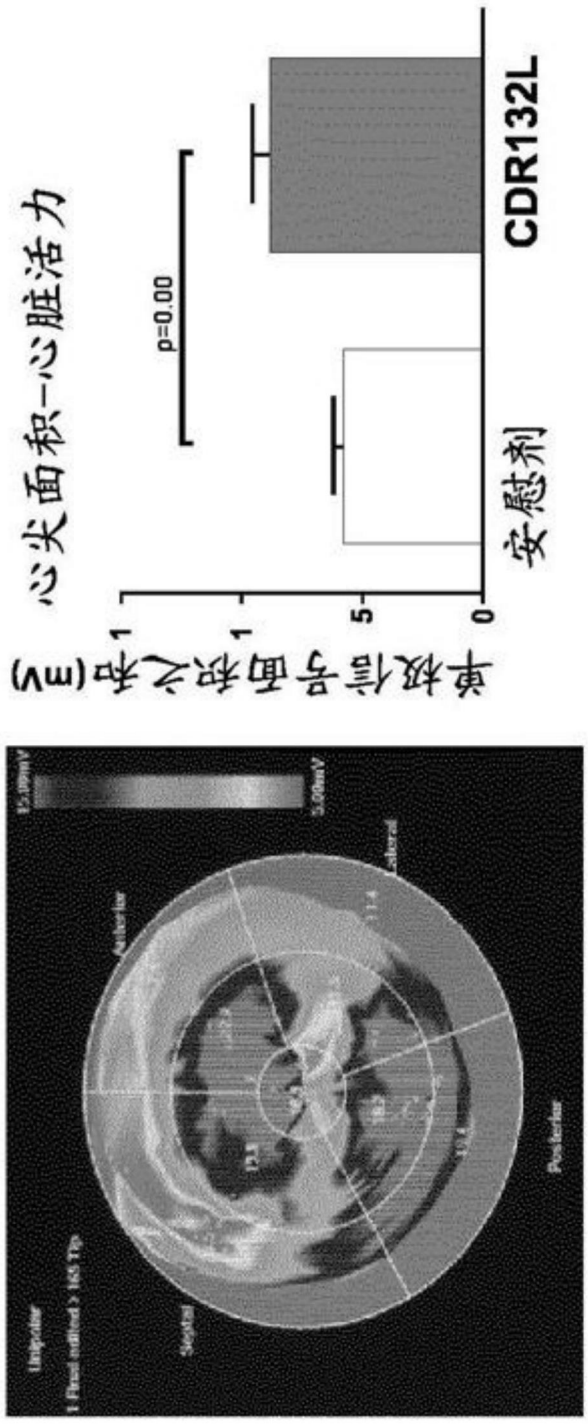

心尖面积-心脏活力
单极信号面积之和(mV)
p=0.00
CDR132L
安慰剂
0
5
1
1
Anterior
Lateral
Posterior
Septal
Inferior

图10

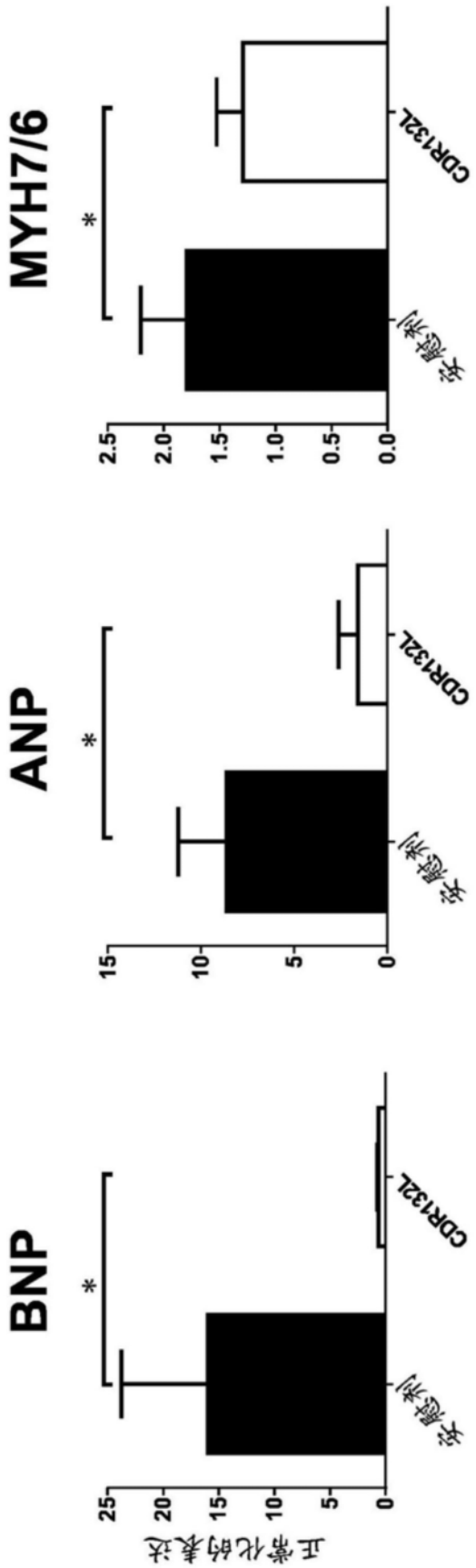

MYH7/6
ANP
BNP
*
*
*
安慰剂
CDR132L
安慰剂
CDR132L
安慰剂
CDR132L
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0
5
10
15
0
5
10
15
20
25
正常化的表达

图11

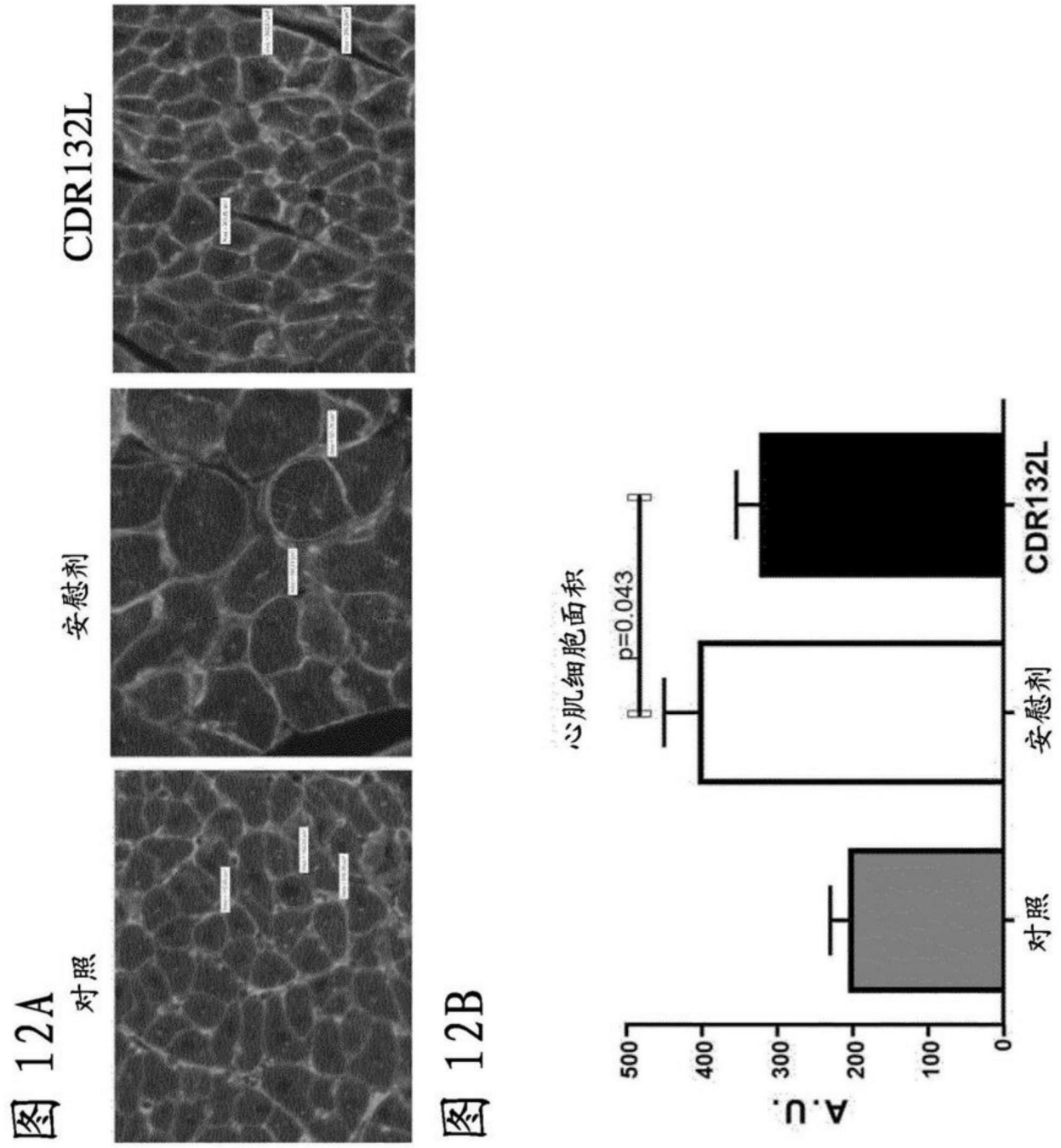


图12A 图12B

图12

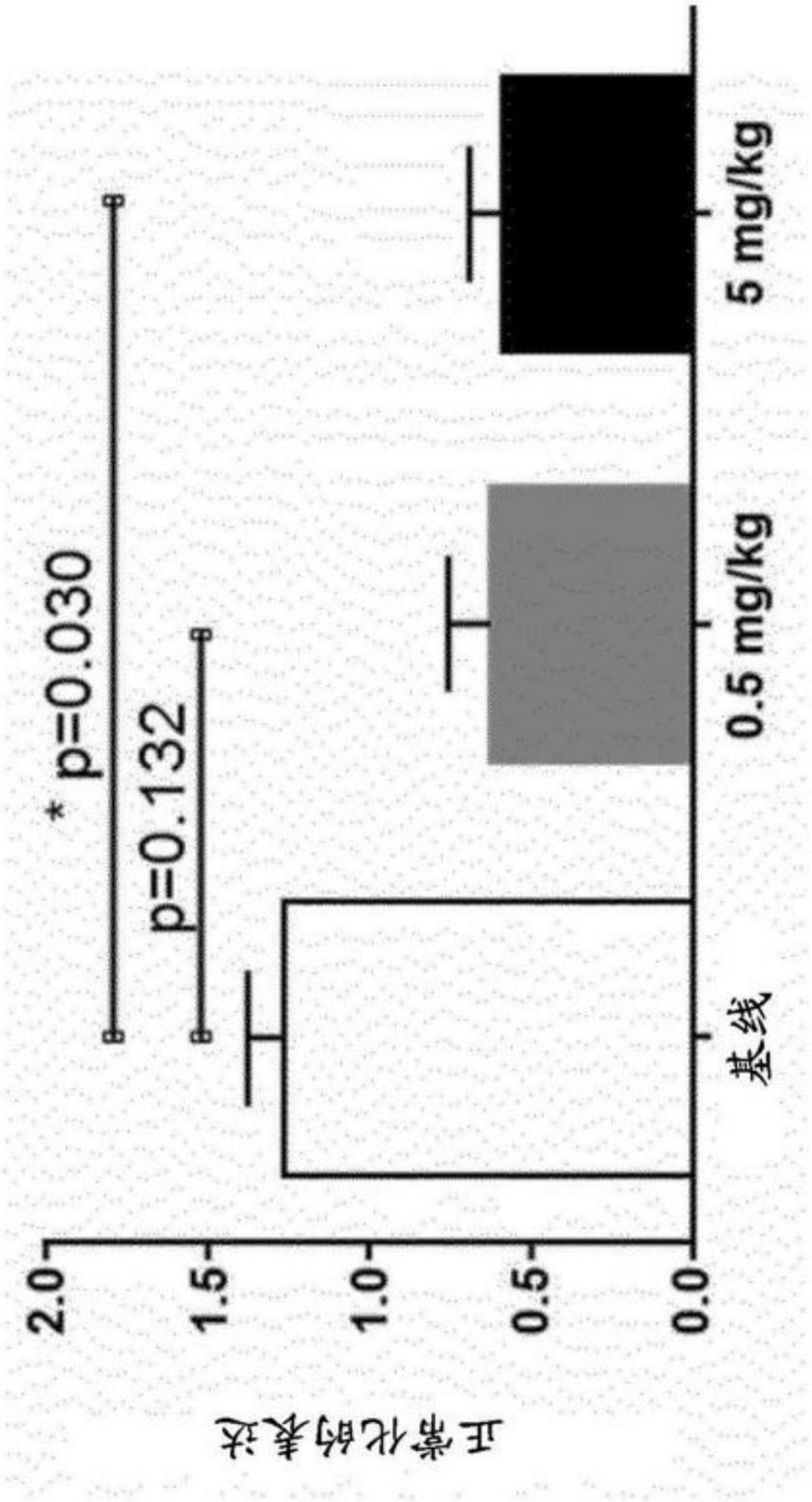


图13

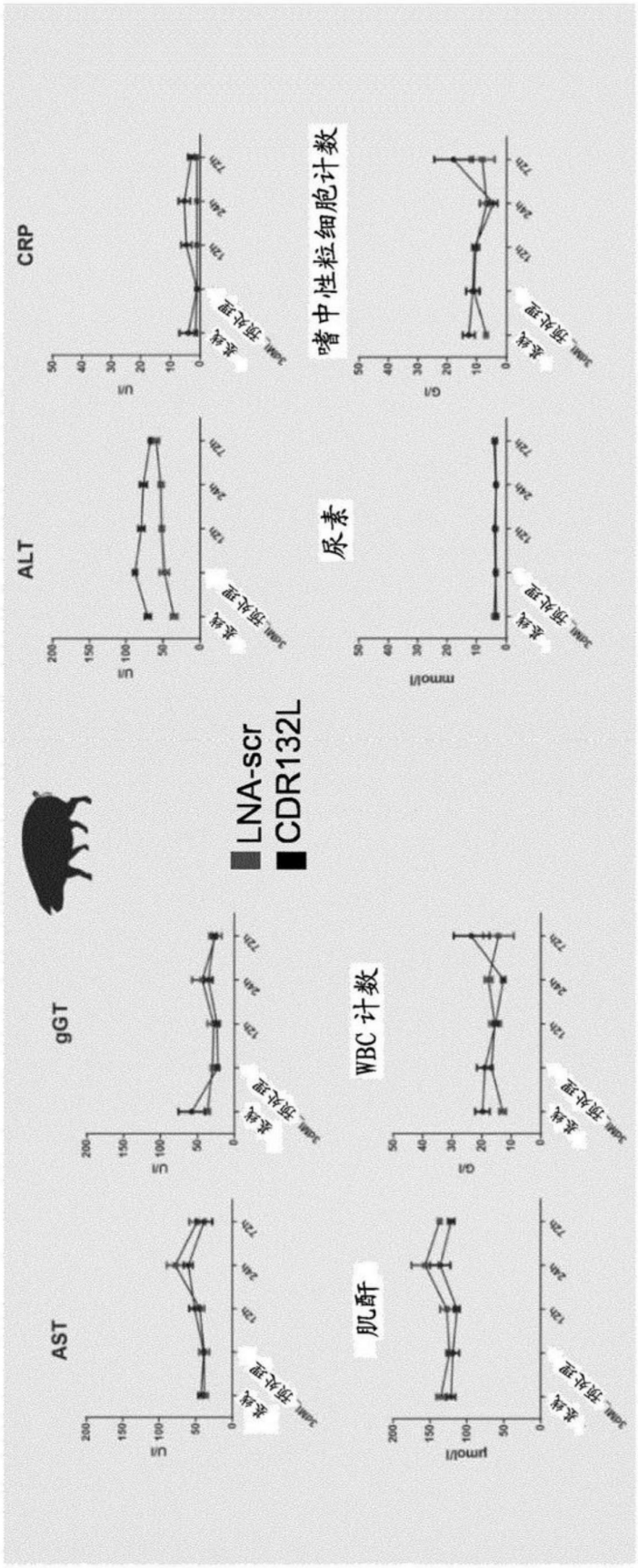

AST
gGT
ALT
CRP
肌酐
WBC 计数
尿素
嗜中性粒细胞计数
LNA-scr
CDR132L
基线
预处理
3dpM
2dpi
12h
7dpi

图14

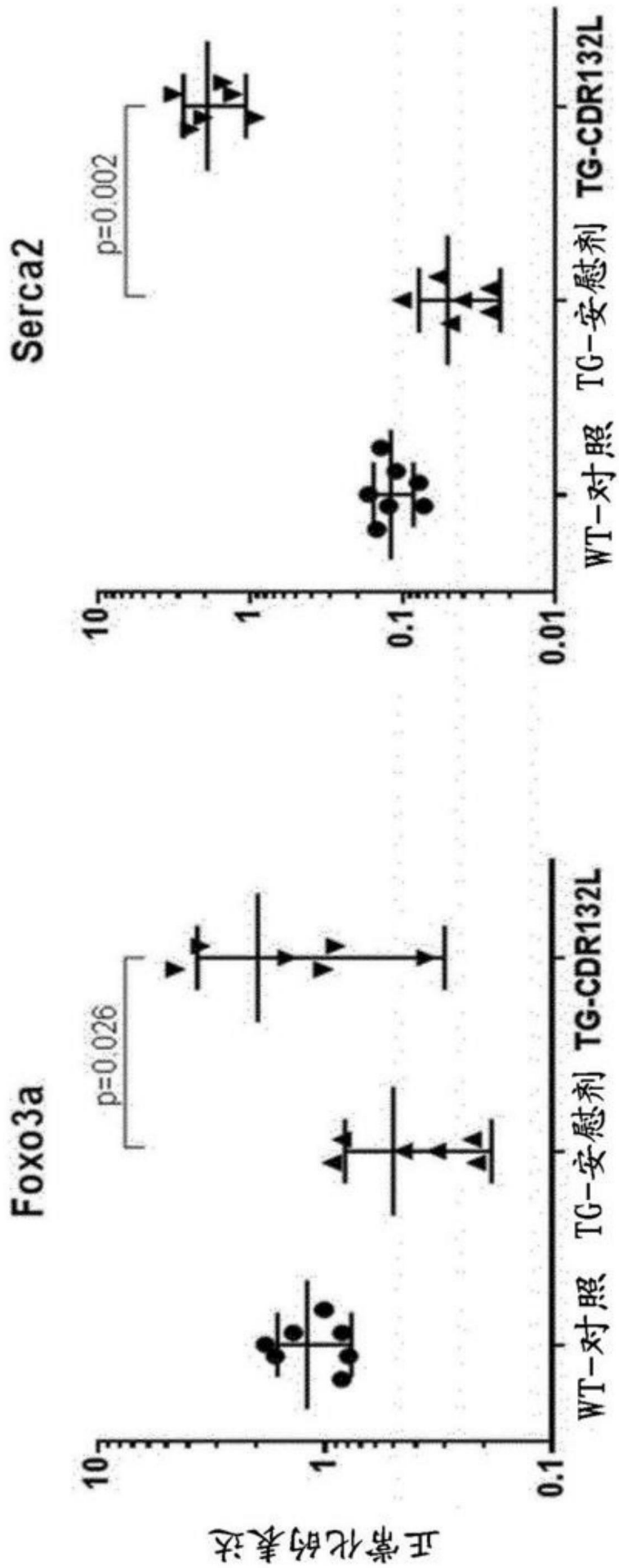

Foxo3a
p=0.026
Serca2
p=0.002
正常化的表达
10
1
0.1
0.01
WT-对照
TG-安慰剂
TG-CDR132L

图15

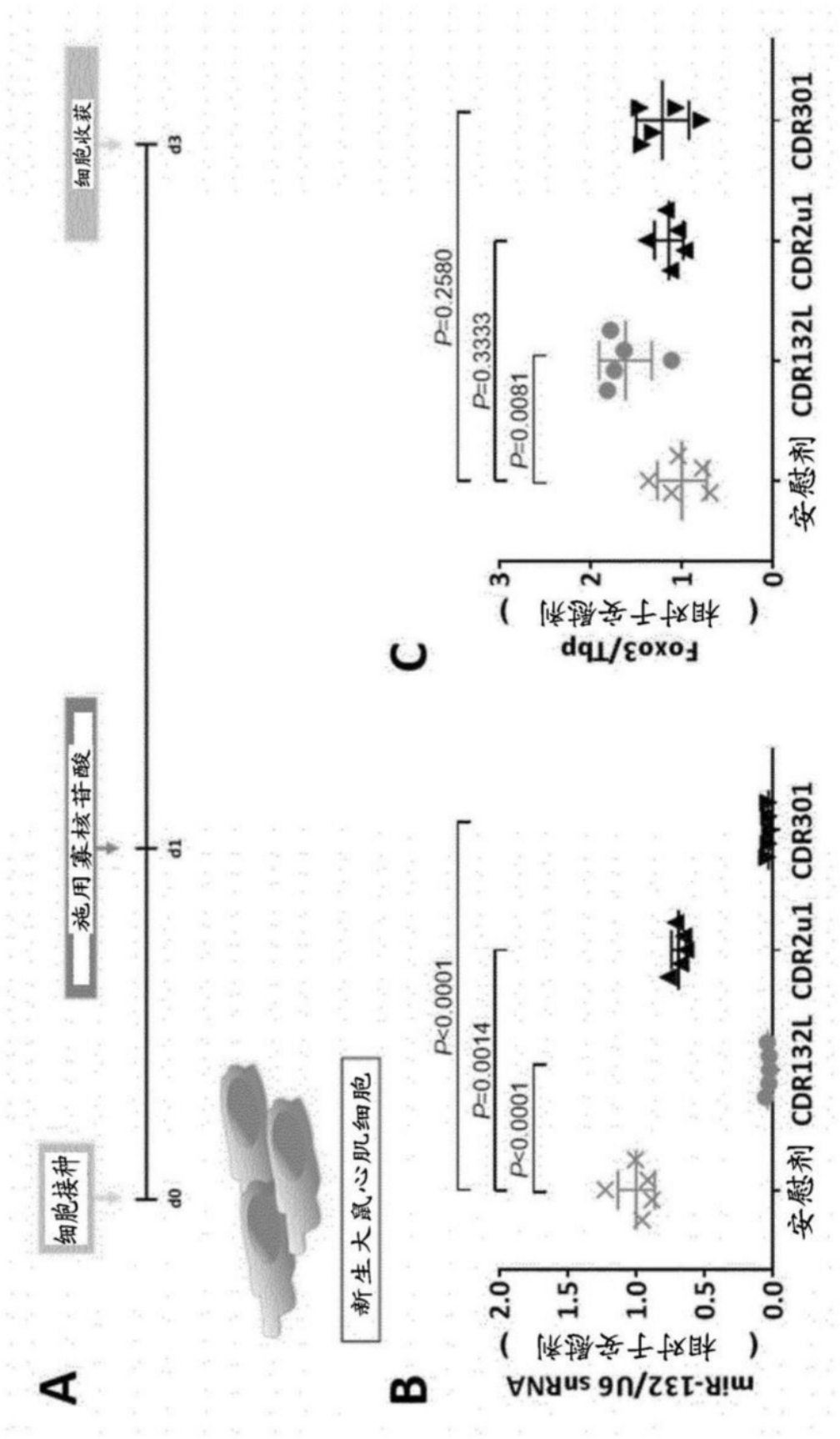

A
细胞接种
施用赛核苷酸
细胞收获
d0
d1
d3
新生大鼠心肌细胞
B
miR-132/U6 snRNA
相对于对照
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
P<0.0001
P=0.0014
P<0.0001
安慰剂
CDR132L
CDR2u1
CDR301
C
Foxo3/Tbp
相对于对照
3
2
1
0
P=0.2580
P=0.3333
P=0.0081
安慰剂
CDR132L
CDR2u1
CDR301

图16

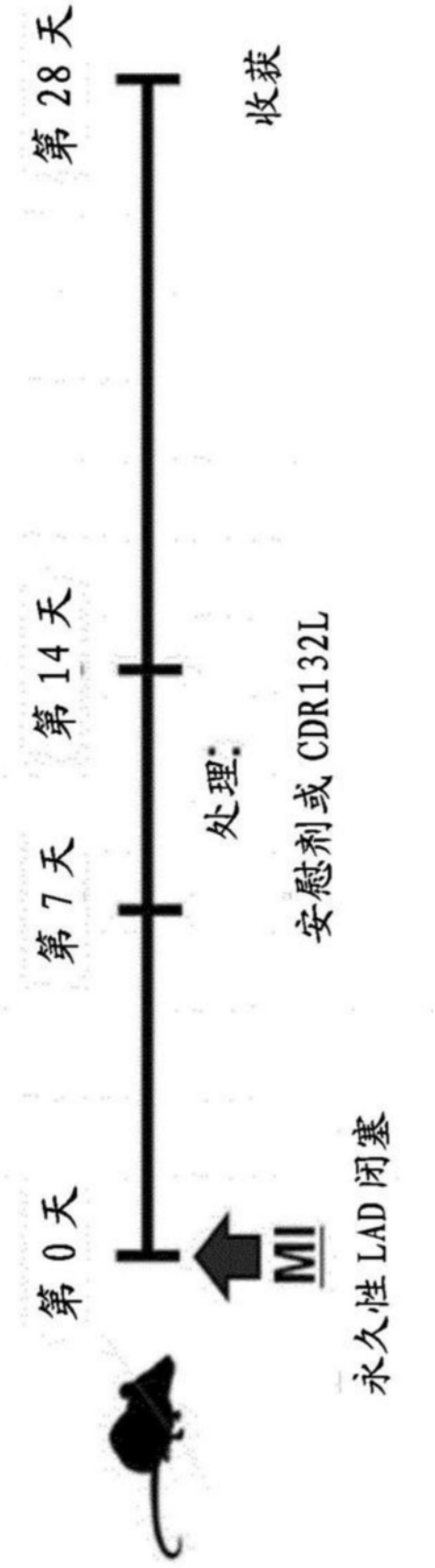


图17

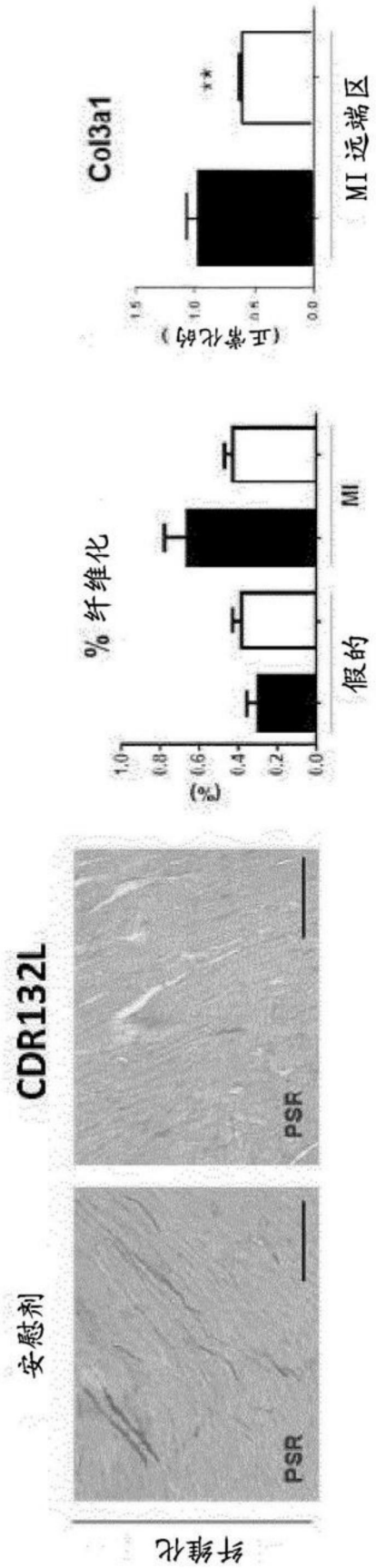

纤维化
安慰剂
CDR132L
PSR
PSR
% 纤维化
(%)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
假的
MI
Col3a1
(正常化的)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
MI 远端区

图18

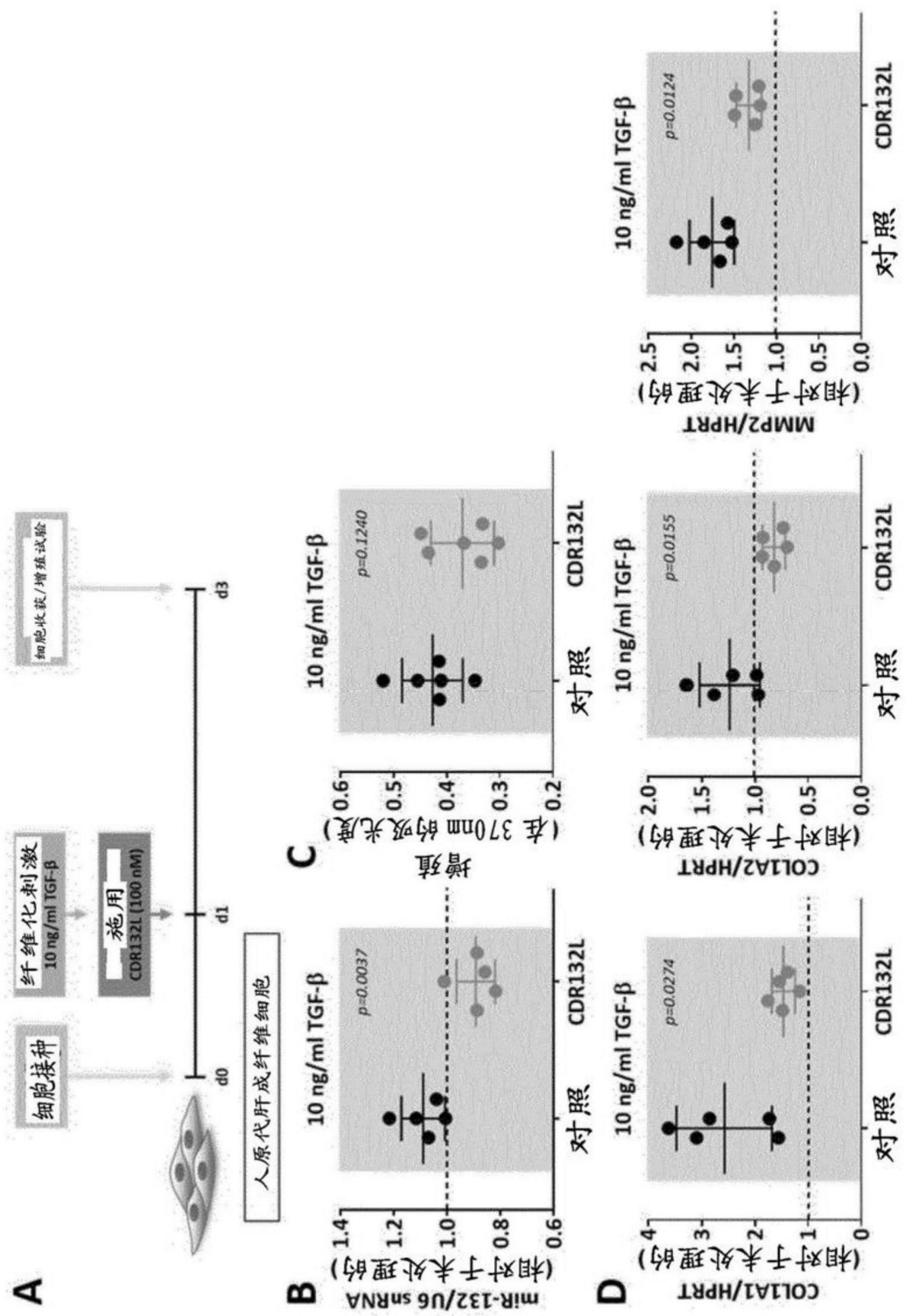

A
细胞接种
纤维化刺激
10 ng/ml TGF-β
施用
CDR132L (100 nM)
细胞收获/增殖试验
d0
d1
d3
人原代肝成纤维细胞
B
10 ng/ml TGF-β
p=0.0037
miR-132/U6 snRNA
(相对于未处理的)
对照
CDR132L
C
10 ng/ml TGF-β
p=0.1240
增殖
(在 370nm 的吸光度)
对照
CDR132L
D
10 ng/ml TGF-β
p=0.0274
COL1A1/HPRT
(相对于未处理的)
对照
CDR132L
10 ng/ml TGF-β
p=0.0155
COL1A2/HPRT
(相对于未处理的)
对照
CDR132L
10 ng/ml TGF-β
p=0.0124
MMP2/HPRT
(相对于未处理的)
对照
CDR132L

图19

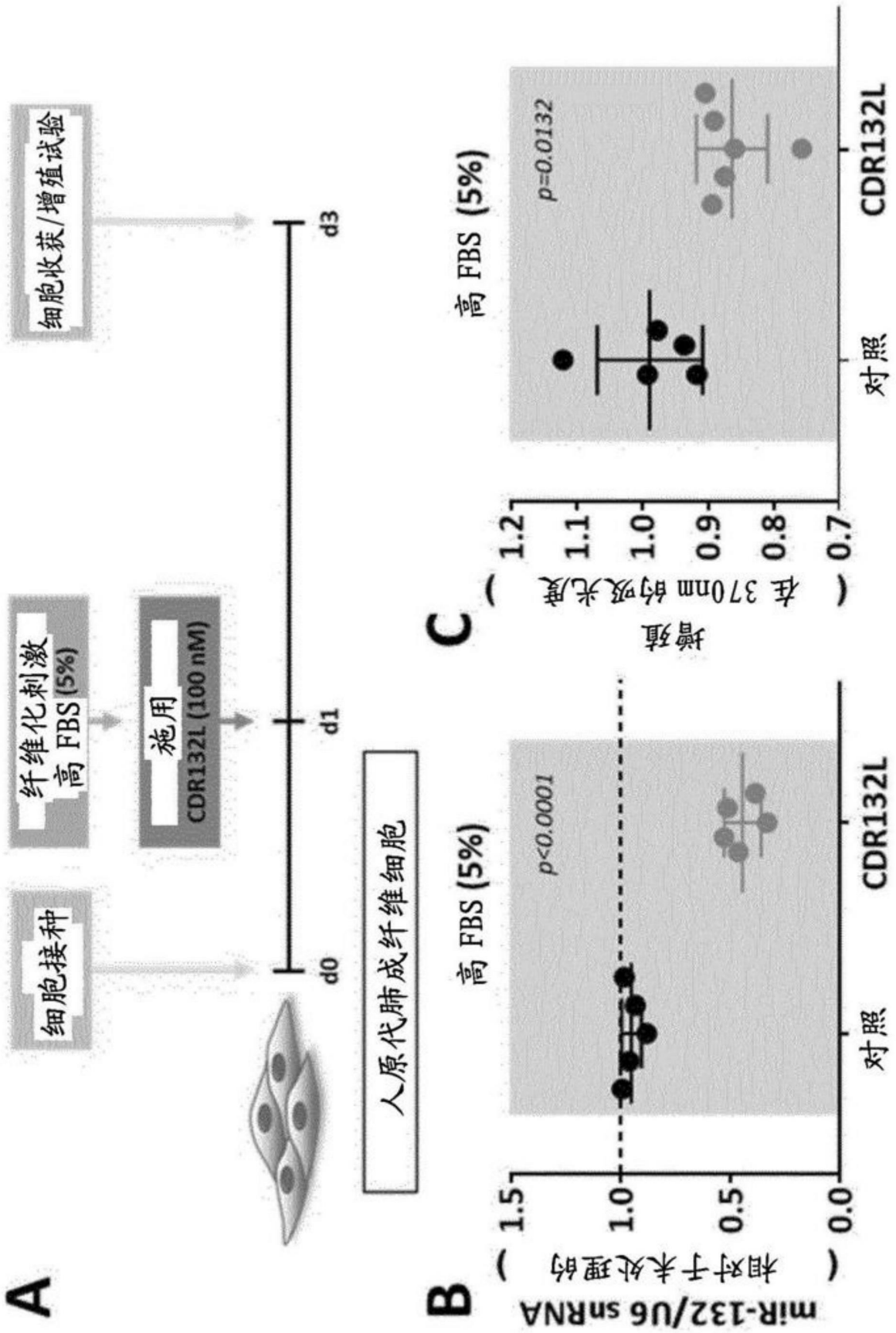

A
细胞接种
纤维化刺激
高 FBS (5%)
施用
CDR132L (100 nM)
细胞收获/增殖试验
d0
d1
d3
人原代肺成纤维细胞
B
高 FBS (5%)
p<0.0001
对照
CDR132L
miR-132/U6 snRNA
相对于未处理的
C
高 FBS (5%)
p=0.0132
对照
CDR132L
增殖
在 370nm 的吸光度

图20