



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102604951 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 25

(21) 申请号 201210049950. 4

A61P 9/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 12. 13

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/869, 937 2006. 12. 14 US

(62) 分案原申请数据

200780046435. 8 2007. 12. 13

(71) 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 I · 伯文克 J · 哈尔 J · 魏勒

C · 施内尔 M · 米勒

M · 申克 - 布劳恩 F · 塞卢卡

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 21/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 2 页

(54) 发明名称

治疗肌肉和心血管病症的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及新型小 RNA, mir-499。本发明也涉及寡核苷酸治疗剂 (反义寡核苷酸和 / 或双链寡核苷酸, 例如 dsRNA) 及其在治疗肌肉和心血管疾患中的用途。

1. 分离的核酸分子,其包含第一链,其中,该第一链的序列为 SEQ ID NO :9 的序列、相应于 SEQ ID NO :9 的 RNA 序列、或与 SEQ ID NO :9 完全互补的序列。
2. 权利要求 1 的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸分子还包括与第一链完全互补的第二链。
3. 包含第一链和第二链的分离的核酸分子,其中第一链和第二链各自长度不超过大约 50 个核苷酸,且第一链的序列包含 SEQ ID NO :9 的序列或相应于 SEQ ID NO :9 的 RNA 序列;且其中第二链的序列包含与 SEQ ID NO :9 完全互补的序列。
4. 权利要求 1 或 3 的分离核酸分子,其是反义寡脱氧核苷酸 (ASO) 或双链寡核糖核苷酸 (dsRNA),可选地包括一个或多个化学修饰,所述修饰选自 :a) 3' 帽子 ;b) 5' 帽子、c) 修饰的核苷间键 ;和 d) 修饰的糖或碱基部分。
5. 核酸载体,其包含或编码权利要求 1-3 之任一项的分离核酸分子、还包含至少一个载体增殖序列。
6. 药物组合物,其包含权利要求 1-4 之任一项的分离的核酸分子和药物可接受的载体。
7. 组合物,其包含权利要求 1-4 之任一项的分离核酸分子和基于脂质或聚合物的治疗递送体系。
8. 药物组合物,其包含根据权利要求 5 的核酸载体和药物可接受的载体。
9. 细胞,其包含权利要求 5 的核酸载体。
10. 权利要求 1-4 之任一项的分离的核酸分子的用途,其用于制备治疗肌肉病症或心血管病症的药物。
11. 用于诊断心血管病症或确定心血管病症的治疗策略的试剂盒,其包含含有权利要求 1 或 3 的分离核酸分子的核酸试剂,所述分离核酸分子任选地还包括一个或多个化学修饰,所述修饰选自 :a) 3' 帽子 ;b) 5' 帽子、c) 修饰的核苷间键 ;和 d) 修饰的糖或碱基部分。
12. 在细胞中减少或增加 mir-499 的表达的方法,包括向细胞施用包含根据权利要求 1-4 之任一项的分离的核酸分子的组合物。

治疗肌肉和心血管病症的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 12 月 13 日的、发明名称为“治疗肌肉和心血管病症的组合物和方法”的中国专利申请 200780046435.8(PCT/US2007/025535) 的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及在肌肉和心血管病症中涉及的新的 RNA (microRNA)、mir-208-2。本发明还涉及寡核苷酸治疗剂 (反义寡核苷酸和 / 或双链寡核苷酸) 及其在治疗由 mir-208-2 失调导致的肌肉和心血管病症中的用途。

背景技术

[0003] 小 RNA (miRNA) 是一类非编码的 RNA 基因, 其终产物是约 22nt 的功能性 RNA 分子。它们是从内源编码的不完全发夹前体加工而成的单链 RNA。它们似乎通过对靶标 mRNA 的 3'-非翻译区 (UTR) 碱基配对经由翻译抑制而起作用 (Griffith-Jones 等人, 2006、Nucleic Acids Research, 卷 34、D140-D144)。

[0004] 小 RNA (miRNA) 的生物生成是个复杂、多步骤的过程。由 RNA 聚合酶 II 转录的初级 miRNA 转录物大小范围在几百至几千个核苷酸长度 (pri-miRNA)。MiRNA 可以追溯为两种基因组来源。一些 miRNA 位于蛋白质编码基因的内含子区域内。其它的位于非编码 RNA 的内含子或外显子之中。有趣的是, pri-miRNA 能够编码单个 miRNA, 也可以含有成簇的多个 miRNA。其后, 通过核内核糖核酸酶 III (RNaseIII) 内切核酸酶 Drosha 将 pri-miRNA 加工为 ~ 70nt 发夹 (pre-miRNA)。然后通过 Exportin5/RanGTP 将 pre-miRNA 从核内运输出来进入细胞质。在细胞质中, 第二 RNaseIII, Dicer, 连同其 dsRBD 蛋白质配偶体一起切割 pre-miRNA 的发夹的茎区域, 由此释放 ~ 21 核苷酸的 RNA- 双螺旋。miRNA 双螺旋的一条链进入抑制靶基因表达的蛋白质复合体, 即, RNA- 诱导的沉默复合体 (RISC), 而另一链被降解。链的选择依赖于该 miRNA 双螺旋的局部热力学稳定性。其 5' 末端较不稳定配对的链被载入 RISC 复合体。载入 RISC 复合体的 miRNA 似乎通过碱基配对于靶标 mRNA 的 3'-非翻译区 (UTR) 经由翻译抑制起作用。Du, T. 和 Zamore, P. D. 等人 micro-Primer: the biogenesis and function of microRNA. Development (2005) 132, 4645-4652。目前在 miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>) 保藏了 462 条人 miRNA 序列, 且看来这一目录将达到 800。迄今为止, 大量 miRNA 的鉴定表明, 它们可能在调节和精细调节生物过程中起到复杂的作用。事实上, 已经有几种 miRNA 牵涉到细胞增殖控制 (mir-125b 和 let-7)、造血 B- 细胞谱系命运 (mir-181)、B- 细胞存活 (mir-15a 和 mir-16-1)、脑模式发育 (mir-430)、胰细胞胰岛素分泌 (mir-357)、脂肪细胞发育 (mir-375) 和肌肉增殖和分化 (miR-1 和 miR-133)。许多 miRNA 位于涉及癌症的基因组区。例如, 在大多数 B- 细胞慢性淋巴细胞性白血病中含有 mir-16-1 和 mir-15 的簇缺失或下调 (B-CLL ; Calin, G. A., 等人。MicroRNA-cancer connection: The beginning of a new tale. Cancer Res. (2006) 66, 7390-7394)。

[0005] 对于可能由失调的 microRNA 引起的疾病或病症, 一直存在着尚未满足的对其进行有效治疗的需要。本发明提供满足这一需要并赋予其它益处的化合物。本发明的化合

物是能够特异性靶向和治疗失调的小 RNA 的核酸。一类是反义 DNA 或 RNA ;另一类是双链 RNA (dsRNA),其也包括称为短干扰 RNA (siRNA) 的类型。siRNA 是新型的治疗剂,其已经显示可以以一种称为 RNA 干扰 (RNAi) 的高度保守的调节机制阻断基因表达。WO99/32619 (Fire 等人) 公开了使用长度至少为 25 个核苷酸的 dsRNA 在秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 中抑制基因表达。已经表明, siRNA 可以在其它生物体中降解靶标 RNA,包括植物 (见,例如, WO 99/53050, Waterhouse 等人 ;和 WO 99/61631, Heifetz 等人),果蝇 (*Drosophila*) (见,例如, Yang, D. 等人, Curr. Biol. (2000) 10 :1191-1200),和哺乳动物 (见 WO 00/44895、Limmer ;和 DE 101 00 586.5, Kreutzer 等人)。这一天然机制现在已经成为开发用于治疗由异常或不需要的基因调节引起的病症的新型治疗剂的焦点。

[0006] 尽管在 RNAi 领域的显著进展,仍然需要各种类型的、能够治疗由新的分子病理学,例如失调的小 RNA 引起的疾病的药剂。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明人已经鉴定到满足以上需要的新的 miRNA, mir-208-2。因此,本发明涉及少于 500 个核苷酸的分离的核酸分子,其特征在于所述分离的核酸分子包含 mir-208-2 (SEQ ID NO :7)。在一个实施方案中,例如,对于靶向 pri-miRNA,包含 mir-208-2 (SEQ ID NO :7) 的该分离的核酸分子长度少于 200 个核苷酸。在另一实施方案中,例如,对于靶向 pre-miRNA,包含 mir-208-2 (SEQ ID NO :7) 的该分离的核酸分子长度少于 80 个核苷酸。本发明的特定实施方案是选自由 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 组成的组,或由 SEQ ID NO :7 组成的组的分离的核酸分子。

[0009] 本领域技术人员将立即意识到,本发明的范围也包括由少于 500 个核苷酸的核酸序列组成的分离的核酸分子,所述核酸序列与上述之一互补。例如,由 SEQ ID NO :8 组成的分离的核酸。

[0010] 本发明的另一实施方案是长度在 8 和 50 个核苷酸之间的分离的核酸分子,所述分子能够在生理条件下,例如,在细胞内 (细胞质或核),或在模拟这类条件的条件下,杂交于上述分离的核酸分子,由此抑制 mir-208-2 (SEQ ID NO :7) 的功能,例如 mir-208-2 对其靶标的结合。

[0011] 这类分子的具体的实例是选自由 SEQ ID NO :10 至 SEQ ID NO :77 组成的组的分离的核酸分子。

[0012] 对于本领域技术人员而言,显而易见的是上述分离的核酸分子能够带有一个或多个化学修饰,例如,选自 a) 3' 帽子、b) 5' 帽子、c) 修饰的核苷间键,或 d) 修饰的糖或碱基部分。

[0013] 包含上述核酸和至少一个载体增殖序列的核酸载体也是本发明的实施方案。本发明还涉及包含上述核酸和至少一个载体增殖序列的核酸载体。

[0014] 本发明的分离的核酸分子,或本发明的核酸载体可以在例如基于液体或聚合物的治疗递送体系中做为药物使用。

[0015] 本发明的这类药物可以在患有肌肉病症的受试者中用于治疗肌肉病症。

[0016] 这类肌肉病症的一个具体的实施方案是心血管病症。因此,本发明的药物用于在受试者中治疗心血管病症,或用于制备治疗肌肉病症或心血管病症的药物。

[0017] 本发明还包括用于诊断心血管病症或确定其治疗策略的试剂盒。典型的,所述试

剂盒包含核酸试剂,该核酸试剂含有 RNA、DNA、混合的 RNA 或 DNA 形式的本发明核酸分子,和任选地任何化学修饰。

[0018] 根据本发明的核酸分子也可以用于任何其它的目的,诸如,实验的目的。因此,本发明也包括减少或增加 mir-208-2 表达的任何方法,其中例如在细胞内使用根据本发明的分离的核酸分子。相似的,根据本发明的核酸分子也可以用作诊断探针或用作实验探针。

[0019] 本发明人还认识到两个其它的 miRNA, mir-208 和 mir-499, 的表达与 mir-208-2 的表达密切相关。因此,本发明也涉及特征在于包含 mir-208 (SEQ ID NO :6) 的少于 500 个核苷酸的分离核酸分子、和 / 或特征在于包含 mir-499 (SEQ ID NO :9) 的少于 500 个核苷酸的分离核酸分子、和 / 或包含 mir-208 (SEQ ID NO :6) 或 mir-499 (SEQ ID NO :9) 的互补序列的少于 500 个核苷酸的分离核酸分子,用于制备药物的用途,所述药物用于治疗肌肉病症或心血管病症、或用于诊断肌肉病症或心血管病症。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1. 含有人 mir-208 的 MYH6 内含子与含有 mir-208-2 的斑马鱼、人、黑猩猩、狗和大鼠的 MYH7 内含子的比对。

[0022] 图 2. 在从不同发育阶段的小鼠心脏分离的 RNA 中对 MYH6、MYH7 和 18S 的 RT-PCR。

[0023] 图 3. 在从不同发育阶段的小鼠心脏分离的 RNA 中用 northern 印迹法分析 mir-208、mir-208-2、mir-499 和 mir-206。使用 U6 snRNA 作为加样对照。第 11-14 道对应于 50pg 合成的 miRNA。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明涉及与肌肉和心血管病症有关的新的 microRNA, mir-208-2 的发现。也涉及寡核苷酸治疗剂 (反义 DNA/RNA 和 / 或双链 RNA) 及其用于治疗肌肉和心血管病症的用途,所述病症是由于 mir-208-2 的失调而产生的。Mir-208-2 是位于 MYH7 基因的内含子 30 中的基因。MYH7 (基因库登录号 NM_000257 ;在 14 号染色体)。MYH7 是由球形头部 (含有肌动蛋白和 ATP 结合位点) 继之以杆状的尾序列组成的运动收缩蛋白,是构建粗肌丝的结构单元之一。每个肌球蛋白丝含有两个重链和四个轻链。心肌收缩的速率由肌球蛋白分子头部区域中三磷酸腺苷酶 (ATPase) 活性的程度控制。肌球蛋白三磷酸腺苷酶活性的主要决定因素和,因此肌肉收缩的速度,取决于两个肌球蛋白重链同种型, MYH 6 和 MYH 7 的相对的量。呈现高三磷酸腺苷酶活性的 MYH6 同种型,具有超过 MYH7 约四倍的酶活性。在人心脏中 MYH6 和 MYH7 以不同量表达。在衰竭的人心脏中, MYH6 mRNA 和蛋白质水平被下调而 MYH7 被上调。

[0026] Mir-208-2 的转录与 MYH7 转录紧密相连,因为其没有独立的启动子。因此仅当产生 MYH7 的转录物时,其才被转录。据信当加工 pre-mRNA 和移出内含子时, mir-208-2 小 RNA 从 MYH7 转录物释放。然后内含子 30 的残留内含子序列经过进一步加工而产生全长的 mir-208-2。

[0027] Mir-208-2 在脊椎动物中是高度保守的,图 1 显示在多个物种之间 mir-208-2 的比对。与 mir-208 (位于 MYH6 的内含子 28 中的不同小 RNA) 的相似性也被图示。

[0028] 由本发明人鉴定的 Mir-208-2 基因具有下列序列 (包括侧翼区:实际的 mir-208-2 序列以粗体和下划线表示):智人 (Homo sapiens)

[0029] 5' -SEQ ID NO :1

[0030] CCCCACCTCCTTCTCCTCTCAGGGAAGCTTTTTGCTCGAATTATGTTT

[0031] CTGATCCGAATATAAGACGAACAAAAGGTTTGTCTGAGGG-3'

[0032] 黑猩猩 (*Pan troglodytes*)

[0033] 5' -SEQ ID NO :2

[0034] CCCCACCTCCTTCTCCTCTCAGGGAAGCTTTTTGCTCGAATTATGTTT

[0035] CTGATCCGAATATAAGACGAACAAAAGGTTTGTCTGAGGG-3'

[0036] 家犬 (*Canis familiaris*)

[0037] 5' -SEQ ID NO :3

[0038] CCCCAGCTCCTTCTCCTCTCAGGGAAGCTTTTTGCTCGCGTTATGTTT

[0039] CTCATCCGAATATAAGACGAACAAAAGGTTTGTCTGAGGG-3'

[0040] 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)

[0041] 5' -SEQ ID NO :4

[0042] CCCCACCTCCTGCTCCTCTCAGGGAAGCTTTTTGCTCGCGTTATGTTT

[0043] CTCATCCGAATATAAGACGAACAAAAGGTTTGTCTGAGGG-3'

[0044] 斑马鱼 (*Danio rerio*)

[0045] 5' -GTAAGACGAACAAAAGTTTTT-3' SEQ ID NO :5

[0046] 为了序列比较,还提供先前已知的来自 MYH6 内含子 28 的 mir-208 智人 mir-208

[0047] 5' -ATAAGACGAGCAAAAAGCTTGT-3' SEQ ID NO :6

[0048] 图 1 图示在脊椎动物物种之间 mir-208-2 的显著保守性。从这一比对,可以鉴别这一小 RNA 的最高保守的部分,推断其为如下的功能性引导和反引导序列:

[0049] 引导序列 (mir-208-2) :5' -ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT-3' (SEQ ID NO :7)

[0050] 反引导序列 :5' -ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT-3' (SEQ ID NO :8)

[0051] 与 MYH6 和 MYH7 不同, MYH7B (基因库登录号 NM_020884 :在 20 号染色体) 较少被表征。基于其与 MYH7 的高度同源性, MYH7B 被归类为慢 MYH 同种型。至今,在文献中没有对 MYH7B 功能的清楚描述。此外,没有疾病联系被归因于 MYH7B 功能障碍。有趣的是,与 MYH6 和 MYH7 相似, MYH7B 在其内含子之一中也还含有 miRNA 即 mir-499。智人 mir-499

[0052] 5' -TTAAGACTTGACAGTGATGTTTAA-3' SEQ ID NO :9

[0053] 以下包括的生物信息学分析和实施例表明新型小 RNA mir-208-2 参与调节与心肌肥大有关的信号转导通路。因此,这一小 RNA 的一个重要用途是作为治疗可能与之有关的病症和疾病的靶标。

[0054] 本发明人在这里公开了具有治疗用途的多个方法和组合物。概括而言,认为在一些情况下减少靶标小 RNA 的水平可以提供治疗益处。可以通过使用反义核酸分子,例如直接结合于靶标 miRNA,例如 mir-208-2 的反义 DNA,容易地实现此减少。在其它情况下,靶标 microRNA,例如 mir-208-2 水平的增长将提供有益效果。可以通过使用有义核酸分子和一些 dsRNA 分子,例如一些 siRNA (其结合于 miRNA 的靶标因此与所述 miRNA 协同作用),容易的获得这类增长。本发明因此涉及两种类型的治疗剂。

[0055] 在本说明书和权利要求中使用下列定义。

[0056] “分离的核酸分子”意指该物质从其最初环境 (例如,如果其是天然存在的,则自然的环境) 中移出。例如,在活的动物中存在的天然存在的多核苷酸不是分离的,但是从该天

然系统中的一些或全部共存在的物质中分出的相同的多核苷酸或多肽是分离的,即使接下来被重新导入该天然系统。这类多核苷酸可以是载体的一部分和/或这类多核苷酸可以是组合物的一部分,且因为这类载体或组合物不是其天然环境的一部分,故仍然是分离的。

[0057] “核酸载体”是设计在暴露于细胞环境,例如细胞裂解物或全细胞时被增殖和/或转录的核酸序列。“基因治疗载体”指如下核酸载体,其还带有用于转染进入全细胞的功能方面,意在用于增加一个或多个基因和/或蛋白质的表达。在每个情况下,这类载体通常含有“载体增殖序列”,其通常是被细胞识别的复制起点以允许在细胞内增殖载体。大量的核酸载体和基因治疗载体是本领域技术人员所熟悉的。

[0058] 如这里所使用,术语“治疗有效量”和“预防有效量”指在治疗、预防或控制由 mir-208-2 失调介导的病理过程中提供治疗益处的量。治疗有效的该特定量可以通过普通的医师容易的确定,并可以根据本领域已知的因素,诸如,病理过程的类型、患者的病史和年龄、病理过程的阶段和与其它物质的组合施用,而改变。

[0059] 如这里所使用,“药物组合物”包含药理学有效量的本发明治疗剂和药物可接受的载体。如这里所使用,“药理学有效量”、“治疗有效量”或简单地“有效量”指有效产生预期的药理学、治疗或预防效果的量。例如,如果当与疾病或病症有关的可测量参数降低至少 25% 时一个给定的临床治疗被认为有效,则对于治疗该疾病或病症而言药物的治疗有效量是实现所述参数的至少 25% 降低所需的量。

[0060] 术语“药物可接受的载体”指用于施用治疗剂的载体。这类载体包括,但不限于,盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。该术语尤其排除细胞培养基。对于口服施用的药物,药物可接受的载体包括,但不限于药物可接受的赋形剂,例如惰性稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙、和乳糖,而玉米淀粉和海藻酸是合适的崩解剂。粘合剂可以包括淀粉和明胶,而润滑剂,如果存在的话,通常是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。如果期望的话,片剂可以用例如单硬脂酸甘油酯或甘油二硬脂酸酯的材料包被,以延迟在胃肠道中的吸收。

[0061] 如这里所使用,表述“肌肉病症”包括,但不限于,心脏病理。这一表述涉及任何类型的变性肌肉病症,其原发病理可以是丧失横纹肌肌肉和/或功能。这将包括,但不限于,肌肉营养不良、创伤和重症肌无力。

[0062] 如这里所使用,“转化的细胞”是已导入了可表达 dsRNA 分子的载体的细胞。包含外源提供的核酸,例如本发明物质,的细胞,无论是瞬时转染或稳定转染的,也被认为是转化的细胞。

[0063] 初级 miRNA 转录物由 RNA 聚合酶 II 转录并且其长度大小范围可以从几百至几千个核苷酸 (pri-miRNA)。pri-miRNA 可以编码单个的 miRNA 但是也可以含有数个 miRNA 的簇。接着,由核内的核糖核酸酶 III (RNase III) 核酸内切酶, Drosha, 加工该 pri-miRNA 为 ~70nt 的发夹 (pre-miRNA)。因此,取决于预期的靶标,本发明的分离的核酸分子将具有各种优选的长度。当靶向 pri-miRNA 时,可以使用约 500 个核苷酸,例如, 499、450、400、350、300、250 个核苷酸的优选的长度。当靶向 pre-miRNA 时,优选的长度为 100 至 200 个核苷酸,例如 100、120、150、180 或 200 个核苷酸。在细胞质中,第二 RNase III, Dicer, 与其 dsRBD 蛋白质配偶体一起,切割 pre-miRNA 的发夹的茎区域,由此释放 ~21 个核苷酸的 RNA- 双螺旋。因此,在本发明的一个实施方案中也考虑例如长度为 80、70、60、50、40、30、25、21、20、

19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9 或 8 个核苷酸的分离的多核苷酸。

[0064] 本发明人已经发现将 mir-208-2 的抑制剂注射入斑马鱼 (*Danio rerio*) 的受精卵导致心脏功能 (血液循环、心脏搏动等) 的显著下降。因此, 可以用这一测定法或相似的测定法来评估“mir-208-2 (SEQ ID NO:7) 的功能”。评估“mir-208-2 (SEQ ID NO:7) 的功能”的另一可能方案是 mir-208-2 与其靶标的相互作用, 例如与靶标的结合。

[0065] 在实施本发明时, 可以使用分子生物学、微生物学、和重组 DNA 中的许多常规技术。这些技术是众所周知的, 并阐述在, 例如, *Current Protocols in Molecular Biology*, 卷 I, II, 和 III, 1997 (F. M. Ausubel 编辑); *Sambrook 等人*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; *DNA Cloning: A Practical Approach*, 卷 I 和 II, 1985 (D. N. Glover 编辑); *Oligonucleotide Synthesis*, 1984 (M. L. Gait 编辑); *Nucleic Acid Hybridization*, 1985, (Hames 和 Higgins); *Transcription and Translation*, 1984 (Hames 和 Higgins 编辑); *Animal Cell Culture*, 1986 (R. I. Freshney 编辑); *Immobilized Cells and Enzymes*, 1986 (IRL Press); *Perbal*, 1984, *A Practical Guide to Molecular Cloning*; *Methods in Enzymology* 系列 (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, 1987 (J. H. Miller 和 M. P. Calos 编辑, Cold Spring Harbor Laboratory); 和 *Methods in Enzymology* 卷 154 和卷 155 (分别由 Wu 和 Grossman, 和 Wu 编辑)。

[0066] 治疗剂 (治疗物质)

[0067] 本发明的某些治疗剂在这里被描述为用于增加或减少细胞中 mir-208-2 活性的、包含 mir-208-2 的反引导和引导序列的 siRNA。本发明的其它治疗剂是用于减少细胞中 mir-208-2 活性的反义 DNA 或 RNA 组合物。

[0068] dsRNA 治疗

[0069] 根据本发明的 siRNA 分子介导 RNA 干扰 (“RNAi”)。术语 “RNAi” 是本领域众所周知的, 通常理解为意指由具有互补于靶标基因的区域 of siRNA 抑制细胞中的一个或多个靶标基因。测试 dsRNA 介导 RNAi 的能力的多种测定法是本领域公知的 (见, 例如 Elbashir 等人, *Methods* 26 (2002), 199-213)。根据本发明的 dsRNA 对基因表达的影响通常导致, 相对于未用根据本发明的 RNA 分子处理的细胞而言, 靶标基因的表达被抑制至少 10%、33%、50%、90%、95% 或 99%。根据本发明的 “siRNA” 或 “小干扰核糖核酸” 具有本领域公知的意义, 包括下列方面。siRNA 由两条核糖核苷酸链组成, 其在生理条件下沿着互补区杂交。这些链通常是分开的。因为两条链在细胞中具有不同的功能, 一条链被称为 “反义” 链, 也称为 “引导” 序列, 用于作用于 RISC 复合体来引导其至正确的 mRNA 进行切割。因为涉及 RNA 化合物, “反义” 的这一使用与在本说明书其它处提及的反义 DNA 化合物不同。另一链被称为 “反引导” 序列并因为其含有与靶标序列相同的核苷酸序列, 称为有义链。在某些实施方案中可以由分子接头将这些链连接在一起。核糖核苷酸个体可以是未修饰的天然存在的核糖核苷酸、未修饰的天然存在的脱氧核糖核苷酸或者它们可以是化学修饰的或合成的 (如在本文其它处所述的)。

[0070] 在本说明书中使用的 dsRNA 包含两个基本的类型。有如上所述的 siRNA。再有, 当两条链是一个更大分子的一部分, 并由此两条链在一条链的 3' 末端和另一链的 5' 末端之间通过连续的核苷酸链连接而形成双螺旋结构时, 该连接的 RNA 链被称为 “发夹环”、“短发

夹 RNA”或“shRNA”。shRNA 通常从核酸载体转录并在目的靶标细胞中表达。

[0071] 如权利要求中定义的,本发明的核酸分子可以是包含 SEQ ID NO :7 或 SEQ ID NO :8 并靶向与 mir-208-2 相同的细胞 mRNA 和 / 或 mir-208-2 本身的任何 dsRNA。

[0072] 引导序列 5' -ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT-3' (SEQ ID NO :7)

[0073] 反引导序列 5' -ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT-3' (SEQ ID NO :8)

[0074] 本发明核酸分子包含基本上与靶标基因的 mRNA 的区域相同的区域。与靶标基因的对应序列有 100% 同一性的区域是合适的。这一情况称为“完全互补”。然而,考虑到 miRNA 及其作用机制的特性,取决于待靶向的 mRNA 的区域的长度,与靶标基因的对应区域相比,本发明核酸分子的该区域也可以含有一个、两个或三个或更多的错配,并由此可以是不完全互补的。然而,最重要的特征是所述分子能够在生理条件下,例如在细胞中,特异性的结合 mir-208-2,在一个实施方案中,本发明的 RNA 分子特异性靶向一个给定的基因。为了仅靶向所期望的 mRNA, siRNA 试剂可以与靶标 mRNA 具有 100% 同源性,并与细胞或生物体中的全部其它基因有至少 2 个错配核苷酸。分析和鉴定具有足够序列同一性以能够有效抑制特定靶标序列表达的 siRNA 的方法是本技术领域公知的,例如在 WO 2005/059132 中所述方法。可以通过本技术领域中公知的序列比较和比对算法(见 Gribskov 和 Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, 和其中引用的参考文献),并通过例如 BESTFIT 软件程序中执行的 Smith-Waterman 算法使用默认参数(例如, University of WisconsinGenetic Computing Group) 计算核苷酸序列之间的百分比差异,从而优化序列同一性。

[0075] 根据本发明,与靶标互补的 siRNA 区域的长度可以是 10-100 个核苷酸、12-25 个核苷酸、14-22 个核苷酸或 15、16、17 或 18 个核苷酸。在与对应靶标区域有错配的情况,互补区域的长度通常需要稍微更长一些。

[0076] 因为 siRNA 可以带有突出的末端(其可以与靶标互补或不互补)、或与其本身而非靶标基因互补的额外的核苷酸,故 siRNA 的每个链的总长度可以是 10-100 个核苷酸、15-49 个核苷酸、17-30 个核苷酸或 19-25 个核苷酸。

[0077] 短语“每条链是 49 个核苷酸或更少”意指在该链中的连续核苷酸的总数,包括全部修饰的或未修饰的核苷酸,但不包括可以被加入该链的 3' 或 5' 末端的任何化学部分。插入该链的短的化学部分不被计算在内,设计连接两个分开链的化学接头不被认为产生连续的核苷酸。

[0078] 术语“在 5' 末端或 3' 末端的至少一个上的 1-6 个核苷酸突出”指在生理条件下由两个分开的链形成的互补 siRNA 的结构。如果末端核苷酸是 siRNA 双链区的一部分,认为该 siRNA 为平末端。如果在末端的一个或多个核苷酸是不配对的,则产生突出端。通过突出核苷酸的数目测量突出端长度。突出核苷酸可以在任一链的 5' 末端或 3' 末端。

[0079] 根据本发明的 siRNA 表现高体内稳定性,并可以通过在至少一条链中包括至少一个修饰的核苷酸而特别适合口服递送。因此,根据本发明的 siRNA 可以含有至少一个修饰的或非天然的核糖核苷酸。许多已知的化学修饰的详细描述在公开的 PCT 专利申请 WO 200370918 中给出和在这里不再赘述。对于递送而言合适的修饰包括选自:a) 3' 帽子、b) 5' 帽子、c) 修饰的核苷间键;或 d) 修饰的糖或碱基部分的化学修饰。

[0080] 合适的修饰包括,但不限于对糖部分的修饰(即,糖部分的 2' 位置,诸如,

2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin 等人, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504), 即, 烷氧基烷氧基基团)或对碱基部分的修饰(即非天然的或修饰的碱基, 其保留与另一核苷酸链中的另一特定碱基配对的能力)。其它的修饰包括所谓的“骨架”修饰, 包括, 但不限于, 替换磷酸酯基团(用例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯连接相邻的核糖核苷酸)。

[0081] 本文有时称为3'帽子或5'帽子的末端修饰可以是有意义的。帽子可以由简单加入的额外核苷酸, 例如“T-T”(其已经被发现能赋予 siRNA 稳定性)组成。帽子可以是本领域技术人员公知的更复杂化学。

[0082] 在一个实施方案中, 3'帽子是经由3'碳缀合于3'末端的化学部分, 其选自式 I 的化合物:



[0084] 其中

[0085] X 是 O 或 S

[0086] R1 和 R2 独立地是 OH、NH₂、SH、烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基, 其中烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基可以被另外的杂原子和官能团取代, 优选的, 杂原子选自 N、O 或 S, 或官能团选自 OH、NH₂、SH、羧酸或酯;

[0087] 或 R1 和 R2 可以是式 Y-Z, 其中 Y 是 O、N、S, Z 是 H、烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基, 其中烷基、芳基、烷基-芳基、芳基-烷基可以被另外的杂原子取代, 优选杂原子选自 N、O 或 S。

[0088] 在糖部分的修饰的实例包括 2'-烷氧基核糖核苷酸、2'-烷氧基烷氧基核糖核苷酸、锁式核酸核糖核苷酸 (LNA)、2'-氟代核糖核苷酸、吗啉代核苷酸。

[0089] 也可以修饰核苷间键。核苷间键的实例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯和酰胺键。

[0090] R1 可以是 OH。

[0091] R1 和 R2 一起可以包括 1-24 个 C-原子、1-12 个 C 原子、2-10 个 C 原子、1-8 或 2-6 个 C 原子。在另一实施方案中, R1 和 R2 独立地是 OH、低级烷基、低级芳基、低级烷基-芳基、低级芳基-烷基, 其中低级烷基、低级芳基、低级烷基-芳基、低级芳基-烷基可以被如上定义的另外的杂原子和官能团取代。在另一实施方案中, R1 和 R2 不都是 OH。

[0092] 术语“低级”与有机基团或化合物连用时意指化合物或基团可以是分支的或不分支的, 具有不超过且包括 7 个碳原子, 优选 1-4 个碳原子。低级烷基代表, 例如, 甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基和分支的戊基、正己基和分支的己基。

[0093] 烷氧基的实例包括 O-Met、O-Eth、O-prop、O-but、O-pent、O-hex。

[0094] 合成 siRNA, 包括含有至少一个修饰的或非天然的核糖核苷酸的 siRNA, 的方法是众所周知的, 可以由本领域技术人员容易的获得。例如, 多种合成化学法在公开的 PCT 专利申请 W02005021749 和 W0200370918 中有描述, 通过参考将两文献并入此处。反应可以在溶液、或优选的在固相进行, 或通过使用聚合物支持的试剂来进行, 接着在可以形成能介导 RNAi 的 siRNA 分子的条件混合合成的 RNA 链。

[0095] 本发明也包括含有至少一个修饰的核苷酸的 siRNA, 所述 siRNA 适于口服递送。在

功能性术语中,这意指当口服施用,siRNA 具有合适的药代动力学和生物分布来实现递送至关心的靶标组织。特别地,这需要血清稳定性、缺乏免疫反应、和药物样行为。可以基于在本文其它处公开的标准胃酸试验和标准血清试验预期 siRNA 的这些特征中的多种。

[0096] 尽管特定治疗剂的设计可以采取多种形式,但某些功能性特征可以将优选的 dsRNA 与其它 dsRNA 区分开来。具体的,可以测试特征例如良好的血清稳定性、高效力、缺少诱导的免疫应答、和良好的药物样行为(全部可以通过本领域技术人员测量),以鉴定本发明的优选的 dsRNA。在一些情况下,这些功能方面并不是全部都存在于优选的 dsRNA 中。但是本领域中的技术人员能够优化这些变量和其它变量以选择本发明的优选的化合物。

[0097] 可以使用任何方法来施用本发明的 dsRNA 于含有失调 mir-208-2 的哺乳动物。例如,施用可以是局部的(例如,阴道的、经皮的等等);口服的;或胃肠外的(例如,通过皮下、心室内、肌肉内、或腹膜内注射、或通过静脉滴注)。施用可以是快速的(例如,通过注射)、或可以在一段时间发生(例如,通过缓慢输注或施用缓释制剂)。

[0098] 例如,可以将用或不用脂质体制配的 dsRNA 直接局部应用于目的组织。为了局部施用,可以将 dsRNA 分子配制成组合物,例如无菌的和非无菌的、水溶液、在常用溶剂,例如乙醇中的非水性溶液、或在液态或固态油基质中的溶液。这类溶液也可以含有缓冲剂、稀释剂、和其它合适的添加剂。局部施用的组合物可以配制为透皮贴剂、软膏、洗剂、霜剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体、和粉末。可以使用本技术领域公知的聚合物和促透剂(pemeabilizer)来配制凝胶和霜剂。

[0099] 对于胃肠外、鞘内或心室内的施用,可以将 dsRNA 分子配制成组合物,例如无菌的水溶液,其还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂(例如,通透增强剂、载体化合物和其它药物可接受的载体)。

[0100] 此外,可以使用非病毒方法,例如生物或非生物的手段,如在例如美国专利 6, 271, 359 中所述,将 dsRNA 分子施用于哺乳动物。非生物递送可以通过多种方法完成,包括,不限于,(1) 在脂质体上装载本文提供的 dsRNA 核酸分子;(2) 使 dsRNA 分子与脂质或脂质体复合以形成核酸-脂质或核酸-脂质体复合物;或(3) 提供基于聚合物的治疗递送系统。这些技术是本技术领域众所周知的。简述如下。

[0101] 脂质体可以由通常用于体外转染细胞的阳离子脂质和中性脂质组成。阳离子脂质可以与带负电荷的核酸复合(例如,电荷结合)来形成脂质体。阳离子脂质体的实例包括,不限于, lipofectin、lipofectamine、lipofectace 和 DOTAP。形成脂质体的操作是本技术领域众所周知的。可以例如从磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油或二油酰基磷脂酰乙醇胺形成脂质体组合物。众多亲脂物质是可商购的,包括 Lipofectin. RTM. (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Calif.) 和 Effectene. TM. (Qiagen, Valencia, Calif.)。此外,可以使用可商购的阳离子脂质,例如 DDAB 或 DOTAP 来优化全身递送方法,所述阳离子脂质均可以与中性脂质,例如 DOPE 或胆固醇混合。在一些情况下,可以使用例如由 Templeton 等人(Nature Biotechnology, 15: 647-652(1997))所述的脂质体。在其它实施方案中,可以使用多聚阳离子,例如聚乙烯亚胺执行体内和离体的递送(Boletta 等人, J. Am Soc. Nephrol. 7:1728(1996))。关于使用脂质体递送核酸的另外的信息可以在美国专利 6, 271, 359、PCT 公开 WO 96/40964 和 Morrissey, D. 等人 2005. NatBiotechnol. 23(8):1002-7 中找到。

[0102] 可以通过多种方法实现生物递送,包括,但不限于,病毒载体的使用。例如,可以使用病毒载体(例如,腺病毒和疱疹病毒载体)来递送 shRNA 分子于皮肤细胞和宫颈细胞。可以使用标准的分子生物技术将本文提供的一个或多个 shRNA 导入先前开发的许多不同病毒载体之一来递送核酸至细胞。可以使用由此产生的病毒载体通过例如感染将一个或多个 dsRNA 递送至细胞。

[0103] 可以在药物可接受的载体或稀释剂中配制本发明的 dsRNA。“药物可接受的载体”(这里也称为“赋形剂”)是药物可接受的溶剂、悬浮剂、或任何其它药理学惰性载体。药物可接受的载体可以是液体或固体,并可以依据计划的施用方式选择从而提供期望的大小、稠度和其它有关的运输和化学特性。典型的药物可接受的载体包括例如,但不限于:水;盐水溶液;粘合剂(例如,聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,乳糖和其它糖类、明胶或硫酸钙);润滑剂(例如,淀粉、聚乙二醇或乙酸钠);崩解剂(例如,淀粉或淀粉乙醇酸钠);和湿润剂(例如,十二烷基硫酸钠)。

[0104] 此外,可以将本发明的 dsRNA 配制成含有该 dsRNA 的组合物,其中该 dsRNA 与其它分子、分子结构或核酸混合物混合、被之包囊化、与之缀合、或以另外方式结合。例如,含有本发明的一个或多个 dsRNA 物质的组合物也可以与在治疗相似病症中使用的其它治疗剂组合。

[0105] 可以在细胞培养物或实验动物中利用标准药学方法,例如,用于确定 LD50(致死群体的 50%的剂量)和 ED50(对群体的 50%具有疗效的剂量)的方法,来确定这类化合物的毒性和治疗功效。在毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,其可以表达为 LD50/ED50 比。优选呈现高治疗指数的化合物。

[0106] 可以使用从细胞培养试验和动物研究获得的数据配制人用剂量范围。本发明组合物的剂量通常在如下循环浓度范围内,所述范围包括 ED50 且几乎没有或完全没有毒性。由使用的药物剂型和施用途径决定,剂量可以在此范围内变动。对于本发明方法中使用的任何化合物,可以最初从细胞培养试验估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以获得该化合物或,如果合适的话,靶标序列的多肽产物的如下循环血浆浓度范围(例如,获得降低浓度的多肽),所述范围包括在细胞培养物中确定的 IC50(即,获得症状的半最大抑制的测试化合物浓度)。可以使用这类信息更精确的确定在人中有用的剂量。可以例如通过高效液相色谱法测量在血浆中的水平。无论如何,给药的医师都能够根据在本领域已知的或本文描述的标准功效测量法中观察到的结果,调整 dsRNA 的施用量和施用时间。

[0107] 反义 DNA 治疗剂

[0108] 可以设计本发明的反义寡核苷酸(这里有时称为“反义分子”)以靶向 mir-208-2 和减少其转录物的水平。同样地,该反义分子可以靶向这一 mir-208-2 的任何部分以在细胞中减少其水平。

[0109] 反义化合物通常被用作研究试剂和诊断剂,多年来一直是治疗研究的对象。反义寡核苷酸能够以精细的特异性抑制基因表达,常被本领域普通技术人员用于阐明特定基因的功能。也可以使用反义化合物,例如以区别生物途径的多个成员的功能。

[0110] 反义分子的特异性和灵敏性也被本领域技术人员用于治疗用途。已经应用反义寡核苷酸作为治疗动物和人的疾病状态的治疗部分。反义寡核苷酸已经安全和有效的施用于人,并且目前正在进行多个临床试验。由此确立了寡核苷酸可以有用的治疗形式,可以对

其进行配置以用于治疗细胞、组织和动物、特别是人的治疗方案中。在本发明中，术语“反义”指脱氧核糖核酸（DNA）或其模拟物的寡聚体或多聚体。这一术语包括由天然存在的核苷碱基、糖和共价核苷间（骨架）键组成的寡核苷酸以及以相似方式行使功能的具有非天然部分的寡核苷酸。这类修饰的或取代的反义分子通常由于期望的性质，例如，增加的细胞摄取、提高的核酸靶标亲和性和在核酸酶存在下增加的稳定性，而比天然形式更为优选。

[0111] 尽管反义寡核苷酸是反义化合物的优选的形式，但本发明也考虑其它的寡聚反义化合物，包括但不限于例如如下所述的寡核苷酸模拟物。根据本发明的反义化合物优选包含约 8 至约 30 个核苷碱基 (nucleobase)。特别优选的是包含约 8 至约 30 个核苷碱基（即，约 8 至约 30 个连结的核苷）的反义寡核苷酸。如在本技术领域公知的，核苷是碱基-糖的组合。核苷的碱基部分通常是杂环碱基。这类杂环碱基的两个最普遍的类型是嘌呤和嘧啶。核苷酸还包括共价连接于核苷的糖部分上的磷酸基团的核苷。对于包括呋喃戊糖的那些核苷，磷酸基团可以连接于糖的 2'、3' 或 5' 羟基部分。在形成寡核苷酸时，磷酸基团使相邻核苷彼此共价连接以形成线性聚合化合物。该线性聚合结构的相应末端又可以进一步连接以形成环状结构，然而，一般优选开放的线性结构。在寡核苷酸结构内，磷酸基团通常参与形成寡核苷酸的核苷间骨架。DNA 的正常连接或骨架是 3' 到 5' 磷酸二酯连接。

[0112] 在本发明中有用的优选反义化合物的特定实例包括含有修饰的骨架或非天然核苷间键的寡核苷酸。如在本说明书中定义的，具有修饰的骨架的寡核苷酸包括在骨架中保留磷原子的那些和在骨架中不具有磷原子的那些。出于本说明书的目的，和如有时在本技术领域所提及的，在核苷间骨架中没有磷原子的修饰的寡核苷酸也可以被认为是寡核苷。

[0113] 优选的修饰的寡核苷酸骨架包括，例如，硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯（包括 3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯）、次磷酸酯 (phosphinate)、磷酰胺酯 (phosphoramidate)（包括 3'-氨基磷酸酰胺酯和氨基烷基磷酸酰胺酯）、硫逐磷酸酯、硫逐烷基磷酸酯、硫逐烷基磷酸三酯和硼烷磷酸酯 (boranophosphate)（这些具有普通 3'-5' 连接）、它们的 2'-5' 连接的类似物和具有反转的极性的那些（其中相邻对的核苷单位是 3'-5' 至 5'-3' 或 2'-5' 至 5'-2' 连接）。还包括多种盐、混合的盐和游离酸形式。用于合成含有具有上述修饰的骨架或非天然核苷间键的寡核苷酸的反义化合物的技术，为本领域技术人员所熟知，并可以使用常规方法学实现。教导上述含磷键的制备的代表性美国专利包括，但不限于，美国专利号 3,687,808；4,469,863 和 5,625,050；每一均以其整体被并入此处作为参考。

[0114] 其中不包括磷原子的优选的修饰的寡核苷酸骨架，可以具有这样的骨架，其由短链烷基或环烷基核苷间键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键、或一个或多个短链杂原子的或杂环的核苷间键形成。这些包括具有吗啉代键（部分地从核苷的糖部分形成）的骨架；硅氧烷骨架；硫化物、亚砷和砷骨架；formacetyl 和 thioformacetyl 骨架；亚甲基 formacetyl 和 thioformacetyl 骨架；含有链烯的骨架；氨基磺酸酯 (sulfamate) 骨架；亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架；磺酸酯和磺酰胺骨架；酰胺骨架；和其它具有混合的 N、O、S 和 CH₂ 组成部分的骨架。可以由本领域技术人员根据常规方法，例如，在美国专利号 5,034,506；5,166,315 或 5,677,439 所述，完成这类寡核苷酸的合成，所述专利各自以其整体被并入作为参考。

[0115] 在其它优选的寡核苷酸模拟物中，由新的基团代替糖和核苷间键两者，即核苷酸

单元的骨架。保持碱基单位以便与合适的核酸靶标化合物杂交。已经被证实具有优秀的杂交特性的一个这样的寡聚化合物,寡核苷酸模拟物,被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖骨架由含有酰胺的骨架,特别是氨基乙基甘氨酸骨架所代替。核苷碱基被保留并直接或间接结合于骨架的酰胺部分的氮杂氮原子上。教导制备PNA化合物的代表性美国专利包括,但不限于,美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262,其各自以其整体被并入作为参考。PNA化合物的另外的教导可以在Nielsen等人,Science,1991,254,1497-1500中发现。

[0116] 本发明的最优选实施方案是如在美国专利号5,034,506中所述的具有吗啉代骨架结构的寡核苷酸。还优选具有硫代磷酸酯骨架的寡核苷酸和具有杂原子骨架的寡核苷,所述杂原子骨架尤其是如在美国专利号5,489,677中所述的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架]、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [其中天然磷酸二酯骨架表示为 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$],和如在美国专利号5,602,240中所述的酰胺骨架。

[0117] 修饰的寡核苷酸也可以含有一个或多个取代的糖部分。优选的寡核苷酸在2'位置包含下列之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-链烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中该烷基、链烯基和炔基可以是取代或未取代的C1至C10烷基或C2至C10链烯基和炔基。特别优选的是 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n \text{O}]_m \text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n \text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n \text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n \text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n \text{ONH}_2$ 和 $\text{O}(\text{CH}_2)_n \text{ON}[(\text{CH}_2)_n \text{CH}_3]$,其中n和m是1到约10。其它优选的寡核苷酸在2'位置包含下列之一:C1至C10低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ON₂、N₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报道基团、嵌入剂、用于改善寡核苷酸的药代动力学特性的基团、或用于改善寡核苷酸的药效学特性的基团、和具有相似特性的其它取代基。优选的修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃,也称为2'-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等人,Helv. Chim. Acta,1995,78,486-504)即,烷氧基烷氧基。再一优选的修饰包括2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即, $\text{O}(\text{CH}_2)_2 \text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团,也称为2'-DMAOE。此类的其它优选的修饰是如在Rajwanshi等人,Angew. Chem. Int. Edit. 2000,39,1656-1659所述统称为LNA(锁式核酸)的二环类修饰。

[0118] 其它优选的修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟(2'-F)。还可以在寡核苷酸的其它位置上进行相似的修饰,特别是3'末端核苷酸上或在2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置,和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可以具有糖模拟物,例如代替呋喃戊糖的环丁基部分。本领域的技术人员可以使用常规方法产生这类修饰的糖结构。教导制备这类修饰的糖结构的代表性美国专利包括,但不限于,美国专利号4,981,957;5,118,800和5,700,920,其各自以其整体被并入作为参考。

[0119] 反义寡核苷酸还可以包括核苷碱基(在本技术领域通常简称为“碱基”)修饰或取代。如这里所使用,“未修饰的”或“天然的”核苷碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)、和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核苷碱基包括其它的合成和天然的核苷碱基,例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、

2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫脲嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和 2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-氮杂 (azo) 尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶 (假尿嘧啶)、4-硫脲嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基和其它 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代特别是 5-溴代、5-三氟甲基和其它的 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和 7-脱氮腺嘌呤和 3-脱氮鸟嘌呤和 3-脱氮腺嘌呤。更多的核苷碱基包括在美国专利号 3,687,808 中公开的那些,在 The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I. 编辑 John Wiley & Sons, 1990 中公开的那些,由 Englisch 等人, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 公开的那些,和由 Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. 和 Lebleu, B. 编辑, CRC Press, 1993 公开的那些。这些核苷碱基中的一些对于增加本发明的寡聚化合物的结合亲和力是特别有用的。这些包括 5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和 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。已经表明,5-甲基胞嘧啶取代增加核酸双螺旋稳定性 0.6-1.2 摄氏度 (Sanghvi, Y. S.、Crooke, S. T. 和 Lebleu, B. 编辑, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), 是目前优选的碱基取代,尤其是当与 2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时甚至更为优选。

[0120] 根据本技术领域众所周知的方法,本领域技术人员能够制备修饰的核苷碱基。例如,教导制备某些上述修饰的核苷碱基以及其它修饰的核苷碱基的代表性的美国专利,包括,但不限于,以上提到的美国专利号 3,687,808,以及美国专利 4,845,205 ;5,130,302 和 5,134,066,其各自以其整体被并入作为参考。

[0121] 本发明的寡核苷酸的另一修饰涉及化学连接于寡核苷酸的一个或多个部分或缀合物,其增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。这样的部分包括,但不限于,脂质部分,例如胆固醇部分 (Letsinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、胆酸 (Manoharan 等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)、硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醚 (Manoharan 等人, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan 等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、硫代胆固醇 (Oberhauser 等人, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪链,例如,十二烷二醇或十一烷基残基 (Saison-Behmoaras 等人, EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov 等人, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk 等人, Biochimie, 1993, 75, 49-54)、磷脂,例如,双十六烷基-外消旋-甘油 (di-hexadecyl-rac-glycerol) 或 1,2-二-O-双十六烷基-外消旋-甘油-3-H-膦酸三乙铵 (Manoharan 等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea 等人, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan 等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) 或金刚烷乙酸 (Manoharan 等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、棕榈基部分 (Mishra 等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、或十八烷基胺或己基氨基-羰基-氧基胆固醇部分 (Crooke 等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)。教导这类寡核苷酸缀合物的制备的代表性美国专利包括,但不限于,美国专利号 4,828,979 ;4,948,882 和 5,688,941,其各自以其整体被并入作为参

考。

[0122] 不需要在给定化合物中的全部位置均一的修饰,实际上可以在寡核苷酸内单个化合物中或甚至在的单个核苷上掺入一种以上的上述修饰。本发明还包括反义化合物,其为嵌合的化合物。在本发明下,“嵌合的”反义化合物或“嵌合体”是这样的反义化合物(特别是寡核苷酸),其含有两个或更多个化学不同区域,每一个区域均由至少一种单体单元(即,在寡核苷酸化合物的情况下核苷酸)组成。这些寡核苷酸通常含有至少一个如下区域,其中该寡核苷酸被修饰从而赋予该寡核苷酸对核酶降解的增加抗性、增加的细胞摄取、和/或对靶标核酸增加的结合亲和力。寡核苷酸的另外区域可以充当能够切割 RNA:DNA 或 RNA:RNA 杂合体的酶的底物。例如, RNase H 是细胞内切核酸酶,其切割 RNA:DNA 双螺旋的 RNA 链。因此, RNase H 的活化导致 RNA 靶标的切割,由此大大增加寡核苷酸对基因表达的抑制效率。所以,与杂交于相同靶标区域的硫代磷酸酯脱氧寡核苷酸相比,当使用嵌合的寡核苷酸时,用更短的寡核苷酸经常可以获得可比的效果。

[0123] 可以以如上所述的两个或更多寡核苷酸、修饰的寡核苷酸、寡核苷和/或寡核苷酸模拟物的复合结构形式,形成本发明的嵌合反义化合物。这样的化合物在本领域中也称作杂合体或 gapmer。本领域技术人员可以根据常规方法制备这些杂合体结构。教导这类杂合体结构的制备的代表性美国专利包括,但不限于,美国专利号 5,013,830 ;5,149,797 和 5,700,922,其各自以其整体被并入作为参考。

[0124] 可以通过众所周知的固相合成技术方便和常规的制备根据本发明使用的反义化合物。这类合成仪器由多家售卖,例如,应用生物系统 (FosterCity、Calif.)。可以另外的或备选的使用在本技术领域公知的用于这类合成的任何其它手段。使用相似技术制备寡核苷酸,例如硫代磷酸酯和烷基化衍生物是众所周知的。

[0125] 此外,技术人员将立即理解,本发明的反义分子不必须靶向 mir-208-2 本身,而也可以靶向包含 mir-208-2 的 mRNA,例如 pri-miRNA 或 pre-miRNA。

[0126] 表 1 给出下调 mir-208-2 的优选的反义序列。可以将这里公开的任何化学修饰应用于这些序列。

[0127] 表 1

[0128]

反义序列	SEQ ID NO:
5'-CCCTCAGACAAACCTTTTGTT-3'	10
5'-CCTCAGACAAACCTTTTG TTC-3'	11
5'-CTCAGACAAACCTTTTG TTCG-3'	12
5'-TCAGACAAACCTTTTG TTCGT-3'	13
5'-CAGACAAACCTTTTG TTCGTC-3'	14
5'-AGACAAACCTTTTG TTCGTCT-3'	15
5'-GACAAACCTTTTG TTCGTCTT-3'	16
5'-ACAAACCTTTTG TTCGTCTTA-3'	17
5'-CAAACCTTTTG TTCGTCTTAT-3'	18
5'-AAACCTTTTG TTCGTCTTATA-3'	19
5'-AACCTTTTG TTCGTCTTATAT-3'	20
5'-ACCTTTTG TTCGTCTTATATT-3'	21
5'-CCTTTTG TTCGTCTTATATTC-3'	22
5'-CTTTTG TTCGTCTTATATTCG-3'	23
5'-TTTTG TTCGTCTTATATTCGG-3'	24
5'-TTTG TTCGTCTTATATTCGGA-3'	25
5'-TTG TTCGTCTTATATTCGGAT-3'	26
5'-TG TTCGTCTTATATTCGGATC-3'	27

[0129]

5'-GTTCTCTTATATTCGGATCA-3'	28
5'-TTCGTCTTATATTCGGATCAG-3'	29
5'-TCGTCTTATATTCGGATCAGA-3'	30
5'-CGTCTTATATTCGGATCAGAA-3'	31
5'-GTCTTATATTCGGATCAGAAA-3'	32
5'-TCTTATATTCGGATCAGAAAC-3'	33
5'-CTTATATTCGGATCAGAAACA-3'	34
5'-TTATATTCGGATCAGAAACAT-3'	35
5'-TATATTCGGATCAGAAACATA-3'	36
5'-ATATTCGGATCAGAAACATAA-3'	37
5'-TATTCGGATCAGAAACATAAT-3'	38
5'-ATTTCGGATCAGAAACATAATT-3'	39
5'-TTCGGATCAGAAACATAATTC-3'	40
5'-TCGGATCAGAAACATAATTCG-3'	41
5'-CGGATCAGAAACATAATTCGA-3'	42
5'-GGATCAGAAACATAATTCGAG-3'	43
5'-GATCAGAAACATAATTCGAGC-3'	44
5'-ATCAGAAACATAATTCGAGCA-3'	45
5'-TCAGAAACATAATTCGAGCAA-3'	46
5'-CAGAAACATAATTCGAGCAAAA-3'	47
5'-AGAAACATAATTCGAGCAAAAA-3'	48
5'-GAAACATAATTCGAGCAAAAAA-3'	49
5'-AAACATAATTCGAGCAAAAAAG-3'	50
5'-AACATAATTCGAGCAAAAAAGC-3'	51
5'-ACATAATTCGAGCAAAAAAGCT-3'	52
5'-CATAATTCGAGCAAAAAAGCTT-3'	53
5'-ATAATTCGAGCAAAAAAGCTTC-3'	54
5'-TAATTCGAGCAAAAAAGCTTCC-3'	55
5'-AATTCGAGCAAAAAAGCTTCCC-3'	56
5'-ATTTCGAGCAAAAAAGCTTCCCT-3'	57
5'-TTCGAGCAAAAAAGCTTCCCTG-3'	58
5'-TCGAGCAAAAAAGCTTCCCTGA-3'	59
5'-CGAGCAAAAAAGCTTCCCTGAG-3'	60
5'-GAGCAAAAAAGCTTCCCTGAGA-3'	61

[0130]

5'-AGCAAAAAGCTTCCCTGAGAG-3'	62
5'-GCAAAAAGCTTCCCTGAGAGG-3'	63
5'-CAAAAAGCTTCCCTGAGAGGA-3'	64
5'-AAAAAGCTTCCCTGAGAGGAG-3'	65
5'-AAAAGCTTCCCTGAGAGGAGA-3'	66
5'-AAAGCTTCCCTGAGAGGAGAA-3'	67
5'-AAGCTTCCCTGAGAGGAGAAG-3'	68
5'-AGCTTCCCTGAGAGGAGAAGG-3'	69
5'-GCTTCCCTGAGAGGAGAAGGA-3'	70
5'-CTTCCCTGAGAGGAGAAGGAG-3'	71
5'-TTCCCTGAGAGGAGAAGGAGG-3'	72
5'-TCCCTGAGAGGAGAAGGAGGT-3'	73
5'-CCCTGAGAGGAGAAGGAGGTG-3'	74
5'-CCTGAGAGGAGAAGGAGGTGG-3'	75
5'-CTGAGAGGAGAAGGAGGTGGG-3'	76
5'-TGAGAGGAGAAGGAGGTGGGG-3'	77

[0131] 本发明的反义化合物可以在体外合成,但是也可以包括生物来源的反义组合物、或设计用于指导反义分子体内合成的遗传载体构建体。本发明的化合物还可以与其它分子、分子结构或化合物的混合物(例如脂质体、靶向受体的分子、口服、直肠、局部或其它的制剂,用于协助摄取、分布和/或吸收)混合、囊化、缀合或以另外方式结合,用于这样做的常规方法是已经存在的并是本领域技术人员所熟悉的。例如,代表性的美国专利包括,但不限于,美国专利号 5,108,921;5,354,844 和 5,595,756,其各自以其整体被并入作为参考。

[0132] 本发明的反义化合物包括任何药物可接受的盐、酯或这类酯的盐、或当施用于包括人的动物时能够提供(直接的或间接的)生物活性代谢物或其残基的任何其它的化合物。因此,例如,本公开也涉及本发明化合物的前药和药物可接受的盐、这类前药的药物可接受的盐、和其它的生物等价物。术语“药物可接受的盐”指本发明化合物的生理学和药学上可接受的盐;即,保留了母体化合物的期望的生物活性并且不导致不期望的毒性效应的盐。本领域技术人员根据常规方法可以制备这类化合物(Berge 等人,“Pharmaceutical Salts” J. of Pharma Sci.,1977,66,1-19)。

[0133] 术语“前药”指这样的治疗剂,其以无活性形式被制备,在体内或细胞内通过内源酶或其它化学药物的作用和/或条件被转化为活性形式(即,药物)。具体的,可以根据在 WO 93/24510(Gosselin 等人,12月9日、1993)中或在 WO 94/26764(Imbach 等人)中公开的方法,将本发明寡核苷酸的前药制备为 SATE[(S-乙酰基-2-硫乙基)磷酸酯]衍生物。

[0134] 也可以将本发明的反义化合物用于诊断、治疗、预防和用作研究试剂和试剂盒。为了治疗,对怀疑患有能够通过调节 mir-208-2 的表达来治疗的疾病或病症的动物,优选人,通过施用根据本发明的反义化合物来治疗。通过将有效量的反义化合物加入合适的药物可接受的稀释剂或载体,可以在药物组合物中应用本发明的化合物。本发明的反义化合物的用途和本发明方法还可以用于预防,例如预防或延迟例如感染、炎症或肿瘤形成。

[0135] 本发明的反义化合物可以用于研究和诊断,因为这些化合物能杂交于编码

mir-208-2 的核酸,这使得三明治及其它试验可以容易地构建以利用这一事实。可以通过本领域公知的手段检测本发明的反义寡核苷酸与编码 mir-208-2 的核酸的杂交。这样的手段可以包括酶与寡核苷酸的缀合、寡核苷酸的放射性标记或任何其它合适的检测手段。也可以制备使用这类检测手段用来在样品中检测 mir-208-2 水平的试剂盒。

[0136] 本发明也包括药物组合物和制剂,其包括本发明的反义化合物。由期望进行局部还是全身治疗决定和由治疗的区域决定,可以以多种方式施用本发明的药物组合物。施用可以是局部的(包括眼的和至粘膜的(包括阴道和直肠的递送)、肺的,例如,通过粉末或气雾剂(包括通过喷雾器)的吸入或吹入;气管内的、鼻内的、表皮的和经皮肤的)、口服的或胃肠道外的。肠胃外施用包括静脉内的、动脉内的、皮下的、腹膜内的或肌内的注射或输注;或颅内的,例如,鞘内的或心室内的施用。具有至少一个 2' -O- 甲氧基乙基修饰的寡核苷酸被认为对于口服施用是特别有用的。

[0137] 本发明的组合物的用途

[0138] 如上所述,本发明的组合物可以在多种情况,包括但不限于研究、诊断和治疗中使用。

[0139] 对于治疗用途,可以使用这里所述的组合物来治疗由 mir-208-2 失调引起的疾病和病症。如在这里提出的,发现这一新型小 RNA 主要在肌肉组织,特别是心脏组织中表达,并与 MYH7 转录和表达相关。与 mir-208-2 失调相关的疾病包括但不限于肌肉病症和心脏病症,并可以包括与 MYH6、MYH7 或 MYH7B 中的突变有关的这类疾病。miRNA 的失调表达可以是疾病进展的原因,并因此使得 miRNA 有资格成为潜在的治疗靶标(通过用合适的递送系统,使用 siRNA 或 shRNA 抑制 miRNA 或重新引入 dsRNA)。

[0140] 例如,可以使用本发明的化合物来治疗心房纤维性颤动 (AF),一种最常见的持久心律失常,其与目的在于最终稳定 AF 的广泛的结构、收缩的和电生理的重塑有关 (Allessie, M.、J. Ausma 和 U. Schotten, *Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2002. 54(2) :p. 230-46)。AF 与心房心肌中心室肌球蛋白同种型的表达增加有关,被认为是去分化过程的一部分。有趣的是,在 AF 心肌中,发现心室心肌特征性的功能类型基因上调,而主要在心房心肌中表达的功能类型下调。(Barth, A. S. 等人, *Reprogramming of the Human Atrial Transcriptome in Permanent Atrial Fibrillation: Expression of a Ventricular-Like Genomic Signature* 10.1161/01.RES.0000165480.82737.33. *Circ Res*, 2005. 96(9) : p. 1022-1029)。在 AF 中发现上调的基因之一是 MYH7B,该基因在其内含子之一中包含 mir-499。在人心房组织中观察到的 MYH 家族成员的同工酶转换被认为是对血液动力学超负荷的早期适应 (Buttrick, P. M. 等人, *Myosin isoenzyme distribution in overloaded human atrial tissue*. *Circulation*, 1986. 74(3) :p. 477-83; Yazaki, Y. 等人, *Molecular adaptation to pressure overload in human and rat hearts*. *J Mol Cell Cardiol*, 1989. 21 Suppl 5 :p. 91-101)。

[0141] 在另一实例中,发现化合物在肥厚性心肌病 (HCM) 中的用途, HCM 的特征在于小的、显著肥厚的、过度收缩的左心室 (LV) (Maron, B. J., *Hypertrophic cardiomyopathy : a systematic review*. *Jama*, 2002. 287(10) :p. 1308-20)。人心室肌表达 MYH6 和 MYH7, 而以 MYH7 占优势。在肥厚期间没有发现 MYH7 表达的显著区别。然而,超负荷的人心室

心肌似乎丧失其通常含有的少量的 MYH6,因为在患有高血压病患者的尸检材料中或在瓣膜性心脏病患者的围手术期活检组织中都没有检查到这一形式 (Schwartz, K. 等人, Left ventricular isomyosins in normal and hypertrophied rat and human hearts. Eur Heart J, 1984. 5 Suppl F :p. 77-83. Mercadier, J. J. 等人, Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human ventricular myocardium. Circ Res, 1983. 53(1) :p. 52-62)。

[0142] 鉴定到的小 RNA, mir-208-2、mir-208 和 mir-499,也可以用作检测心房纤颤的早期发作或肥厚性心肌病的生物标记。

[0143] 用于局部施用的本发明化合物的药物组合物和制剂可以包括:透皮贴剂、软膏、洗剂、霜剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体,水性的、粉末的或油性的基质、增稠剂等可以是必须的或期望的。包衣的避孕套、手套等也可以是有用的。

[0144] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒、在水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、囊剂 (sachet) 或片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可能是可期望的。

[0145] 用于胃肠道外、鞘内或心室内施用的组合物和制剂可以包括无菌的水溶液,其也可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂,例如,但不限于,渗透增强剂、载体化合物和其它药物可接受的载体或赋形剂。

[0146] 本发明的药物组合物包括,但不限于,溶液、乳剂和含有脂质体的制剂。这些组合物可以由本领域技术人员,根据常规方法从各种成分(包括,但不限于,预形成的液体、自乳化固体和自乳化的半固体)产生。

[0147] 可以根据在制药工业中众所周知的常规方法制备本发明的药物组合物,其可以方便地为单位剂型的形式。这类技术包括将活性成分与药物载体或赋形剂混合的步骤。一般而言,通过将活性成分与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀地紧密地混合,接着,如果需要,使该产物成型来制备该制剂。

[0148] 可以将本发明的组合物配制成任何可能的剂型,例如,但不限于,片剂、胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。还可以在水介质、非水介质或混合的介质中将本发明的组合物配制为悬浮液。水性的悬浮液还可以含有增加悬浮液的粘度的物质,包括,例如,羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或葡聚糖。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0149] 在本发明的一个实施方案中,可以配制药组合物并以泡沫形式使用。药物泡沫包括制剂,例如,但不限于,乳剂、微乳、霜剂、凝胶剂和脂质体。尽管性质上基本相似,这些制剂在组分和最终产物的稠度上不同。这类组合物和制剂的制备是在制药和制剂领域技术人员中公知的,并可以应用于本发明组合物的配制。

[0150] 可以将组合物单独的施用或与至少一种其它的药剂(例如稳定化合物)组合施用,其可以在任何无菌的、生物相容的药物载体中被施用,所述载体包括,但不限于,盐水、缓冲盐水、葡萄糖和水。可以单独的或与其它药剂、药物或激素组合地施用该组合物。

[0151] 本发明涵盖的药物组合物可以通过任何的多种途径施用,包括,但不限于,口服、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、透皮、皮下的、腹膜内的、经鼻的、肠的、局部的、舌下的或直肠的手段。除了活性成分,这些药物组合物可以含有合适的药物可接受的载体,包括促进将活性化合物加工为能够药物使用的制备物的赋形剂和助剂。配制和施用的更多技术的细节可以在最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack

Publishing Co., Easton, Pa.) 中找到。可以使用本领域众所周知的药物可接受的载体以适合口服施用的剂量配制用于口服施用的药物组合物。这类载体使药物组合物能够被配制为用于由患者摄入的片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆 (Slurry)、悬浮液等。口服使用的药物制剂可以通过如下方式获得：将活性化合物与固体赋形剂混合、任选地研磨产生的混合物、和加工该颗粒的混合物（如果期望的话，在加入合适的助剂之后），以获得片剂或锭剂核芯。合适的赋形剂是碳水化合物或蛋白质填充剂，例如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇、或山梨糖醇；来自玉米、小麦、稻、马铃薯或其它植物的淀粉；纤维素，例如甲基纤维素、羟丙甲基纤维素、或羧甲基纤维素钠；树胶，包括阿拉伯胶和黄蓍胶；和蛋白质例如明胶和胶原蛋白。如果需要的话，可以加入崩解剂或增溶剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或其盐，例如藻酸钠。

[0152] 锭剂核芯可以与合适的包衣，例如浓缩的糖溶液联合使用，所述包衣也可以含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、紫胶漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或锭剂包衣加入着色剂或色素用于产品鉴定或表征活性化合物的量，即，剂量。

[0153] 可以口服使用的药物制剂包括由明胶制备的推入配合式 (push-fit) 胶囊、以及由明胶和例如甘油或山梨糖醇等包衣制备的软密封胶囊。推入配合式胶囊可以含有与填充剂或粘合剂，例如乳糖或淀粉，润滑剂，例如滑石或硬脂酸镁，和，任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中，活性成分可以被溶解或悬浮在有或没有稳定剂的合适的液体，例如脂肪油、液体、或液体聚乙二醇中。

[0154] 可以在含水溶液，优选在生理相容的缓冲液，例如汉克斯溶液、林格溶液、或生理缓冲盐水中配制适合胃肠外施用的药物组合物。含水的注射悬浮液可以含有增加悬浮液黏性的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇、或葡聚糖。此外，可以将活性化合物的悬浮液制备为合适的油性注射悬液。合适的亲脂溶剂或运载体 (vehicle) 包括脂肪油，例如芝麻油、或合成的脂肪酸酯，例如油酸乙酯或甘油三酯、或脂质体。也可以使用非脂质的聚阳离子氨基聚合物用于递送。可选的，悬浮液也可以含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度的物质以允许制备高浓度溶液。

[0155] 对于局部或经鼻的施用，在制剂中使用对于待透过的特定屏障合适的渗透剂。这类渗透剂是本技术领域公知的。

[0156] 可以以本技术领域公知的方式制备本发明的药物组合物，例如，通过常规的混合、溶解、制粒、制成锭剂、研末 (levigate)、乳化、包囊化、包埋 (entrap) 或冻干加工。

[0157] 可以提供盐形式的药物组合物，并其可以用许多酸形成，包括但不限于，盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。与相应的游离碱形式相比，盐倾向于在水溶液或其它质子性溶剂中更加可溶。在其它情况下，优选的制剂可以是冻干的粉末，其可以含有下列的任何或全部：1-50mM 组氨酸、0.1% -2% 蔗糖、和 2-7% 甘露糖醇，在 pH 4.5-5.5 的范围，使用前将其与缓冲液混合。

[0158] 在制备药物组合物之后，可以将其置于合适的容器中并标记用于治疗适应症。为了施用，这类标记将包括施用的量、频率和方法。

[0159] 适合在本发明中使用的药物组合物包括其中含有有效量的活性成分以实现预期目的的组合物。有效剂量的确定是在本领域技术人员的能力范围之内。对于任何化合物，

可以最初在细胞培养试验（例如，赘生性细胞）或在动物模型、通常是小鼠、兔子、狗或猪中评估治疗有效剂量。也可以使用动物模型确定施用的合适浓度范围和途径。然后可以使用这类信息来确定在人中施用的有用的剂量和途径。治疗有效剂量指改善症状或病况的活性成分的量。可以在细胞培养物或实验动物中通过标准药理学方法确定治疗功效和毒性，例如，ED50（在 50% 的群体中治疗有效的剂量）和 LD50（对 50% 的群体致死的剂量）。在毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数，其可以被表示为比例 LD50/ED50。优选显示大的治疗指数的药物组合物。使用从细胞培养试验和动物研究中获得的数据来配制用于人的剂量范围。在这类组合物中含有的剂量优选在几乎没有或完全无毒性的包括 ED50 的循环浓度范围内。由使用的剂量形式、患者的敏感度、和施用的途径决定，剂量在这一范围内变化。医师考虑到涉及需要治疗的受试者的因素，来确定确切的剂量。可以调正剂量和施用以提供足够水平的活性部分或维持期望的效果。可以考虑的因素包括疾病状态的严重性、受试者的一般健康情况、年龄、体重和受试者的性别、饮食、施用的时间和频率、药物组合、反应敏感度、和对治疗的耐受度 / 反应。根据特定制剂的半衰期和清除率，可以每 3-4 天、每周或每两周一次，施用长效的药物组合物。

[0160] 由施用的途径决定，正常剂量可以从 0.1 至 100,000 微克，高达总剂量约 1 克。在文献中提供了有关具体剂量和递送方法的指导，这些指导通常是本领域技术人员可获得的。本领域技术人员针对核苷酸和蛋白质或其抑制剂将使用不同制剂。相似的，多核苷酸或多肽的递送对特定细胞、病症、位点等将是特定的。

[0161] 本发明组合物的备选的用途包括非治疗性用途，包括，但不限于生物标记指示、诊断和研究用途。基于这里公开的 mir-208-2 的新发现，本领域的技术人员目前能够利用本发明的化合物用于这些目的。特别有意义的研究应用方法包括在细胞中减少或增加 mir-208-2 小 RNA 的表达。同样的，本发明也考虑用于诊断或确定心血管或肌肉病症的治疗策略的试剂盒、在细胞中减少或增加 mir-208-2、mir-208 和 / 或 mir-499 表达的方法、和在细胞中减少或增加 mir-208-2、mir-208 和 / 或 mir-409 活性的方法。

实施例

[0162] miRNA-208-2 的鉴定和表征

[0163] 根据下列操作方案描绘小 RNA 表达谱：

[0164] RNA 分离

[0165] 用异氟醚（3%，20L/min）深度麻醉之后，对大鼠和小鼠行胸廓部分切除术并通过左心室灌注。用来自翼型灌注设备（SV-19BLK；Termudo, Elkton, MD）的 23 号针头穿刺左心室，所述针头连接于含有洗涤溶液（NaCl 0.9% 和 250,000U/l 肝素，在 38℃）的密闭式加压注射器。穿刺右心房以提供流出，在精确控制的 120mm Hg 压力下输注灌注液。在恒定速率下持续灌注 2 分钟（20ml）。分离器官，在液氮中速冻和保藏在 -80℃。根据厂商提供的说明书，在每 100mg 组织 1ml **Trizol**® 试剂（Life-Technologies™，货号：15596-018）存在下，使用 polytron 匀浆器匀浆器官。RNA 被溶解在无 RNase 的水中和贮存在 -80℃。

[0166] 用于 RNA 印迹的 DNA 探针

[0167] 针对 mir-208 (5' -acaagctttttgctcgtctttat-3')、mir-208-2 (5' -acaaacctttt tgttcgtctttat-3')、mir-499 (5' -aaacatcactgcaagtctt-3')、mir-206 (5' -ccacacactt

ccttacattcca-3') 和 U6 snRNA(5' -gccatgctaattcttctgtatc-3') 的探针是 5' -地高辛配基 - 标记的。从 Microsynth GmbH 获得全部探针和合成的 miRNA 序列。

[0168] RNA 印迹

[0169] 使用地高辛配基 - 标记的 DNA 寡核苷酸进行 RNA 印迹分析。简言之,在变性的 15% 聚丙烯酰胺 /7M 尿素凝胶 (Invitrogen, 货号 :EC68855BOX) 分离来自各个组织的 5 μ g 的总 RNA,在 1xTBE 中跑胶。在 0.5xTBE 中以 0.8mA/cm² 将分离的 RNA 转移 90 分钟至带正电荷的尼龙膜 (Roche, 货号 :1209299)。在 120mJ 进行 UV 交联之后,用 2xSSC 洗膜和用 DIG Easy Hyb- 缓冲液 (Roche, 货号 :11603558001) 封闭 20 分钟。封闭之后,用含有 1pmol/ml 5' -DIG 标记的 DNA 寡核苷酸的 DIG Easy Hyb- 缓冲液孵育膜 60 分钟。用 0.1% SDS/2xSSC 洗膜继之用 2xSSC 洗两次。接着洗膜、封闭 (Roche, 货号 :1585762, Roche) 和根据厂商说明书用碱性磷酸酶缀合的抗 - 地高辛配基抗体 (Roche, 货号 :1093274) 孵育。在即用型 CDP-Star (Roche, 货号 2041677) 中孵育膜和使用 ChemiDoc XRS (BioRad) 检测化学发光。

[0170] 结果 :不同小鼠组织的 miRNA 表达谱显示在心脏中 mir-208 和 mir-499 的表达是高度丰富的。小鼠和大鼠组织的 RNA 印迹分析证实观察到的这些 miRNA 的表达模式 (数据未显示)。

[0171] 更具体的,在心脏的心房和心室中发现 mir-208 高度表达,该表达在小鼠和大鼠中都是保守的。在另一方面,Mir-499 局限于心脏的心室区域。Mir-206 主要在肌肉中表达,在心脏中检测到低水平的表达。基于这些发现,我们确定 mir-499 的表达 (Bentwich, I. 等人, Identification of hundredsof conserved and nonconserved human microRNAs. Nat Genet, 2005.) 在心脏心室区域高度富集 ;并证实 mir-208 的心脏和肌肉富集的表达谱 (Lagos-Quintana, M. 等人, Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol, 2002. 12(9) :p. 735-9.) 和 mir-206 的心脏和肌肉富集的表达谱 (Sempere, L.F. 等人, Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. Genome Biol, 2004. 5(3) :p. R13.)。

[0172] 先前从心脏克隆的 Mir-208 (Lagos-Quintana, M. 等人, New microRNAs from mouse and human. Rna, 2003. 9(2) :p. 175-9.) 位于肌球蛋白重链 6 基因的内含子内,在哺乳动物中高度保守。有趣的是, mir-499 (Bentwich 等人, 如上引文) 位于人肌球蛋白重链 7B 基因的内含子内。与 mir-208 (斑马鱼、人、黑猩猩、狗、大鼠、小鼠和爪蟾 (xenopus)) 相比, miRNA mir-499 在甚至更大物种群中是高度保守的。

[0173] 这一数据表明基因和 miRNA 的功能都是保守的,因此令人惊讶的是在 mir-208 中未发现与 mir-499 相似的保守水平。有趣的是,在斑马鱼 (Danio rerio) 中,心室肌球蛋白重链 (vmhc) 是人 MYH6 的密切相关的同源物,其转录物具有相似的内含子 / 外显子结构。

[0174] 包含 mir-208 序列的 MYH6 内含子与 vmhc 转录物的比对,显示存在有 4 个核苷酸差异的相似 mir-208 序列 (图 1)。有趣的是, vmhc 与哺乳动物 MYH7 家族成员比 vmhc 与 MYH6 成员更加相关,因为 vmhc 和 MYH7 两者都由于低速率的 ATP 水解而具有慢的收缩速率。另一方面, MYH6 属于 '快' - 同种型 (Weiss, A. 和 L. A. Leinwand, The mammalian myosin heavy chain gene family. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. 12 :p. 417-39)。令人惊讶的是,含有 mir-208-2 的 vmhc 内含子与哺乳动物 MYH7 内含子的比对显示新 mir-208 样 miRNA, 这里现

称之为 mir-208-2。

[0175] 总之,我们已经鉴定到在斑马鱼基因 *vmhc* 和哺乳动物 MYH7 基因的内含子内嵌入的新型 miRNA 序列。

[0176] 实施例 :mir-208-2 的表征

[0177] 在正常小鼠和大鼠心脏中,MYH7 仅在新生儿的发育期间表达 (Lyons,G. E. 等人, *Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle*. *J Cell Biol*,1990. 111(6Pt 1) :p. 2427-36.)。然而,当心脏暴露于超负荷压力而导致肥厚时,MYH7 和其它胎儿基因被重新表达。为了验证 mir-208-2 的存在,在不同的发育阶段,从小鼠心脏分离总 RNA。执行 RT-PCR (图 2) 和 RNA 印迹分析 (图 3) 以分别证实基因表达和 miRNA 表达。

[0178] RNA 分离

[0179] 分离从胎龄 (ED) 17 天到出生后 19 天的不同发育阶段的小鼠心脏,在液氮中速冻和贮存在 -80°C 。根据厂商提供的说明书,使用 polytron 匀浆器,在每 100mg 组织存在 1ml **Trizol**® 试剂 (Life-Technologies™, 货号 :15596-018) 情况下对器官匀浆。将 RNA 溶解在无 RNase 水中并贮存在 -80°C 。

[0180] 用于 RNA 印迹法的 DNA 探针

[0181] 针对 mir-208 (5' -acaagctttttgctcgtctttat-3')、mir-208-2 (5' -acaaacctttt tgttcgtctttat-3')、mir-499 (5' -aaacatcactgcaagtctt-3')、mir-206 (5' -ccacacactt ccttacattcca-3') 和 U6 snRNA (5' -gccatgctaattcttctgtatc-3') 的探针是 5' -地高辛配基 - 标记的。全部探针和合成的 miRNA 序列获自 Microsynth GmbH。

[0182] RNA 印迹

[0183] 使用地高辛配基标记的 DNA 寡核苷酸执行 RNA 印迹分析。简言之,在变性的 15% 聚丙烯酰胺 /7M 尿素凝胶 (Invitrogen, 货号 :EC68855BOX) 上分离来自各个组织的 5 μg 的总 RNA,在 1xTBE 中跑胶。在 0.5xTBE 中以 0.8mA/cm² 将分离的 RNA 转移 90 分钟至带正电荷的尼龙膜 (Roche, 货号 :1209299)。在 120mJ 进行 UV 交联之后,用 2xSSC 洗膜和用 DIG EasyHyb 缓冲液 (Roche, 货号 :11603558001) 封闭 20 分钟。封闭之后,用含有 1pmol/ml 5' -DIG 标记的互补 DNA 寡核苷酸的 DIG Easy Hyb 缓冲液孵育膜 60 分钟。用 0.1% SDS/2xSSC 洗膜,继之用 2xSSC 洗两次。接着洗膜、封闭 (Roche, 货号 :1585762, Roche) 并根据厂商说明书用碱性磷酸酶缀合的抗 - 地高辛配基抗体 (Roche, 货号 :1093274) 孵育。在即用型 CDP-Star (Roche, 货号 2041677) 中孵育膜和使用 ChemiDoc XRS (BioRad) 检测化学发光。

[0184] 基因表达分析

[0185] MYH6 (Mm00440354_m1)、MYH7 (Mm00600555_m1) 和 18S (Hs99999901-s1) 的 PCR- 引物组获自应用生物系统 (AB),根据厂商提供的说明书,使用一步 RT-PCR Master Mix 试剂 (AB, 货号 :4309169)。使用 7500FAST 实时 PCR 系统 (AB),一式三份的测量全部样品。

[0186] 我们证实 MYH7 表达限制于小鼠心脏发育的新生儿阶段。出生之后两天,通过 RT-PCR 不再检测到 MYH7。Mir-208-2 在出生前表达和在出生后不久 (8 天) 表达,但是到 14 天几乎检测不到 Mir-208-2。mir-208 的 RNA 印迹分析与 MYH6 表达相关,在新生和出生后阶段存在。

[0187] 在成人心脏中的 Mir-208-2 表达：与小鼠和大鼠不同，健康人心脏表达 MYH6 和 MYH7 两者。Schiaffino 等人 (Schiaffino, S. 等人, Myosin changes in hypertrophied human atrial and ventricular myocardium. A correlated immunofluorescence and quantitative immunochemical study on serial cryosections. Eur Heart J, 1984. 5 Suppl F :p. 95-102.) 使用特异性抗-肌球蛋白抗体在人心脏的尸检样品和活检样品中检测到 MYH6 和 MYH7。作者报道在大多数正常的心室样本中 MYH6 少于 5% 并在超负荷压力的影响下完全消失。另一方面，在左心房心肌中通常检测不到重链 β ，但是在肥厚的心房的活检组织中增加到高达 90%。Sato 等人 (Sato, H. 等人, [mRNA detection of beta-myosin heavy chain gene in the autopsy cases of hypertrophic cardiomyopathy]. Nippon Hoigaku Zasshi, 2000. 54(3) :p. 408-13) 也报道 MYH7 的过表达与心脏猝死有关，表明失调的 MYH 表达促成心脏的病理性功能障碍。(Garcia-Castro, M. 等人, Hypertrophic cardiomyopathy : low frequency of mutations in the beta-myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin T (TNNT2) genes among Spanish patients. Clin Chem, 2003. 49(8) :p. 1279-85 ; Perrot, A. 等人, Prevalence of cardiac beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Med, 2005. 83(6) :p. 468-77)。

[0188] 在 MYH7 内含子中新型小 RNA 的鉴定确立这一 miRNA 的表达失调可能事实上对归因于 MYH7 本身的心脏疾患负责。本说明书提供涉及这一发现的组合物和方法。

[0189] 在本说明书中提到的全部出版物、专利和专利申请指示本发明所属领域的技术人员的技术水平。这里引用的全部出版物、专利和专利申请通过参考以其整体被并入。

人_mir-208-2	AGGACTCTGCCCCGG-CCCCACCTCCTCTCCTCTCAGGGAAGCTTTTGTCTCGAATTAT
黑猩猩_mir-208-2	AGGACTCTGCCCCGG-CCCCACCTCCTCTCCTCTCAGGGAAGCTTTTGTCTCGAATTAT
狗_mir-208-2	AGAACCTGTGCAGGGCCCCAGCTCCTCTCCTCTCAGGGAAGCTTTTGTCTCGGTTAT
大鼠_mir-208-2	-----CCCCACCTCCTCTCCTCTCAGGGAAGCTTTTGTCTCGGTTAT
斑马鱼_mir-208-2	GG-----TTTAACTTCT-CTACTGACGAGAGAGCTTTTGTCTGTGTTAT
人_mir-208	-GAACTCTGGCT-GGCCCTGACCCACTCTCTGTGACGGGCGAGCTTTTGGCCCGGTTAT
* * * * *	
Mir-208-2	
人_mir-208-2	GTTTCTGATCCGAATATAAGACGACAAAAGGTTTGCTGAGGGCAGAGT--GCTTCGGT
黑猩猩_mir-208-2	GTTTCTGATCCGAATATAAGACGACAAAAGGTTTGCTGAGGGCAGAGC--GCTTCGGT
狗_mir-208-2	GTTTCTCATCCGAATATAAGACGACAAAAGGTTTGCTGAGGGTAGAGT--GCTCCAC
大鼠_mir-208-2	GTTTCTCATCCGAATATAAGACGACAAAAGGTTTGCTGAGGGCAGAGT--GCTCCAC
斑马鱼_mir-208-2	GTTTATT-TTCAAATGAAGACGACAAAAGGTTTCTGTAGTAGGCCAAGCTTCCT
人_mir-208	ACCTGATGCTCAGTAATAAGACGACAAAAGCTTGT--GCTCAGAGGA-GCTACCGT
* * * * *	

图 1

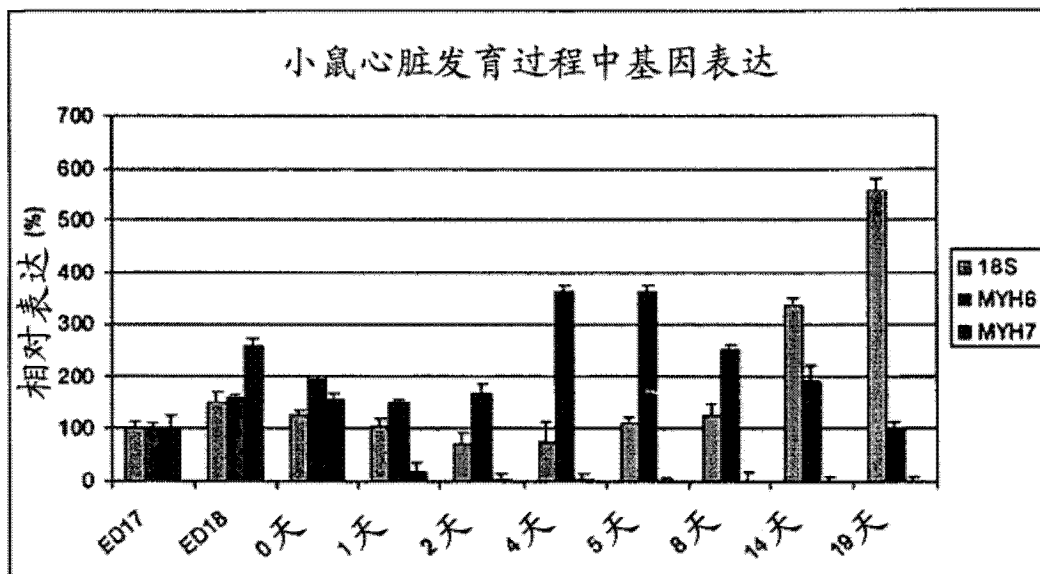


图 2

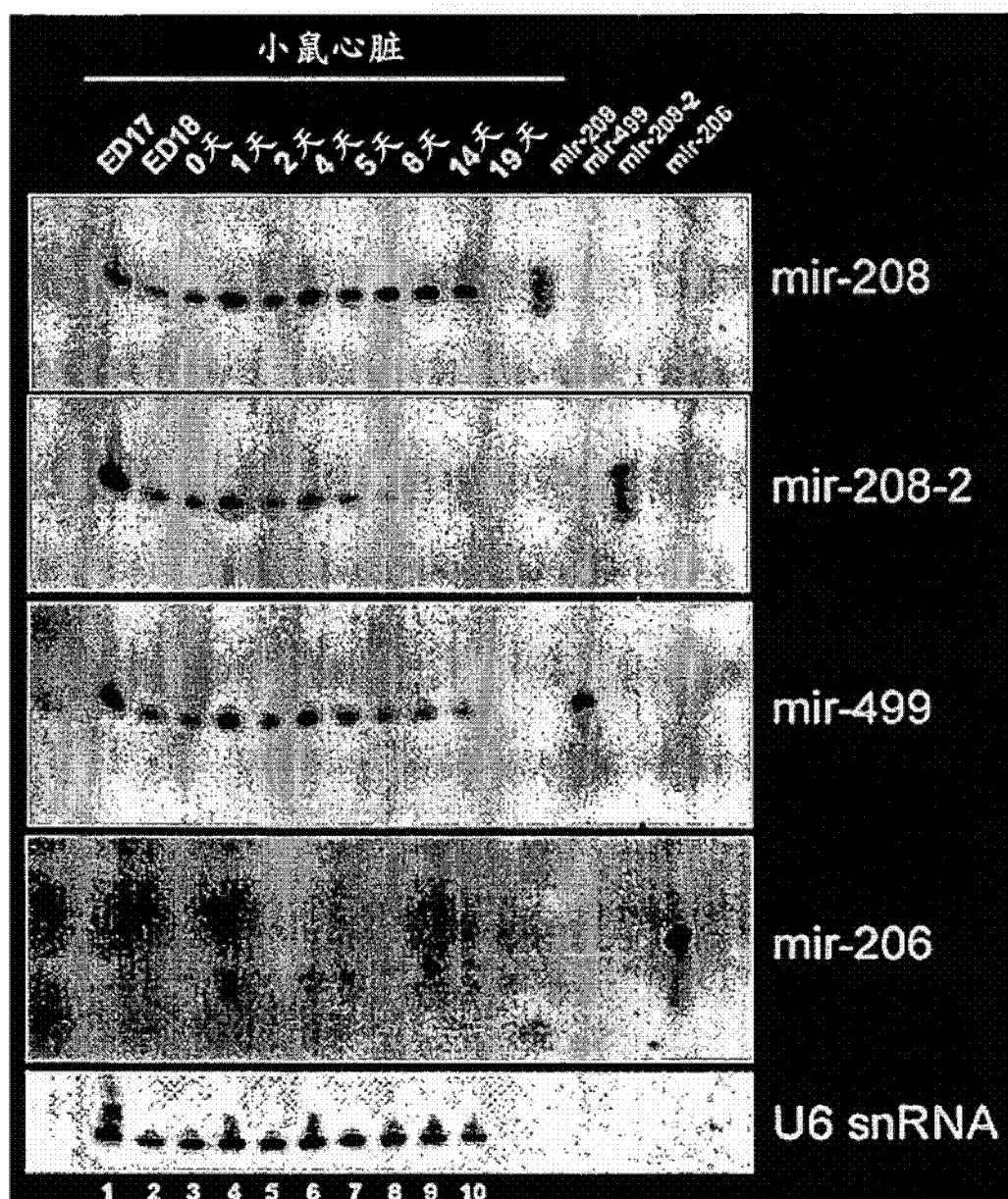


图 3