



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112513272 A

(43) 申请公布日 2021.03.16

(21) 申请号 201980050686.6

(22) 申请日 2019.05.31

(30) 优先权数据

10-2018-0063047 2018.05.31 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2019/006626 2019.05.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/231299 KO 2019.12.05

(71) 申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔

(72) 发明人 池晟旭 张恩淑 石熙暎

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠 张静

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/077 (2006.01)

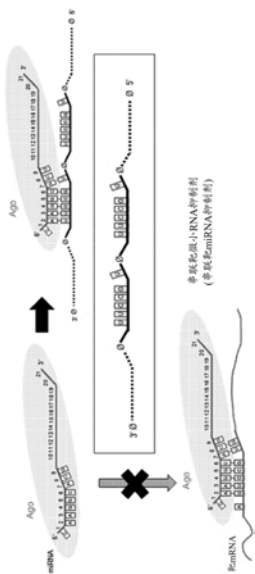
权利要求书1页 说明书19页
序列表5页 附图24页

(54) 发明名称

抑制微小RNA的修饰核酸及其用途

(57) 摘要

本发明涉及抑制微小RNA的修饰核酸及其用途。根据本发明的抑制微小RNA的修饰核酸可通过在微小RNA种子区域上连续排列至少两个包含最少6个互补结合核苷酸序列的微小RNA靶位点而与微小RNA牢固结合,并且,由于在微小RNA靶位点之间插入了脱碱基间隔子,不仅有效抑制了微小RNA,而且还具有插入所述修饰核酸中的所述序列的有益效果,从而可防止与其他微小RNA意外结合。可以使用micro RNA的规范靶标识别,也可以使用micro RNA的非规范靶标识别,例如成核凸出位点和G:A或G:U摆动排列位点,并且可以选择性地抑制由于微小RNA的非规范靶标识别引起的生物学功能。



1. 一种抑制miRNA的修饰核酸,其包括:
至少两个连续的miRNA靶位点序列,每个序列由至少6个核苷酸组成,
其中所述miRNA靶位点序列是选自以下的一种:
 - 1) 与从miRNA的5'端开始2至7位或3至8位碱基互补的序列,
 - 2) 与从miRNA的5'端开始2至7位碱基互补并且在5至6位碱基之间具有凸起的序列,和
 - 3) 与从miRNA的5'端开始2至7位或3至8位碱基互补并且具有互补的G:A或G:U摆动碱基对的序列,以及在所述miRNA靶位点序列之间,至少一个碱基被脱碱基间隔子替代。
2. 根据权利要求1所述的修饰核酸,其中所述miRNA是miR-1。
3. 根据权利要求1所述的修饰核酸,其中所述抑制miRNA的修饰核酸包含5'-ACAUUCCA-3'或5'-AAAUUCCA-3'序列。
4. 根据权利要求3所述的修饰核酸,其中所述抑制miRNA的修饰核酸连续包含至少两个5'-ACAUUCCA-3'序列,以及在所述序列之前和之后的至少一个脱碱基间隔子。
5. 根据权利要求3所述的修饰核酸,其中所述抑制miRNA的修饰核酸连续包含至少两个5'-AAAUUCCA-3'序列,以及在所述序列之前和之后的至少一个脱碱基间隔子。
6. 根据权利要求1所述的修饰核酸,其中所述miRNA靶位点序列包含与miRNA的种子区域互补的6至8个核苷酸。
7. 根据权利要求6所述的修饰核酸,其中,所述种子区域是在从miRNA的5'端开始1至8位之间的序列。
8. 根据权利要求1所述的修饰核酸,其中,所述脱碱基间隔子选自以下项中的一种或多种:无碱基的脱碱基核糖核苷酸间隔子(rSpacer,rSp),脱碱基脱氧核糖核苷酸间隔子(dSpacer),C3间隔子和C6间隔子。
9. 一种制备抑制miRNA的修饰核酸的方法,其包括:
连续排列选自以下项中的一个:
 - 1) 与从miRNA的5'端开始2至7位或3至8位碱基互补的序列,
 - 2) 与从miRNA的5'端开始2至7位碱基互补并且在5至6位碱基之间具有凸起的序列,
 - 3) 与从miRNA的5'端开始2至7位或3至8位碱基互补并且具有互补的G:A或G:U摆动碱基对的序列;和在连续排列的碱基序列之间用脱碱基间隔子替代至少一个碱基。
10. 一种抑制miRNA的方法,其包括:
体外将根据权利要求1至8中任一项所述的抑制miRNA的修饰核酸引入细胞中。
11. 一种基因转移系统,其包含根据权利要求1至8中任一项所述的抑制miRNA的修饰核酸。

抑制微小RNA的修饰核酸及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抑制微小RNA的修饰核酸及其用途,更具体地,涉及与微小RNA互补结合的抑制微小RNA的修饰核酸及其用途。

[0002] 本申请要求于2018年5月31日提交的韩国专利申请10-2018-0063047和于2019年5月31日提交的韩国专利申请10-2019-0064767的优先权和利益,并且其说明书和附图的公开内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] RNA干扰是在转录后水平上抑制基因表达的现象,并且被广泛用作通过将引起这种现象的RNA物质引入细胞中以人为地诱导基因沉默来抑制所需靶基因的技术。RNA干扰实际上是由约21个核苷酸(称为微小RNA(miRNA))组成的小RNA介导的,并且miRNA通过与种子(seed)区域(位置1-8)(尤其在miRNA的5'末端)进行碱基配对,识别mRNA中的数百个靶基因并抑制其表达,从而显示出生物学功能。

[0004] 具体而言,作为天然存在的诱导RNA干扰的核酸的微小RNA与Argonaute蛋白形成复合物,然后通过互补碱基配对与靶标结合。在此,对于在动物中发现的miRNA,当从miRNA的5'端起的位置1至8中(最重要的是位置2至7中)的至少6个连续碱基的序列(称为种子区域)与靶mRNA配对时,靶mRNA的表达被抑制。由于上述类型的碱基序列最常出现,因此将其定义为miRNA的规范(canonical)靶标,并且这些类型的互补序列对于miRNA的规范生物学功能非常重要。然而,最近,由于诸如可以对miRNA靶标进行实验测序的Ago HITS-CLIP的技术,因此已发现存在许多违反规则的非规范靶标,而不是识别诸如种子区域的规范靶标。

[0005] 由于miRNA通过识别靶mRNA并抑制其表达而表现出生物学功能,因此它可以用作这样一种机制,其中核苷酸序列在与靶mRNA竞争的同时可以与miRNA的种子区域互补配对,从而抑制了由miRNA诱导的生物学功能(Ebert MS等人,Nat Methods.2007Sep;4(9):721-6)。特别地,在具有引起疾病的功能的miRNA的情况下,可以通过特异性抑制该功能来将其用作治疗剂。miRNA的抑制剂通常可包含与miRNA整个序列几乎完全互补的序列,因此以通过与miRNA进行特异性碱基配对来抑制功能的模式被广泛使用。然而,这种类型可以抑制特定的miRNA,但不能区分被miRNA识别的规范靶标和用于抑制的非规范靶标。因此,当将其用作药物时,它可能会产生不利影响,也抑制所有生物学上所需的miRNA功能。

发明内容

[0006] [技术问题]

[0007] 发明人进行了认真的研究,发现miRNA中的实际靶标识别区域是从5'端开始的位置1至8之间(显著地是从5'端开始的位置2至7之间)的种子区域,因此可能仅通过与种子区域互补的序列与miRNA充分结合。可以确认的是,如果存在与种子区域互补的短8-nt序列,则可能竞争性地抑制miRNA的规范靶标识别,并且当在同一分子中反复存在如此短的miRNA结合位点时,与整个序列与miRNA互补的情况相比,它们能够与miRNA更加牢固地配对。实际

上,根据Ago HITS-CLIP分析,可以观察到在各种miRNA的靶mRNA中3'UTR处连续存在若干个短种子靶位点。

[0008] 因此,基于以上描述,本发明旨在提供抑制miRNA的修饰核酸,其包括两个或多个碱基的短序列,根据miRNA靶标识别规则,其能够被识别为与miRNA结合的miRNA靶标。

[0009] [技术方案]

[0010] 为了实现上述目的,本发明提供了具有以下特征的抑制miRNA的修饰核酸。

[0011] 本发明提供了抑制miRNA的修饰核酸,其中

修饰核酸连续包含至少两个miRNA靶位点序列,每个序列由至少6个核苷酸组成,miRNA靶位点序列可以是选自以下的一种:

1) 与从miRNA 5'端开始2至7位或3至8位碱基互补的序列;

2) 与从miRNA 5'端开始2至7位碱基互补并且在5至6位碱基之间具有凸起(bulge)的序列,和

3) 与从miRNA 5'端开始2至7位或3至8位碱基互补并且具有互补的G:A或G:U摆动碱基对的序列,以及

在miRNA靶位点序列之间,至少一个碱基被脱碱基间隔子(spacer)替代。

[0012] 另外,本发明提供了制备抑制miRNA的修饰核酸的方法,该方法包括:连续地排列选自以下项中的一个:

1) 与从miRNA的5'端开始2至7位或3至8位碱基互补的序列,

2) 与从miRNA的5'端开始2至7位碱基互补并且在5至6位碱基之间具有凸起的序列,和

3) 与从miRNA的5'端开始2至7位或3至8位碱基互补并且具有互补的G:A或G:U摆动碱基对的序列;和

在连续排列的碱基序列之间用脱碱基间隔子替代至少一个碱基。

[0013] 另外,本发明提供了抑制miRNA的方法,其包括体外将抑制miRNA的修饰核酸引入细胞。

[0014] 另外,本发明提供了包括抑制miRNA的修饰核酸的基因转移系统。

[0015] 在本发明的一实施方案中,miRNA可以是miRNA-1。

[0016] 在本发明的另一实施方案中,抑制miRNA的修饰核酸可以包括5'-ACAUUGCA-3' (抗miR-1-种子位点;SEQ ID NO:1) 或5'-AAAUUGCA-3' (抗miR-1-7G:A种子位点;SEQ ID NO:2) 序列。

[0017] 在本发明的另一实施方案中,抑制miRNA的修饰核酸可以连续包含至少两个5'-ACAUUGCA-3' 序列,并且在该序列之前和之后包含至少一个脱碱基间隔子。

[0018] 在本发明的另一实施方案中,抑制miRNA的修饰核酸可以连续地包括至少两个5'-AAAUUGCA-3' 序列,并且在该序列之前和之后包含至少一个脱碱基间隔子。

[0019] 在本发明的另一实施方案中,miRNA靶位点序列可以包含与miRNA的种子区域互补的6至8个核苷酸。

[0020] 在本发明的又一实施方案中,种子区域可以是miRNA的5'末端开始的位置1至8的碱基的序列。

[0021] 在本发明的又一实施方案中,所述脱碱基间隔子可以是选自以下的一种或多种:

脱碱基核糖核苷酸间隔子 (rSpacer, rSp), 脱碱基脱氧核糖核苷酸间隔子 (dSpacer), C3间隔子和C6间隔子, 其不包含碱基, 以及不含碱的所有间隔子修饰剂之一。

[0022] [有益效果]

[0023] 根据本发明的抑制miRNA的修饰核酸可以通过连续地排列至少两个由至少6-nt序列组成的miRNA靶位点从而与miRNA的种子区域互补结合, 并通过在miRNA靶位点之间引入脱碱基间隔子而与miRNA牢固结合, 不仅具有有效抑制miRNA的作用, 而且还可以防止由于其他miRNA或RNA结合蛋白与引入修饰核酸的序列边界区域处形成的核苷酸序列之间的意外相互作用引起的竞争抑制。

[0024] 此外, 修饰核酸还可以使用miRNA的非规范靶位点 (例如miRNA的成核凸起位点和G:A或G:U摆动配对位点) 以及规范靶位点, 因此预期仅由miRNA的非规范靶标识别表现出的生物学功能可以被选择性抑制。

附图说明

[0025] 图1是图示了串联靶miRNA抑制剂的作用机理的图, 所述串联靶miRNA抑制剂是根据本发明的抑制miRNA的修饰核酸。

[0026] 图2A示出了miR-1和miR-1的规范种子靶位点 (miR-1种子位点), 并显示了包括其的荧光素酶报告基因 (Luc-miR-1-种子), 图2B示出了使用荧光素酶报告基因测量miR-1的规范种子靶效率的结果, 图2C示出了具有两个miR-1的规范种子靶位点的串联靶miRNA抑制剂 (抗miR-1-种子 (2x)) 和对照 (抗NT (2x)), 并且图2D示出了当图2C的抗miR-1-种子 (2x) 和抗NT (2x) 应用于根据本发明的miR-1时证实miR-1活性的抑制作用的结果。

[0027] 图3A至图3C示出了根据本发明观察在心肌纤维母细胞细胞系H9c2细胞中串联靶miRNA抑制剂抑制miR-1的规范种子靶位点的作用的结果。

[0028] 图4A和图4B示出了通过对作为miRNA靶标结合序列的Ago HITS-CLIP进行分析而获得的结果, 表明miRNA可以通过种子区域通过非典型地形成摆动碱基配对 (G:A摆动) 而与靶mRNA结合, 并且图4C显示了规范种子位点, 以及通过miR-124的5'端的4位的G (4G:A位点) 和5位的G (5G:A位点) 的非规范G:A摆动种子位点。

[0029] 图5A示意性地示出了在心肌病患者的心脏组织上执行的Ago HITS-CLIP数据分析, 图5B示出了miR-1通过种子区域通过非规范地形成摆动碱基配对 (G:A摆动配对) 而与靶mRNA结合, 图5C显示miR-1的序列变异发生在相应的G:A位点。

[0030] 图6A至图6D示出了相应的荧光蛋白报告基因分析的结果, 其证实了miR-1可以通过在心肌纤维母细胞细胞系 (即H9c2细胞) 中在图5中发现的miR-1的非典型G:A摆动种子靶位点抑制靶基因。

[0031] 图7A和7B示出了对miRNA的非规范靶标识别模式 (即凸起碱基配对) 的荧光素酶报告实验结果, 以证实通过在miR-124中miRNA的非规范凸起碱基配对而抑制miRNA的靶基因表达, 并表明可以由此开发抑制剂。

[0032] 图8A至8C示出了观察到miR-1可以通过抑制原代大鼠心肌细胞的种子序列中的G:A摆动配对靶标来诱导心脏肥大的结果, 与miR-1中的功能不同。

[0033] 图9A示出了用于仅抑制miR-1的非规范G:A摆动配对靶标识别的串联靶miRNA抑制剂 (抗miR-1-7G:A (2x)), 图9B示出了miR-1的非规范G:A摆动种子靶位点 (miR-1-7G:A位点)

和包括其的荧光素酶报告基因,图9C示出了确认抗miR-1-7G:A (2x) 是否表现出对抑制G:A摆动配对靶标基因的miR-1:G7U的抑制作用的结果。

[0034] 图10A示出了荧光素酶报告实验的结果,证实了图9的串联靶miRNA抑制剂(抗miR-1-7G:A (2x)) 可以抑制心肌纤维母细胞细胞系(H9c2细胞) 中的miR-1的非规范G:A摆动配对,并且图10B和10C示出了其中与由其引起的生物学效应一样,通过抗miR-1-7G:A (2x) 使心肌纤维母细胞(H9c2细胞) 的尺寸减小的现象。

[0035] 图11A示出了具有9个miR-1的非规范G:A摆动位点的串联靶miRNA抑制剂(抗miR-1-7G:A (9x)),图11B示出了荧光素酶报告实验的结果,显示了通过应用抗miR-1-7G:A (9x) 可以防止由非规范的G:A摆动位点引起的基因抑制现象,图11C示出了在H9c2细胞中抑制了由PE药物引起的诱导心脏肥大现象。

[0036] 图12A示出了在miR-1的非规范G:A摆动位点之间具有脱碱基间隔子修饰物的串联靶miRNA抑制剂的序列(抗miR-1-7G:A (9x)) 和不具有脱碱基间隔子修饰物的对照(抗miR-1-7G:A (9x) NS),图12B示出了,在miRNA与相应靶位点的配对区域的序列结合的情况下,显示了其中串联靶miRNA抑制剂意外抑制miRNA的不利影响,但是当在靶位点中存在脱碱基间隔子修饰物时,未显示该不利影响,并且图12C示出了通过荧光素酶报告实验证明图12B所示的事实的结果。

具体实施方式

[0037] [发明的方式]

[0038] 本发明可以具有各种修改形式和各种实施方案,因此在附图中示出了具体的实施方案并且在具体实施方式中进行了详细描述。然而,应当理解,本发明不限于具体实施方案,并且包括在本发明的思想和技术范围内的所有修改、等同方式或替代。在本发明的描述中,如果确定可以模糊本发明的要旨,则将省略对相关技术的详细描述。

[0039] 在下文中,将详细描述本发明。

[0040] 在规范miRNA抑制剂的情况下,为了增加抑制作用,排列了可以竞争性结合miRNA的若干个序列。在此,由于在引入的多个序列之间的边界处新产生的碱基序列的互补性,可能表现出与不同miRNA意外结合的不利影响。因此,由于努力不断增加对应序列的配对的多样性并开发出可以解决由边界序列引起的不利影响的miRNA抑制剂,发明人发明了包含至少两个连续的miRNA靶位点的修饰核酸,miRNA靶位点具有与miRNA的种子区域互补序列,并通过引入脱碱基间隔子抑制miRNA,其中在miRNA靶位点之间由于无碱基而没有碱基配对,从而完成了本发明。

[0041] 本发明提供了一种抑制miRNA的修饰核酸,其中修饰核酸连续包含至少两个miRNA靶位点序列,每个序列由至少6个核苷酸组成,

miRNA靶位点序列可以是选自以下的一种:

- 1) 与从miRNA 5'端开始2至7位或3至8位碱基互补的序列,
- 2) 与从miRNA 5'端开始2至7位碱基互补并且在5至6位碱基之间具有凸起的序列,
- 3) 与从miRNA 5'端开始2至7位或3至8位碱基互补并且具有互补的G:A或G:U摆动碱基对的序列,以及

在miRNA靶位点序列之间,至少一个碱基被脱碱基间隔子替代。

[0042] 在本发明中,抑制miRNA的修饰核酸可以包括5'-ACAUCCA-3'或5'-AAAUCCA-3'序列。然而,只要包括与1)至3)中任一项相对应的miRNA靶位点序列,序列就不限于此。

[0043] 在本发明中,抑制miRNA的修饰核酸可以是连续包含至少两个5'-ACAUCCA-3'序列以及在所述序列之前和之后的至少一个脱碱基间隔子的修饰核酸,或连续包含至少两个5'-AAAUCCA-3'序列和在所述序列之前和之后的至少一个脱碱基间隔子的修饰核酸。

[0044] 对根据本发明的miRNA的类型没有限制,并且根据本发明的示例性实施方案,miRNA可以是miRNA-1。

[0045] 在本发明中,miRNA靶位点序列可包括至少6个核苷酸,优选21个或更少的核苷酸,最优选6至8个核苷酸,但是本发明不限于此。

[0046] 由于miRNA实际上仅识别从其5'端开始的位置1至8中的至少6个碱基对,因此,即使仅与位置1至8中的碱基序列互补的序列可以与miRNA充分结合,并且当miRNA靶位点序列包括6至8个核苷酸,仅miRNA的规范靶标识别能被竞争性抑制。

[0047] 在本发明中,抑制miRNA的修饰核酸可以连续包含至少两个miRNA靶位点序列,并且因为连续包含两个或更多个miRNA靶位点序列,其是更好的。例如,可以包括100个或更少的miRNA靶位点序列,并且优选地连续包括2至70、2至50、2至30、2至9、9至30、9至50或9至70个miRNA靶位点序列,但是本发明不限于此。与仅包含一个miRNA靶位点序列的情况相比,当连续包含两个miRNA靶位点序列时,它们可以更牢固地与miRNA结合。在本发明的一实施方案中,与当抑制miRNA的修饰核酸连续包含两个miRNA靶位点序列时相比,当连续包含9个miRNA靶位点序列时,已证实显示出更好的抑制作用(参见实施例4-2)。

[0048] “连续地(包括)”是指miRNA靶位点序列被线性地包括在修饰核酸的单链中,并且也可以彼此间隔开地被包括。

[0049] 在本发明中,至少一个碱基,优选一个以上的碱基,例如10个或更少的碱基可以被脱碱基间隔子替代并连接在连续排列的miRNA靶位点序列之间,但是本发明不限于此。

[0050] 由于miRNA可仅与从5'端开始的1至8位的匹配6-8个碱基完全结合,因此引入抑制miRNA的修饰核酸的序列可能会通过意外的不同miRNA意外地碱基配对而起作用。当miRNA靶位点序列中的一个碱基被脱碱基间隔子替代时,可以防止miRNA靶位点序列结合形成新位点,从而防止引入miRNA靶位点的序列与不同的miRNA意外结合。

[0051] 本文使用的术语“脱碱基间隔子”可以是维持间隔而不是单个核苷酸的替代物,并且可以以维持间隔的方式连接相邻的核苷酸。所述脱碱基间隔子优选为有机化合物,更优选为含磷酸基($-\text{H}_2\text{PO}_4$)或含硫酸基($-\text{H}_2\text{PSO}_4$)的(连接的)烃链,最优选为具有至少三个碳原子的烷基(C3间隔子)或具有至少6个碳原子的烷基(C6间隔子),但是本发明不限于此。另外,脱碱基间隔子可以包括脱碱基核苷酸,并且这种脱碱基核苷酸型间隔子通常是指不具有碱基的单核苷酸类似物,并且是指不能与所有来源于RNA的所有其他生物碱基结合的所有类型的修饰,包括脱碱基的脱氧核糖核苷酸间隔子(dSpacer)和脱碱基的核糖核苷酸间隔子(rSpacer)。根据本发明的示例性实施方案,脱碱基间隔子可以是具有核糖核苷酸作为骨架的rSpacer分子。

[0052] 在本发明中,miRNA靶位点序列与miRNA种子区域的碱基序列互补。

[0053] 在本发明中,种子区域是指从miRNA的5'末端开始的位置1至8之间的序列。

[0054] 根据本发明的抑制miRNA的修饰核酸不仅可以用作miRNA的规范靶标,而且可以用

作非规范靶标识别类型成核凸起位点和G:A或G:U摆动碱基对位点。

[0055] 在本文,非规范靶标识别是指当miRNA与靶mRNA结合时,即使miRNA的种子区域不是完全互补的,也将其识别为miRNA的靶标。

[0056] 在本发明中,成核凸起位点是指与从miRNA的5'端开始的第5和第6个碱基互补的凸起碱基,并且与从miRNA的5'端起直到第5个碱基的所有碱基具有互补关系并且被第6个碱基识别(与从miRNA的5'末端开始的第6个碱基配对)的基因是指其中将直接连续的碱基以凸起形式环化的情况,并且具有与miRNA互补关系的碱基是由从miRNA 5'末端起的第6个碱基识别的碱基,而不是与具有与从miRNA 5'末端起的第5个碱基互补的关系的碱基直接连续的碱基。

[0057] G:A或G:U摆动碱基配对是指,除了A:U,G:C,C:G或U:A的互补配对之外,miRNA的碱基和由miRNA识别的靶基因也具有G:A或G:U碱基配对。

[0058] 例如,当miRNA与由miRNA识别的靶基因处于G:A摆动配对关系时,特异性miRNA的碱基:被特异性miRNA识别的靶基因的碱基对是G:A,并且当miRNA和由miRNA识别的靶基因处于G:U摆动关系,特异性miRNA的碱基:被特异性miRNA识别的靶基因的碱基对是G:U。

[0059] 此外,当miRNA与由miRNA识别的靶基因处于G:A摆动配对关系时,特异性miRNA识别的靶基因的碱基:特异性miRNA的碱基:抑制特异性miRNA的修饰核酸的碱基可以是A:G:A,并且当miRNA和由miRNA识别的靶基因处于G:U摆动配对关系时,特异性miRNA识别的靶基因的碱基:特异性miRNA的碱基:抑制特异性miRNA的修饰核酸的碱基可以是U:G:U。

[0060] 在本发明中,抑制miRNA的修饰核酸可以是诸如反义RNA,LNA,PNA,UNA,siRNA,miRNA,shRNA,DsiRNA,lsiRNA,ss-siRNA,asiRNA,piRNA或内源siRNA(endo-siRNA)之类的核酸和核酸衍生物,但本发明不限于此。

[0061] 另外,本发明提供了一种制备抑制miRNA的修饰核酸的方法,其包括:

连续排列选自以下项的一种:

1) 与从miRNA 5'端开始2至7位或3至8位碱基互补的序列,

2) 与从miRNA 5'端开始2至7位碱基互补并且在5至6位碱基之间具有凸起的序列,

和

3) 与从miRNA 5'端开始2至7位或3至8位碱基互补并且具有互补的G:A或G:U摆动碱基对的序列,以及

在连续排列的碱基序列之间至少一个碱基被脱碱基间隔子替代。

[0062] 关于制备抑制miRNA的修饰核酸的方法,上述内容重叠,因此将省略其详细描述。

[0063] 另外,本发明提供了抑制miRNA的方法,其包括体外将抑制miRNA的修饰核酸引入细胞。

[0064] 在本发明中,“细胞”的类型包括脊椎动物,例如哺乳动物,包括人(人,猴,小鼠,大鼠,仓鼠,牛等),禽类(鸡,鸵鸟等),两栖动物(青蛙等)和鱼或无脊椎动物,例如昆虫(蚕,蛾,果蝇等),植物或微生物(例如酵母),优选哺乳动物包括人类,但是本发明不限于此。

[0065] 在本发明中,“引入”是指通过向细胞内注射核酸来修饰细胞的基因型,对向细胞内注射核酸的方法没有特别限制。可以通过本发明所属领域的普通技术人员众所周知的方法进行引入,例如使用磷酸钙的转染(Graham,FL等人,Virology,52:456(1973)),DEAE葡聚糖转染,显微注射转染(Capecchi,MR,Cell,22:479(1980)),阳离子脂质转染(Wong,TK等

人, Gene, 10:87 (1980)), 电穿孔 (Neumann E等人, EMBO J, 1:841 (1982)), 如文献中所公开的那样进行转导或转染 (Basic methods in molecular biology, Davis等人, 1986, and Molecular cloning: A laboratory manual, Davis et al., 1986), 优选是转染。转染效率可根据细胞类型以及细胞培养条件和转染试剂而有很大差异。

[0066] 另外, 本发明提供了包含抑制miRNA的修饰核酸的基因转移系统。

[0067] “基因转移”是指将基因递送到细胞内, 并且可以具有与基因的细胞内转导相同的含义。在组织水平上, 术语“基因转移”可以具有与基因传播相同的含义。另外, 本发明的基因转移系统可以以各种形式形成, 例如裸露的重组DNA分子, 质粒病毒载体和包含裸露的重组DNA分子或质粒的脂质体或囊泡 (niosome), 但是本发明不限于此。

[0068] 另外, 本发明提供了用于调节心脏肥大的组合物, 其包括抑制miRNA的修饰核酸。在本发明的示例性实施方案中, 已经证实, 当在心肌细胞中诱导心脏肥大时, 心肌细胞的尺寸通过miR-1的规范靶标识别减小, 并且通过G:A摆动配对进行非规范靶标识别而增加到类似于诱导心脏肥大的细胞的水平 (请参见实施例3)。

[0069] 由于与miRNA的互补结合, 根据本发明的抑制miRNA的修饰核酸可以竞争性地抑制miRNA与靶mRNA的结合, 并且串联靶miRNA抑制剂 (其是抑制miRNA的修饰核酸) 的作用机理如图所示1。

[0070] 在本发明的另一实施方案中, 证实了miRNA可以通过种子序列中的G:A摆动配对抑制靶基因, 并且miRNA的非规范成核凸起位点被荧光素酶报告基因抑制 (参见实施例2)。

[0071] 在本发明的又一实施方案中, 证实了miRNA可以通过种子序列中的G:A摆动配对靶标抑制而表现出不同的生物学功能 (参见实施例3)。

[0072] 在本发明的又一实施方案中, 证实了通过串联靶miRNA抑制剂抑制miRNA的非规范G:A摆动配对功能的作用 (参见实施例4)。

[0073] 在本发明的又一实施方案中, 证实了通过将间隔子修饰物引入串联靶miRNA抑制剂中来消除由靶位点之间的接头序列引起的不利影响的作用 (参见实施例5)。

[0074] 在下文中, 将参考附图详细描述本发明的优选实施例和实验实施例。然而, 仅提供这些实施例和实验实施例以举例说明本发明, 并且不应解释为本发明的范围不限于此。

[0075] 实施例1. 通过串联靶miRNA抑制剂证实抑制miRNA的规范种子结合功能的作用

[0076] 1-1. 制备串联靶miRNA抑制剂的方法

[0077] 如图1所示, 5'-UAAGGCACG-3' 是从与Argonaute蛋白结合的miRNA的碱基序列的5'端起的1至8位的碱基序列, 是相应miRNA (例如, miR-124) 的种子碱基序列, 并且miRNA使用此序列与靶mRNA互补结合。在此, 当通过引入两个或更多个能够与miRNA种子互补配对的短8-nt靶序列制备串联靶miRNA抑制剂 (一种抑制miRNA的修饰核酸) 时, miRNA种子 (5'-UAAGGCACG-3') 和串联靶miRNA抑制剂的5'-UGCCUU-3' 序列完全互补, 从而相对抑制了与实际靶mRNA碱基的配对, 并抑制了miRNA的规范靶标抑制功能。串联靶miRNA抑制剂连续包含两个或更多个相应的碱基序列 (5'-UGCCUU-3'), 以实现更强和更有效的碱基配对, 从而可以在miRNA种子和串联靶miRNA抑制剂之间具有一个或多个碱基对。此外, 通过将连续排列的碱基序列 (5'-UGCCUU-3') 与脱碱基间隔子连接, 可以从根本上防止由在相应碱基序列之间的边界新产生的连续序列引起的脱靶抑制。

[0078] 1-2. 证实串联靶miRNA抑制剂对miR-1规范种子靶位点的作用

[0079] 为了确认实施例1-1中所示的串联靶miRNA抑制剂的作用,将该抑制剂应用于miR-1。在这里,为了实验确定miR-1的靶抑制作用,进行了荧光素酶报告基因测定。为此,如图2A所示,作为miR-1的规范种子靶位点(miR-1种子位点),五个靶位点序列各自包含与从miR-1的5'端开始的2至8位的核苷酸连续互补的序列,其是作为miR-1规范种子靶位点(miR-1种子位点)的最低标准,连续排列在荧光素酶报告基因的3'端,从而形成荧光素酶报告基因载体(psi-check2, Promega; Luc-miR-1-种子)。

[0080] 随后,为了测量如上形成的荧光素酶报告基因载体的功能,以及使用荧光素酶报告基因载体根据miR-1浓度的变化对具有规范靶种子位点的基因的抑制能力,将各种浓度(0、0.01、0.1、0.5、2.5、15nM) miR-1引入细胞,并测量半数抑制浓度(IC_{50})作为荧光素酶的活性。根据制造商的操作规程,使用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen)将相应浓度的miR-1和通过上述方法形成的荧光素酶报告基因载体共转染到HeLa细胞(ATCC CCL-2)中,以研究其作用。在此,通过Bioneer化学合成miR-1,其具有两个核苷酸序列,例如引导链和过客链,并通过HPLC分离,然后通过制造商提供的方法形成双链体。将HeLa细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(Invitrogen)中孵育,在转染过程中,将细胞在无抗生素的完全培养基中孵育。转染后二十四小时,根据制造商的操作规程,使用双荧光素酶报告基因检测系统(Promega)测量荧光素酶活性,此处,使用Glomax发光计(Promega)将海肾荧光素酶活性的测定重复至少3次,并通过归一化(normalization)荧光素酶活性计算。

[0081] 结果,如图2B所示,能够看出miR-1的 IC_{50} 为2.2nM,并且可以使用如上形成的荧光素酶载体精确地测量miR-1对靶基因的抑制。

[0082] 为了确认实施例1-1中所述的串联靶miRNA抑制剂的作用,由Bioneer化学合成用于抑制种子靶位点的串联靶miRNA抑制剂(抗miR-1-种子(2x)),即规范的miR-1靶标,以具有图2C所示的序列,然后通过HPLC分离。在此,抑制剂的碱基序列和组成如下(抗miR-1-种子(2x)):5'p-dTdT (rSP) ACAUUGCA (rSP) ACAUUGCA (rSP) dTdT-3', SEQ ID NO:3)。具体而言,由于在miR-1的碱基序列(5'p-UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3', SEQ ID NO:4)中,识别出规范靶标的种子区域的碱基序列为5'-UGGAAUGU-3',因此,串联靶miRNA抑制剂具有两个重复的碱基序列(5'-ACAUUGCA-3'),与miR-1种子区域的碱基序列具有完全互补的配对。通过将这些规范靶序列与无碱基的脱碱基核糖核苷酸rSpacer (rSP) 连接,可以防止在两个相邻靶序列之间的边界处连续产生规范靶位点而引起的脱靶效应。

[0083] 通过上述方法形成的针对miR-1种子靶标的串联靶miRNA抑制剂(抗miR-1-种子)的序列在图2C中示出。此外,为防止核酸外切酶攻击导致串联靶miRNA抑制剂的5'端和3'端在细胞中降解,在两端合成了两个核苷酸以具有脱氧核苷酸,例如胸腺嘧啶(dT)。同时,以与上述相同方式,使用cel-miR-67的规范种子靶位点(NT; 非靶向:5'-UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA-3', SEQ ID NO:5) (其是秀丽隐杆线虫特异性miRNA)设计了串联靶miRNA抑制剂(抗NT(2x))作为对照,其序列如下(抗NT(2x)):5'p-dTdT (rSP) GGUUGUGA (rSP) GGUUGUGA (rSP) dTdT-3', SEQ ID NO:6)。串联靶miRNA抑制剂也由Bioneer化学合成,并通过HPLC分离。

[0084] 另外,通过图2B所示的 IC_{50} 测定,根据制造商的操作规程使用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen),将表现出对靶基因表达的40%抑制的1nM miR-1和50nM的抑制剂(抗

miR-1-种子(2x)或抗NT(2x))共转染HeLa细胞(ATCC CCL-2),以研究抗miR-1-种子(2x)抑制miR-1的规范种子靶标抑制的作用。

[0085] 结果,如图2D所示中,通过转染1nM miR-1观察到的荧光素酶活性为约50%(与IC₅₀预期的相似),即基于该值计算的相对荧光素酶活性(%)为56.58%±4.27,不转染miR-1。引入相同浓度的miR-1和50nM抗NT(2x)的实验组的相对荧光素酶活性(%)为54.07%±3.89,与受miR-1调控的荧光素酶活性的值无显著差异,因此无法观察到抗NT(2x)介导的抑制作用。另一方面,同时引入了miR-1和抗miR-1-种子(2x)的实验组的相对荧光素酶活性百分比为96.43%±8.44,证实了完全恢复miR-1调节的荧光素酶活性值的作用,这具有统计学意义($p=1.0 \times 10^{-8}$)。由上可知,可以证实抗miR-1-种子(2x)可以特异性地完全防止miR-1诱导的规范种子靶基因的抑制。

[0086] 1-3.通过串联靶miRNA抑制剂在心肌细胞中证实miR-1对心肌细胞大小减小的抑制作用

[0087] 为了确认通过实施例1-1的方法制备的并且其作为miRNA抑制剂的作用在实施例1-2中得到了证实的串联靶miRNA抑制剂是否可以抑制miRNA的生物学功能,将该抑制剂应用于miR-1的规范种子结合位点。首先,为了检测心肌细胞中的miR-1,从美国典型培养物保藏中心(ATCC)购买了心肌纤维母细胞细胞系(H9c2),将miR-1引入其中,然后观察是否已经诱导了细胞大小的减少(这是心肌细胞中miR-1的一个已知功能)。在此,将H9c2细胞在补充有10%FBS、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基(Invitrogen)中孵育,miR-1是根据在miRNA数据库miRBase(www.mirbase.org)中显示的人miR-1序列(MIMAT0000416)由Bioneer化学合成双链,并通过HPLC进行分离来制备的。另外,合成了与秀丽隐杆线虫的miRNA cel-miR-67(MIMAT0000039)的序列相同的对照。然后,按照制造商提供的方法将合成的双链miRNA制备成引导链和过客链的双链体,并按照制造商的操作规程使用RNAiMAX试剂(Invitrogen)通过转染50mM miRNA将miRNA导入H9c2细胞,转染后48小时对其效果进行了研究。

[0088] 结果,如图3A的左侧的图像中所示,与对照相比,观察到导入miR-1的H9c2细胞的大小减小。另外,作为使用ImageJ程序(NIH)对100个以上的细胞进行定量分析的结果,如图3A的右侧的曲线图所示,观察到导入miR-1双链体的细胞的大小减少到对照细胞的约60%。

[0089] 另外,如上所述在H9c2细胞中确认了miR-1减少心肌细胞大小的功能后,如实施例1-2中的,形成了具有串联靶miRNA抑制剂(抗miR-1-种子(2x))的与miR-1的种子区域互补配对的两个碱基序列(图2C),然后转染到心肌纤维母细胞细胞系(H9c2)中,进行确认miR-1功能是否受到抑制的实验。

[0090] 虽然在对照(NT)和与miR-1共转染的情况下仍观察到miR-1诱导的细胞大小减少,但在通过与上述相同的方式分别以25nM的浓度共转染,将抗miR-1-种子(2x)和miR-1引入H9c2细胞时,如图3B和3C所示,证实了在抗miR-1-种子(2x)的情况下这种作用被抑制。

[0091] 如上所述,其中抗miR-1-种子(2x)抑制miR-1减小心肌细胞大小的功能的现象,表明miRNA的规范靶标抑制功能可以通过连续配对两个或更多个规范的结合位点而得到有效抑制,每个结合位点由8个碱基组成,被识别为种子区域。

[0092] 实施例2.发现和验证允许miRNA种子区域中存在摆动碱基配对的非规范靶位点

[0093] 2-1.Ago HITS-CLIP法检测大脑皮层中表达的miRNA的非规范G:A摆动配对位点

[0094] 作为在转录组水平上分析miRNA靶标的方法,已经开发并广泛使用了一种称为Ago HITS-CLIP的实验方法,Ago HITS CLIP分析是一种方法,其通过紫外线照射细胞或组织样品诱导细胞中RNA和Argonaute蛋白之间共价键合,由此形成的RNA-Argonaute复合物通过使用特异识别Argonaute的抗体通过免疫沉淀分离,并通过下一代测序分析经分离的RNA。由此获得的碱基序列数据不仅可以通过生物信息学分析鉴定miRNA的靶mRNA,而且可以精确地分析其结合位点和序列。AGO HITS-CLIP首先应用于小鼠大脑皮层组织,以对大脑组织中的miRNA靶标进行定位。从那时起,该方法已应用于各种组织。通过许多Ago HITS-CLIP分析,鉴定了各种组织中的miRNA结合位点,发现有许多非规范的结合位点,特别是在上述靶标序列中产生相似的miRNA种子结合,但在靶mRNA序列中的结合不同。

[0095] 已经观察到,除了常规的已知碱基配对之外,一些已知的非规范结合规则以通过G:U碱基配对的摆动的形式存在。与常规的碱基配对不同,在特定的RNA中发现了摆动碱基配对,这表明众所周知的G:U摆动配对也可以在miRNA的非规范靶标中形成。但是,与此相比,结合力弱并且不经常被发现的G:A摆动配对可以在特定RNA中形成碱基配对,但是除此之外,还没有被研究。但是,就miRNA的种子序列而言,由于碱基配对的自由能通过Argonaute蛋白在结构上稳定,因此通常弱的G:A碱基配对可能相对重要。

[0096] 因此,首先,为了确认在人脑组织的miRNA靶标中是否存在包括G:A对的摆动碱基对,分析了死亡后脑组织灰质的Ago HITS-CLIP数据。通过使用FASTQ文件通过Bowtie2将已经与Argonaute-miRNA结合的RNA序列根据Ago HITS-CLIP开发中使用的方法与人基因组序列配对以便进行该分析。此外,同时将与miRNA序列配对的相应测序结果进行分析,以分析在相应脑组织中频繁结合Argonaute蛋白的20种miRNA(前20种miRNA)。最后,对于通过上述方法鉴定的前20种miRNA,检查了具有与相应种子序列互补序列的规范靶位点,该种子序列是从5'端开始的第2至8个碱基的序列。在此,如在图4A中所示,观察到在miRNA结合位点发现大量的规范种子靶位点(中位数:1292.5位点,误差范围:±706.62)。之后,从Ago HITS-CLIP数据中,检查在此类miRNA种子碱基序列中是否存在与G:U或G:A摆动配对结合的非规范靶位点。在此,为了进行分析,将由于与miRNA种子碱基序列相同的碱基序列而不能互补碱基配对的靶序列用作对照。

[0097] 结果,如在图4A中所示,所有G:A摆动配对允许的靶位点(中位数:1119.5个位点,误差范围:±526.48)和G:U摆动配对允许的靶位点(中值:995个位点,误差范围:±523.22)显示出比对照(中位891个位点,错误范围:±410.71)更高的分布,这特别表明,具有G:A摆动配对的miRNA靶位点大约是具有G:U摆动配对的miRNA靶位点的1.1倍。

[0098] 另外,在脑组织中特异性表达的miR-124在种子区域的5'端起第4和5位具有两个G碱基,因此可以实现G:U和G:A摆动碱基配对。因此,作为分别分析通过特定位置处的G碱基的G:A和G:U摆动碱基配对的结果,如在图4B中所示,发现miR-124的最大数量(1992)个规范的种子靶位点(种子位点)。然而,与上述相比,发现了在位置4的碱基处具有G:U摆动配对的1800个位点(4G:A位点),然后观察到了具有G:A摆动配对的1542个位点。另外,观察到具有G:U摆动配对的1427个靶位点和具有G:A摆动配对的1196个靶位点(5G:A位点)。可以确认所有调查的位点的数量都大于对照的数量(647个位点)。在图4C中示出了miR-124的种子位点,4G:A位点和5G:A位点的序列和碱基对。因此,当通过种子区域的碱基序列识别靶mRNA时,miRNA允许使用种子区域以及非规范的G:U或G:A摆动碱基配对进行规范的碱基配对,并

且可以看出通过这些类型的配对,miRNA可以与靶mRNA结合。通过G:A摆动碱基配对进行的此类miRNA靶标识别是一个尚未报道的新颖结果,并且如上所观察的,可以证实在许多miRNA中都可以识别非规范靶标。

[0099] 2-2.AGO HITS-CLIP分析在心肌病患者心脏组织中发现miR-1的非规范G:A摆动配对位点

[0100] 在实施例2-1中,根据从人脑组织获得的Ago HITS-CLIP数据分析了miRNA种子区域与靶mRNA之间的G:A摆动碱基配对,揭示了这种配对以非规范靶标存在。类似地,通过分析从六个心肌病患者的心脏组织获得的Ago HITS-CLIP数据(图5A),检查了在miRNA靶标中是否存在G:A摆动碱基配对。在此,将RNA测序结果与和人miRNA序列配对的Argonaute-miRNA结合,从而通过关注与相应心脏组织中频繁与Argonaute蛋白结合的miRNA中的心肌组织中特异性存在的miR-1,并关注相应种子区域的G:A摆动碱基配对来进行分析。特别是,由于miR-1种子区域具有从5'端开始在2、3和7位的3个G碱基,因此这3个G碱基可与A配对,从而与Argonaute一起与靶基因的mRNA结合。

[0101] 因此,作为分别分析特定G位点处的G:A摆动碱基对的结果,如在图5B中所示,确认了在位置2处的G处的G:A摆动配对的数量为27,在位置3处的G处的G:A摆动配对的数量为19,并且在位置7处的G:A摆动配对的数量为26,并且所有上述检查的位点均以大于对照(9个位点)的数量存在。此外,像以前的报告一样,找到了最多数量(128个)的miR-1规范种子靶位点。因此,在心肌细胞中表达最高的miR-1不仅允许使用种子区域进行规范碱基配对,而且还可以通过种子区域的碱基序列在靶mRNA识别中进行非规范G:A摆动碱基配对,表明通过这些类型的配对,miRNA可以与靶mRNA结合。

[0102] 根据上述实施例,证实了miRNA非规范地与G:A摆动配对位点结合,从而抑制了靶基因表达。如果通过miRNA种子序列中的G的摆动配对使靶mRNA与A的规范结合改变了miRNA功能,则预期在疾病情况下,通过miRNA序列变异可以显示出这种机制,因此,使用心肌病患者心脏组织的Ago HITS-CLIP结果对与Argonaute结合的miRNA进行测序,以确定miR-1的G是否已变为T。作为分析miR-1的种子区域中的从miR-1的5'端开始第1至20个碱基处发生的所有变异的结果,如在图5C中所示,观察到从miR-1的5'末端开始的位置2、3、7、12和15的G碱基被改变为T碱基。特别是,种子区域中第2、3和7位的G碱基变为T核苷酸的频率高于其他变异并进行了测序的这一事实表明,在心肌病的情况下,G变为U,从而将现有的非规范G:A摆动配对改变成现有规范种子靶位点,而不是当对应位点上的G识别出靶基因的mRNA时,将现有miR-1序列通过非规范G:A摆动配对与靶mRNA配对。

[0103] 2-3. 确认通过心肌细胞中miR-1种子序列中的G:A摆动配对抑制靶基因表达

[0104] 之后,发现在实施例2-1和2-2中,通过允许种子区域中的非规范G:A摆动配对,miRNA可以与靶mRNA结合,然后进行了报告基因实验,以确认这种结合是否能实际上在细胞水平上引起靶基因抑制。在此,对已知在诸如心肌细胞系(H9c2)等的肌细胞中高表达并在实施例2-2中进行了鉴定的miR-1进行了实验,特别是对G:A摆动配对碱基配对,关注从miR-1 5'端开始第7位的G,进行了实验^o。为了在单个细胞水平上更精确地测量miRNA介导的基因抑制,构建并使用了荧光蛋白表达报告系统。荧光蛋白表达报告系统设计用于在一种载体中表达两种颜色的荧光蛋白,并允许绿色荧光蛋白(GFP)在SV40启动子中表达,并且若干个miRNA靶位点连续排列在3'非翻译区(3'UTR),以便通过GFP强度测量miRNA介导的基因抑

制作用。同时,通过Tk启动子表达红色荧光蛋白(RFP),并且将绿色荧光信号归一化为RF强度(图6A)。

[0105] 通过在如上所述形成的荧光蛋白表达报告基因载体中插入非规范靶位点(7G:A位点;5'p-AAAUCCA-3',SEQ ID NO:2)形成报告基因(GFP-7G:A位点),非规范靶位点与从miR-1的5'末端起2到8位的碱基互补并通过G:A摆动配对与7位的G配对,然后进行实验以确定该报告基因被miR-1抑制。在此,实验通过以下进行:根据制造商的操作规程使用Lipofectamine2000(Invitrogen),通过将500ng GFP-7G:A位点报告基因载体和25nM miR-1共转染到心肌纤维母细胞细胞系(H9c2)中,转染24小时后,使用流式细胞仪(Attune NxT, Life Technology)测量每个荧光信号。

[0106] 结果,如图6A所示,证实了与引入对照核苷酸(cont;NT)的细胞相比,miR-1的7G:A位点被miR-1表达非常有效地抑制的事实。即,作为根据心肌纤维母细胞细胞系(H9c2)中的两种荧光蛋白的表达水平分析了四个部分(Q5-1,Q5-2,Q5-3和Q5-4)的结果,观察到与引入对照核苷酸的细胞相比,在引入miR-1的细胞中,表达强度为 10^3 的红色荧光蛋白和强度为 10^3 的绿色荧光蛋白的细胞分布从59.51%(对照:Q5-3)降低至41.80%(miR-1:Q5-3)。

[0107] 从以上结果,在对照中观察到在没有miR-1导入的情况下,在H9c2细胞中GFP-7G:A位点报告基因载体在一定程度上被抑制。可以估计,通过已经在H9c2细胞中表达的miR-1,使G:A摆动碱基与报告基因靶mRNA配对抑制了GFP-7G:A位点报告基因载体。为了证实上述发现,从Dharmacon购买了能够抑制H9c2细胞中miR-1表达的miRIDIAN微小RNA发夹抑制剂(miR-1抑制剂),然后将其以50nM的浓度用于转染细胞。

[0108] 结果,与对照相比,当引入miR-1抑制剂时,表达强度为 10^3 的红色荧光蛋白和强度为 10^3 的绿色荧光蛋白的细胞分布增加至81.56%(miR-1抑制剂:Q5-3),证实,存在于细胞中的miR-1可以由于miR-1的7G:A位点而抑制基因表达。

[0109] 另外,将其中没有将miRNA靶位点引入荧光蛋白表达报告基因的对照(GFP-无位点),或作为其中引入miR-1的7G:A位点的报告基因的GFP-7G:A位点,引入H9c2细胞,并比较它们的活性。将其中miRNA靶位点与miR-1共引入的阳性对照用于定量比较。此处,通过以下进行分析:将流式细胞仪测得的RFP值除以截面(section),然后将GFP值求平均值,然后将平均值转换为对数比,通过将对照GFP-无位点的绿色荧光蛋白值(相对logGFP)设置为1获得对数比。

[0110] 结果,如图6B所示,在位点通过G:A摆动配对(GFP-7G:A位点)与miR-1的位置7的G进行互补碱基配对的情况下,特别是在显示1.5至2.5的红色荧光蛋白表达的截面中(log RFP),证实了通过G:A摆动配对的绿色荧光蛋白表达(相对log GFP)比1低约12.5%。在阳性对照中,观察到以相同模式显示了这种抑制,特别是,观察到在显示1.5至2.5的RFP表达(与抑制模式相同模式的log RFP)的截面中,GFP表达(相对log GFP)被抑制约40%至25%。

[0111] 为了确认上述结果不受相应的荧光蛋白报告基因中使用的两种不同荧光蛋白的荧光活性和不同启动子的强度的差异的影响,从Addgene购买了具有不同荧光蛋白的两种荧光蛋白报告基因p.UTA.3.0(质粒#82447)。在此,通过将miR-1的7G:A序列插入在p.UTA.3.0载体中的受SV40启动子调控的RFP的3'UTR中五次,构建报告基因载体(RFP-7G:A位点),进行报告基因实验,在此,通过归一化由Tk启动子表达的GFP值的程度来修改RFP表达水平,这反映了引入细胞中的程度。

[0112] 结果,如图6C所示,如上所述,通过比较对照的结果,例如没有miRNA靶位点的报告基因(RFP-无位点),以及具有miR-1的7G:A位点的报告基因(RFP-7G:A位点),证实了H9c2细胞中表达的miR-1对miR-1的7G:A位点的抑制,同时如图6D所示,即使通过阳性对照和miR-1的共转染,也观察到miR-1-7G:A位点的抑制,如图6B所示。

[0113] 从上面可以确认,通过Ago HITS-CLIP分析发现的miRNA的非规范靶标,不仅可以由G:A摆动配对实际结合miRNA的种子序列,而且可以抑制相应的靶基因的表达。

[0114] 因此,考虑到这一点,可以通过使用G:A摆动配对使用靶位点来实现与miRNA的充分结合,并且可以推断出,如果竞争性地使用这种结合从而可以抑制miRNA,则通过G:A摆动配对进行的非规范靶点抑制可以仅抑制miRNA的生物学功能。

[0115] 2-4. 确认由荧光素酶报告基因抑制miRNA的非规范成核凸起位点表达

[0116] 已知miRNA除了通过种子区域的连续碱基配对进行规范的靶标识别以外,还可非规范地识别靶标。特别是据报道,当miRNA的种子区域与靶mRNA配对时,存在靶mRNA的形式,其中从miRNA 5'端起的5位和6位核苷酸凸出。特别是,在miR-124中发现的成核凸起位点中,已确认在位置5至6之间的G处形成了凸起,但与通过常规已知的种子配对的规范靶标相比,尚不知道靶标在多大程度上抑制了靶基因的表达。

[0117] 为了确认用于凸起形成的碱基序列是否可以在一定程度上与miRNA结合以被功能激活,使用荧光素酶报告基因进行了研究。在此使用的规范靶标种子位点是如在图7A中上图所示的,与5'-AAGGCAC-3'完全互补的5'-GUGCCUU-3'(miR-124-种子位点,SEQ ID NO:8),其是从miRNA-124的种子序列(5'UAAGGCACGCGUGAAUGCCAA-3',SEQ ID NO:7)的5'端起起的2至7位碱基的序列,并连续两次插入荧光素酶报告基因载体(psi-check2,Promega)中的海肾荧光素酶基因的3'UTR中。另外,如图7A中下图所示的,在种子位点靶标的5至6位之间的凸起中形成能够与5'端的第6个碱基互补配对的碱基序列的凸起位点具有在miR-124中的5'-GUGGCCUU-3'的碱基序列(miR-124-凸起位点,SEQ ID NO:9),并以与上述相同的方式连续两次与海肾荧光素酶基因的3'UTR配对,从而构建了报告基因载体。

[0118] 根据制造商的操作规程使用Lipofectamine 2000试剂(Invitrogen)将通过上述方法产生的荧光素酶报告基因载体与各种浓度(0.02、0.1、0.5、2.5和15nM)的miR-124共转染到HeLa细胞(ATCC CCL-2)中,以研究其作用。由Bioneer化学合成本文所用的miR-124,其具有包括引导链和过客链的两个核酸序列,通过HPLC分离,并根据制造商提供的方法制备成双链体。将HeLa细胞在补充有10%FBS、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的Dulbecco's改良Eagle培养基(Invitrogen)中孵育,在转染过程中,将细胞在无抗生素的完全培养基中孵育。转染后24小时,根据制造商的操作规程,使用双荧光素酶报告基因检测系统(Promega)测量荧光素酶活性,以研究miR-124的作用,并使用Glomax发光计(Promega)至少3次重复测定海肾荧光素酶活性,并由萤火虫荧光素酶的活性通过归一化进行计算。用各种浓度的miR-124测量成核凸起位点的抑制作用,并且作为与miR-124的规范种子位点比较的结果,如图7B所示,成核凸起位点和种子靶标的抑制浓度50(IC₅₀)分别为0.8nM和0.4nM,并且可以观察到,尽管通过成核凸起位点抑制基因表达的效率是种子靶标的二分之一,miR-124仍能很好地抑制非规范靶标,例如成核凸起位点。

[0119] 从上方,通过Ago HITS-CLIP分析,可以看出先前报道为非规范靶标的成核凸起位点不仅与miRNA结合,而且有效抑制了具有该位点的基因的表达。另外,考虑到这一点,可以

推断出可以利用成核凸起位点与miRNA充分结合,并且如果竞争性地进行这种结合从而可以抑制miRNA,则通过抑制成核凸起位点可以仅抑制miRNA的生物学功能。

[0120] 实施例3.证实通过抑制miRNA的种子序列中的G:A摆动配对靶标来调节另一种生物学功能的可能性

[0121] 3-1.实验材料和方法

[0122] 在实施例2中,从心肌病患者的人脑组织和心脏组织获得的Ago HITS-CLIP数据显示,miRNA的种子区域和靶mRNA之间的G:A摆动碱基配对作为非规范靶标存在,并且根据另外的报告基因实验,证实了这样的非规范靶位点可以表现出miRNA介导的基因抑制作用。非规范基因抑制现象表明G:A摆动碱基配对可能作为miRNA的非规范靶标来调节miRNA的生物学功能,因此,为证实这一可能性,我们针对miR-1进行了实验,miR-1是在上述实施例中描述的心肌细胞的miRNA。为了研究非规范的G:A摆动靶标是否具有特定的生物学功能,由于miR-1仅需识别非规范的G:A摆动配对靶标位点而不识别规范的靶标,因此它通过用U替代G来制造,使得在实验中使用miR-1种子区域中的G与A(而非C)配对。为了在生理上类似于心脏的条件下进行该实验,对来源于大鼠心脏组织的原代心肌细胞进行培养(原代大鼠新生心肌细胞培养)。在这里,心肌细胞培养通过以下进行:通过酶反应(Neomyt试剂盒(Cellutron))从在出生后一天的大鼠新生心脏组织中分离心肌细胞,并在通过将补充有10%FBS、5%马血清(HS)、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的Dulbecco改良Eagle培养基(Invitrogen)和M199培养基(WellGene)以4:1混合制备的添加brdU的培养基中培养心肌细胞,使其与存在于心脏组织中的具有细胞周期的其他细胞分开。

[0123] 3-2.确认通过miR-1导致的心肌细胞尺寸减小

[0124] 首先确认在如上所述获得的原代培养的心肌细胞中是否诱导了心脏肥大。心肌细胞具有细胞周期停滞和尺寸增加的特征,称为心肌肥大。心肌肥大在补偿心肌细胞功能下降中发挥作用,被称为心脏病病理学的中间阶段,并且是具有众所周知的细胞形态和基因表达谱变化的心脏病模型系统。在心脏肥大细胞模型中,可以通过用肾上腺素受体激动剂例如去氧肾上腺素(PE)处理心肌细胞来诱导心脏肥大。

[0125] 因此,通过用100μM去氧肾上腺素(+PE)处理培养的心肌细胞来诱导心脏肥大,如图8A所示,与未处理的对照(rCMC)相比,心肌细胞的尺寸增加。另外,如实施例1所示,当在心肌纤维母细胞细胞系(H9c2细胞)中表达miR-1时,细胞尺寸会减小,即使将miR-1导入培养的原代心肌细胞中,也可观察到心肌细胞的尺寸由于与上述相同的现象而减小。这与众所周知的心脏肥大现象和心肌细胞中miR-1诱导的心肌萎缩相一致。

[0126] 3-3.使用miR-1替代物证实miRNA种子序列中的G:A摆动配对靶标抑制显示出具有另一种生物学功能的可能性

[0127] 由于miR-1在种子区域中包含三个G碱基,因此它无法识别规范靶标,并且仅识别非规范G:A摆动配对靶标位点,因此设计了其中将这些G碱基替换为U碱基的miR-1,并且通过根据G位点将miR-1应用于从5'端2位(miR-1-G2U),3位(miR-1-G3U)和7位(miR-1-G7U)来合成miR-1替代物。本文中使用的miR-1替代物的碱基序列如下(miR-1-G2U:5'p-UUGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3'(SEQ ID NO:10);miR-1-G3U:5'p-UGUAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3'(SEQ ID NO:11);和miR-1-G7U:5'p-UGGAAUUUAAAGAAGUAUGUAU-3'(SEQ ID NO:12)),它们是由引导链和过客链(hsa-miR-1-5p;miRBase登录号:MIMAT0031892,5'-

ACAUACUUCUUUAUAUGCCCAU-3', SEQ ID NO:13) 合成的, 过客链与从替代的miR-1的5'端起第2、3和7个碱基不完全互补并且与引导链形成双链体。miR-1替代物的碱基序列在设计miRBase中记录的人miR-1碱基序列后由Bioneer化学合成, 通过HPLC分离, 然后根据制造商提供的方法制备成引导链和过客链的双链体。使用RNAimax试剂 (Invitrogen) 将50mM的相应miRNA转染到原代心肌细胞系中。

[0128] 结果, 如图8A所示, 当将miR-1-G2U、miR-1-G3U或miR-1-G7U引入原代心肌细胞培养物中时, 可以观察到心肌细胞的形态增加至与心肌肥大诱导细胞 (+PE) 相似的水平。为了定量分析每个细胞尺寸, 使用ImageJ程序 (NIH) 对100个以上的细胞进行定量, 如图8B所示, 分析了与引入对照核苷酸 (NT) 的情况相比, 合成为仅识别miR-1的G:A摆动配对位点的所有miR-1替代物 (miR-1-G2U, miR-1-G3U和miR-1-G7U) 的尺寸均增加了约1.5-1.8倍。这类似于去氧肾上腺素 (PE) 诱导的心肌肥大模型的心肌细胞尺寸, miR-1本身就心肌细胞的形态表现出减小细胞尺寸的作用, 因此观察到规范靶标抑制作用导致细胞形态功能不同于通过G:A摆动配对进行的靶标抑制。此外, 为了进一步从分子水平确认本实施例中观察到的心肌肥大, 通过定量聚合酶链反应 (qPCR) 将已知会增加其表达作为标志物的心钠素 (ANP) 基因的表达与GAPDH进行了比较, 测量为相对值。通过使用RNeasy试剂盒 (Qiagen) 提取总RNA, 根据相应实验方案用Superscript III RT (Invitrogen) 逆转录总RNA, 使用SYBRTM Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 通过qPCR通过相应的引物扩增ANP的mRNA, 并测量扩增量来进行实验。

[0129] 结果, 如图8C所示, 当合成以仅识别miR-1的G:A摆动配对位点的miR-1替代物 (miR-1-G2U, miR-1-G3U和miR-1-G7U) 引入心肌细胞时, 所有替代物具有显著增加的ANP表达水平, 其为对照 (NT) 的约1.2至1.5倍, 这通过四次重复实验得到了证实。尽管ANP表达的这种增加少于去氧肾上腺素 (PE) 处理的心肌细胞实验组的这种增加 (其是对照组的约2倍), 但即使原始miR-1被引入, 这也与显著降低ANP表达的现象相反, 从而表明miR-1通过G:A摆动配对位点具有完全不同的生物学功能。

[0130] 从以上所述, 最终可以得知, miRNA种子区域中被G:A摆动配对抑制的非规范靶标具有与常规规范靶标识别不同的生物学功能。这样的发现表明, 通过miRNA的规范靶标的功能不同于非规范靶标的功能, 并且考虑到这一点, 可以预期的是, 如果仅能够抑制miRNA的G:A摆动靶标, 则仅由G:A摆动靶标产生的生物学功能将受到选择性控制。

[0131] 实施例4. 确认由串联靶miRNA抑制剂抑制miRNA的非规范G:A的摆动配对功能的作用

[0132] 4-1. 确认串联靶miRNA抑制剂 (2x) 对miR-1的非规范G:A种子结合位点的作用

[0133] 抗miR-1-种子 (2x) (5' p-dTdT (rSP) ACAUCCA (rSP) ACAUCCA (rSP) dTdT-3'), 是抑制种子靶位点而形成的串联靶miRNA抑制剂, 在实施例1中是作为miR-1的规范靶标, 其显示出抑制miR-1减小心肌细胞尺寸的功能的现象。因此, 串联靶miRNA抑制剂可以应用于能够与miRNA结合的任何序列, 因此也可以应用于实施例2和3中鉴定的miRNA的非规范靶序列。因此, 为了仅抑制在实施例2和3中证实的G:A摆动位点的生物学功能, 将串联靶miRNA抑制剂应用于miR-1。

[0134] 首先, 像图9A中所示的序列一样, 将与在miR-1种子序列中从5'端起第7位的G替换为U的序列互补的两个序列引入串联靶miRNA抑制剂 (抗miR-1-7G:A (2x))。即, 串联靶miRNA

抑制剂(抗miR-1-7G:A(2x))通过以下设计:连续排列使能够与实施例3的miR-1-G7U的种子序列互补碱基配对的5'-AAAUCCA-3'互补碱基配对,并在排列的序列之间引入如实施例1所示的脱碱基核苷酸rSpacer,以防止因在连续排列的序列之间的边界上产生新位点而引起脱靶效应。

[0135] 为了实验上证实抑制miR-1的非规范G:A摆动种子靶基因的效率,如实施例1-2中所述,进行了荧光素酶报告基因测定。为此,如图9B所示,在荧光素酶报告基因的3'UTR(Luc-miR-1-7G:A位点)中连续排列了miR-1的5个非规范G:A摆动种子靶位点(miR-1-7G:A位点)。

[0136] 为了确认基因是否被miR-1的非规范G:A摆动种子靶位点可靠地抑制,然后这种抑制通过相应的链靶miR-1G:A摆动位点抑制剂(抗miR-1-7G:A(2x))而受到抑制,根据上述实施例中所述的相同方法通过Bioneer合成了其中从miR-1的5'端起第7位的G被U替代的miR-1:G7U,然后以5nM的浓度使用miR-1:G7U,并根据制造商的操作规程使用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen)将其与50nM的抑制剂(抗miR-1-7G:A(2x),SEQ ID NO:14)共转染HeLa细胞(ATCC CCL-2),调查抗miR-1-7G:A(2x)是否表现出抑制非规范G:A摆动种子靶标抑制的作用。

[0137] 结果,如图9C所示,证实了miR-1:G7U转染后观察到的荧光素酶活性被抑制为基于未转染miR-1:G7U时的值计算的相对荧光素酶活性(%)的88%,以及导入了miR-1和抗miR-1-7G:A(2x)的实验组的相对荧光素酶活性(%)为95%,这证实了其表达被miR-1:G7U抑制的荧光素酶的活性几乎得以恢复到了不受抑制的原始值,并且具有统计意义($p=0.027$)。

[0138] 4-2. 确认串联靶miRNA抑制剂(2x)可以抑制由miR-1的非规范G:A种子结合位点引起的生物学功能

[0139] 已在其中通过研究荧光素酶报告基因的活性从外部转染miR-1-G7U替代碱基的HeLa细胞(ATCC CCL-2)中证实了在上述实施例中的抗miR-1-7G:A(2x)特异性抑制miR-1调节7G:A摆动靶标的功能。因此,为了确认天然存在于心肌纤维母细胞中的miR-1的7G:A摆动靶标调节功能,将Luc-miR-1-7G:A位点(其是含有miR-1-7G:A位点的荧光素酶报告基因载体)和在实施例4-1中实验中使用的50nM抗miR-1-7G:A(2x)或对照抗NT(2x)进行转染,然后如实施例4中所述研究荧光素酶活性。

[0140] 结果,如图10A所示,通过将含有miR-1-7G:A位点的荧光素酶的活性值归一化为没有miR-1-7G:A位点的荧光素酶报告基因(Luc-无位点)的活性值而计算出的相对活性(%)值为 86.28 ± 2.59 ,对应于测量心肌纤维母细胞中天然存在的miR-1的7G:A摆动靶标调节功能的值。在此,抗miR-1-7G转染的实验组的相对荧光素酶活性(%)为 89.96 ± 2.13 ,表明miR-1-G7U的活性在统计学上被显著抑制。

[0141] 其显示,作为心肌纤维母细胞细胞系的H9c2细胞在其中天然表达miR-1,可以通过miR-1的7G:A摆动配对抑制靶基因。另外,在实施例3-3中,观察到,为了使miR-1的第7碱基与A配对,第7位的G被U替代的miR-1-G7U使心肌细胞的尺寸因其表达而变大。因此,预期如果通过H9c2细胞中miR-1的7位G处的G:A摆动配对靶标可以被根据本发明的抑制miRNA的修饰核酸所抑制,则心肌细胞会变小,并且为了确认这一点,作为按照与上述实施例相同的方式将对照(抗NT(2x))和抗miR-1-7G:A(2x)转染到H9c2细胞中并确认转染效果的结果,如图10B所示,观察到H9c2细胞的尺寸减小。

[0142] 另外,使用ImageJ程序(NIH)对100个以上的H9c2细胞的尺寸进行了定量分析,如图10C所示,证实与对照(抗NT(2x))相比,引入抗miR-1-7G:A(2x)的细胞的尺寸减少了约40%。由此可见,由于miR-1位置7的G碱基,抗miR-1-7G:A(2x)能够竞争性地抑制G:A摆动靶标识别机制,从而抑制了相应的功能。

[0143] 如上所述,可以看出,串联靶miRNA抑制剂不仅可以防止miRNA的常规已知的规范种子靶识别,而且即使其被应用于非规范靶标例如G:A摆动配对也可以有效抑制miRNA的特异性功能。

[0144] 4-3. 证实串联靶微小RNA抑制剂(9x)可以通过非规范的G:A种子结合位点抑制miR-1的生物学功能

[0145] 用于本实施例中miR-1的非规范G:A种子结合位点的串联靶miRNA抑制剂(抗miR-1-7G:A(2x))具有miR-1的两个连续的非规范G:A种子结合位点,其被特异性抑制。而且,如图11A所示,设计了其中重复相应位点9次的串联靶miRNA抑制剂(抗miR-1-7G:A(9x)),并进行了荧光素酶报告基因实验以证实其抑制作用(图11B)。

[0146] 通过Trilink化学合成具有下列序列的抗miR-1-7G:A(9x),并通过HPLC分离(抗miR-1-7G:A(9x):5'-p-NN(rSP)AAAUUCCA(rSP)AAAUUCCA(rSP)AAAUUCCA(rSP)AAAUUCCA(rSP)AAAUUCCA(rSP)AAAUUCCA(rSP)AAAUUCCA(rSP)AAAUUCCA(rSP)AAAUUCCA(rSP)NN-3', SEQ ID NO:15)。实验中用作对照的对照抑制剂也是通过Trilink化学合成的,具有以下碱基序列,具有9个重复的NT靶位点,并通过HPLC分离(抗NT(9x):5'-p-NN(rSP)GGUUGUGA(rSP)GGUUGUGA(rSP)GGUUGUGA(rSP)GGUUGUGA(rSP)GGUUGUGA(rSP)GGUUGUGA(rSP)GGUUGUGA(rSP)NN-3', SEQ ID NO:16)。在这里,按照图9B的实验中使用的制造商的操作规程使用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen),将含有荧光素酶报告基因载体Luc-miR-1-7G:A位点的miR-1-7G:A位点和25nM或50nM的抗miR-1-7G:A(9x)或作为对照的抗NT(9x),与5nM miR-1:G7U转染到HeLa细胞(ATCC CCL-2)中,研究了荧光素酶活性。

[0147] 结果,如图11B所示,观察到通过将转染miR-1-G7U和抗NT(9x)的试验的荧光素酶活性值归一化为未转染miR-1-G7U的荧光素酶报告基因的活性值而计算出的相对活性(%)为74.57 $\pm$ 6.36,从而证实了相应的miRNA介导的基因抑制的作用。在这里,观察到在还引入了抗miR-1-7G:A(9x)的实验组中,相对活性(%)为87.23 $\pm$ 5.68,表明25nM的抗miR-1-7G:A(9x)在统计学上显著抑制miR-1-G7U的活性(P=0.05)。另外,当抗miR-1-7G:A(9x)的量增加到50nM时,荧光素酶报告基因的相对活性(%)为107.15 $\pm$ 9.58,这在统计学上显著地显示了靶基因抑制被miR-1-G7U完全抑制(P=0.0008)。

[0148] 因此,可以看出,当靶碱基序列重复两次或更多次时,可以检测到串联靶miRNA抑制剂的抑制作用,但是当重复9次时,显示出进一步增强的抑制作用。

[0149] 使用荧光素酶报告基因证实了抗miR-1-7G:A(9x)抑制miR-1的7G:A摆动配对靶标的有效抑制作用,然后证实了抗miR-1-7G:A(9x)还可以通过抑制miR-1的7G:A摆动种子靶标来有效抑制心肌萎缩现象。在本实验中,使用了H9c2细胞(一种心肌纤维母细胞细胞系),转染后使用Lumascop400(Etaluma)研究了随着时间的推移(0、24、48和60小时)抗miR-1-7G:A(9x)引起的细胞尺寸变化。在相应的实验中,通过在转染过程中除去FBS并用作为100uM α -肾上腺素能激动剂的去氧肾上腺素(PE;Sigma)处理细胞,并培养细胞长达60小时,观察到抗miR-1-7G:A的引入。

[0150] 结果,如图11C所示,在对照(抗-NT (9x))中观察到由PE处理诱导的心肌纤维母细胞细胞系的细胞尺寸增加,而在转染抗miR-1-7G:A (9x)的实验组中,完全没有观察到心肌细胞系的萎缩。

[0151] 如上所述,随着要被抑制的miRNA靶标的数量增加,串联靶miRNA抑制剂的抑制作用增强,表明这种抑制能力足以抑制相应的miRNA的生物学功能。

[0152] 实施例5.证实通过将间隔子修饰物引入串联靶miRNA抑制剂中消除了由靶位点之间的接头序列引起的不利影响

[0153] 在以上实施例中制备的串联靶miRNA抑制剂被设计为连续比对两个或更多个待抑制的miRNA靶位点。因此,串联靶miRNA抑制剂可以由于靶位点之间的接头序列而意外地与不同的miRNA或RNA结合蛋白结合,因此可具有抑制该抑制剂的不利影响。在这种情况下,在通过miR-1的7位上的G抑制非规范G:A种子靶标的抑制剂(抗miR-1-7G:A (9X))序列中,例如抗miR-1-7G:A (9x)的碱基序列在如图12A中所示的重复的靶位点之间具有脱碱基修饰物rSpacer,并且相应的序列如下(5'-p-NN (rSP) AAAUUGCA (rSP) AAAUUGCA (rSP) AAAUUGCA (rSP) AAAUUGCA (rSP) AAAUUGCA (rSP) AAAUUGCA (rSP) AAAUUGCA (rSP) AAAUUGCA (rSP) NN-3')。与此相反,抗miR-1-7G:A (9x) -NS具有相同的碱基序列,但是在重复的靶位点序列之间不包含脱碱基修饰物,其碱基序列如下(5'-NNAAAUUGCAAAAUUGCAAAAUUGCAAAAUUGCAAAAUUGCAAAAUUGCANN-3', SEQ ID NO:17)。

[0154] 在此,如图12A所示,能够在连续配对中互补结合的唯一碱基序列是5'-AAAUUGCA-3',但是在抗miR-1-7G:A (9x) -NS不具有脱碱基修饰物的情况下,能够与miRNA结合的序列除了最初的靶位点即5'-AAAUUGCA-3'外,还由7个相互连接的位点意外地产生的,这些碱基序列如下(5'-AAUUGCAA-3', 5'-AUUGCAAA-3', 5'-UUGCAAAA-3', 5'-UGCAAAAU-3', 5'-CAAUUAU-3', 5'-CAAAUUC-3'和5'-AAAUUCC-3')。因此,在本发明的实施例中使用的的所有串联靶miRNA抑制剂都用靶位点之间的脱碱基修饰剂rSpacer修饰,以防止由靶位点之间的接头序列产生的新序列本身意外地成为不同miRNA的靶位点(miR-接头(junction)),或者成为不同RNA结合蛋白的结合位点,如图12B所示。

[0155] 因此,为了确认本发明的串联靶miRNA抑制剂是否能通过脱碱基修饰剂防止上述不良影响,以与上述实施例相同的方式进行了荧光素酶报告实验。为了证实这一点,用图12B所示的序列合成了miR-接头,其是识别靶位点之间的接头序列的miRNA。这包括位于从5'端起的1至8位的与靶位点之间的接头序列完全互补的碱基,以及9至21位的Cel-miR-67-3p序列(miR接头:5'-AAAUUUUG CCUAGAAAGAGUA-3', SEQ ID NO:18)。为了用双聚合物进行实验,通过Bioneer用过客链(miR-接头-过客:5'-TACTCTTCTAGGCAAAATTT-3')化学合成了miR-接头,并通过HPLC进行了分离。另外,为了测量相应的miR-接头的抑制作用,构建了作为荧光素酶报告基因载体的靶位点(5'-CAAAATT-3'),以具有与miR-接头的位置1至位置8的碱基互补的五个重复碱基序列,并通过与上述实施例相同的方法使用。

[0156] 作为荧光素酶报告实验的结果,检查了miR-1接头的抑制作用,如图12C所示,在靶位点之间具有间隔子修饰物的抗miR-1-7G:A (9X)的情况下,由于相应的靶位点被rSpacer分开,因此,由于5nM的MiR-1接头的表达而导致的基因抑制作用的抑制高达12%不具有统计学意义(P=0.23),但在抗miR-1-7G:A (9X) -NS不具有间隔子修饰物的情况下,通过miR-1接头对基因抑制作用的抑制具有统计学意义(P=0.01)。

[0157] 如上所述,能够证实,由于串联靶miRNA抑制剂在要抑制的miRNA的靶位点之间具有脱碱基修饰剂,因此可以消除由位点之间的接头序列引起的不利影响。

[0158] 如上所述,由于已经详细描述了本说明书的特定部分,尽管对于本领域技术人员而言清楚的是,该特定技术仅仅是优选实施方案,但是本说明书的范围不限于此。因此,说明书的实质范围将由所附的权利要求书及其等同物限定。

[0159] [工业实用性]

[0160] 根据本发明的抑制miRNA的修饰核酸包含在miRNA靶位点之间引入的脱碱基间隔子,从而不仅有效地抑制miRNA,而且防止了引入修饰核酸中的序列与不同的miRNA的意外结合。因此,预期修饰核酸可有效地用于仅选择性地抑制由miRNA的非规范靶标识别引起的生物学功能。

<110> 高丽大学校产学协力团
<120> 抑制微小RNA的修饰核酸及其用途
<130> MP020-106CN
<150> PCT/KR2019/006626
<151> 2019-05-31
<150> KR 10-2018-0063047
<151> 2018-05-31
<150> KR 10-2019-0064767
<151> 2019-05-31
<160> 18
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 8
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗miR-1-种子位点
<400> 1
acauucca 8
<210> 2
<211> 8
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗miR-1-7G:A 种子位点
<400> 2
aaauucca 8
<210> 3
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗miR-1-seed (2x) : n 是脱碱基 rSpacer
<400> 3
ttnacauucc anacauucca ntt 23
<210> 4
<211> 22
<212> RNA

<213> 智人
<220>
<221> 基因
<222> (1) .. (22)
<223> miR-1
<400> 4
uggaauguaa agaaguaugu au 22
<210> 5
<211> 24
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> cel-miR-67
<400> 5
ucacaaccuc cuagaaagag uaga 24
<210> 6
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗NT (2x): n 是脱碱基 rSpacer
<400> 6
ttngguugug angguuguga ntt 23
<210> 7
<211> 22
<212> RNA
<213> 智人
<220>
<221> 基因
<222> (1) .. (22)
<223> miRNA-124
<400> 7
uaaggcacgc ggugaaugcc aa 22
<210> 8
<211> 7
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> miR-124-种子位点

<400> 8
gugccuu 7
<210> 9
<211> 8
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> miR-124-凸起位点
<400> 9
guggccuu 8
<210> 10
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> miR-1-G2U
<400> 10
uugaauguaa agaaguaugu au 22
<210> 11
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> miR-1-G3U
<400> 11
uguaauguaa agaaguaugu au 22
<210> 12
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> miR-1-G7U
<400> 12
uggaauuuuaa agaaguaugu au 22
<210> 13
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> hsa-miR-1-5p
<400> 13
acauacuucu uuauaugccc au 22
<210> 14
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗miR-1-7G:A (2x) : n 是脱碱基 rSpacer
<400> 14
ttnaaaauucc anaaaauucca ntt 23
<210> 15
<211> 82
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗miR-1-7G:A (9x) : n 是脱碱基 rSpacer
<400> 15
naaaauuccan aaauuccana aaauuccanaa auuccanaaa uuccanaaaau uccanaaaau 60
ccanaaaauuc canaaaauucc an 82
<210> 16
<211> 82
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗NT (9x) : n 是脱碱基 rSpacer
<400> 16
ngguugugan gguugugang guugugangg uuguganggu ugugangguu gugangguug 60
ugangguugu gangguugug an 82
<210> 17
<211> 72
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗miR-1-7G:A (9x) -NS
<400> 17
aaaauccaaa auuccaaaaau uccaaaaauuc caaaaaucca aaaauccaaa auuccaaaaau 60
uccaaaaauuc ca 72
<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> miR-接头(junction)

<400> 18

aaauuuugcc uagaaagagu a 21

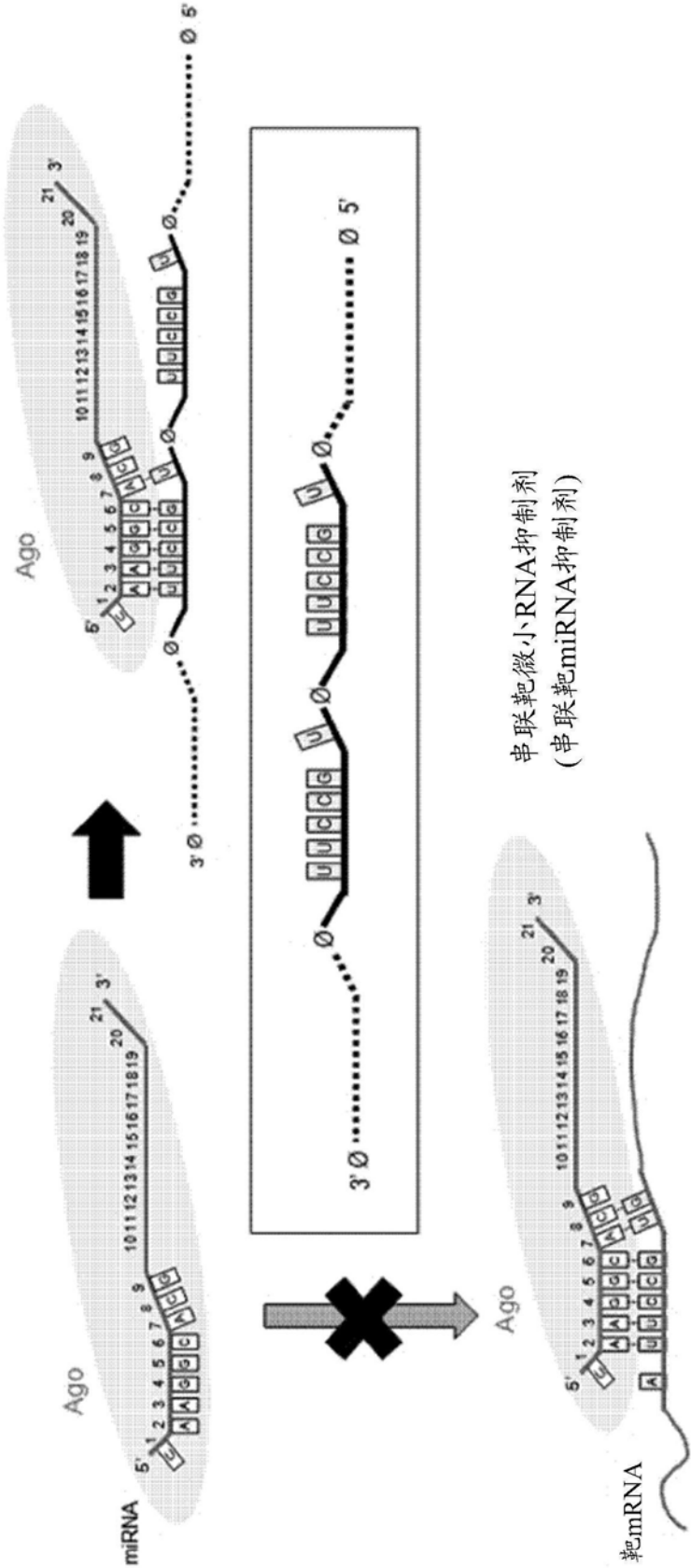


图1

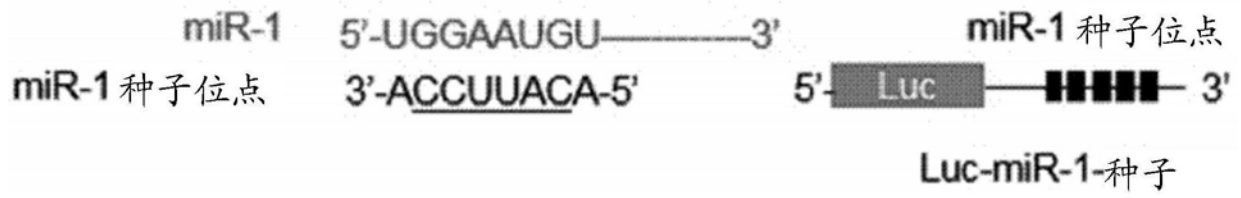


图2A

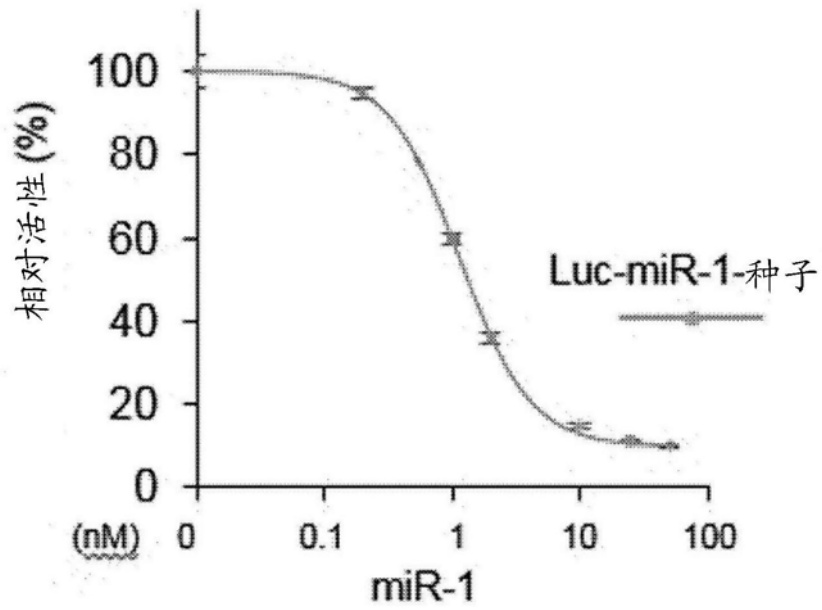


图2B

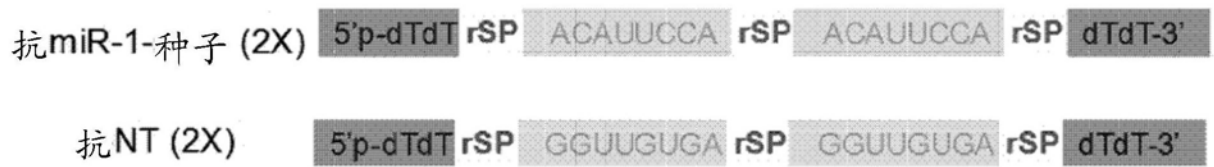


图2C

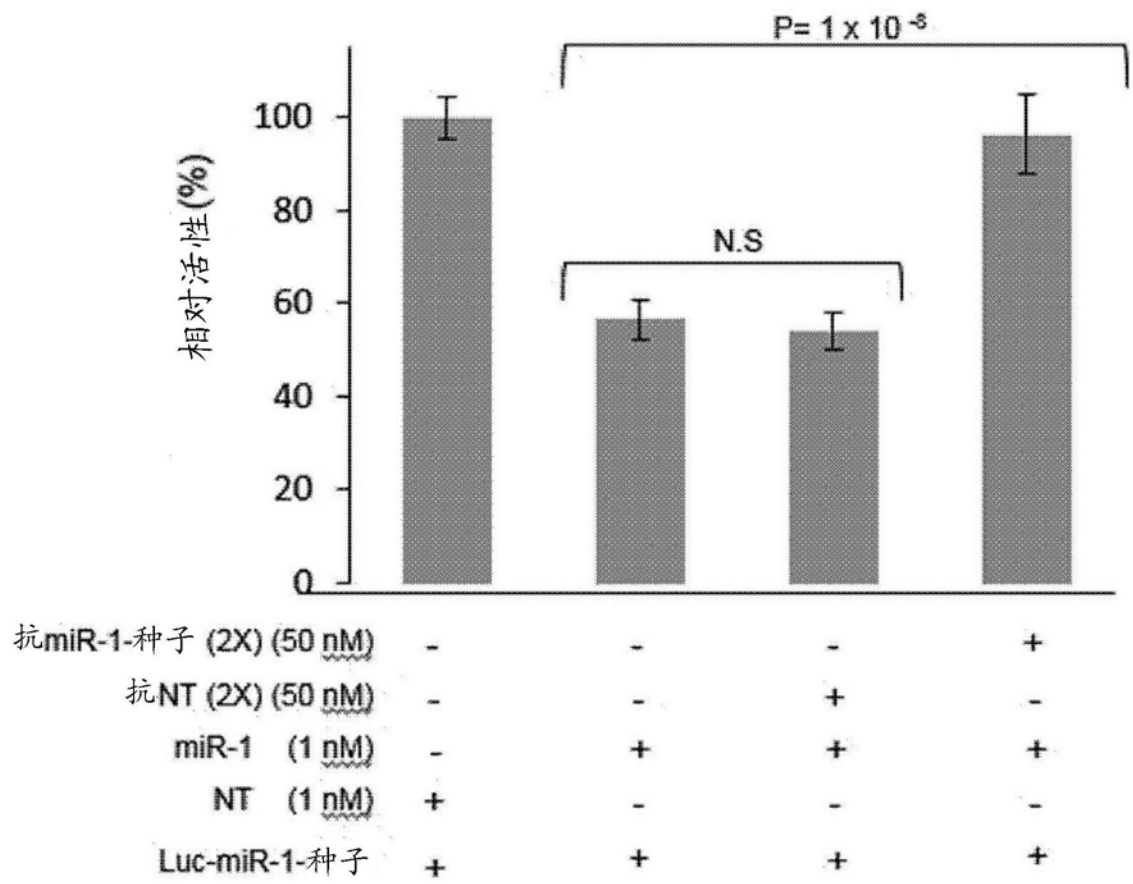


图2D

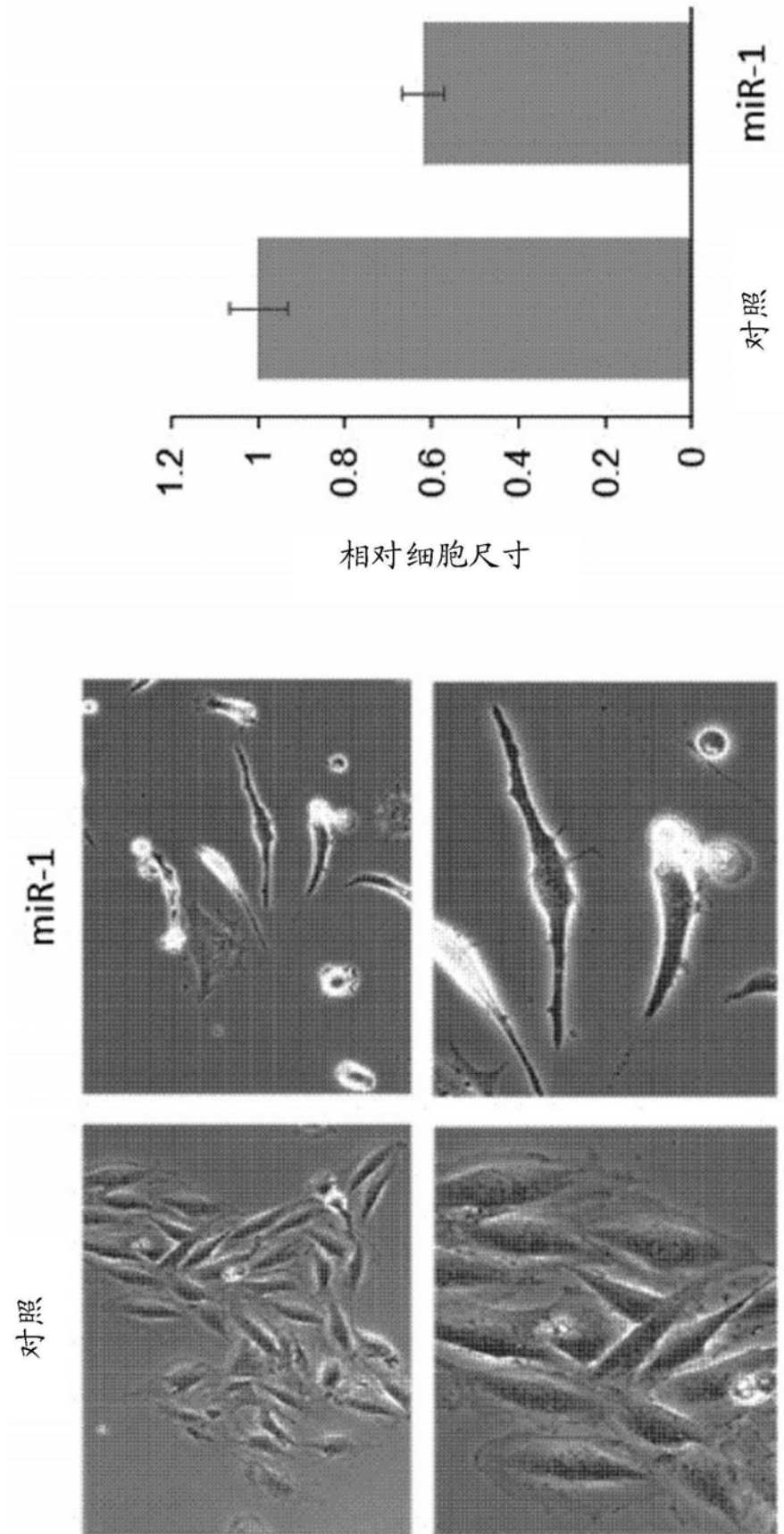


图3A

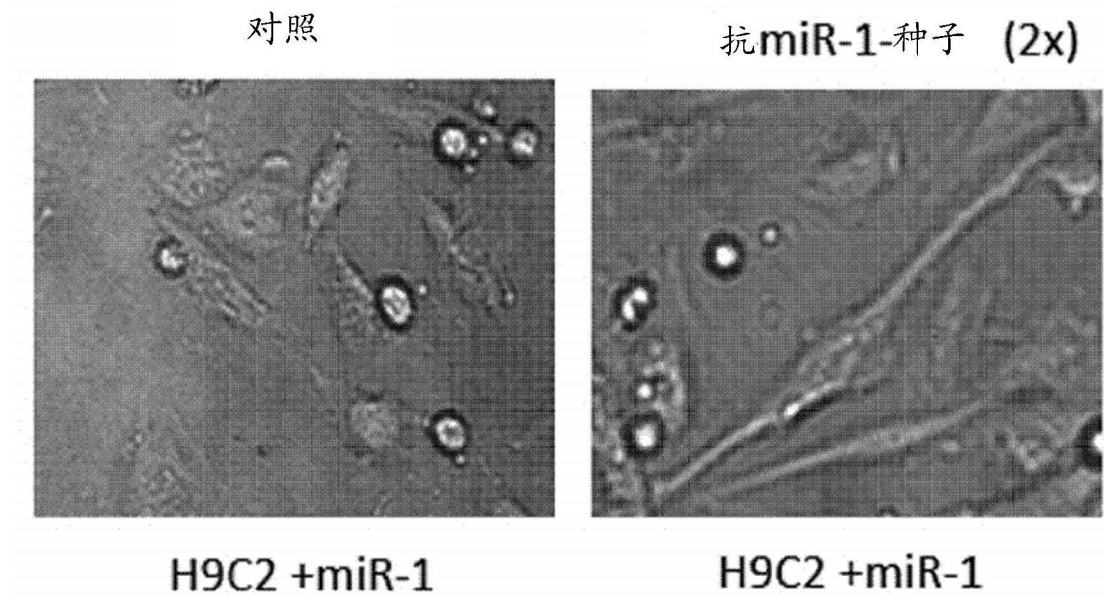


图3B

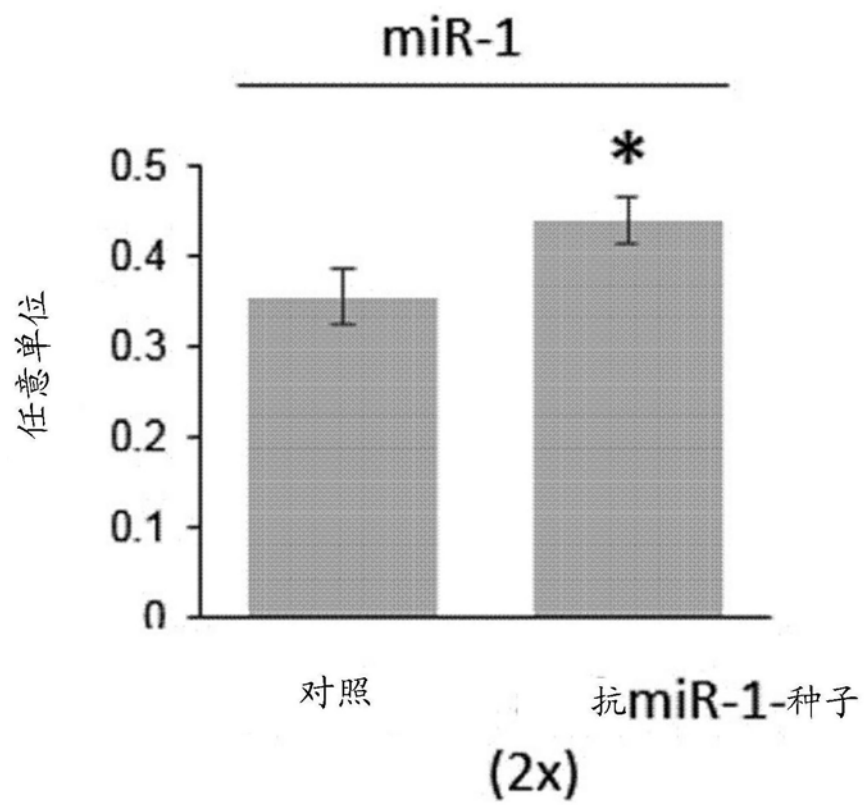


图3C

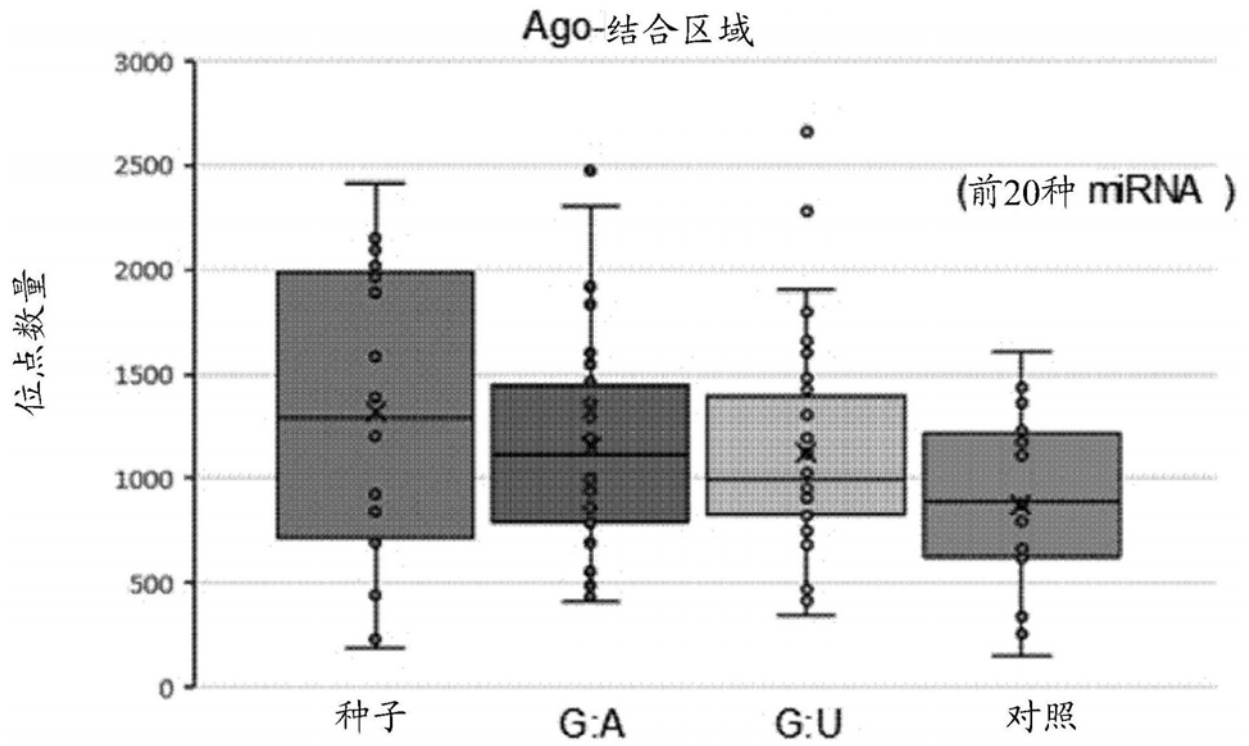


图4A

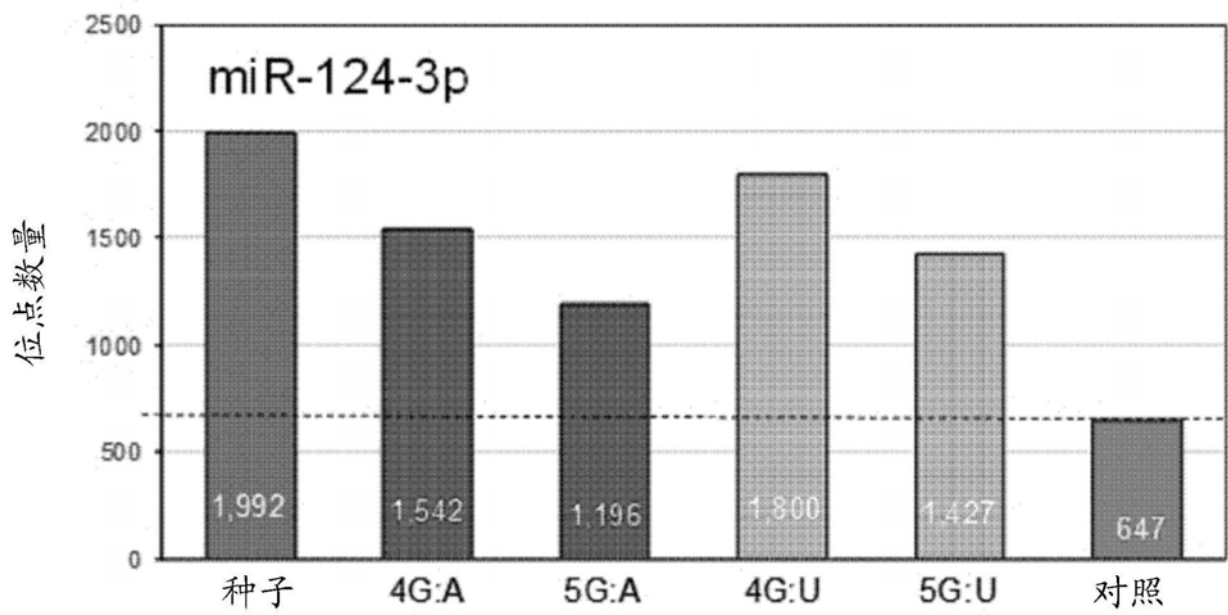


图4B



图4C

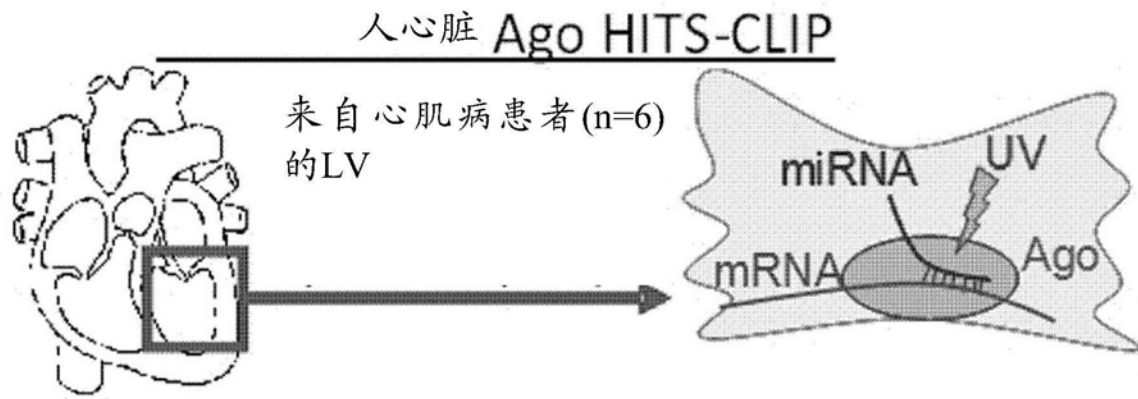


图5A

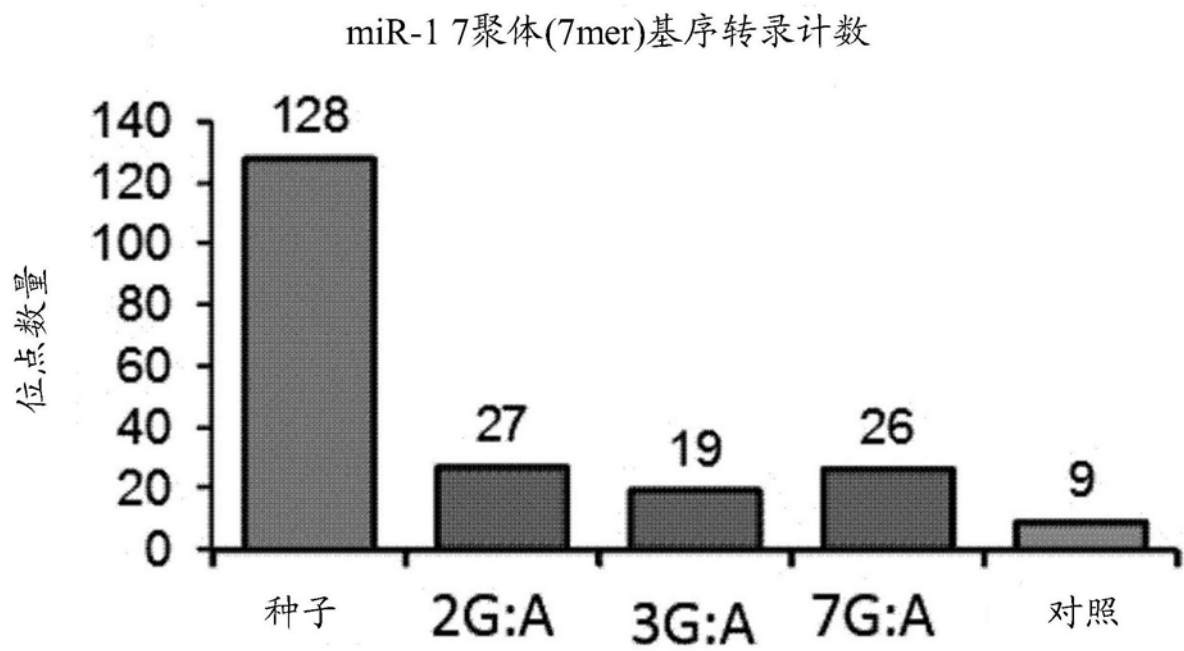


图5B

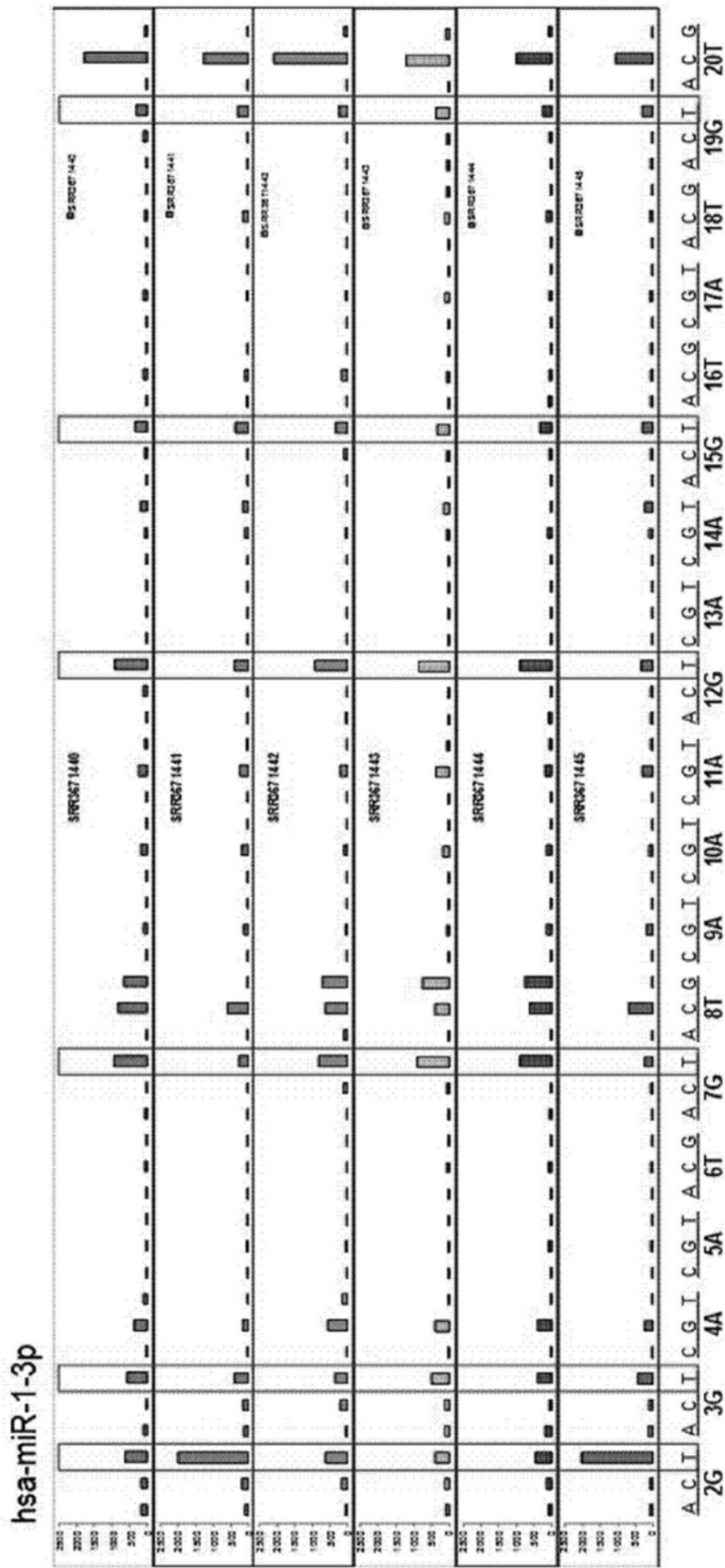


图5C

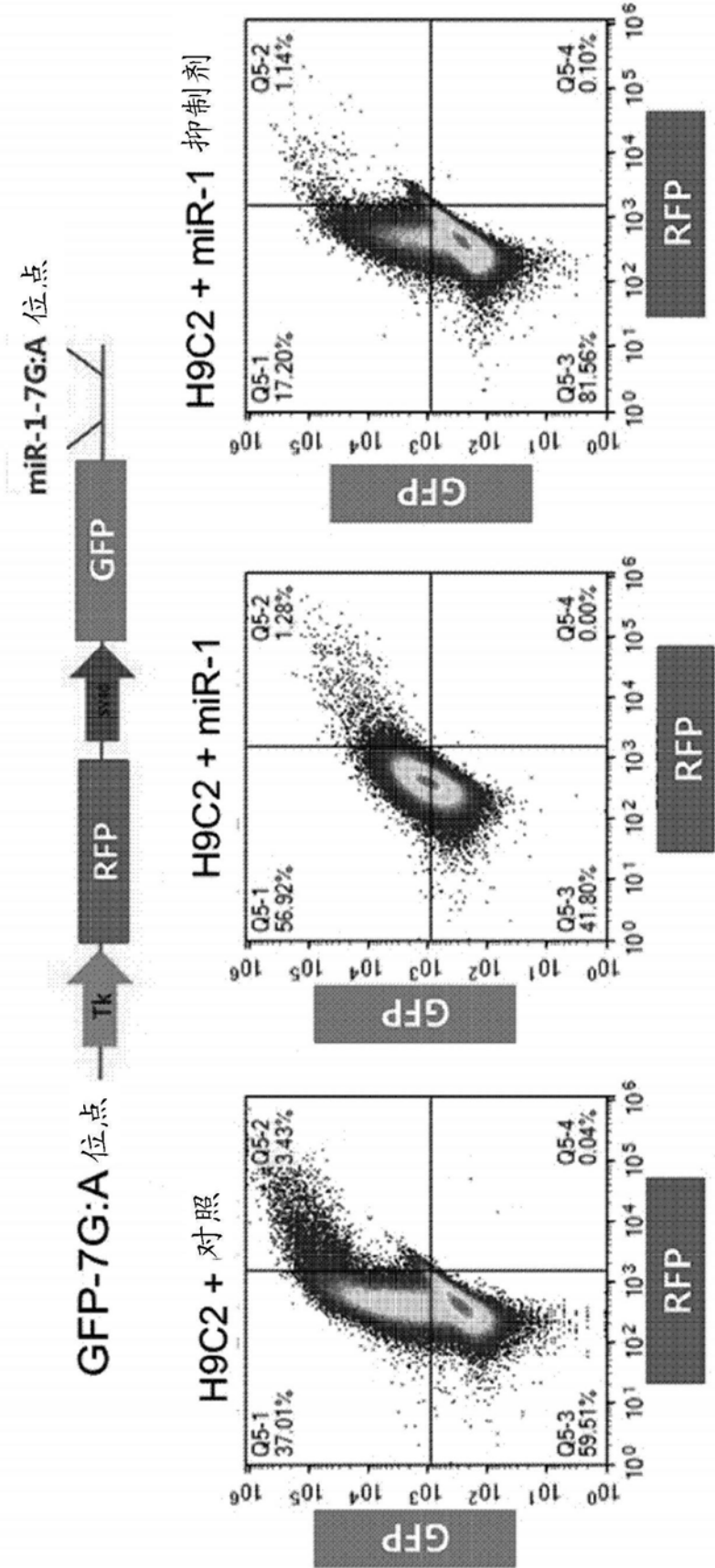


图6A

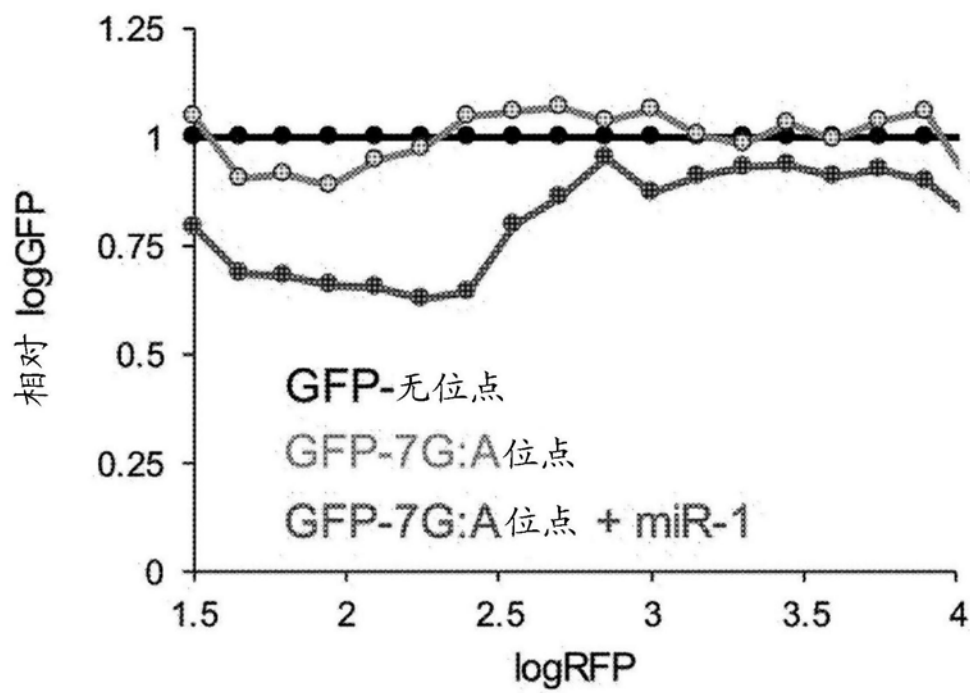


图6B

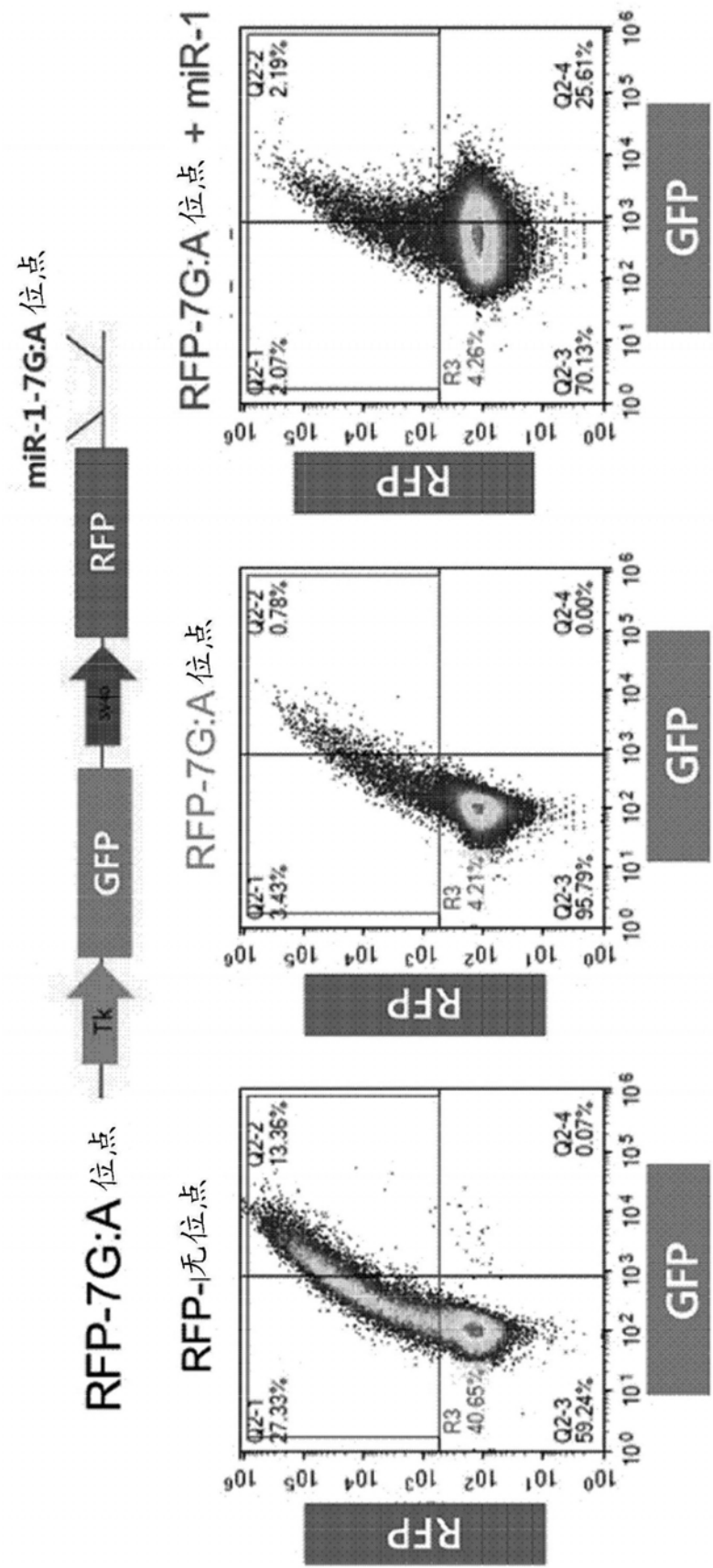


图6C

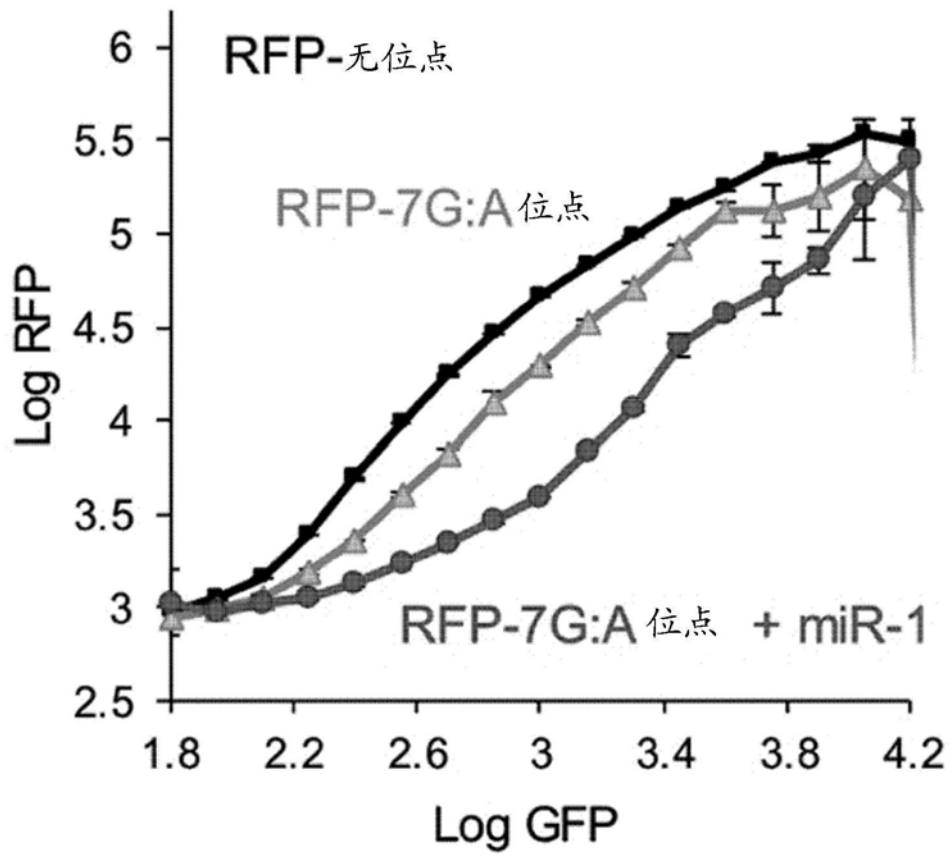


图6D



图7A

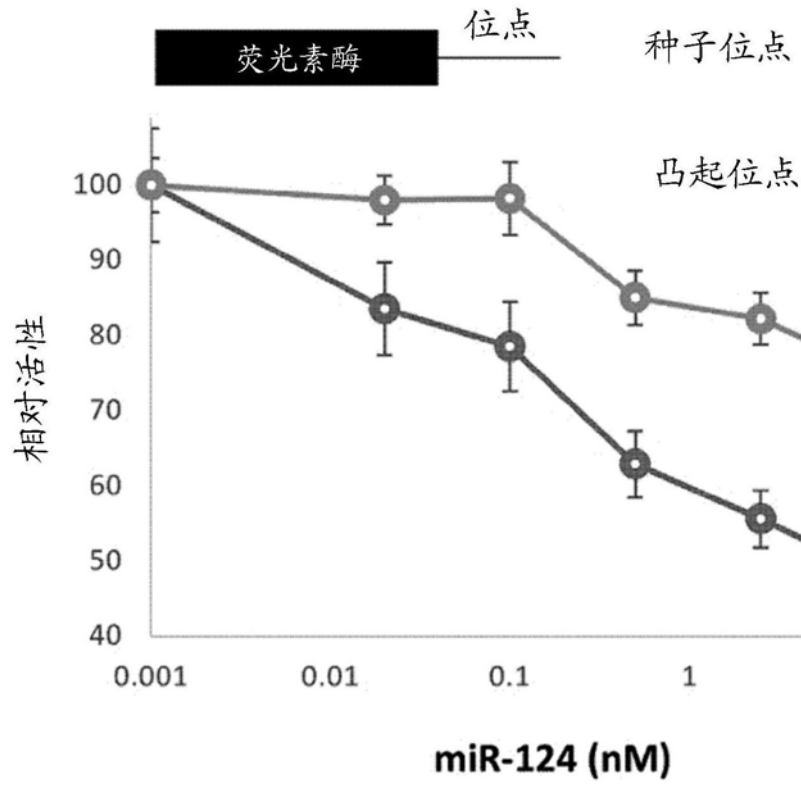


图7B

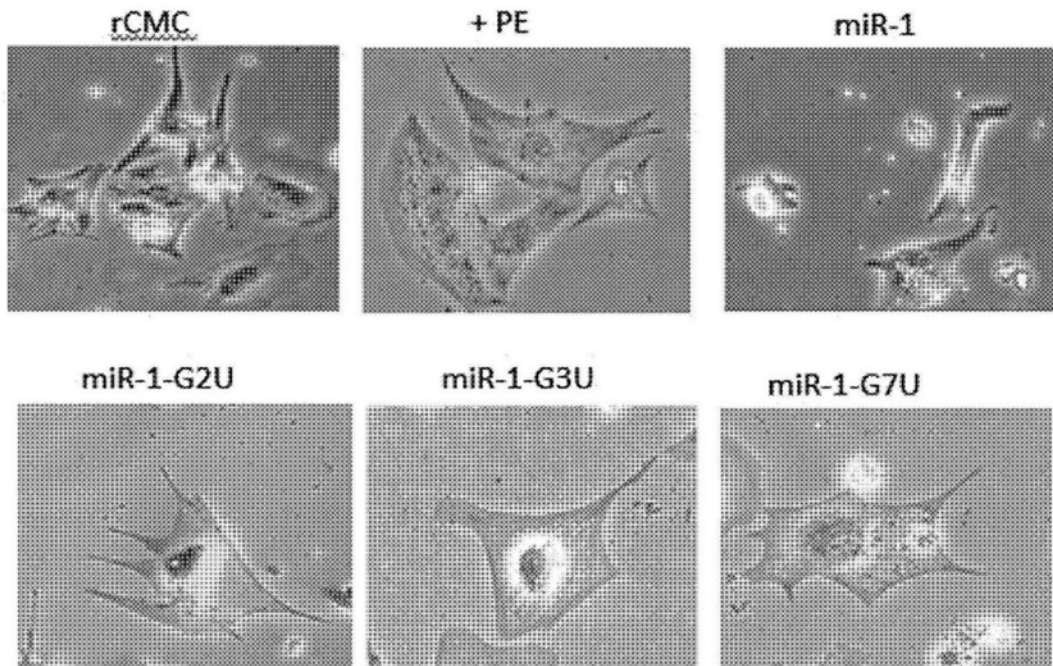


图8A

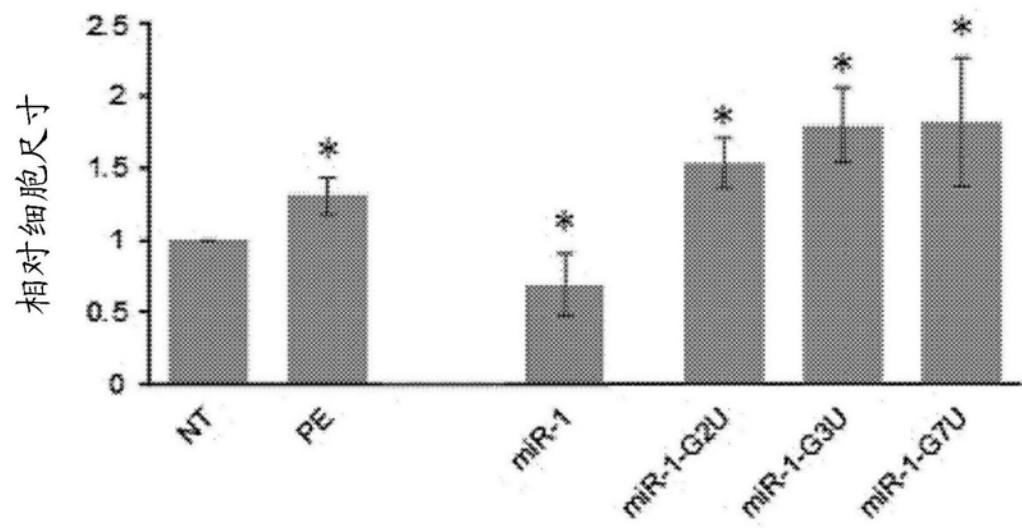


图8B

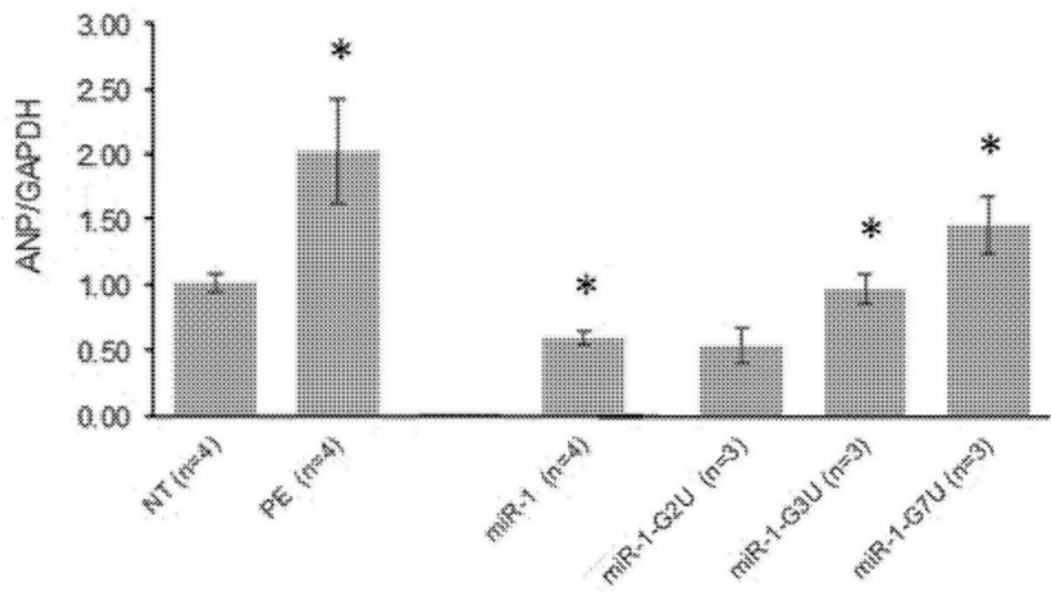


图8C



图9A

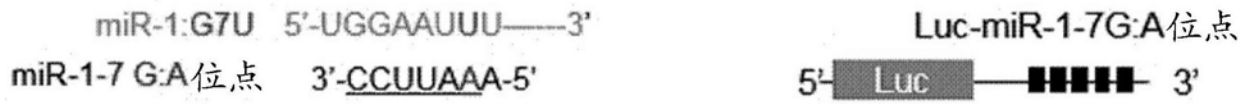


图9B

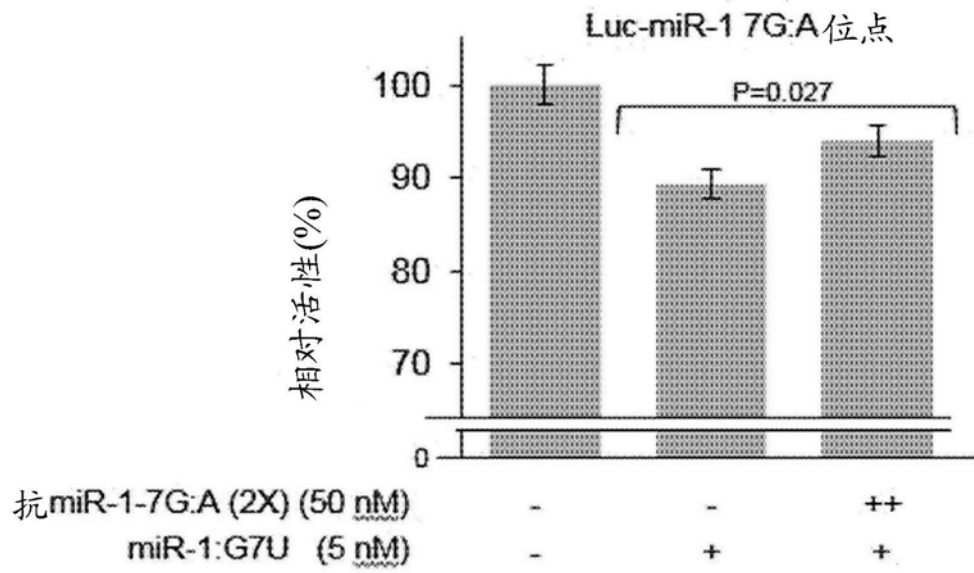


图9C

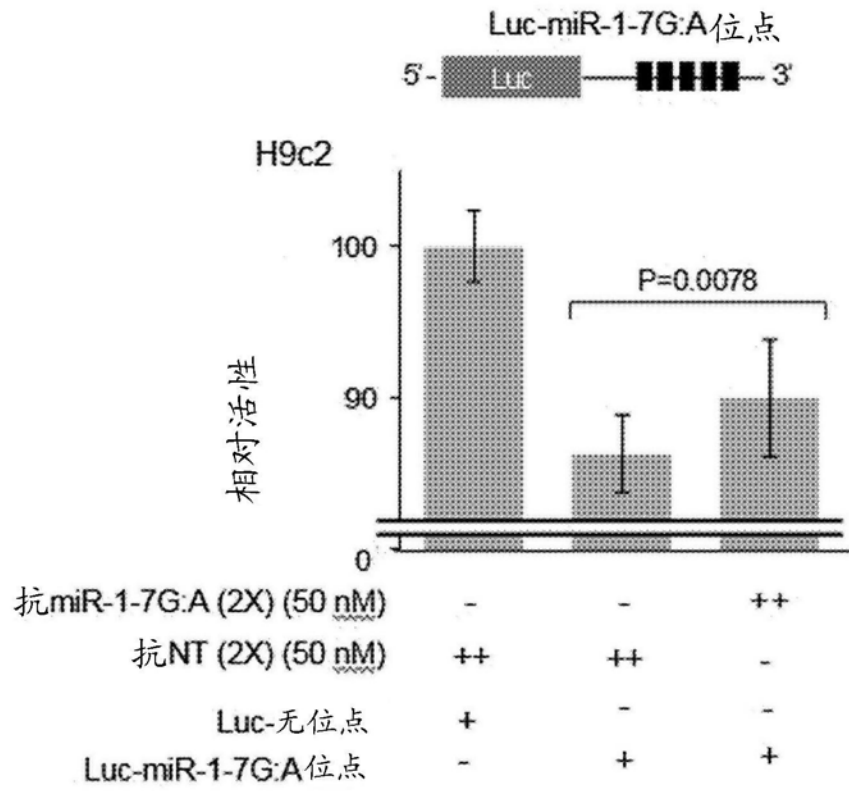


图10A

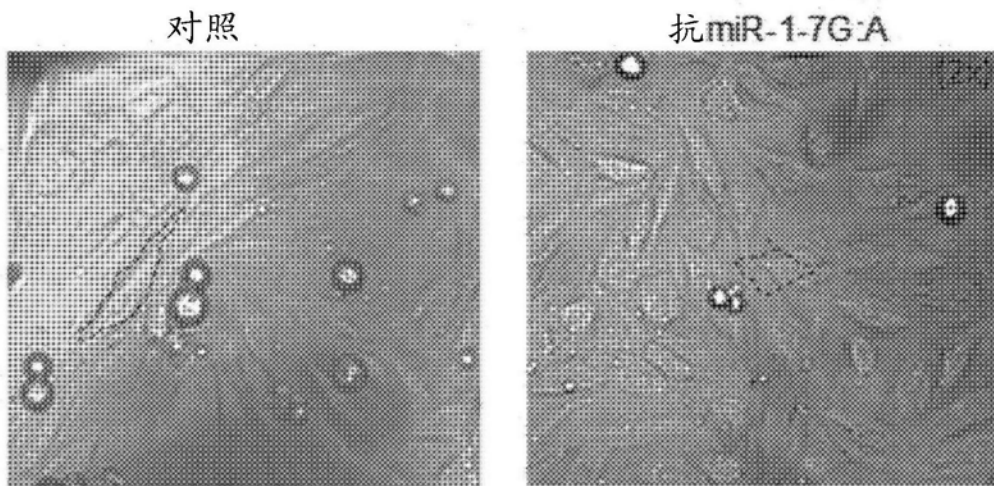


图10B

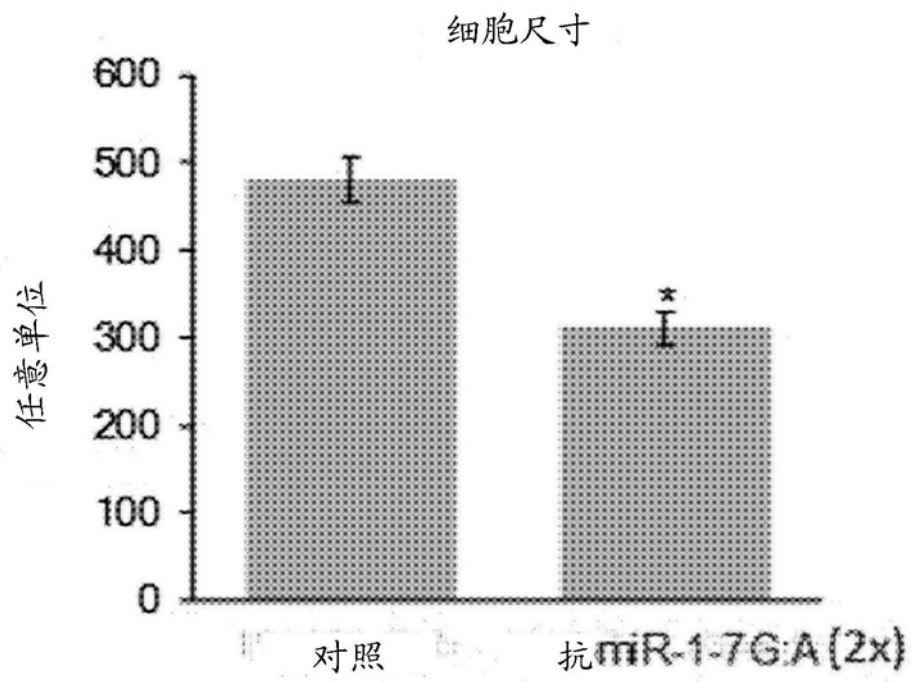


图10C



图11A

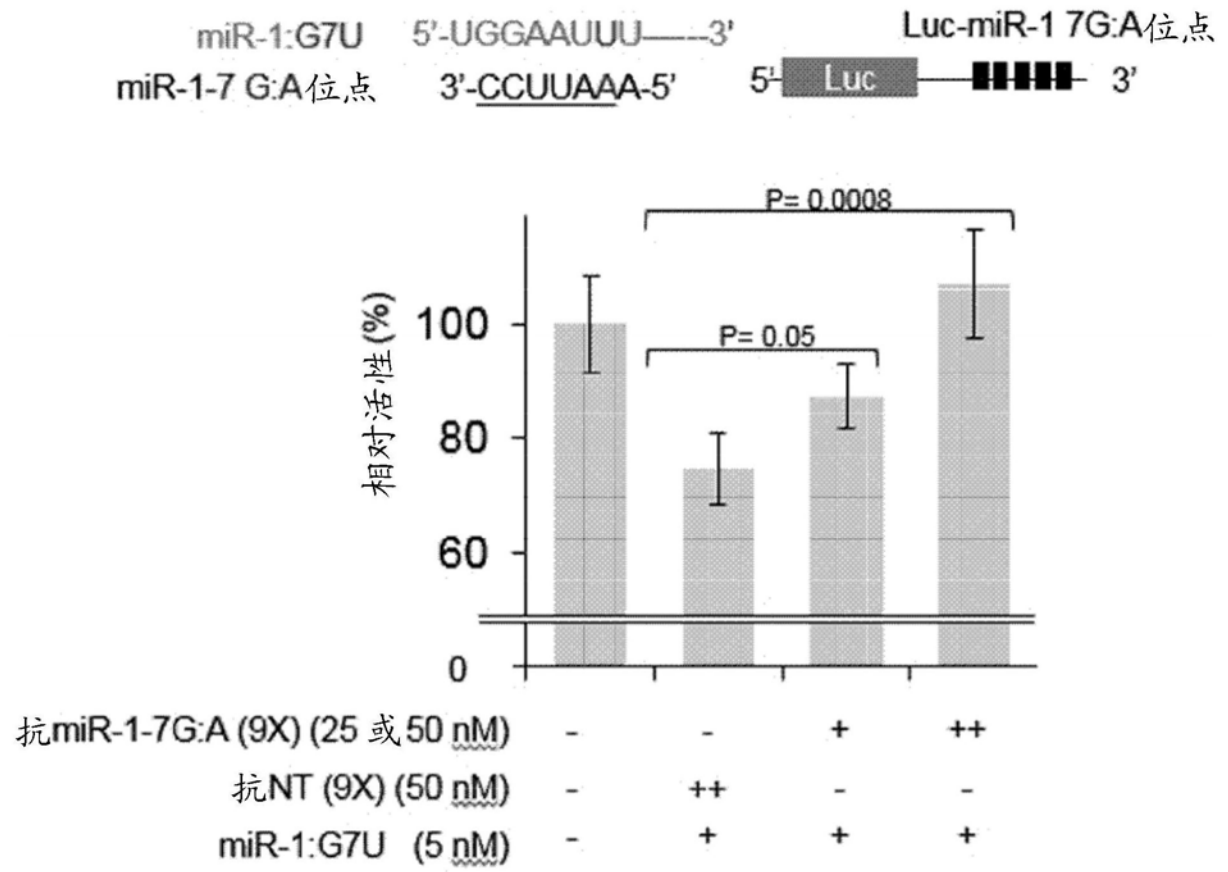


图11B

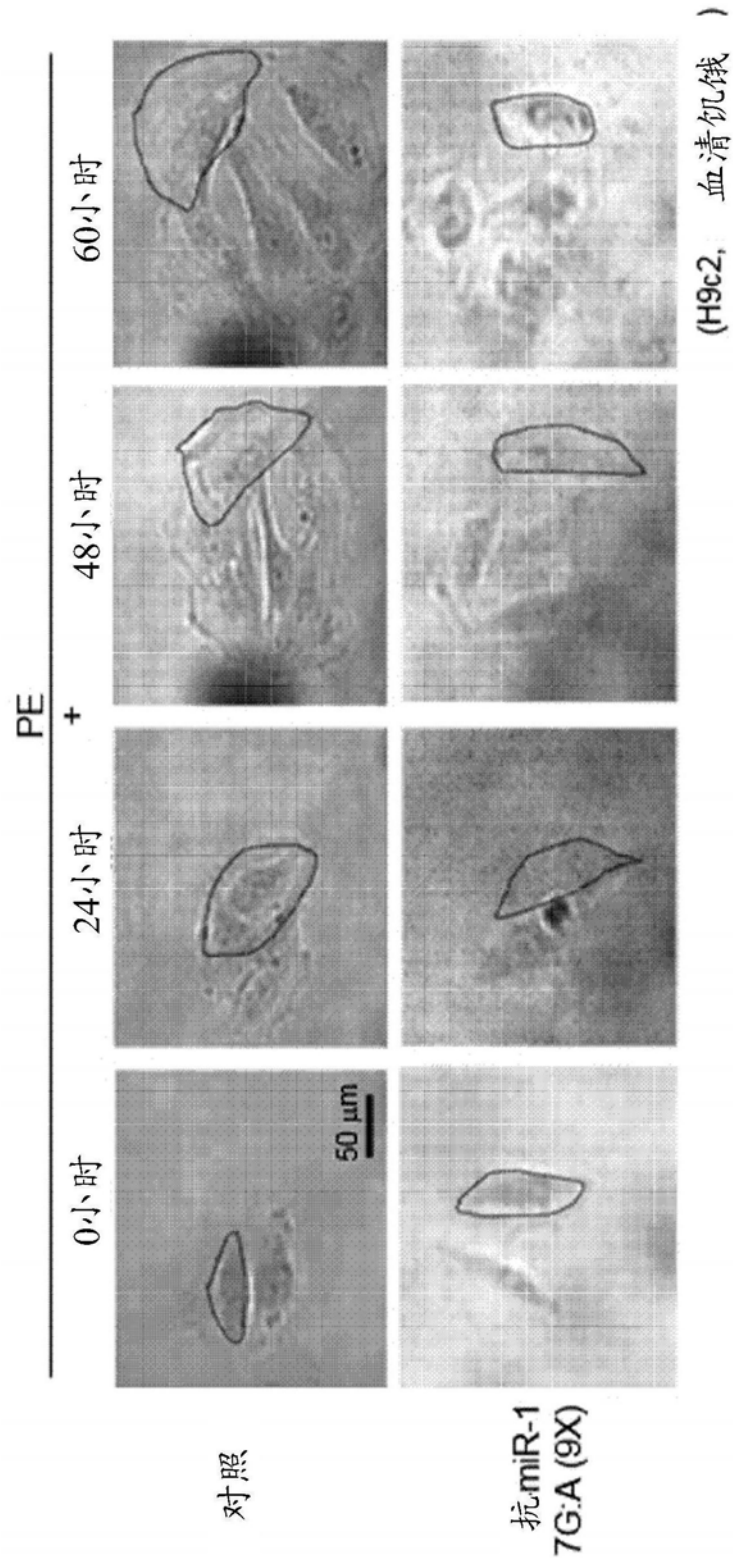


图11C



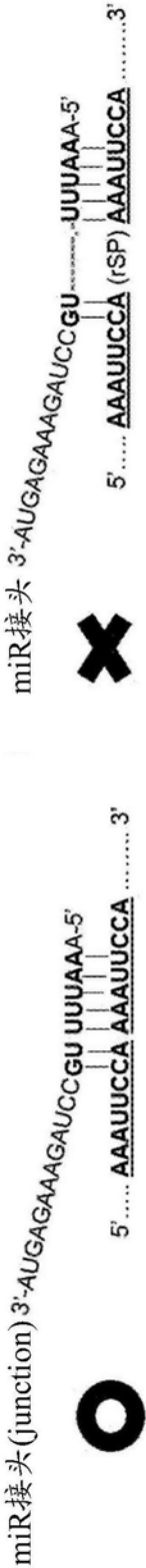


图12B

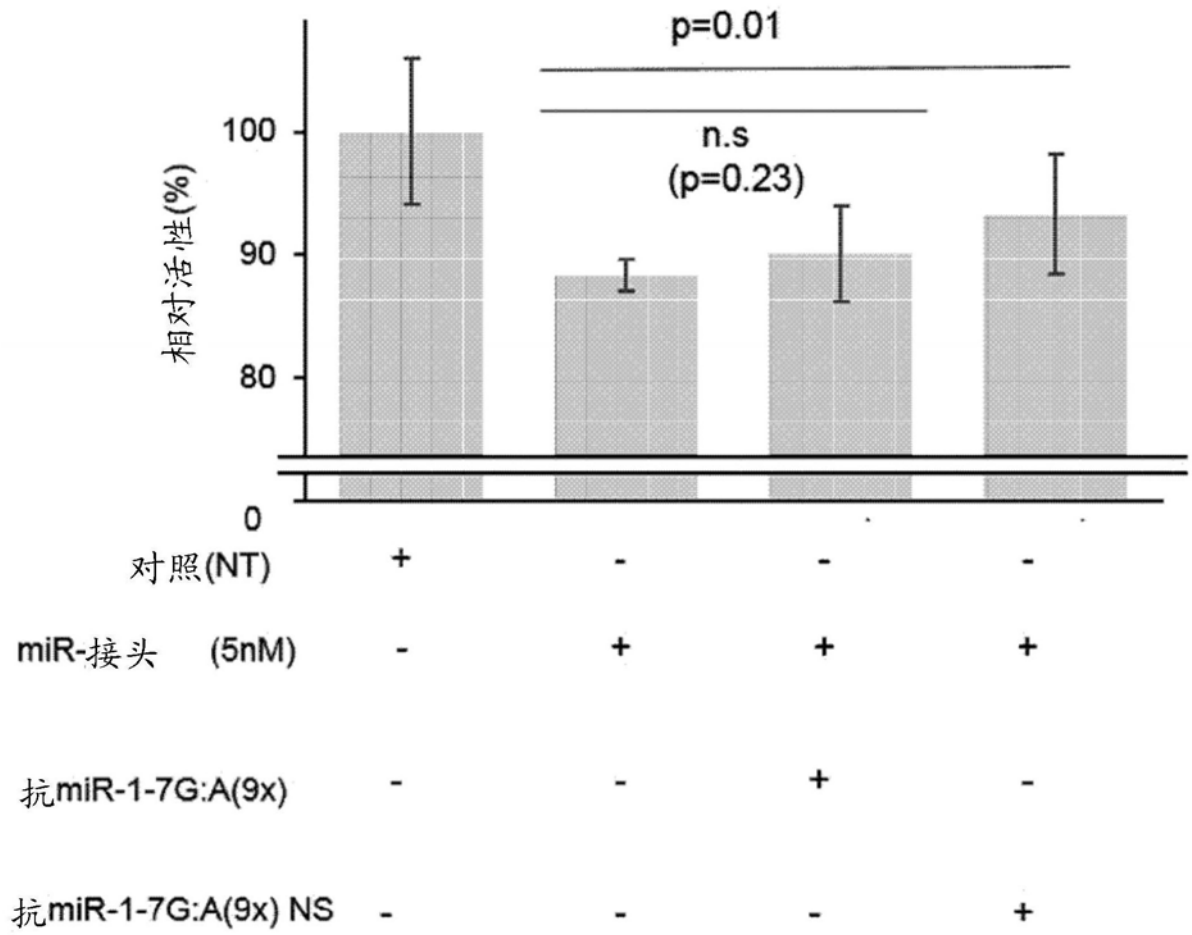


图12C