(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116744942 A
(43)申请公布日 2023.09.12

(21)申请号 202180087062.9

(22)申请日 2021.10.25

(30)优先权数据
2016863.9 2020.10.23 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.06.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/079580 2021.10.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/084561 EN 2022.04.28

(71)申请人 高士威治疗有限公司
地址 英国格拉斯哥

(72)发明人 D·S·吉尔克里斯特 N·L·米勒

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 陈艳娟 王艳波

(51)Int.Cl.
A61K 31/713(2006.01)

权利要求书2页 说明书59页
序列表2页 附图36页

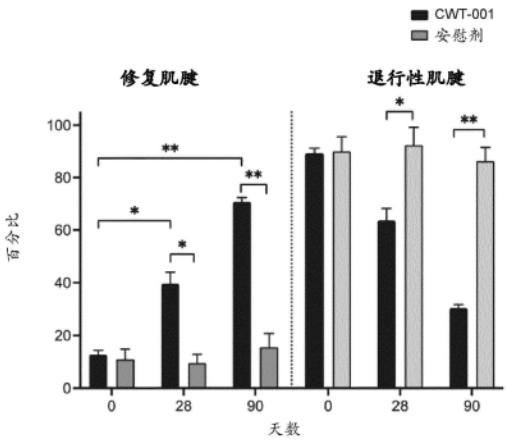
(54)发明名称

MICRORNA-29化合物、组合物及其治疗用途

(57)摘要

本发明涉及新的microRNA-29(miR-29)化合物、包含其的组合物以及它们在治疗中的用途。特别地,本文提供了miR 29化合物以及在涉及局部胶原失调的疾病诸如肌腱损伤包括肌腱病,以及组织纤维化包括佩罗尼氏病和掌肌腱膜挛缩症的治疗中特别有效和安全的组合物。还提供了miR-29化合物有利的剂量和治疗方案。

N



CN 116744942 A

1.一种miR-29化合物或其盐,包括:

(a)引导链,其包含核碱基序列5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'(SEQ ID NO:1),或在序列5'-AGCACCA-3'(SEQ ID NO:8)外的不超过三个位置处不同于SEQ ID NO:1的核碱基序列;其中至少50%的核苷包括2'-氟核糖并且其中一个或两个核苷在3'端处各自包括2'-O-甲基核糖;和

(b)乘客链,其包含核碱基序列5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3'(SEQ ID NO:2)或5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3'(SEQ ID NO:3),或其包含在不超过三个位置处不同于SEQ ID NO:2的核碱基序列;并且其中至少10个连续核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。

2.根据权利要求1所述的miR-29化合物或盐,其中一个或两个核苷在引导链的3'端处各自包括2'-O-甲基核糖并且:(i)包括2'-修饰的核糖的引导链的每个其余核苷是2'-氟核糖核苷,或(ii)引导链的每个其余核苷是2'-氟核糖核苷或未修饰的核糖部分。

3.根据权利要求1所述的miR-29化合物或盐,其中(i)引导链的每个核苷包括2'-修饰的核糖,(ii)引导链的每个核苷包括2'-O-甲基核糖或2'-氟核糖,或(iii)在引导链的3'端处的一个或两个核苷每个包括2'-O-甲基核糖并且引导链的每个其余核苷是2'-氟核糖核苷。

4.前述权利要求中任一项所述的miR-29化合物或盐,其中引导链和/或乘客链的所有核苷间键合是磷酸二酯核苷间键合。

5.前述权利要求中任一项所述的miR-29化合物或盐,其中引导链的核碱基序列是SEQ ID NO:1定义的,和/或乘客链的核碱基序列是SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3定义的。

6.前述权利要求中任一项所述的miR-29化合物或盐,其中引导链是5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3';和/或乘客链是5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'。

7.前述权利要求中任一项所述的miR-29化合物或盐,进一步包括共价附接至乘客链的3'端的胆固醇部分。

8.一种药物组合物,其包括根据前述权利要求中任一项所述的miR-29化合物或其盐,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

9.根据权利要求1-7中任一项所述的miR-29化合物或盐,或根据权利要求8所述的药物组合物,用于在治疗中使用。

10.根据权利要求1-7中任一项所述的miR-29化合物或盐,或根据权利要求8所述的药物组合物,用于在治疗肌腱损伤或组织纤维化中使用。

11.根据权利要求1-7中任一项所述的miR-29化合物或盐,或根据权利要求8所述的药物组合物,用于在治疗肌腱损伤、佩罗尼氏病或掌肌腱膜挛缩症中使用。

12.miR-29化合物或其盐,用于在治疗受试者中的肌腱损伤中使用,其中治疗包括通过向受试者的损伤的肌腱注入剂量为至少47μg的miR-29化合物或其盐的等同剂量的单一施用。

13.miR-29化合物或其盐,用于在治疗受试者中的佩罗尼氏病中使用,其中治疗包括通过向受试者的白膜的受影响区域注入剂量为至少47μg的miR-29化合物或其盐的等同剂量的单一施用。

14.miR-29化合物或其盐，用于在治疗受试者中的掌肌腱膜挛缩症中使用，其中治疗包括通过向受试者的掌筋膜的受影响区域注入剂量为至少47μg的miR-29化合物或其盐的等同剂量的单一施用。

15.根据权利要求12-14中任一项所述使用的miR-29化合物或盐，其中miR-29化合物的剂量是至少95μg、至少190μg、至少475μg、至少1420μg、至少1900μg、至少4270μg或其盐的等同剂量。

16.根据权利要求12-15中任一项所述使用的miR-29化合物或盐，其中miR-29化合物的剂量不超过4740μg或其盐的等同剂量。

17.根据权利要求12-17中任一项所述使用的miR-29化合物或盐，其中miR-29化合物或其盐以约1ml的无菌水溶液的体积施用。

18.根据权利要求12所述使用的miR-29化合物或盐，其中肌腱损伤是肌腱病。

19.根据权利要求12-18中任一项所述使用的miR-29化合物或盐，其中化合物或其盐是根据权利要求1-7中任一项定义的。

20.根据权利要求12-19中任一项所述使用的miR-29化合物或盐，其中miR-29化合物或其盐的引导链是5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'，miR-29化合物或其盐的乘客链是5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'并且包括共价附接至乘客链的3'端的胆固醇部分，以及包括胆固醇部分的重量的miR-29化合物的剂量是50μg和5000μg之间，例如200μg、500μg、1500μg或4500μg或其盐的等同剂量。

MICRORNA-29化合物、组合物及其治疗用途

技术领域

[0001] 本发明涉及新的microRNA-29(miR-29)化合物、包含其的组合物,及它们在治疗中的用途。特别地,本文提供了miR 29化合物以及在涉及局部胶原失调的疾病诸如肌腱损伤包括肌腱病,以及组织纤维化包括佩罗尼氏病和掌肌腱膜挛缩症的治疗中特别有效和安全的组合物。还提供了miR-29化合物有利的剂量和治疗方案。

[0002] 背景和概要

[0003] MicroRNA(miR)是小的非编码RNA,其与RNA诱导的沉默复合物(RISC)一起工作以减少或防止包含互补靶序列的信使RNA(mRNA)的翻译。

[0004] miR-29家族的成员已被暗示为细胞外基质(例如,胶原)的转录后调节剂。失调的胶原合成,特别是一种或多种类型的胶原的过度产生,有助于在某些疾病诸如肌腱损伤包括肌腱病以及组织纤维化包括佩罗尼氏病和掌肌腱膜挛缩症中看到的病理。

[0005] 发明人先前公开的研究(参考文献1、2、3)建立了miR-29在肌腱损伤中调节胶原产生中的关腱疾病途径。例如,在健康肌腱细胞中,miR-29(例如miR-29a,在本文中也称为miR29a)抑制胶原3(col3)过度产生,而在肌腱病中,miR-29水平降低和col3过度产生,这导致机械上较差的肌腱组织易于进一步损伤。在那些研究中,发明人表明,用miR-29a化合物体外转染肌腱细胞显著降低了col3表达,而col1的水平,即肌腱中胶原的理想和生物力学上优异形式仍然很大程度上不受影响。本发明人还证明了,由于替代的多聚腺苷酸化位点的利用,肌腱细胞中大多数col1转录物缺乏miR-29的结合位点,而肌腱细胞中大多数col3转录物保留了miR-29结合位点。因此,肌腱细胞中的Col1转录物对miR-29介导的下调不敏感,而miR-29能够特异性地抑制那些细胞中的col3。这在肌腱损伤的体内模型中被证实,其中显示miR-29a化合物递送至小鼠损伤的肌腱(参考文献1、2)或马(参考文献3)导致col3合成的减少,同时维持col1水平。先前的研究已经表明,在成纤维细胞中,miR-29不仅抑制了col3的表达,而且抑制了其它类型的胶原包括col1的表达(例如,参考文献4)。

[0006] 本发明提供了改进的miR-29化合物,其在治疗中特别有效和安全。这些化合物可用于治疗需要增加的miR-29(例如miR-29a)活性的任何病况。这涵盖涉及局部胶原失调,并且需要减少或抑制一种或多种类型的胶原(诸如胶原3)的表达的病况,包括但不限于肌腱损伤,包括肌腱病(例如,外上髁炎,也称为网球肘)以及组织纤维化诸如佩罗尼氏病和掌肌腱膜挛缩症。本文所述的化合物模拟天然miR-29的活性,同时某些化学修饰提供改善的药理性质,诸如增加的活性、稳定性和细胞摄取,又不引起免疫原性问题。本文所述的化合物和组合物的进一步优点是它们在简单水性载体中是稳定的,并且可以直接施用于患病(afflicted)位点,而不需要重构或稀释。

[0007] 本文还提供了miR-29化合物在治疗疾病诸如肌腱损伤包括肌腱病和组织纤维化诸如佩罗尼氏病和掌肌腱膜挛缩症中特别有利的剂量和治疗方案。发明人已经表明,例如在肌腱病的小鼠模型中通过局部(肌腱内)注入施用miR-29化合物至损伤的肌腱改善肌腱愈合和肌腱纤维质量。令人惊讶的是,仅单一施用(即单剂量)就能达到治疗功效。提供了适合于治疗(例如,人治疗)的剂量。数据也可用来支持miR-29化合物在组织纤维化诸如掌肌

腱膜挛缩症和佩罗尼氏病中的治疗功效。miR-29化合物可以在简单水性载体中在病理学位点处(病灶内)局部施用。本文提供的数据表明,在局部病灶内施用后,存在可忽略的全身暴露或分布到其它组织中,从而提供特别安全的治疗。此外,因为单剂量可以是治疗有效的,所以仅需要保健专业人员随访一次,从而实现简单、成本有效的和快速有效的治疗。

[0008] 本发明的公开

[0009] 在一个方面,本发明提供了miR-29化合物、包含其的组合物以及它们在治疗中的用途。本发明因此提供了miR-29化合物或其盐,其包括引导(反义)链和乘客链(正义)链,其模拟天然miR-29a的生物活性,例如下调胶原3表达。本发明的化合物因此能够减少或抑制胶原3表达。由于各种miR-29家族成员(miR-29a、miR-29b-1、miR-29b-2和miR-29c)之间的生物活性重叠,本文提供的miR-29化合物也可模拟其他miR-29家族成员的生物活性。miR-29化合物因此也可称为miR-29模拟物或miR-29模拟化合物。

[0010] miR-29化合物的引导链和乘客链是寡核苷酸,即它们包含通过核苷间键合连接的核苷。引导链和乘客链形成双链体,典型地在至少一条链中包含许多错配和悬垂。本文描述的miR-29化合物典型地是化学修饰的,其意指至少一种糖、核苷间键合或核碱基具有不同于天然存在的miR-29中的结构的化学结构。也可以选择化学修饰以改善miR-29化合物的药理性质,例如,通过增强它的活性和/或稳定性。示例性修饰的糖是2'-氟核糖、2'-O-甲基核糖或2'-脱氧核糖。示例性修饰的核苷间键合是硫代磷酸核苷间键合。示例性修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。miR-29化合物也可以典型地在乘客链的3'端处缀合(即共价连接)至亲脂性部分诸如胆固醇部分。此类至亲脂性部分的缀合可改善miR-29化合物用于体内用途的性质,例如,通过改善它的细胞摄取。

[0011] 在一个实施方式中,本发明因此提供了miR-29化合物或其盐,其包括:

[0012] (a)引导链,其包含在序列5'-AGCACCA-3'(SEQ ID NO:8,其是种子序列)外的不超过五个(或不超过四个、三个、两个或一个)位置处,以及任选地在种子序列内的不超过三个(或不超过两个或一个)位置处不同于5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'(SEQ ID NO:1)的核碱基序列;其中至少一个核苷包括2'-氟核糖并且任选地其中至少一个核苷包括2'-O-甲基核糖;和

[0013] (b)乘客链,其包含在不超过五个(或不超过四个、三个、两个或一个;例如在不超过三个)位置处不同于5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3'(SEQ ID NO:2)的核碱基序列;以及其中至少一个核苷包括2'-O-甲基核糖并且至少一个核苷包括未修饰的核糖。

[0014] 如果在相应位置存在不同的、另外的或缺失的核碱基,核碱基序列与另外的核碱基序列不同。在不超过一定数量的位置处与另外的核碱基序列不同的核碱基序列还涵盖在零位置处不同的核碱基序列,即,核碱基序列可以是相同的。

[0015] 因此引导链的核碱基序列可以在天然miR-29a的种子序列(AGCACCA,SEQ ID NO:8)外,在不超过五个位置处,例如,在不超过四个位置处、不超过三个位置处、不超过两个位置处或在不超过一个位置处,优选地在不超过三个位置处不同于天然miR-29a的核碱基序列(SEQ ID NO:1)。在一个实施方式中,种子序列外的引导链的核碱基序列与SEQ ID NO:1中相应的位置相同。另外的或可选的,miR-29化合物的引导链的种子序列可在不超过三个位置处,例如,在不超过两个位置处或在不超过一个位置处不同于天然miR-29a的种子序列(AGCACCA,SEQ ID NO:8)。在优选的实施方式中,种子序列与SEQ ID NO:8相同。

[0016] 乘客链的核碱基序列可在不超过五个位置处，例如在不超过四个位置处不同于5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3’(SEQ ID NO:2)。在优选的实施方式中，乘客链的核碱基序列在不超过三个位置处不同于SEQ ID NO:2。在其他实施方式中，乘客链的核碱基序列在不超过两个位置处不同于SEQ ID NO:2。在具体实施方式中，乘客链的核碱基序列在不超过一个位置处不同于SEQ ID NO:2。这意指乘客链的核碱基序列具有SEQ ID NO:2的序列或相对于SEQ ID NO:2具有一个不同的、另外的或缺失的核碱基的序列。SEQ ID NO:3相对于SEQ ID NO:2具有一个缺失的核碱基。

[0017] 因为SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3仅在一个位置不同，本文还提供了如上其中乘客链在不超过五个等位置不同于SEQ ID NO:3的实施方式。

[0018] 在某些实施方式中，乘客链包括在以上SEQ ID NO:2中加下划线的序列5’-UUU-3’和/或5’-UUCA-3’(其对应于SEQ ID NO:2的位置10-12和18-21)外在不超过五个(例如，不超过四个、三个、两个或一个；诸如不超过三个)位置处不同于5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3’(SEQ ID NO:2)的核碱基序列。在某些实施方式中，乘客链的核碱基序列仅在序列5’-UUU-3’和5’-UUCA-3’外不同于SEQ ID NO:2。例如，乘客链的核碱基序列可在序列5’-UUU-3’和5’-UUCA-3’外在不超过两个位置处不同于SEQ ID NO:2。在具体实施方式中，乘客链的核碱基序列可在序列5’-UUU-3’和5’-UUCA-3’外在不超过一个或两个位置处，例如在不超过一个位置处不同于SEQ ID NO:2。在具体实施方式中，此类乘客链与如本文描述的氟化的引导链(例如，包括一个或多个2’-氟核糖核苷，诸如其中至少50％的核苷是2’-氟核糖核苷，或其中除了一个或两个2’-O-甲基核糖核苷外所有核苷优选地位于3’端处是2’-氟核糖核苷)组合。

[0019] 在一个实施方式中，引导链具有包括SEQ ID NO:1核碱基序列的至少7个连续核碱基的核碱基序列。例如，引导链可具有包括SEQ ID NO:1核碱基序列的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至少21个连续核碱基的核碱基序列。在一个实施方式中，引导链具有包括SEQ ID NO:1核碱基序列的至少18个连续核碱基的核碱基序列。

[0020] 在相同或其它实施方式中，乘客链可具有包括SEQ ID NO:2核碱基序列的至少7个连续核碱基的核碱基序列。例如，乘客链可具有包括SEQ ID NO:2核碱基序列至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至少21个连续核碱基的核碱基序列。在一个实施方式中，乘客链具有包括SEQ ID NO:2核碱基序列的至少18个连续核碱基的核碱基序列。

[0021] 在一个实施方式中，引导链包括在SEQ ID NO:1的整个长度上至少85％相同的核碱基序列。例如，引导链可包括在SEQ ID NO:1的整个长度上至少90％、95％、96％、97％、98％、至少99％或100％相同的核碱基序列。在某些实施方式中，引导链具有如前述句子定义的核碱基序列，并且它在对应于SEQ ID NO:1的位置2-8的位置处包括序列5’-AGCACCA-3’(SEQ ID NO:8)。在那些实施方式中，引导链的核碱基序列可仅在SEQ ID NO:1的位置2-8外不同于SEQ ID NO:1。不同可通过如上所述的同一性百分比或通过相同/不同核碱基的数量来定义。

[0022] 在相同或其它实施方式中，乘客链可包括在SEQ ID NO:2或3的整个长度上至少85％相同的核碱基序列。例如，乘客链可包括在SEQ ID NO:2或3的整个长度上至少90％、95％、96％、97％、98％、至少99％或100％相同的核碱基序列。在某些实施方式中，乘客链具有如前述句子定义的核碱基序列，并且它在对应于SEQ ID NO:2的位置10-12和18-21的位

置处包括序列5’-UUU-3’和/或5’-UUCA-3’。在那些实施方式中，乘客链的核碱基序列可仅在SEQ ID NO:2的位置10-12和/或18-21外不同于SEQ ID NO:2。在具体实施方式中，乘客链的核碱基序列可仅在SEQ ID NO:2的位置10-12和18-21外不同于SEQ ID NO:2。不同可通过如上所述的同一性百分比或通过相同/不同核碱基的数量来定义。在具体实施方式中，此类乘客链与如本文描述的氟化的引导链(例如，包括一个或多个2’-氟核糖核苷，诸如其中至少50％的核苷是2’-氟核糖核苷，或其中除了一个或两个2’-O-甲基核糖核苷外的所有核苷(优选地位于3’端处)是2’-氟核糖核苷)组合。

[0023] 在进一步的实施方式中，引导链和/或乘客链可由如上指出的核碱基序列组成。在具体实施方式中，引导链包括核碱基序列5’-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3’(SEQ ID NO:1)或由核碱基序列5’-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3’(SEQ ID NO:1)组成，和/或乘客链包括核碱基序列5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3’(SEQ ID NO:2)或5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3’(SEQ ID NO:3)或由核碱基序列5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3’(SEQ ID NO:2)或5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3’(SEQ ID NO:3)组成。在具体实施方式中，引导链包括5’-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3’(SEQ ID NO:1)或由核碱基序列5’-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3’(SEQ ID NO:1)组成，和/或乘客链包括核碱基序列5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3’(SEQ ID NO:3)或由核碱基序列5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3’(SEQ ID NO:3)组成。在具体实施方式中，引导链包括核碱基序列5’-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3’(SEQ ID NO:1)，以及乘客链包括核碱基序列5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3’(SEQ ID NO:3)。在具体实施方式中，引导链由核碱基序列5’-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3’(SEQ ID NO:1)组成，以及乘客链由核碱基序列5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3’(SEQ ID NO:3)组成。在这些实施方式的任一个中，术语“由……组成”不排除附接至引导链或乘客链的其它(非核苷)部分的存在，例如，乘客链可例如经由接头典型地在乘客链的3’端处连接至亲脂性部分诸如胆固醇部分。

[0024] 在某些实施方式中，在乘客链的3’端处的核碱基是A或G。在某些实施方式中，在乘客链的3’端处的核碱基是A。

[0025] 在本文描述的实施方式的任一个中，引导链的至少或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个核苷可包括2’-氟核糖。例如，引导链的至少或约11、12、13、14、15、16、17、18或19个核苷是2’-氟核糖核苷。在某些实施方式中，引导链的不超过20个或不超过21个核苷是2’-氟核糖核苷。

[0026] 在本文描述的实施方式的任一个中，引导链的核苷的至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、91％、92％、93％、94％或至少95％包括2’-氟核糖。在一些实施方式中，引导链的至少一个核苷包含糖(其可以是修饰的糖)而非2’-氟核糖。在具体实施方式中，引导链的核苷的至少50％(或至少60％、70％、80％、90％、91％、92％、93％、94％或至少95％)包括2’-氟核糖，并且引导链的至少一个核苷包括2’-O-甲基核糖。在另外的具体实施方式中，引导链的核苷的至少50％(或至少60％、70％、80％、90％、91％、92％、93％、94％或至少95％)包括2’-氟核糖，并且引导链的至少两个核苷包括2’-O-甲基核糖。例如，引导链的一个或两个核苷可包括2’-O-甲基核糖。包括2’-O-甲基核糖的引导链的核苷可位于引导链的3’端处。

[0027] 在一个实施方式中，引导链的核苷的至少50％、60％、70％、80％或90％是2’-氟核

糖核苷,和/或引导链的核苷的不超过91%或不超过95%是2'-氟核糖核苷。例如,引导链的核苷的至少50%和不超过91%是2'-氟核糖核苷。

[0028] 在一个实施方式中,乘客链的核苷包括2'-O-甲基核糖和未修饰的核糖替代物。例如,乘客链中至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或至少20个连续核苷可交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。因此乘客链中可以有至少10个连续核苷,所述核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。乘客链中可以有至少12个连续核苷,所述核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。乘客链中可以有至少14个连续核苷,所述核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。乘客链中可以有至少16个连续核苷,所述核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。在优选的实施方式中,乘客链中有至少18个连续核苷,所述核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。乘客链的一个或多个核苷可包括脱氧核糖。此类核苷可位于乘客链的3'端处。

[0029] 在一个实施方式中,乘客链的至少5、6、7、8或9个核苷是2'-O-甲基核糖核苷,和/或乘客链的不超过10个核苷是2'-O-甲基核糖核苷。

[0030] 在一个实施方式中,乘客链的核苷的至少10%、20%、30%、40%或45%是2'-O-甲基核糖核苷酸,和/或乘客链的寡核苷酸的不超过50%是2'-O-甲基核糖核苷酸。

[0031] 本发明因此提供了miR-29化合物或其盐,其包括如在本文实施方式的任一个中描述的引导链以及如在本文实施方式的任一个中描述的乘客链。

[0032] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了miR-29化合物或其盐,其包括:

[0033] (a)引导链,其包含核碱基序列5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'(SEQ ID NO:1),或在序列5'-AGCACCA-3'(SEQ ID NO:8)外的不超过五个位置处以及任选地在该序列内的不超过三个位置处不同于SEQ ID NO:1的核碱基序列;其中至少50%的核苷包括2'-氟核糖并且其中一个或两个核苷优选地在3'端处各自包括2'-O-甲基核糖;和

[0034] (b)乘客链,其包含核碱基序列5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3'(SEQ ID NO:2)或5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3'(SEQ ID NO:3),或包含在不超过三个位置处不同于SEQ ID NO:2的核碱基序列;并且其中至少10个连续核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。

[0035] 在具体实施方式中,本发明提供了miR-29化合物或其盐,其包括:

[0036] (a)引导链,其包含核碱基序列5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'(SEQ ID NO:1),或在序列5'-AGCACCA-3'(SEQ-ID NO:8)外的不超过三个位置处不同于SEQ ID NO:1的核碱基序列;其中至少50%的核苷包括2'氟核糖并且其中一个或两个核苷在3'端处各自包括2'-O-甲基核糖;和

[0037] (b)乘客链,其包含核碱基序列5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3'(SEQ ID NO:2)或5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3'(SEQ ID NO:3),或包含在不超过三个位置处不同于SEQ ID NO:2的核碱基序列;并且其中至少10个连续核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。

[0038] 根据该实施方式的示例性化合物是Teno15、Teno18、Teno19、Teno20、Teno29、Teno32、Teno33和Teno34,其在以下实例中描述。

[0039] 如上所指出的,乘客链中至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或至少20个连续

核苷可交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。例如,乘客链中的至少12个连续核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。例如,乘客链中至少14个连续核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。例如,乘客链中至少16个连续核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。在某些实施方式中,乘客链中至少18个连续核苷交替地是2'-O-甲基核糖核苷和具有未修饰的核糖部分的核苷。

[0040] 优选地,各自包括2'-O-甲基核糖的乘客链中的至少一个或两个核苷位于乘客链的3'端处。然而,这不是必需的。

[0041] 在某些实施方式中,在引导链的3'端处的一个或两个核苷可各自包括2'-O-甲基核糖和(i)包括2'-修饰的核糖的引导链的每个其余核苷是2'-氟核糖核苷,或(ii)引导链的每个其余核苷是2'-氟核糖核苷或未修饰的核糖部分。

[0042] 在某些实施方式中,(i)引导链的每个核苷包括2'-修饰的核糖,(ii)引导链的每个核苷包括2'-O-甲基核糖或2'-氟核糖,或(iii)在引导链的3'端处的一个或两个核苷各自包括2'-O-甲基核糖并且引导链的每个其余核苷是2'-氟核糖核苷。

[0043] 在某些实施方式中,引导链和/或乘客链的核苷间键合都不被化学修饰。因此,在某些实施方式中,引导链和/或乘客链的所有核苷间键合是磷酸二酯核苷间键合。

[0044] 在某些实施方式中,引导链和/或乘客链的核碱基都不被化学修饰的。例如,在某些实施方式中,引导链和/或乘客链的核碱基都不包含5-甲基胞嘧啶。

[0045] 在某些实施方式中,引导链的核碱基序列是如SEQ ID NO:1定义的,和/或乘客链的核碱基序列是如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3定义的。

[0046] 在某些实施方式中,引导链的核碱基序列是如SEQ ID NO:1定义的,和/或乘客链的核碱基序列是如SEQ ID NO:3定义的。

[0047] 在某些实施方式中,引导链是5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3';并且乘客链是5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3';其中在核苷前的'f'=2'-脱氧-氟核糖核苷(-F);在核苷前的'm'=2'-O-甲基核糖核苷(-O-Me);在核苷前的'r'=具有未修饰的核糖部分的核苷(-OH);在核苷前的'd'=2'-脱氧核糖核苷(-H)。根据该实施方式的示例性化合物是Teno18,其在以下实例中描述。

[0048] 在某些实施方式中,引导链是5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3';并且乘客链是5'-mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG-3';其中在核苷前的'f'=2'-脱氧-氟核糖核苷(-F);在核苷前的'm'=2'-O-甲基核糖核苷(-O-Me);在核苷前的'r'=具有未修饰的核糖部分的核苷(-OH)。根据该实施方式的示例性化合物是Teno20,其在以下实例中描述。

[0049] 在某些实施方式中,引导链是5'-fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA-3';并且乘客链是5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAdG-3';其中在核苷前的'f'=2'-脱氧-氟核糖核苷(-F);在核苷前的'm'=2'-O-甲基核糖核苷(-O-Me);在核苷前的'r'=具有未修饰的核糖部分的核苷(-OH);在核苷前的'd'=2'-脱氧核糖核苷(-H)。根据该实施方式的示例性化合物是Teno33,其在以下实例中描述。

[0050] 在本文描述的实施方式的任一个中,miR-29化合物或其盐可进一步包括共价附接至乘客链的3'端的胆固醇部分。胆固醇部分可以是三甘醇胆固醇部分。示例性胆固醇部分

是3’磷酸丙-2-醇(3’phosphopropy-2-ol)、2,2’-[乙烷-1,2-二基双(氧)]二(乙-1-醇)(2,2’-[Ethane-1,2-diylbis(oxy)]di(ethan-1-ol))、10-O-[1-丙基-3-N-氨基甲酰胆甾醇基](10-O-[1-propyl-3-N-carbamoylcholesteryl])。

[0051] 在示例性实施方式中,引导链是5’-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3’;并且乘客链是5’-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdAchol-3’;其中在核苷前的‘f’=2’-脱氧-氟核糖核苷(-F);在核苷前的‘m’=2’-O-甲基核糖核苷(-O-Me);在核苷前的‘r’=具有未修饰的核糖部分的核苷(-OH);在核苷前的‘d’=2’-脱氧核糖核苷(-H);chol表示胆固醇部分。根据该实施方式的示例性化合物是胆固醇-缀合的Teno18(CWT-001),其在以下实例中描述。

[0052] 在这些实施方式的任一个中,在引导链5’端处核苷的糖的5’位置处可以有磷酸基(‘5’Phos’)。

[0053] 因此,在一个实施方式中,引导链是5’-PhosfUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3’;并且乘客链是5’-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3’;其中引导链和乘客链的所有核苷间键合是磷酸二酯核苷间键合。根据该实施方式的示例性化合物是Teno18,其在以下实例中描述。

[0054] 在另外的实施方式,引导链是5’-PhosfUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3’;并且乘客链是5’-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdAchol-3’;其中chol是胆固醇部分,例如三甘醇胆固醇部分;并且其中引导链和乘客链的所有核苷间键合是磷酸二酯核苷间键合。根据该实施方式的示例性化合物是胆固醇-缀合的Teno18(CWT-001),其在以下实例中描述。

[0055] 本发明还提供了药物组合物,其包括如本文描述的miR-29化合物或其盐。药物组合物典型地包括药学上可接受的载体或稀释剂。在某些实施方式中,药学上可接受的载体或稀释剂是无菌溶液。药学上可接受的载体或稀释剂是肠胃外可接受的水溶液。例如,药学上可接受的载体或稀释剂可以是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。药学上可接受的载体或稀释剂可例如以0.001%-0.005%(如0.003%(100μM))的终浓度包括另外的物质,例如EDTA。在某些实施方式中,药物组合物不包括非液体载体,例如miR-29化合物或其盐不包含在固体载体诸如可移植支架中或在固体载体诸如可移植支架中施用或与固体载体诸如可移植支架一起施用。

[0056] 本发明进一步提供了包含如本文所述的miR-29化合物或其盐的容器。miR-29化合物或其盐典型地以治疗有效量提供。治疗有效量是当施用至受试者时,减少或抑制胶原3,并且典型地导致疾病症状的改善,例如减少的疼痛或障碍、改善的功能性和/或减缓的疾病进展的miR-29化合物或其盐的量。容器典型地包括固定到容器的标签。容器可以是含有本文所述的药物组合物的玻璃小瓶(例如,单次使用玻璃小瓶)。容器可以是注射器(syringe)或注入器(injector)。

[0057] 本发明还提供了本文所述的miR-29化合物或其盐或药物组合物,用于治疗用途。

[0058] 因此,本文还提供了如本文所述的miR-29或其盐或药物组合物用于制备药物的用途。

[0059] 还提供了一种治疗疾病或病况的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所述的miR-29化合物或其盐或药物组合物。

[0060] 术语“治疗/疗法(therapy)”、“药物”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”等等包括治疗以及预防方法。

[0061] 因此,在优选的实施方式中,本文提供了miR-29化合物或其盐用于治疗用途,例如包括通过注入miR-29化合物或其盐的病灶内施用(例如,单个病灶内施用),其中miR-29化合物或其盐包括引导链5’-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3’和乘客链5’-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3’,任选地其中亲脂性(例如,胆固醇)部分共价附接至乘客链的3’端。

[0062] 在某些实施方式中,治疗用于胶原失调,特别是胶原过度产生,例如胶原3过度产生。术语"过度产生"是指相对于相应健康组织增加的胶原产生。过度产生典型地是局部的。例如,肌腱损伤诸如肌腱病涉及局部胶原3过度产生。纤维化病况诸如佩罗尼氏病或掌肌腱膜挛缩症也涉及局部胶原3过度产生。因此,在一个实施方式中,本文所述的miR-29化合物或其盐或药物组合物用于治疗肌腱损伤诸如肌腱病,或组织纤维化诸如佩罗尼氏病或掌肌腱膜挛缩症。在一个实施方式中,本文所述的miR-29化合物或其盐或药物组合物用于治疗肌腱损伤。肌腱损伤可以是肌腱病。肌腱损伤可以是慢性肌腱病。肌腱损伤可以是外上髁炎。

[0063] 受试者典型地是人。然而,另外优选的受试者是马,特别是已被饲养用于马上运动的马。

[0064] 在另外的方面,本发明提供了miR-29化合物、其盐以及包含其的药物组合物的剂量和治疗方案。本文提供的剂量和治疗方案适用于miR-29化合物的范围,即,本文的剂量和治疗方案公开内容的适用性包括但不限于本文提供的新的miR-29化合物。然而,剂量和治疗方案优选地涉及新的miR-29化合物,因为发明人已经发现该剂量和治疗方案特别适用于这些化合物。

[0065] 以本文公开的剂量和治疗方案使用的miR-29化合物可以是如上所述化学修饰的。这意味着再次如上所述,至少一种糖、核苷间键合或核碱基具有与天然存在的miR-29中的化学结构不同的化学结构。在某些实施方式中,miR-29化合物或其盐包含修饰的糖,但不包含修饰的核苷间键合或修饰的核碱基(miR-29化合物或其盐不包含修饰的核苷间键合且它不包含修饰的核碱基)。例如,引导链和/或乘客链的所有核苷间键合都可以是磷酸二酯核苷间键合。miR-29化合物也可以典型地在乘客链的3’端处缀合(即,共价连接)至亲脂性部分诸如胆固醇部分。miR-29化合物或其盐可以是本文所述的具体化合物或盐中的任一种,或者它可以是不同的miR-29化合物或其盐。

[0066] 在该方面的一个实施方式中,本发明因此提供了miR-29化合物或其盐用于治疗的用途,其包括通过注入一剂量的miR-29化合物或其盐的单个病灶内施用。如以上和以下所述,还提供了相应的用于制备药物的用途,以及相应的治疗方法。

[0067] 在某些实施方式中,治疗包括通过注入miR-29化合物或其盐的不超过两个或不超过三个病灶内施用。在其它实施方式中,治疗包括通过注入miR-29化合物或其盐的单个病灶内施用。

[0068] 治疗可用于肌腱损伤(例如,肌腱病),并且施用进入肌腱的损伤区域(肌腱内(intra-tendon)或腱内(intratendinous))。

[0069] 治疗可用于佩罗尼氏病,并且施用进入受试者白膜的受影响区域中。

[0070] 治疗可用于掌肌腱膜挛缩症，并且施用进入受试者掌筋膜的受影响区域中。

[0071] 在这些实施方式的任一个中，miR-29化合物的单剂量可以在miR-29化合物的10μg和5000μg之间，或其盐的等同剂量。如以下进一步详细解释的，除非另有说明，否则剂量是指作为游离酸的引导链和乘客链的寡核苷酸部分的重量(即，排除任何缀合基团诸如胆固醇部分)。

[0072] 单剂量因此可以在miR-29化合物的10μg和4500μg之间、10μg和4000μg之间、10μg和3500μg之间、10μg和3000μg之间、或在10μg和2500μg之间，或其盐的等同剂量。

[0073] 单剂量可以在miR-29化合物的47μg和4740μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的47μg和4270μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的47μg和1900μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的47μg和1420μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的47μg和475μg之间，或其盐的等同剂量。

[0074] 单剂量可以在miR-29化合物的95μg和4740μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的95μg和4270μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的95μg和1900μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的95μg和1420μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的95μg和475μg之间，或其盐的等同剂量。

[0075] 单剂量可以在miR-29化合物的190μg和4740μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的190μg和4270μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的190μg和1900μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的190μg和1420μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的190μg和475μg之间，或其盐的等同剂量。

[0076] 单剂量可以在miR-29化合物的475μg和4740μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的475μg和4270μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的475μg和1900μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的475μg和1420μg之间，或其盐的等同剂量。

[0077] 单剂量可以在miR-29化合物的1420μg和4740μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的1420μg和4270μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以在miR-29化合物的1420μg和1900μg之间，或其盐的等同剂量。

[0078] 在某些实施方式中，单剂量在miR-29化合物的190μg和1420μg之间，或其盐的等同剂量。单剂量可以是约190μg、475μg、1420μg或4270μg的miR-29化合物，或是其盐的等同剂量。例如，单剂量可以是约190μg、475μg或1420μg的miR-29化合物，或是其盐的等同剂量。这意味着单剂量可以是约190μg的miR-29化合物，或是其盐的等同剂量。单剂量可以是约475μg的miR-29化合物，或是其盐的等同剂量。单剂量可以是约或1420μg的miR-29化合物，或是其盐的等同剂量。

[0079] 在优选的实施方式中，单剂量在约190μg和约475μg的miR-29化合物之间，或其盐的等同剂量。例如，单剂量可以是约190μg的miR-29化合物，或是其盐的等同剂量。单剂量还可以是约475μg的miR-29化合物，或是其盐的等同剂量。在优选的实施方式中，单剂量是约190μg的miR-29化合物，或是其盐的等同剂量。

[0080] 因此，在一个实施方式中，本发明提供了miR-29化合物或其盐用于治疗受试者的肌腱损伤的用途，其中治疗包括通过向受试者损伤的肌腱中注入剂量为至少47μg的miR-29化合物或其盐的等同剂量的单一施用。

[0081] 在另外的实施方式，本发明提供了miR-29化合物或其盐用于治疗受试者的佩罗尼氏病的用途，其中治疗包括通过向受试者白膜的受影响区域中注入剂量为至少47μg的miR-29化合物或其盐的等同剂量的单一施用。

[0082] 在进一步的实施方式中，本发明提供了miR-29化合物或其盐用于治疗受试者的掌肌腱膜挛缩症的用途，其中治疗包括通过向受试者掌筋膜的受影响区域中注入剂量为至少47μg的miR-29化合物或其盐的等同剂量的单一施用。

[0083] 在某些实施方式中，单剂量的miR-29化合物是至少95μg、至少190μg、至少475μg、至少1420μg、至少1900μg、至少4270μg、或其盐的等同剂量。

[0084] 例如，单剂量miR-29化合物可以是至少95μg(或至少190μg、至少475μg、至少1420μg、至少1900μg、至少4270μg)和不超过4740μg的miR-29化合物，或其盐的等同剂量。因此单剂量可以在以上所述的某个范围内。

[0085] 更一般地，单剂量的miR-29化合物可以是至少或约10μg、15μg、20μg、25μg、30μg、35μg、40μg、45μg、47μg、50μg、55μg、60μg、75μg、80μg、95μg、100μg、110μg、120μg、130μg、140μg、150μg、160μg、170μg、180μg、190μg、200μg、220μg、240μg、260μg、280μg、300μg、320μg、340μg、350μg、360μg、380μg、400μg、420μg、440μg、460μg、470μg、475μg、480μg、500μg、550μg、600μg、650μg、700μg、750μg、800μg、850μg、900μg、950μg、1000μg、1100μg、1200μg、1300μg、1400μg、1420μg、1500μg、1600μg、1700μg、1800μg、1900μg或2000μg的miR-29化合物，或其盐的等同剂量。在某些实施方式中，更高的剂量可以以诸如在4000μg和4500μg之间，例如4270μg使用。

[0086] 在可以与本文描述的其它实施方式组合的某些实施方式中，单剂量的miR-29化合物不超过190μg、200μg、220μg、240μg、260μg、280μg、300μg、320μg、340μg、350μg、360μg、380μg、400μg、420μg、440μg、460μg、470μg、475μg、480μg、500μg、550μg、600μg、650μg、700μg、750μg、800μg、850μg、900μg、950μg、1000μg、1100μg、1200μg、1300μg、1400μg、1420μg、1500μg、1600μg、1700μg、1800μg、1900μg、2000μg、2200μg、2400μg、2600μg、2800μg、3000μg、3200μg、3400μg、3600μg、3800μg、4000μg、4200μg、4270μg、4400μg、4600μg、4740μg、4800μg或5000μg的miR-29化合物，或其盐的等同剂量。在具体实施方式中，单剂量的miR-29化合物不超过190μg，或其盐的等同剂量。在具体实施方式中，单剂量的miR-29化合物不超过475μg，或其盐的等同剂量。在具体实施方式中，单剂量的miR-29化合物不超过1420μg，或其盐的等同剂量。在具体实施方式中，单剂量的miR-29化合物不超过1900μg，或其盐的等同剂量。在具体实施方式中，单剂量的miR-29化合物不超过4270μg，或其盐的等同剂量。

[0087] 在治疗肌腱损伤的情况中，肌腱损伤可以是肌腱病。肌腱损伤可以是慢性肌腱病。肌腱损伤可以是外上髁炎、内上髁炎、肩旋转肌袖病变、伸肌端肌腱病、屈肌端肌腱病、臀肌肌腱病(大转子疼痛综合征，GTPS)、髌肌腱病、跳跃膝、足底筋膜炎、跟腱病、腓侧肌腱病、冈上综合征或其组合。在一个实施方式中，肌腱损伤是上肢肌腱病(包括外上髁炎、高尔夫球肘、肩旋转肌袖病变和奎尔万氏病)。在特定的实施方式中，肌腱损伤是外上髁炎。

[0088] 受试者典型地是人。然而，另外优选的受试者是马，特别是已被饲养用于马上运动

的马。

[0089] 在某些实施方式中，miR-29化合物或其盐以0.5ml-5ml，例如0.5ml-1.5ml(诸如0.8ml-1.2ml(如0.9ml-1.1ml))的体积施用。例如，体积可以是约0.5ml、0.75ml、1ml、1.25ml、1.5ml、1.75ml、2ml、2.5ml、3ml、3.5ml、4ml、4.5ml或约5ml。在具体实施方式中，体积是约1ml。例如，在一个实施方式中，miR-29化合物或其盐以约1ml无菌水溶液的体积施用。

[0090] miR-29化合物或其盐可以以对应于以上指出的任何剂量的浓度施用。例如，在剂量为190μg的miR-29化合物的情况下，化合物可以以190μg/ml的浓度施用。

[0091] 在某些实施方式中，miR-29化合物或其盐是本文提供的具体miR-29化合物或其盐的任一种。

[0092] 在具体实施方式中，本发明因此提供了miR-29化合物或其盐用于治疗用途，其包括通过注入一剂量的miR-29化合物或其盐的单个病灶内施用，其中引导链是5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'，乘客链是5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'并且包括共价附接至乘客链的3'端的胆固醇部分(5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdAchol-3')，并且miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)在50μg和5000μg之间，例如在200μg和4500μg之间，诸如在200μg和1500μg之间、在200μg和500μg之间、在500μg和1500μg之间或在1500μg和4500μg之间(例如，约100μg、200μg、250μg、300μg、500μg、1000μg、1500μg或约4500μg)，或在其盐的等同剂量之间；其中在核苷前的'f'＝2'-脱氧-氟核糖核苷(-F)；在核苷前的'm'＝2'-O-甲基核糖核苷(-O-Me)；在核苷前的'r'＝具有未修饰的核糖部分的核苷(-OH)；在核苷前的'd'＝2'-脱氧核糖核苷(-H)。在优选的实施方式中，miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)在约200μg和约500μg之间，或其盐的等同剂量。例如，miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)可以是约200μg，或是其盐的等同剂量。miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)也可以是约500μg，或是其盐的等同剂量。在具体实施方式中，miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)是约200μg，或是其盐的等同剂量。

[0093] 因此在一个实施方式中，miR-29化合物或其盐的引导链是5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'，miR-29化合物或其盐的乘客链是5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'并且包括共价附接至乘客链的3'端的胆固醇部分，以及包括胆固醇部分的重量的miR-29化合物的剂量在50μg和5000μg之间，例如200μg、500μg、1500μg或4500μg，或其盐的等同剂量。这意味着包括胆固醇部分的重量的miR-29化合物的剂量可以是约200μg，或是其盐的等同剂量。包括胆固醇部分的重量的miR-29化合物的剂量可以是约500μg，或是其盐的等同剂量。包括胆固醇部分的重量的miR-29化合物的剂量可以是约1500μg，或是其盐的等同剂量。包括胆固醇部分的重量的miR-29化合物的剂量可以是约4500μg，或是其盐的等同剂量。在优选的实施方式中，miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)在约200μg和约500μg之间，或其盐的等同剂量。例如，miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)可以是约200μg，或是其盐的等同剂量。miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)也可以是约500μg，或是其盐的等同剂量。在具体实施方式中，miR-29化合物的剂量(包括胆固醇部分的重量)是约200μg，或是其盐的等同剂量。治疗可用于组织纤维化，诸如佩罗尼氏病或掌肌腱膜挛缩症。治疗可用于肌腱损伤。肌腱损伤可以是肌腱病。肌

腱损伤可以是慢性肌腱病。肌腱损伤可以是外上髁炎。miR-29化合物可以以盐例如以钠盐施用。载体可以是肠胃外可接受的无菌水溶液，例如PBS。

[0094] 在另外的方面，本发明提供了制备根据本发明的miR-29化合物的方法。本发明还提供了制备药物组合物的方法，包括提供根据本发明的miR-29化合物，以及将所述化合物与药学上可接受的载体或稀释剂组合。

[0095] MicroRNA-29化合物

[0096] 本文所用的“microRNA-29”化合物是指具有天然内源miR-29的生物学功能的寡核苷酸，其包括miR-29a、miR-29b(其包括miR-29b-1和miR-29b-2)和miR-29c。该功能包括通过与包含miR-29的一个或多个结合位点(例如，miR-29a的一个或多个结合位点)的任何靶mRNA的3’非翻译区(3′UTR)互补结合(杂交)来靶向mRNA，从而引起它的降解和/或翻译抑制。具有miR-29结合位点的靶mRNA典型地编码某些细胞外基质蛋白，诸如胶原，例如胶原3(col3a1)。本文所述的miR-29化合物模拟天然miR-29的生物学功能，但是可以相对于天然miR-29(例如，天然miR-29a)是修饰的，以便例如增强它的活性、稳定性和/或细胞摄取，但不引起免疫原性。修饰可以包括在一个或多个糖部分、核苷间键合和/或核碱基处的核碱基序列修饰和/或化学修饰。修饰还包括缀合例如至亲脂性部分。在一个实施方式中，化合物具有人成熟miR-29a的生物学功能，即它是人成熟miR-29a的模拟物。

[0097] 本文所述的miR-29化合物能够减少或抑制由具有miR-29的一个或多个结合位点(例如，miR-29a的一个或多个结合位点)的mRNA编码的蛋白质的表达。例如，本文所述的miR-29化合物能够减少或抑制胶原表达，例如胶原3(col3a1)表达。miR-29化合物可以比天然miR-29a更大程度地减少胶原表达。例如，与天然miR-29相比，miR-29化合物可以将胶原表达减少至少10％、至少20％或至少30％或更多。评估胶原(col3a1)表达减少的合适的测定法是本领域技术人员已知的，例如以下实施例1中所述的荧光素酶测定法或qPCR测定法。蛋白质水平也可以通过本领域公知的方法(例如蛋白质印迹法)来评估。

[0098] 本文所述的miR-29化合物能够进行细胞摄取，例如它们可以在体内被靶细胞(诸如肌腱细胞或成纤维细胞)摄取而不使用转染剂或其它转染介质，诸如脂质体。miR-29化合物与亲脂性部分如胆固醇部分的缀合增强细胞摄取。细胞摄取的能力可以通过本领域技术人员已知的方法来评估，例如在体外胶原3荧光素酶报告测定法中测量miR-29活性。

[0099] 本文所述的miR-29化合物是稳定的。在37℃储存3个月后，稳定的miR-29化合物基本上保持体外胶原3荧光素酶报告测定法中的活性。

[0100] 与未修饰的(天然)miR-29相比，本文所述的miR-29化合物还在它们由于2’糖修饰具有更长体内半衰期的意义上是稳定的。

[0101] 双链RNA可以刺激哺乳动物的先天免疫响应。例如，已经描述了miR-29a可以与免疫细胞中的Toll样受体(TLR)家族的受体结合并触发炎症响应(参考文献5)。免疫刺激可显著限制miRNA治疗的体内应用。因此，需要能够有效介导miRNA活性但避免或最小化免疫激活的化合物。本文提供的miR-29化合物在施用于受试者(例如，人受试者)时是非免疫原性的。本领域技术人员已知合适的测定法来评估非免疫原性，例如使用如下文实施例1中所述的人巨噬细胞的TNF-α测定法。优选的化合物不诱导TNF-α的表达，或者它们诱导不超过10pg/ml TNF-α的表达，如在用化合物处理后24小时培养的原代人巨噬细胞的上清液中测量的。

[0102] 由于本文所述的化合物不诱导不希望的免疫响应,因此不需要通过包封到脂质体中或类似手段来保护化合物不受免疫系统的识别。因此,即使当在简单水性载体(例如PBS)中施用时,本文所述的化合物在体内也是有效的。这显著简化了治疗的准备和施用,并且避免了将进一步的外来成分引入至受试者中(这可能引起安全问题)。因此,本文所述的化合物具有有效模拟天然miR-29(例如,miR-29a)的功能但具有更高活性和稳定性而具有非免疫原性的优点。实施例还表明,化合物可以是抗炎的。

[0103] 因此,实施例中描述的示例性miR-29化合物是miR-29的化学合成模拟物,其具有改善的稳定性、活性和细胞摄取,同时是非免疫原性的。化合物的核碱基序列最接近miR-29a的核碱基序列,然而,如上所指出的,功能性模拟可以延伸到其他miR-29家族成员。miR-29化合物在水性载体中是稳定的,并且甚至在37℃储存三个月后仍保持活性。为了增加稳定性和活性,某些miR-29化合物已经通过在引导链中引入2'-氟和2'-O-甲基基团,以及在乘客链中引入2'-O-甲基基团进行化学改性。乘客链可以另外包含3'胆固醇基团以增加细胞摄取。

[0104] 将化合物施用至胶原失调位点例如损伤的肌腱或纤维化组织,恢复miR-29a功能。本文所述的miR-29化合物具有定义明确的作用模式。化合物直接靶向与一系列致病病况相关的胶原产生中的关腱途径,所述致病病况包括肌腱损伤诸如肌腱病,以及其它需要减少或抑制胶原(特别是胶原3)产生的疾病例如组织纤维化。此外,用本文所述的miR-29化合物治疗不需要侵入性程序并且可以在初始诊断点递送,从而在最早的时间启动恢复。

[0105] 如实施例中所述,体外和体内试验证明了本文所述的miR-29化合物能够例如在肌腱细胞和成纤维细胞中显著降低胶原3的表达。实施例还表明,在小鼠肌腱损伤模型中,miR-29化合物的单个肌腱内注入显著减少了胶原3表达和改善了肌腱结构。

[0106] 在安全性方面,在大鼠和犬中的研究监测了各种特征,包括:临床观察、体重、血液学、凝血或临床化学参数以及急性期和随访14天后的大体尸检结果。这些研究还被设计为显示安全药理作用,并且在大鼠中的Irwin行为概况或遥测犬中的任何心血管作用中没有看到变化。大鼠中的呼吸参数保持不受影响。实施例还表明,在局部(病灶内)施用后,观察到其它组织中可忽略的分布以及任何全身miR29a被快速降解。分离的人巨噬细胞和小鼠肌腱损伤模型中的体外和体内数据都已经提供了本文所述的miR-29化合物是非免疫原性的证据。此外,用本文所述的miR-29化合物的治疗没有显示任何脱靶效应。

[0107] 发明人发现,双链miR-29化合物(包括引导链和乘客链)比单链miR-29化合物(仅包括引导链;例如,实施例1中的Teno36)更具活性。因此,本文所述的miR-29化合物典型地是双链的。两条链基本上彼此互补,使得它们形成双链体。

[0108] 长度

[0109] 引导链的长度可以在20和24个连接的核苷之间。例如,引导链的长度可以是20、21、22、23或24个连接的核苷。在一个实施方式中,引导链的长度在20和23个连接的核苷之间。在一个实施方式中,引导链的长度是20和22个连接的核苷之间。在一个实施方式中,引导链的长度在21和23个连接的核苷之间。在一个实施方式中,引导链的长度是21或22个连接的核苷。在一个实施方式中,引导链的长度是22或23个连接的核苷。在优选的实施方式中,引导链的长度是22个连接的核苷。

[0110] 乘客链的长度可以在19和23个连接的核苷之间,或在20和24个连接的核苷之间。

例如,乘客链的长度可以是19、20、21、22、23或24个连接的核苷。在一个实施方式中,乘客链的长度在19和22个连接的核苷之间。在一个实施方式中,乘客链的长度在19和21个连接的核苷之间。在一个实施方式中,乘客链的长度是20或21个连接的核苷。在一个实施方式中,乘客链的长度是21或22个连接的核苷。在优选的实施方式中,乘客链的长度是21个连接的核苷。

[0111] 悬垂

[0112] 由于引导链和乘客链的各自寡核苷酸之间的序列互补性的部分,miR-29化合物的引导链和乘客链形成双链体。引导链和乘客链可以形成双链体,使得引导链相对于乘客链具有例如两个核苷的3'悬垂,并且乘客链具有相对于引导线的例如一个核苷的3'悬垂。引导链和乘客链可以形成双链体,使得引导链相对于乘客链具有例如两个核苷的3'悬垂。

[0113] 错配

[0114] 当对齐时,即,当在双链体中时,在引导链和乘客链的相应核碱基之间可能存在错配。错配存在于相应核碱基不是互补的地方。互补的核碱基是U和A,以及C和G。例如可以有3至8个错配,例如3、4、5、6、7或8个错配。在一个实施方式中,有3至6个错配。在一个实施方式中,有5或6个错配。在一个实施方式中,有6个错配。例如,错配可以在位置3、10至12、18和20处(相对于乘客链编号)。本发明人惊奇地发现,与具有较少或没有错配的miR-29化合物相比,在引导物和乘客链之间包含错配的miR-29化合物具有更高的活性(例如,如在胶原3荧光素酶测定法中确定的)。

[0115] 缀合物

[0116] 本文所述的miR-29化合物可包括共价附接至化合物的寡核苷酸的一个或多个缀合基团。示例性的缀合基团是胆固醇部分,尽管改善寡核苷酸的药理性质(例如细胞摄取)的其它缀合物部分是本领域已知的,并且可以代替胆固醇部分使用。因此,缀合基团典型地是亲脂性部分。

[0117] 在一个实施方式中,miR-29化合物包含共价附接至miR-29化合物的一条或多条寡核苷酸链的胆固醇部分。在一个实施方式中,胆固醇部分共价附接至乘客链。在一个实施方式中,胆固醇部分共价附接至乘客链,并且引导链是未缀合的。在一个实施方式中,胆固醇部分共价附接至乘客链的3'端。在这些实施方式的任一个中,胆固醇部分可经由接头(例如,三甘醇)附接。因此,在一个实施方式中,胆固醇部分是三甘醇胆固醇部分。示例性胆固醇部分是3'磷酸丙-2-醇、2,2'-[乙烷-1,2-二基双(氧)]二(乙-1-醇))、10-O-[1-丙基-3-N-氨基甲酰胆甾醇基](10-O-[1-propyl-3-N-carbamoylcholesteryl])。

[0118] 盐

[0119] 本文所述的miR-29化合物可以作为盐提供。因此,术语"化合物"包括化合物的盐。盐是药学上可接受的盐,即,盐保留化合物的生物活性,并且不对其赋予毒性作用。药学上可接受的盐的实例包括钠盐和钾盐。在一个实施方式中,miR-29化合物是钠盐。

[0120] CWT-001

[0121] 实施例中描述的特定miR-29化合物是CWT-001。CWT-001是至少miR-29a的双链化学修饰的模拟物,其包含以1:1比率的引导(反义)链和乘客(正义)链。引导链和乘客链的核碱基序列和化学修饰对应于'Teno18'(T18)的核碱基序列和化学修饰。

[0122] CWT-001引导链

[0123] CWT-001抑制至少与天然存在的miR-29a相同的靶基因(包括胶原3)的表达。通过引入2'-氟和2'-O-甲基基团对糖残基进行化学修饰,这增加了化合物的稳定性和活性。CWT-001的引导链具有与人成熟miR-29a("hsa-miR-29a-3p")天然存在的引导链相同的核碱基序列,其为:

[0124] 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'(SEQ ID NO:1)。

[0125] 每个核苷是2'-取代的核苷,这意味着核苷包括包含至少一个2'-取代基而非H或OH的糖部分。CWT-001的引导链具有下式:

[0126] 5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'

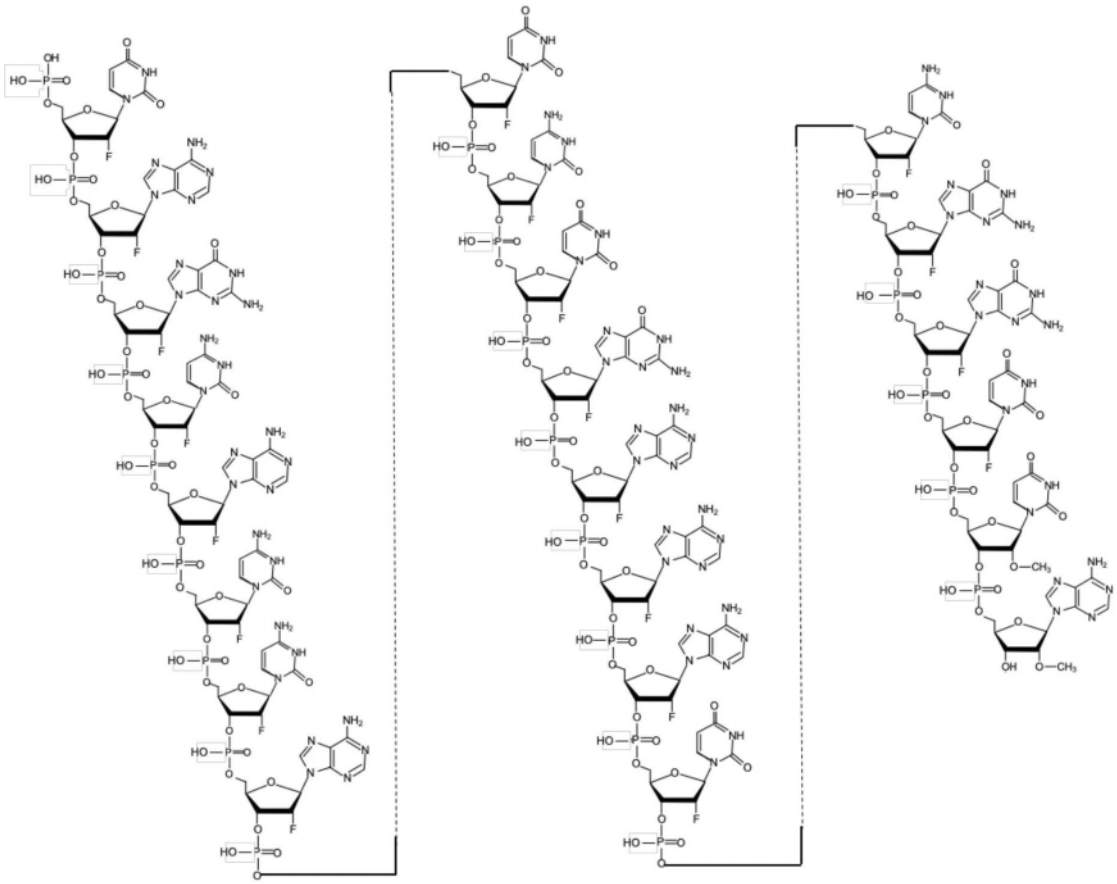
[0127] 其中,"f"表示在核糖环的2'位置处包含氟的核苷,和"m"表示在核糖环的2'位置处包含O-甲基基团的核苷。

[0128] 全部核苷间键合是磷酸二酯核苷间键合。

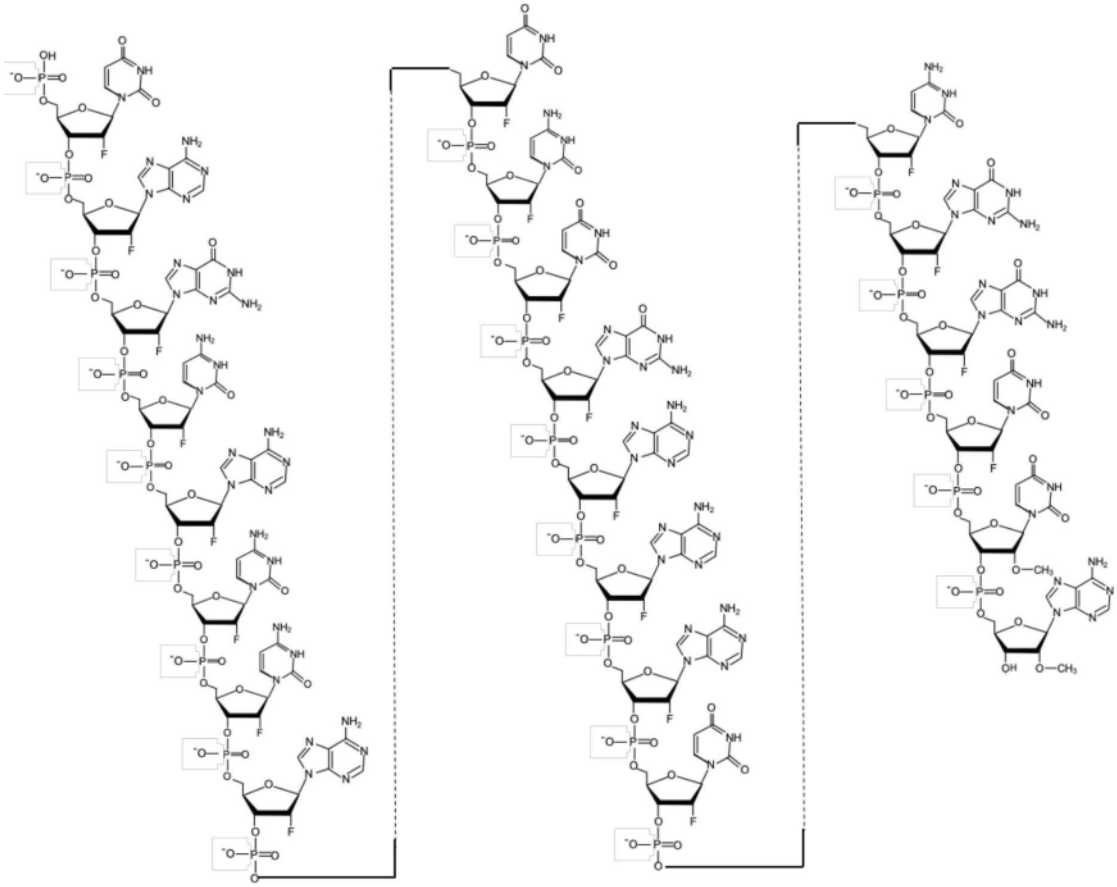
[0129] CWT-001引导链的化学名称是:

[0130] RNA(5'磷酸(2'脱氧-2'氟)U-(2'脱氧-2'氟)A-(2'脱氧-2'氟)G-(2'脱氧-2'氟)C-(2'脱氧-2'氟)A-(2'脱氧-2'氟)C-(2'脱氧-2'氟)C-(2'脱氧-2'氟)A-(2'脱氧-2'氟)U-(2'脱氧-2'氟)C-(2'脱氧-2'氟)U-(2'脱氧-2'氟)U-(2'脱氧-2'氟)G-(2'脱氧-2'氟)A-(2'脱氧-2'氟)A-(2'脱氧-2'氟)A-(2'脱氧-2'氟)U-(2'脱氧-2'氟)C-(2'脱氧-2'氟)G-(2'脱氧-2'氟)G-(2'脱氧-2'氟)U-(2'脱氧-2'O甲基)U-(2'O甲基)A),任选地作为盐,例如钠盐。

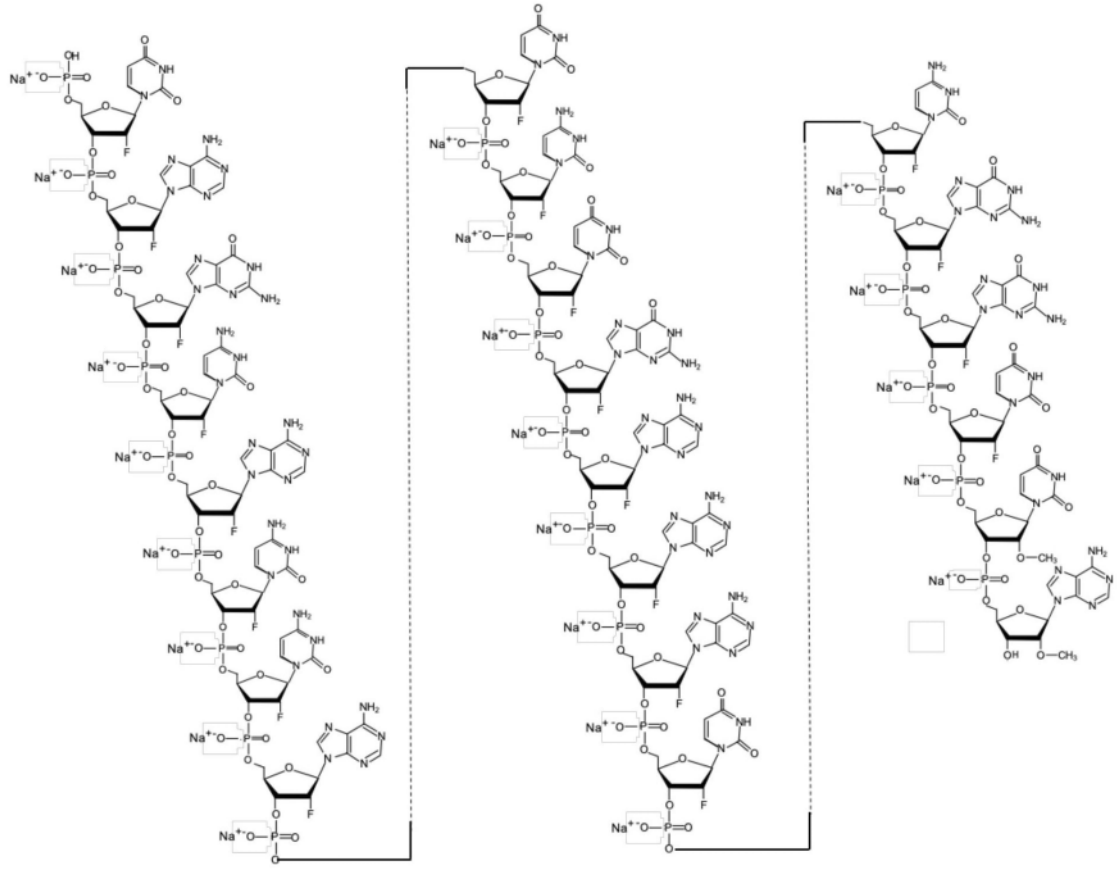
[0131] CWT-001引导链作为游离酸的结构式如下所示:

[0132] 

[0133] 离子形式的CWT-001引导链(即盐的阴离子)的结构式如下所示:

[0134] 

[0135] 作为钠盐的CWT-001引导链的结构式如下和图1A中所示：

[0136] 

[0137] CWT-001乘客链

[0138] CWT-001的乘客链具有与人成熟miR-29a(“hsa-miR-29a-5p”)的天然存在的乘客链相同的核碱基序列,除了在3’端处的G不存在于CWT-001中。CWT-001乘客链的核碱基序列因此是:

[0139] 5’-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3’(SEQ ID NO:3)。

[0140] 乘客链包括包含修饰的糖部分(2’-O-甲基)的核苷、包含未修饰的糖部分的核苷和包含脱氧核糖糖部分的核苷。CWT-001的乘客链具有下式:

[0141] 5’-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3’

[0142] 其中,“m”表示在核糖环的2’位置处包含O-甲基基团的核苷,“r”表示核糖核苷,即在核糖环的2’位置处包含OH基团,“d”表示脱氧核糖核苷。

[0143] 所有核苷间键合都是磷酸二酯核苷间键合。

[0144] CWT-001的乘客链包括共价附接至乘客链的3’端的胆固醇部分,例如三甘醇胆固醇部分。胆固醇部分改善了miR-29a化合物的药理学性质,例如胆固醇部分增加了寡核苷酸的细胞摄取。

[0145] 作为钠盐的CWT-001乘客链的化学名称是:

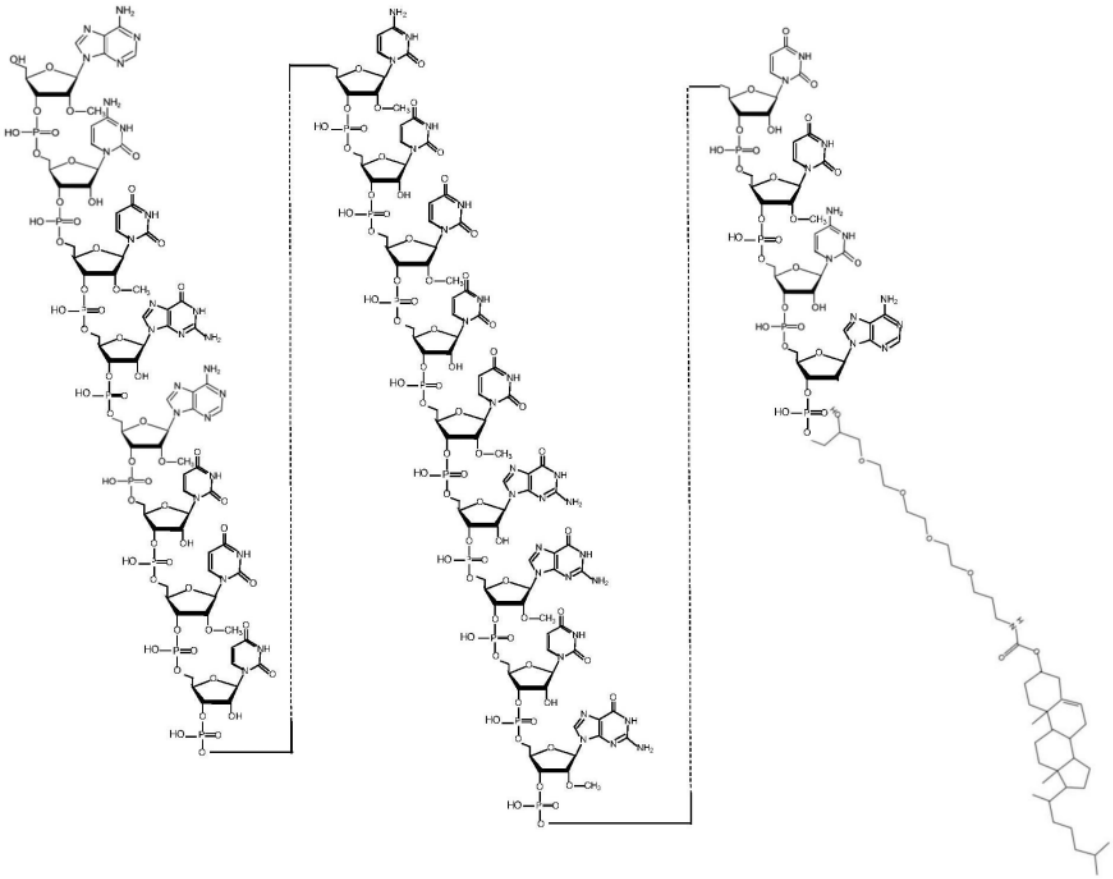
[0146] RNA((2’O甲基)A-C-((2’O甲基)U-G-(2’O甲基)A-U-(2’O甲基)U-U-(2’O甲基)C-U-(2’O甲基)U-U-(2’O甲基)U-G-(2’O甲基)G-U-(2’O甲基)G-U-(2’O甲基)U-C-(2’脱氧)A-3’磷酸丙-2-醇、2,2’-[乙烷-1,2-二基双(氧)]二(乙-1-醇),10-O-[1-丙基-3-N-氨基甲酰胆甾醇基],任选地作为盐,例如,钠盐。

[0147] 因此包括共价附接至乘客链的3’端的胆固醇部分(例如,三甘醇胆固醇部分)的乘客链也可以由下式表示:

[0148] 5’-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdAchol-3。

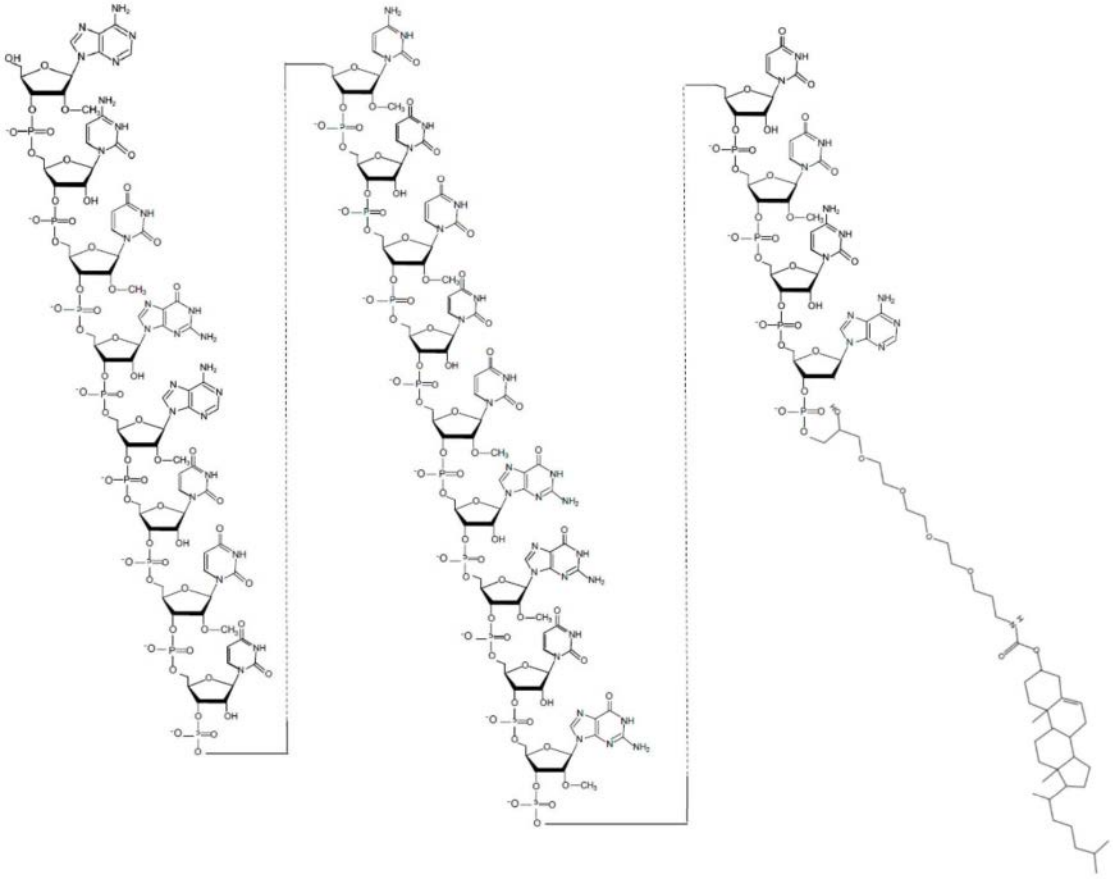
[0149] 作为游离酸的CWT-001乘客链的结构式如下所示:

[0150]

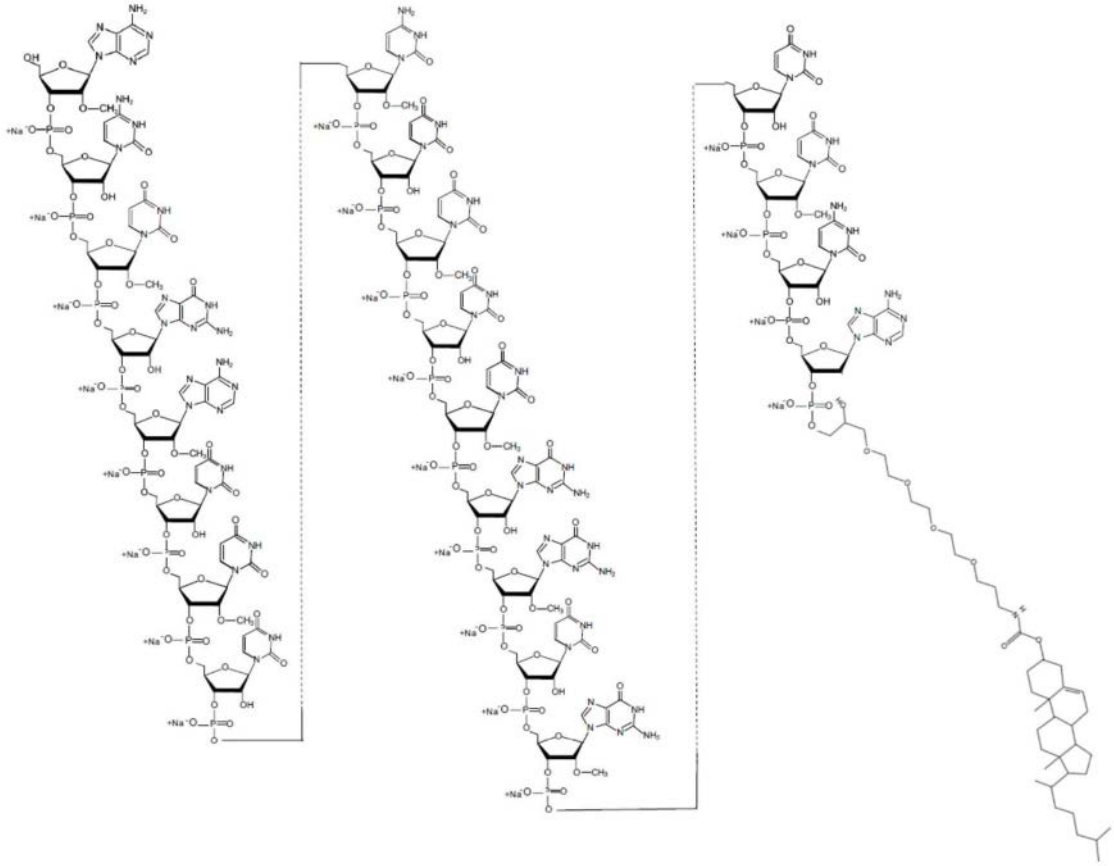


[0151] 离子形式(即盐的阴离子)的CWT-001乘客链的结构式如下所示：

[0152]



[0153] 作为钠盐的CWT-001乘客链的结构式如下和图1B中所示：

[0154] 

[0155] 关于CWT-001的进一步信息提供在以下表A中。

[0156] 表A

[0157]

	CWT-001 反义链	CWT-001 正义链
结构式，钠盐	$C_{211}H_{244}N_{82}O_{134}P_{22}F_{20}Na_{22}$	$C_{246}H_{332}N_{67}O_{162}P_{21}Na_{21}$
分子量，钠盐	7639.47	7952.02
分子量，游离酸	7134.1	7470.1
分子量，游离酸(不包括胆固醇部分)	7134.1	6714.2

[0158] microRNA-29化合物和组合物的治疗方法和治疗用途

[0159] 本文所述的化合物和组合物特别适用于涉及局部胶原失调的疾病的治疗，特征在于一种或多种类型的胶原纤维的局部过度产生。例如，本文所述的miR-29化合物减少或抑制胶原3的表达，例如如在荧光素酶测定法中评估的。因此，本文所述的miR-29化合物可用于治疗需要减少或抑制一种或多种类型的胶原纤维，例如胶原3(col3a1)的表达的疾病。

[0160] 下面描述了三种示例性疾病：肌腱损伤(特别是肌腱病)、佩罗尼氏病和掌肌腱膜挛缩症，后两种是组织纤维化的例子。

[0161] 肌腱损伤

[0162] 肌腱是将肌肉连接至骨的结缔组织。肌腱组织包含嵌入细胞外基质中的约30％胶原和2％弹性蛋白(湿重)，所述细胞外基质包含各种类型的细胞，最特别地是肌腱细胞。主要的胶原是1型胶原，其具有大的直径(40-60nm)并连接在一起以形成紧密的纤维束。3型胶

原也存在并且直径较小(10-20nm),形成较松的网状束。健康的肌腱主要包含有序束的胶原1(col1)纤维(～95%),其散置有较小量的生物力学较差的胶原3(col3)纤维(～5%)。在健康的肌腱细胞中,miR-29(例如,miR-29a)分别通过靶向Col3a1、VEGFA、AKT3和TGF-B2来直接抑制胶原3过度产生、新血管化、肌腱细胞的过度增殖和粘附形成。miR-29a的序列及其在这些靶mRNA中的结合位点在哺乳动物物种中是保守的。

[0163] 肌腱的生物力学性质尤其是它的拉伸强度,与横截面面积(即厚度)、胶原含量以及不同类型胶原之间的比率有关。

[0164] 如上所指出的,健康的肌腱主要包含有序束的胶原1(col1)纤维(～95%),其散置有较小量的生物力学较差的胶原3(col3)纤维(～5%)。在急性损伤后,在肌腱病期间以及在肌腱损伤愈合期间,在胶原合成中发生偏移,远离1型胶原朝向3型胶原。3型胶原合成的持续增加导致胶原比率的长期不平衡。这对肌腱的生物力学性质具有显著和有害的影响。特别地,它降低肌腱的拉伸强度,减少它的最终破坏强度(failure strength),并且因此使其更易于随后的破裂。

[0165] 肌腱损伤可由多种因素引起或与多种因素相关联,这些因素包括但不限于外部创伤、机械应力(包括过度使用)、退化、炎症和这些的组合。肌腱病是与肌腱过度使用和损伤相关联的疾病的医学名称。

[0166] 过度使用的肌腱病是肌腱复杂的多面病理学,临床上在活性相关疼痛的逐渐开始、功能减少并且有时具有肌腱的局部肿胀之后被诊断。过度使用、重复的应变或创伤导致肌腱中胶原纤维的分解。响应于该损伤,肌腱细胞启动修复响应,其中它们最初产生高水平的胶原3,其充当'补丁'以快速恢复肌腱功能。随着时间的推移,胶原3将逐渐被胶原1取代。然而,由于胶原3生物力学差于胶原1,肌腱易于进一步损伤,导致更多的胶原3产生。在肌腱病中,进一步损伤和较差愈合的恶性循环导致损害的形成,特征在于增加的胶原3(～30%)、细胞性(cellularity)、血管化、炎症和粘附形成。

[0167] 用于肌腱病的常规治疗诸如类固醇注入通常凭经验被采用以用于对抗疼痛和炎症,但它们不变化肌腱的组织学结构。然而,这些治疗不是完全令人满意的,并且症状的复发是常见的。

[0168] 下面的实施例特别指出本文提供的miR-29化合物是安全的并且有效地减少或抑制体内的胶原3表达,包括在肌腱病的小鼠模型中。例如,使用小鼠模型,图4显示以根据本发明的示例性miR-29化合物(CWT-001)的治疗,经由抑制肌腱疾病中的胶原3表达,显著改善肌腱纤维排列和胶原产生。此外,发明人先前已经表明,马胶原酶诱导的肌腱病(SDFT)模型反映了人肌腱病,其在肌腱损伤后miR-29a的表达减少,并伴随col3:col1比率的增加。miR-29化合物的单个病灶内注入减少了胶原3表达和病变尺寸,以及改善肌腱结构(参见参考文献3)。这些数据一起提供了使用miR-29化合物(包括本文提供的miR-29化合物)的安全和有效的人治疗的根本原因。根据本文所述的实验(参见实施例),在μg和低mg范围内的剂量预期在动物物种中是良好耐受的,并且可以以能够容易且安全地被注入的体积(例如,约1ml)施用。在1期,随机、双盲、安慰剂对照的患有外上髁炎的人受试者的研究中,发现在1ml体积中施用剂量为200μg、500μg和1500μg的CWT-001是安全有效的(参见实施例7)。

[0169] 因此,本发明的miR-29化合物和组合物可用于治疗肌腱病,例如过度使用的肌腱病。受试者可以是人受试者。受试者可以具有亚急性肌腱病。用本发明的化合物和组合物治

疗可以减少慢性肌腱病的进展。受试者可以患有慢性肌腱病。受试者可以患有活动性肌腱病。受试者可以患有部分撕裂肌腱。治疗可以减少到完全撕裂肌腱的进展。

[0170] 本发明的方法可应用于任何受损的肌腱。人中受肌腱病影响的主要肌腱是跟腱、冈上肌腱、屈肌总腱、伸肌总腱、髌腱和臀肌腱。马受试者中受肌腱病影响的主要肌腱是浅屈肌腱。在具体实施方式中,这些肌腱的一种或多种是用于治疗的靶。

[0171] 因此,肌腱损伤可以是外上髁炎、内上髁炎、肩旋转肌袖病变、伸肌端肌腱病、屈肌端肌腱病、臀肌肌腱病(大转子疼痛综合征、GTPS)、髌肌腱病、跳跃膝、足底筋膜炎、跟腱病、腓侧肌腱病、冈上综合征或其组合。在一个实施方式中,肌腱损伤是上肢肌腱病(包括外上髁炎、高尔夫球肘、肩旋转肌袖病变和奎尔万氏病)。在特定的实施方式,肌腱损伤是外上髁炎。

[0172] 用miR-29化合物治疗促进患病组织例如在肌腱、白膜或跖腱膜中的再生或修复。

[0173] 用miR-29化合物治疗减少了胶原例如胶原3在治疗部位的表达。

[0174] 本发明的方法可应用在肌腱损伤的任何阶段或在损伤肌腱的愈合过程的任何阶段。在一个实施方式中,本发明的miR-29化合物和组合物在初始诊断点施用于受试者。

[0175] 受试者(例如,人受试者)可能未能响应先前的治疗或对先前的治疗具有不充分的响应或不耐受先前的治疗。这意味着,尽管治疗,但受试者的症状已经持久化。先前的肌腱病治疗可以包括以下的一种或多种:物理疗法、夹板、用非甾体抗炎药(NSAID)治疗、以及局部皮质类固醇注入到受影响的肌腱中。受试者可能具有失败的保守治疗,即,即使治疗症状仍持续3个月或更长的时间。

[0176] miR-29治疗在肌腱损伤(例如,肌腱病,诸如肘部肌腱病)中的功效可以基于以下的一种或多种(还参见实施例7)进行评估:

[0177] -疼痛的减少,使用视觉模拟量表(VAS),例如在施用miR-29化合物或其盐后14天、28天和/或90天测量的;

[0178] -障碍和症状的改善,例如使用上肢功能评定表(Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand Questionnaire)(快速DASH)评分法和/或美国肩肘外科协会评分(ASES-E),例如在施用miR-29化合物或其盐后14天、28天和/或90天测量的;

[0179] -疼痛和障碍的改善,例如通过患者评分的网球肘评估(PRTEE)如在施用miR-29化合物或其盐后14天、28天和/或90天测量的;和

[0180] -经治疗的肌腱的改善,如通过超声评估例如在施用miR-29化合物或其盐第14天、28天和/或90天测量的。

[0181] 掌肌腱膜挛缩症

[0182] 掌肌腱膜挛缩症(DD)影响位于掌和指中的皮肤下面的组织的纤维层,也已知为‘筋膜’或‘掌筋膜’。在患有DD的受试者中,筋膜变厚,然后随着时间变紧。这引起指朝向掌向内拉动,导致所谓的杜普伊特伦挛缩。患有DD的受试者可能不能进行某些日常活动。尽管非外科(例如,类固醇或胶原酶注入)和外科治疗选项可用于帮助减缓疾病的进展并改善受影响的指的运动,这些可具有显著的副作用或并发症。

[0183] 在分子水平上,DD的特征在于异常成纤维细胞增殖过程和胶原的过度产生,包括胶原3(参考文献6)。本文所述的miR-29化合物被认为在基于它们特别有效和安全地抑制筋膜中局部胶原(例如,胶原3)表达,因此对抗表征掌肌腱膜挛缩症的纤维化组织形成的能力

的基础上,有效地治疗该疾病。

[0184] miR-29治疗在掌肌腱膜挛缩症中的功效可以基于障碍和症状的改善(例如使用上肢功能评定表(快速DASH)评分法测量的)、症状和/或疼痛减少(VAS评分)以及掌肌腱膜挛缩症结节和索状形成减少的临床评估(例如,通过在Tubiana分级系统中的改善)来评估。参见例如参考文献7。

[0185] 佩罗尼氏病

[0186] 佩罗尼氏病(PD)是渐进的纤维化紊乱,其特征在于在阴茎的白膜(TA)内疤痕或斑块的形成。由于阴茎疼痛和阴茎畸形的发展,该病况在身体以及情绪水平上都是使受试者高度虚弱的。

[0187] 胶原3和细胞外基质的其它组分的过度局部积累是疾病的特征。纤维化组织与以正常胶原3/1比率朝向胶原3含量增加的转变相关联。例如,已经表明,PD动物发展了纤维化的白膜和白膜下区域,其中胶原3蛋白显著上调。此外,与对照组(P<.05)相比,在PD组中胶原3/1比率更高(参考文献8)。本文所述的miR-29化合物被认为在基于它们特别有效和安全地抑制TA中的局部胶原3表达,因此对抗表征佩罗尼氏病的纤维化组织形成的能力的基础上,有效地治疗该疾病。

[0188] 掌肌腱膜挛缩症和佩罗尼氏病的共同出现是常见的(例如,参考文献9),并且两种疾病都与胶原3过度产生相关联(参考文献10)。数据表明它们共享共同的病理生理学并且适合于相同的治疗方案。这进一步支持miR-29模拟物的治疗功效,所述miR-29模拟物包括本文提供的在治疗佩罗尼氏病和掌肌腱膜挛缩症中的那些。

[0189] miR-29治疗在佩罗尼氏病中的功效可以基于障碍、症状和/或疼痛减少的改善、阴茎曲度的改善或没有进展以及双链体超声检查中的改善来评估。

[0190] 治疗的受试者

[0191] 受试者典型地是人。然而,本发明的方法可延伸到任何其它哺乳动物,包括其它灵长类动物(尤其是大猿类,诸如大猩猩、黑猩猩和红毛猩猩,也包括旧大陆和新大陆猴子)以及啮齿类动物(包括小鼠和大鼠),以及其他常见的实验室、家养和农业动物(包括但不限于兔子、犬、猫、马、牛、绵羊、山羊等)。另一种优选的受试者是马,特别是已被饲养用于马上运动的马。

[0192] 药物组合物和施用

[0193] 本文所述的miR-29化合物或其盐可配制在药物组合物中。除了miR-29化合物或其盐之外,这些组合物还可以包括药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员公知的其它材料。此类材料是无毒的并且不干扰miR-29化合物的功效。

[0194] 因此,在一个实施方式中,药物组合物包含miR-29化合物或其盐以及药学上可接受的载体或稀释剂,例如无菌液体载体如可注入溶液。药学上可接受的载体或稀释剂可包括盐水。药学上可接受的载体或稀释剂可以是无菌水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)。药学上可接受的载体或稀释剂可以是无菌水溶液,例如氯化钠溶液诸如等渗盐水(如0.9%w/v NaCl)。在一个实施方式中,药物组合物包括miR-29化合物或其盐,并且进一步包括PBS和氯化钠溶液诸如等渗盐水(例如,0.9%w/v NaCl)。

[0195] 鉴于待治疗的病况的局部性质,局部施用例如通过局部注入是特别合适的。因此,本发明的化合物和组合物因此典型地在患病部位(病灶内)局部施用。例如,注入物

(injection)可以被递送到受影响的肌腱中。注入到受影响的肌腱中也被称为腱内施用。

[0196] 为了注入在患病部位,miR-29化合物可以包含在药物组合物中,所述药物组合物进一步包括肠胃外可接受的水溶液。溶液是无菌的。溶液是无热原的,并且具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域技术人员能够很好地使用例如等渗介质(诸如磷酸盐缓冲盐水、氯化钠溶液、林格氏溶液、乳酸盐林格氏溶液)来制备合适的溶液。根据需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。例如,可以例如以0.001%-0.005%,如0.003%(100μM)的终浓度添加EDTA。本发明化合物的特定制剂是可注入溶液,例如包含本发明的miR-29化合物或盐以及PBS,任选地进一步包括EDTA的溶液。

[0197] 注入肌腱典型地由超声波引导,例如使用“密击技术(peppering technique)”(参考文献11)。“密击技术”是注入方法,借此通过撤回、重定向和重新插入针而不从皮肤露出来执行多次小注入。在损伤/慢性肌腱情况下,这可以是有利的,以便刺激愈合响应。因此,在一个实施方式中,miR-29化合物的单剂量以多针注入的形式在损伤肌腱内的不同部位施用到肌腱中。

[0198] 常规技术和方案的实例可以在Remington's Pharmaceutical Sciences,第22版,2012中找到。

[0199] 剂量和治疗方案

[0200] 本领域技术人员知道可以以各种方式表示剂量。除非另有说明,如本文所示的miR-29化合物的剂量是指作为游离酸的引导链和乘客链的寡核苷酸部分的重量(即不包括任何缀合基团诸如胆固醇部分)。参考化合物是作为游离酸的CWT-001,并且不包括三甘醇胆固醇部分。本领域技术人员可以计算可具有不同分子量的miR-29化合物、盐和/或缀合形式的等同剂量。等同剂量也可以以摩尔量(例如,nmol)或摩尔浓度(例如,nM)表示。本领域技术人员知道如何在这些不同的单元之间进行转换。

[0201] 在下面描述的实施例和附图中,所示的剂量是指化合物的胆固醇-缀合形式的游离酸。因此,在实施例和附图提及200μg或200μg/ml的情况下,这对应于约1190μg或190μg/ml的作为游离酸不包括胆固醇部分的化合物;在实施例提及500μg或500μg/ml的情况下,这对应于约475μg或475μg/ml的作为游离酸不包括胆固醇部分的化合物;在实施例提及1500μg或1500μg/ml的情况下,这对应于约1420μg或1420μg/ml的作为游离酸不包括胆固醇部分的化合物;在实施例提及2000μg或2000μg/ml,这对应于约1900μg或1900μg/ml的作为游离酸不包括胆固醇部分的化合物等。在不包括胆固醇部分的情况下,这也排除了胆固醇部分和化合物的寡核苷酸部分之间的任何接头(例如,三甘醇)。

[0202] 施用典型地以“治疗有效量”或“预防有效量”(视情况而定,尽管治疗可以包括预防),但这足以显示对受试者的益处。例如,治疗有效量是miR-29化合物或其盐在施用于受试者时导致疾病症状的改善,例如减少的疼痛或障碍,改善的功能性和/或预防或更慢的疾病进展的量。

[0203] miR-29化合物可以直接施用到损伤的组织中,即病灶内。施用典型地通过注入(例如使用针)。

[0204] 在一个实施方式中,可以仅通过单一施用本文所述的剂量来实现治疗效果。“单一施用”是指仅需要一个剂量的化合物来实现治疗效果。因此,受试者典型地不需要返回进行第二剂量,以便在施用第一剂量的部位经历疾病症状的改善。

[0205] 总体

[0206] 除非另有说明,本发明的实践将采用本领域技术人员的化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学的常规方法。

[0207] 术语“包括/包含(comprising)”涵盖“含有(including)”以及“由……组成”,例如,“包括/包含(comprising)”X的组合物可排他地由X组成或者可以包括另外的物质,例如X+Y。

[0208] 关于数值x的术语"约"是任选的,并且意指例如x±10%。

[0209] 词语"基本上"不排除“完全”。在需要的情况下,可以从本发明的定义中省略该词。

[0210] 提及两个寡核苷酸序列之间的序列百分比同一性意味着,当比对时,该百分比的核碱基在横跨那些序列的整个长度上在比较两个序列时是相同的。

[0211] 提供以下实施例以说明本发明的各种实施方式。实施例是说明性的,并不旨在以任何方式限制本发明。

[0212] 附图简要说明

[0213] 图1:(A)作为钠盐的CWT-001引导(反义)链的结构。(B)作为钠盐的CWT-001乘客链(正义)链的结构。

[0214] 图2:在用含有人胶原3miR29结合位点的荧光素酶质粒和miR29a化合物共转染的HEK293细胞和对照中的荧光素酶活性(n=4)。荧光素酶活性与miR29a活性成反比。

[0215] 图3:(A)选择的miR29化合物通过评估它们在原代人巨噬细胞中诱导产生促炎细胞因子TNF-α的能力来测试潜在免疫原性。未处理细胞(“未处理”)用作阴性对照;以2.5μg/ml咪喹莫特(“IMQ 2.5”)处理的细胞用作阳性对照。(B)测试了选择的miR29化合物在人肌腱细胞中敲低col3a1表达的能力。加扰的(scrambled)miR29a(“scr”)和未处理细胞(“untr”)用作阴性对照。(C)以含有人胶原3miR29-结合位点的荧光素酶质粒和选择的miR-29化合物共转染的HEK293细胞的荧光素酶活性,如所示的。加扰的miR29a(“scr”)用作阴性对照。使用单因素方差分析评估显著性。***P≤0.001,相比于Teno20,n=3。(D)如所示,用胆固醇-缀合的miR-29化合物处理肌腱细胞后,通过定量PCR测量的Col3a1转录物水平。值标准化为GAPDH,并显示与未处理样本相比的相对表达。学生t检验,*P≤0.05,在第5天Teno18与Teno33相比,n=3。(E)在小鼠肌腱损伤模型中测试选择的miR-29化合物。将这些化合物直接注入至损伤的髌腱中,并且允许小鼠恢复1、3或7天。通过q-PCR测量Col3a1转录本的绝对数。使用单因素方差分析评估显著性。*P≤0.05,**P≤0.01,在各时间点Teno18与Teno20相比,n=4。

[0216] 图4:诱导肌腱损伤后立即用CWT-001处理的小鼠肌腱组织学和分子分析。(A)注入CWT-001或PBS后第1、3、7天小鼠髌腱中col3a1 mRNA的绝对拷贝数(n=3)。(B)以CWT-001(右)或PBS对照(左)处理7天后损伤肌腱的代表性H&E染色切片。

[0217] 图5:以CWT-001、加扰的阴性对照或聚IC阳性对照处理后24小时,通过ELISA测量培养的原代人巨噬细胞上清液中促炎细胞因子肿瘤坏死因子α(TNF-a)的水平。

[0218] 图6:在CWT-001(中柱)或poly IC阳性对照(右柱)处理后24小时,通过qPCR测量在培养的原代人巨噬细胞中干扰素-可诱导基因OAS2(A)、INFa(B)、IFTM1(C)、MX1(D)、IRF9(E)和OAS1(F)的表达水平,并且表达为相对于未处理对照(左柱)的倍数变化。“无TF”=无转染试剂(通过胆固醇部分增强了细胞摄取)。

[0219] 图7:在CWT-001或PBS阴性对照的肌腱内注入后的0、1、3和7天,通过qPCR测量的小鼠肌腱中干扰素-可诱导基因MX1(A)、OAS2(B)、IFITM1(C)和IRF9(D)的表达水平,并且表示为以每106个拷贝的18S的干扰素响应基因的绝对拷贝数。

[0220] 图8:通过qPCR测量的以0、2、20和100μg/ml CWT-001在37℃下孵育0、6、12和24小时的新鲜人血清中miR29a的水平,标准化为对照中的Cel39峰,并显示与未处理样本相比的相对表达(n=3)。

[0221] 图9:通过qPCR测量的以0、2、20和100μg/ml CWT-001在37℃下孵育0分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、6小时、12小时和24小时的新鲜人血清中miR29a的水平,标准化为对照中的Cel39峰,并表示为相对于未处理样本的倍数变化(n=3)。

[0222] 图10:通过qPCR测量的静脉内注入CWT-001后0、1、4和7天收获的小鼠肾(A)、脾(B)、肝(C)、血清(D)、肺(E)、肌肉(F)和心脏(G)中miR29a的水平。器官miR29a表达水平标准化为GAPDH,并显示为与未处理对照相比的相对倍数变化;血清miR29a表达水平标准化为对照中的Cel39峰,并表示为相对于PBS对照的倍数变化(n=4)。

[0223] 图11:通过qPCR测量的CWT-001注入髌腱后0分钟、15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、24小时和72小时从小鼠采集的血夜中miR29a的血清水平,标准化为对照中的Cel39峰,并表示为相对于PBS处理的对照的倍数变化(n=4)。

[0224] 图12:通过qPCR测量的静脉内注入4、20、40和50mg/ml的CWT-001或PBS对照后7天收获的小鼠血清(A)、肺(B)、肌腱注入近端的皮肤(C)、肾(D)、脾(E)、肌肉(F)、肝(G)、心脏(H)和骨髓(I)中miR29a的水平。器官miR29a表达水平标准化为GAPDH,并显示为与未处理对照相比的倍数变化;血清miR29a表达水平标准化为对照中Cel39的峰,并表示为相对于PBS对照的倍数变化(n=4)。

[0225] 图13:研究设计为随机、双盲、安慰剂对照的1期研究,评估在患有外上髁炎的人受试者中单次提升剂量的CWT-001注入的安全性、耐受性和药代动力学。

[0226] 图14:超声图像(A和B)显示CWT-001施用至伸肌总腱期间探针的位置。桡骨头(r)、桡肱关节(j)、外上髁和伸肌总腱是可见的。探针沿平行于伸肌总腱纵轴的肘部的外侧放置。

[0227] 图15:通过qPCR测量的健康和掌肌腱膜挛缩症的人筋膜组织中miR29a水平的比较(n=4健康,n=3掌肌腱膜挛缩症)。

[0228] 图16:通过qPCR测量的以5μM的miR29a模拟物、miR29b模拟物、miR29c模拟物、CWT-001、miR29a拮抗剂或加扰的miR29a对照转染后的人掌肌腱膜挛缩症成纤维细胞中胶原1(A)和胶原3(B)的水平。miR29a表达水平标准化为GAPDH,并显示为与加扰的对照相比的相对倍数变化(n=3)。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005相对于加扰的对照。(学生t检验)。

[0229] 图17:在随机、双盲I期研究中,患有外上髁炎的人受试者经由肌腱内注入接受施用的单一200μg(n=6)(A)、500μg(n=6)(B)或1500μg(n=6)(C)剂量的CWT-001或匹配的安慰剂(n=2)(3:1)。在治疗后的前14天,受试者使用100mm视觉模拟量表(VAS)评估他们的疼痛,每天一次,对前24小时的疼痛进行评级。第14天后,受试者每周记录疼痛日记,直至注入后第90天。水平"MCID"线表示在治疗外上髁炎中建立的VAS的最小临床重要性差异(MCID)。将所有接受任何剂量的CWT-001的受试者(n=18)的VAS评分均值变化与所有接受安慰剂的受试者(n=6)的VAS评分均值变化进行比较(D),并且将所有接受任何剂量的CWT-001的受

试者的VAS评分平均百分比变化与在单独的研究中用皮质类固醇(n＝50)、富血小板血浆(PRP)(n＝50)或昔罗卡因(n＝50)处理的受试者的VAS评分平均百分比变化进行比较(E)。

[0230] 图18:在随机、双盲I期研究中,患有外上髁炎的人受试者接受经由肌腱内注入施用的单一200μg(n＝6)(A)、500μg(n＝6)(B)或1500μg(n＝6)(C)剂量的CWT-001或匹配的安慰剂(n＝2)(3:1)。受试者使用QuickDASH指数报告他们的身体功能和症状,并从给药前第1天至第14天、第28天和第90天绘制QuickDASH评分的变化。将所有接受任何剂量CWT-001的受试者(n＝18)的QuickDASH评分的平均变化与所有接受安慰剂的受试者(n＝6)的QuickDASH评分的平均变化进行比较(D)。水平"MCID"线表示在患有上肢肌肉骨骼紊乱的患者中为QuickDASH建立的MCID。

[0231] 图19:在随机、双盲I期研究中,患有外上髁炎的人受试者接受经由肌腱内注入施用的单一200μg(n＝6)(A)、500μg(n＝6)(B)或1500μg(n＝6)(C)剂量的CWT-001或匹配的安慰剂(n＝2)(3:1)。使用患者评分的网球肘评估(PRTEE)来测量研究受试者的感知疼痛和障碍,并从给药前第1天至第14天、第28天和第90天绘制PRTEE评分变化。将所有接受任何剂量CWT-001的受试者(n＝18)的PRTEE评分的平均变化与所有接受安慰剂的受试者(n＝6)的PRTEE评分的平均变化进行比较(D)。

[0232] 图20:在随机、双盲I期研究中,患有外上髁炎的人受试者接受经由肌腱内注入施用的单一200μg(n＝6)、500μg(n＝6)或1500μg(n＝6)剂量的CWT-001或匹配的安慰剂(n＝2)(3:1)。超声组织表征(UTC)用于可视化肌腱结构,并将灰色标度肌腱基质变化量化为与肌腱完整性相关的4种不同回声型。I型和II型代表有组织的基质;III型和IV型代表杂乱无章的基质(A)。对于在注入前(B)、第28天(C)和第90天(D)已经接受安慰剂的受试者,以及在注入前(E)、第20天(F)和第90天(G)已经接受200μg CWT-001的受试者,提供侧肘的代表性超声图像。对于接受200μg(H、I)、500μg(J、K)或1500μg(L、M)剂量的CWT-001或匹配的安慰剂的受试者,对UTC I、II、III和IV型肌腱组织的百分比以及修复肌腱(UTC I和II型)相对于退行性肌腱(UTC III和IV型)的总百分比进行量化。将所有接受任何剂量的CWT-001的受试者(n＝18)的修复肌腱和退行性肌腱的平均百分比与所有接受安慰剂的受试者(n＝6)的修复肌腱和退行性肌腱的平均百分比进行比较(N)。*P<0.05、**P<0.01。

实施例

[0233] 实施例1:miR-29化合物的评价和初级药理学研究(图1-3)

[0234] 产生了在不同组合中含有各种化学修饰(2'-氟核糖、2'-O-甲基核糖、脱氧核糖和/或硫代磷酸酯)的miR-29模拟化合物的文库。除了一种(Teno36)之外的所有化合物都是包含引导链和乘客链的双链化合物。每个化合物的引导链具有与天然人成熟miR-29a的引导链(hsa-miR-29a-3p;SEQ ID NO:1)相同的核碱基序列。乘客链具有与天然人成熟miR-29a的乘客链(hsa-miR-29a-5p;SEQ ID NO:2)相同的核碱基序列,或者它可以缺少3'G核苷酸(SEQ ID NO:3),和/或它可以具有相对于天然miR-29a乘客链的序列的一个或多个核苷酸取代(SEQ ID NO:4-6),参见表1b。还测试了阴性对照乘客链,其表示SEQ ID NO:2的反向序列(SEQ ID NO:7)。核碱基序列与任何糖和核苷间键合(主链)修饰在表1a中示出。对于每种化合物,第一行表示引导链,第二行表示乘客链。所有序列以5'至3'方向显示。SEQ ID NO表示核碱基序列(即,不包括化学修饰)。Teno46不包含任何化学修饰,并且因此对应于天然

成熟miR-29a。Teno39在前文中描述(参考文献2)。作为钠盐并且其中乘客链在3'端处与胆固醇部分缀合的示例性化合物Teno18的结构在图1A(引导链)和1B(乘客链)中示出。

[0235] 表1a:miR-29化合物

[0236]

化合物	式	核碱基 SEQ ID NO
Teno1	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmArG	2
Teno2	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrCmUrAmG	4
Teno3	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno4	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno5	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno6	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1

[0237]

	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno7	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrGmUrGmCrUmAmG	4
Teno8	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmArG	2
Teno9	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrCmUrAmG	4
Teno10	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno11	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno12	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno13	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno14	5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrGmUrGmCrUmAmG	4
Teno15	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmArG	2
Teno16	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrCmUrAmG	4
Teno17	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno18	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno19	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno20	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno21	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrGmUrGmCrUmAmG	4
Teno22	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmArG	2
Teno23	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrCmUrAmG	4
Teno24	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno25	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3

[0238]

Teno26	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno27	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno28	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrGmUrGmCrUmAmG	4
Teno29	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmArG	2
Teno30	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrCmUrAmG	4
Teno31	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno32	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno33	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno34	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno35	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrGmUrGmCrUmAmG	4
Teno36	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	无乘客链	n/a
Teno37	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUA	6
Teno38	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAmG	5
Teno39	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAG	5
Teno40	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUA	6
Teno41	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAmG	5
Teno42	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAG	5
Teno43	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUA	6
Teno44	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAmG	5
Teno45	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1

[0239]

	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAG	5
Teno46 (天然)	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	rArCrUrGrArUrUrUrCrUrUrUrUrGrGrUrGrUrUrUrCrArG	2
Teno47	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUA	6
Teno48	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAmG	5
Teno49	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAG	5

[0240] /5Phos/＝5’磷酸盐

[0241] mA＝2’-O-甲基腺苷核糖核苷；

[0242] mC＝2’-O-甲基胞嘧啶核糖核苷；

[0243] mG＝2’-O-甲基鸟嘌呤核糖核苷；

[0244] mU＝2’-O-甲基尿嘧啶核糖核苷；

[0245] rA＝腺苷核糖核苷；

[0246] rC＝胞嘧啶核糖核苷；

[0247] rG＝鸟嘌呤核糖核苷；

[0248] rU＝尿嘧啶核糖核苷；

[0249] fA＝2’-脱氧-氟腺苷核糖核苷；

[0250] fC＝2’-脱氧-氟胞嘧啶核糖核苷；

[0251] fG＝2’-脱氧-氟鸟嘌呤核糖核苷；

[0252] fU＝2’-脱氧-氟尿嘧啶核糖核苷；

[0253] *rA＝5’-O-硫代磷酸酯腺苷核糖核苷；

[0254] *rC＝5’-O-硫代磷酸酯胞嘧啶核糖核苷；

[0255] *rG＝5’-O-硫代磷酸酯鸟嘌呤核糖核苷；

[0256] *rU＝5’-O-硫代磷酸酯尿嘧啶核糖核苷；

[0257] A＝腺苷脱氧核糖核苷；

[0258] C＝胞嘧啶脱氧核糖核苷；

[0259] G＝鸟嘌呤脱氧核糖核苷；

[0260] U＝尿嘧啶脱氧核糖核苷。

[0261] 因此，测试了以下乘客链核碱基序列，参见表1b。SEQ ID NO:2代表天然人miR-29a乘客链序列。SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:2在一个位置处不同，如下划线所示。SEQ ID NO:4与SEQ ID NO:2在五个位置处不同。SEQ ID NO:5与SEQ ID NO:2在六个位置处不同。SEQ ID NO:6与SEQ ID NO:2在七个位置处不同。SEQ ID NO:7是SEQ ID NO:2的反向序列并且代表阴性对照。

[0262] 表1b:乘客链核碱基序列

[0263]

序列	SEQ ID NO
ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG	2
ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-	3

ACCGAUUUCAAUUGGUGCU-AG	4
ACCGAUUUCAGAUGGUGCU-AG	5
ACCGAUUUCAGAUGGUGCU-A-	6
GACUUGUGGUUUUCUUUAGUCA(SEQ ID NO:2的反向)	7

[0264] 下表1c显示了每种化合物中2'糖修饰、核碱基序列(如SEQ ID NO)和核苷间键合的组合。Teno1-Teno49包含5种类型引导链(以下表示为G1-G5)中的一种以及11种类型乘客链(以下表示为P1-P11)中的一种。Teno36是一个例外,因为它不包含乘客链。所有序列以5'至3'表示。

[0265] 以Teno1为例,表1c显示它包含具有SEQ ID NO:1的核碱基序列的"G1"引导链,其中在3'端处的三个核苷是2'-O-甲基核糖核苷,以及其余核苷是未修饰的核糖核苷,并且所有核苷间键合磷酸二酯。乘客链是"P1",其具有SEQ ID NO:2的核碱基序列以及其中所有核苷交替地是2'-O-甲基和未修饰的核糖核苷,并且所有核苷间键合都是磷酸二酯。Teno2包含与Teno1相同的引导链("G1"),但是不同的乘客链("P2")等。

[0266] 表1c:MiR-29化合物-通过引导链分组

[0267]

化合物	修饰	核碱基 SEQ ID NO	糖	键合	#
Teno1	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno2	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_nm$	o_n	P2
Teno3	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno4	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	o_n	P4
Teno5	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_nmd$	o_n	P5
Teno6	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno7	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno37	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	6	m(mr)d	o_n	P8
Teno38	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	5	$m(mr)_nm_2$	o_n	P9
Teno39	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	5	$m(mr)_nmd$	o_n	P10
Teno8	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno9	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_nm$	o_n	P2
Teno10	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno11	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	o_n	P4
Teno12	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_nmd$	o_n	P5
Teno13	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno14	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno40	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	6	m(mr)d	o_n	P8

[0268]

Teno41	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	$o_n s_2$	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	5	$m(mr)_n m_2$	o_n	P9
Teno42	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	$o_n s_2$	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	5	$m(mr)_n md$	o_n	P10
Teno15	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno16	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_n m$	o_n	P2
Teno17	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	rrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno18	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_n d$	o_n	P4
Teno19	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_n md$	o_n	P5
Teno20	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	2	$m(mr)_n m_3$	o_n	P6
Teno21	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$m(mr)_n m_2$	o_n	P7
Teno43	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmd	6	m(mr)d	o_n	P8
Teno44	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	5	$m(mr)_n m_2$	o_n	P9
Teno45	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	5	$m(mr)_n md$	o_n	P10
Teno36	fffffffffffffffffmm	1	$f_n m_2$	o_n	G3
	无乘客链	-	-	-	-
Teno22	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno23	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_n m$	o_n	P2
Teno24	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno25	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_n d$	o_n	P4
Teno26	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_n md$	o_n	P5
Teno27	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4

[0269]

	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno28	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno46	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
(天然)	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	2	r_n	o_n	P11
Teno29	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno30	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_nm$	o_n	P2
Teno31	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno32	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	o_n	P4
Teno33	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_nmd$	o_n	P5
Teno34	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno35	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno47	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	6	m(mr)d	o_n	P8
Teno48	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	5	$m(mr)_nm_2$	o_n	P9
Teno49	frrfrffrfffrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	5	$m(mr)_nmd$	o_n	P10

[0270] m＝2’-O-甲基核糖核苷酸(-O-Me)；

[0271] f＝2’-脱氧-氟核糖核苷酸(-F)；

[0272] d＝2’-脱氧核糖核苷酸(-H)；

[0273] r＝未修饰的核糖核苷酸(-OH)；

[0274] o＝5’-O-磷酸二酯核苷间键合；

[0275] *或s＝5’-O-硫代磷酸酯核苷间键合；

[0276] n＝核苷数。

[0277] 表1d根据化合物的乘客链对化合物进行分组。

[0278] 表1d:MiR-29化合物-通过乘客链分组

[0279]

化合物	修饰	核碱基 SEQ ID NO	糖	键合	#
Teno1	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno8	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno15	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno22	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno29	frrfrffrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	o_n	P1
Teno2	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_nm$	o_n	P2
Teno9	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_nm$	o_n	P2
Teno16	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_nm$	o_n	P2
Teno23	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_nm$	o_n	P2
Teno30	frrfrffrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrm	4	$(mr)_nm$	o_n	P2
Teno3	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno10	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno17	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno24	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno31	frrfrffrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	o_n	P3
Teno4	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	o_n	P4
Teno11	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	o_n	P4

Teno18	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	o_n	P4
Teno25	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	o_n	P4
Teno32	frrfrffrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	o_n	P4
Teno5	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_nmd$	o_n	P5
Teno12	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_nmd$	o_n	P5
Teno19	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_nmd$	o_n	P5
Teno26	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_nmd$	o_n	P5
Teno33	frrfrffrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	2	$(mr)_nmd$	o_n	P5
Teno6	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno13	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno20	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno27	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno34	frrfrffrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmmm	2	$m(mr)_nm_3$	o_n	P6
Teno7	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno14	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno21	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno28	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno35	frrfrffrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5

[0280]

[0281]

	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_nm_2$	o_n	P7
Teno37	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	6	m(mr)d	o_n	P8
Teno40	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	6	m(mr)d	o_n	P8
Teno43	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	6	m(mr)d	o_n	P8
Teno47	frfrfrfrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	6	m(mr)d	o_n	P8
Teno38	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	5	$m(mr)_nm_2$	o_n	P9
Teno41	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	5	$m(mr)_nm_2$	o_n	P9
Teno44	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	5	$m(mr)_nm_2$	o_n	P9
Teno48	frfrfrfrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	5	$m(mr)_nm_2$	o_n	P9
Teno39	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmmm	1	r_nm_3	o_n	G1
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	5	$m(mr)_nmd$	o_n	P10
Teno42	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	o_ns_2	G2
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	5	$m(mr)_nmd$	o_n	P10
Teno45	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	5	$m(mr)_nmd$	o_n	P10
Teno49	frfrfrfrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	o_n	G5
	mmrmrmrmrmrmrmrmrmrmd	5	$m(mr)_nmd$	o_n	P10
Teno36	fffffffffffffffffffmm	1	f_nm_2	o_n	G3
	无乘客链	-	-	-	-
Teno46 (天然)	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	o_n	G4
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	2	r_n	o_n	P11

使用体外胶原3荧光素酶报告测定法测试化合物相对于天然人成熟miR29a的活性。该测定法的基础是包含来自胶原3的miR29a结合位点的荧光素酶报告基因。在该测定法中，荧光素酶活性与miR29a活性成反比。这意味着高miR29a活性更强烈地抑制胶原3表达，其导致更低的荧光素酶信号。在用转染剂转染miR-29化合物之后，在HEK293细胞中进行荧光素酶测定法。将miR-29化合物的荧光素酶活性与用商业可得的人天然miR29a阳性对照处理的细胞(“mir29a+ve”)和加扰的miR29a阴性对照(“加扰的”)进行比较(n＝4)。结果如图2所示。

[0282] 在图2中提及“Chol.conj.”是指涉及商业可得的miR29a阳性对照，其在乘客链的

3’端处与胆固醇部分缀合，并且在不使用任何转染剂的情况下添加到HEK293细胞。图2显示胆固醇-缀合的化合物能够进入细胞并抑制胶原3表达。与未缀合的miR29a阳性对照相比，具有胆固醇-缀合的化合物的更高荧光素酶信号被认为反映了转染剂的作用，所述转染剂用于转染未缀合的miR29a阳性对照，而当转染胆固醇-缀合的化合物时不存在转染剂。

[0283] 通过测试选择的化合物(Teno2、Teno5、Teno6、Teno7、Teno11、Teno12、Teno13、Teno15、Teno18、Teno19、Teno20、Teno25、Teno26、Teno27、Teno32、Teno33和Teno34)在原代人巨噬细胞中诱导促炎细胞因子TNF-α产生的能力，来测试它们的潜在免疫原性。对作为先天免疫系统的关键组分对ds-RNA分子敏感的培养的原代人巨噬细胞用0.35μg/ml miR-29化合物处理24小时(n＝4)，并且通过ELISA测量促炎细胞因子肿瘤坏死因子-α(TNFα)的水平。将咪喹莫特(IMQ)(TLR7/8激动剂)用作阳性对照(2.5μg/ml)。结果显示在图3A中。诱导表达超过10pg/ml TNF-α的化合物未被向前推进(taken forward)。然而，Teno12被向前推进，因为其在所测试的包含具有硫代磷酸酯核苷间键合的引导链的miR-29化合物(Teno11、Teno12和Teno13)中代表具有最低免疫原性的miR-29化合物。

[0284] 因此，对选择的化合物(Teno2、Teno9、Teno12、Teno15、Teno18、Teno19、Teno20、Teno33和Teno38)测试抑制人肌腱细胞中col3a1表达的能力。结果如图3B所示。这导致选择三种miR-29化合物：Teno18、Teno20和Teno33。

[0285]

化合物	式	核 碱 基 SEQ ID NO
Teno18	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno20	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno33	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2

[0286] 在37℃储存三个月后，通过测量Teno18、Teno20和Teno33在体外胶原3荧光素酶报告测定法中的活性来确认它们的稳定性。所有化合物都是稳定的。Teno18和Teno33显示储存后的最高活性，随后是Teno20(图3C)。

[0287] 基于以上数据，Teno18和Teno33被向前推进以测试在人肌腱细胞和小鼠肌腱损伤模型中的体内活性。为了增强体内细胞摄取，胆固醇部分与每种化合物的乘客链的3’端缀合(例如，参见图1B的Teno18)。Teno18和Teno33都有效地敲低人肌腱细胞(图3D)和小鼠肌腱损伤模型(图3E)中的col3a1表达。用Teno18处理最有效地在人肌腱细胞中在第5天时间点(图3D)以及在小鼠肌腱损伤模型中在第1天和第3天时间点(图3E)敲低col3a1表达。

[0288] 因此选择Teno18作为用于随后实施例中描述的进一步体内测试的临床候选物。

[0289] 使用常规方法(固相合成)合成药物物质(胆固醇-缀合的Teno18，命名为CWT-001)并提供为冻干粉末。药物产物可以提供为在透明玻璃小瓶中含有5mg/mL CWT-001的无菌溶液，典型地为pH 7.3，在施用前用盐水稀释用于注入。可选地，CWT-001可以以用于施用的终浓度(例如，约200μg/ml、500μg/ml、1500μg/ml、2000μg/ml、4500μg/ml或5000μg/ml，诸如约200μg/ml、500μg/ml、1500μg/ml或4500μg/ml)的无菌溶液提供。为了优化药物物质的稳定性，可以加入例如终浓度0.001％-0.005％(如约0.003％(100μM))的EDTA。

[0290] 药物产品小瓶可以在-20℃储存和运输，并用于单次使用。冷冻的小瓶呈浑浊的白色。在解冻到室温后，活性药物成分(API)将溶解并变成澄清无色溶液。

[0291] CWT-001药物物质(作为钠盐)的结构如图1所示，图1A显示了引导链，并且图1B显示了在3'端处与胆固醇部分缀合的乘客链。

[0292] 实施例2：体内初级药理学研究(图4)

[0293] 由于啮齿类具有与人相似的肢解剖结构(包括易于患肌腱病的肌腱(跟腱、髌腱和冈上肌腱))，选择验证的小鼠肌腱损伤模型(参考文献12)以测试用CWT-001处理是否显著降低胶原3表达并改善肌腱愈合。在这些实验中，使用0.75mm直径活检针诱导肌腱损伤，随后立即注入0.35μg/ml CWT-001至损伤部位。使小鼠恢复1、3或7天，并且移除肌腱用于组织学和分子分析。

[0294] 经由抑制肌腱疾病中的胶原3表达，用CWT-001处理显著改善腱纤维排列和胶原产生(图4A和4B)。

[0295] 实施例3：次级药理学(图5-7)

[0296] 实施例3a-生物信息学分析CWT-001的潜在脱靶效应

[0297] MicroRNA就其本质而言在大多数情况下经由6-8个核苷酸种子序列的碱基配对与大量靶mRNA种类相互作用。CWT-001的引导链的序列与天然miR29a的序列相同，这意味着CWT-001将经由RISC-依赖性机制靶向与天然分子相同的mRNA。为了解决潜在杂交依赖性脱靶效应的可能性，如由寡核苷酸安全性工作组指导(Oligonucleotide Safety Working Group guidance)推荐的那样对引导链和乘客链进行生物信息学分析(参见参考文献13)。该分析产生了以下详述的52个基因的列表，其理论上可以与CWT-001的引导链和乘客链杂交。这些基因的13个中的突变与已知的人疾病相关，也如下详述的。

[0298] A1)前体microRNA序列中CWT-001引导链的潜在杂交依赖性倾向的计算机评价

[0299] 在用CWT-001处理后，对原代人肌腱细胞中miRNA的表达水平进行Q-PCR分析。将潜在交叉杂交靶鉴定为hsa-miR29a、hsa-miR29c、hsa-mir-1302-4、hsa-mir-3657、hsa-mir-3657和hsa-mir-4647。正义(+)取向的顶部命中为靶microRNA miR29a和miR29c(miR29b未根据用于该分析的生物信息学参数鉴定)。潜在交叉杂交靶处于互补(-)取向。顶部互补microRNA序列是差表征的microRNA hsa-mir-3657和hsa-mir-4647。这两种microRNA均可代表在计算机中无功能的伪影(artefact)。此外，这两个序列共享完全中断同一性的有限区域(10bp)，并且不太可能具有足够的亲和力以在体内生理浓度下被miR29a模拟物的空间抑制强烈地调节。

[0300] A2)NCBI的参考序列(RefSeq)RNA序列中的CWT-001引导链的潜在杂交依赖性倾向的计算机评价

[0301] 在用CWT-001处理后，对原代人肌腱细胞中潜在的脱靶基因的表达水平进行Q-PCR分析。将潜在交叉杂交靶鉴定为LAMA2、PDE7B、LRRC73、NETO1、FHL5、LINC00309、DOCK8、FILIP1、CUL9、CNOT8、LOC100132077、SCP2和PROX2。简而言之，在适合交叉杂交的互补取向中，多个独特的基因以对序列13-14bp的不间断互补性鉴定。没有RNA具有超过14bp的不间断互补性，其限制交叉杂交的可能性。三种基因中的突变(LAMA2、DOCK8和SCP2)与已知的人疾病相关联。

[0302] B1)前体microRNA序列中CWT-001乘客链的潜在杂交依赖性倾向的计算机评价

[0303] 在用CWT-001处理后，对原代人肌腱细胞中miRNA的表达水平进行qPCR分析。将潜在的交叉杂交靶鉴定为hsa-miR29a、hsa-mir-5186、hsa-mir-548at、hsa-mir-1283-2、hsa-mir-454、hsa-mir-4782、hsa-mir-515-1、hsa-mir-515-2、hsa-mir-5691。顶部互补microRNA序列是hsa-mir-548at、hsa-mir-1283-2和hsa-mir-515家族。所有这些序列共享完全中断的同一性的有限区域(11bp或更少)，并且不太可能具有足够的亲和力以在体内生理浓度下被CWT-001的空间抑制强烈地调节。

[0304] B2)NCBI的参考序列(RefSeq)RNA序列中的CWT-001乘客链的潜在杂交依赖性倾向的计算机评价

[0305] 在用CWT-001处理后，对原代人肌腱细胞中潜在的脱靶基因的表达水平进行qPCR分析。将潜在的交叉杂交靶鉴定为PDCD10、ITGB6、LPGAT1、BPTF、CTTNBP2、EIF4A3、KIAA1210、SLC7A11-AS1、THSD4、TNFAIP3、ANKLE2、ARL4A、ATG14、BCL11A、CCDC83、CDH4、CLVS1、DKFZp434L192、ETV7、FBXO45、KCNJ1、LINC01973、MCF2L2、METTL5、NBN、POC1B、RAVER2、RPA2、ZNF441、ZNF667和OPCML。九个基因(ANKLE2、BCL11A、BPTF、EIFA3、ITGB6、KCNJ1、NBN、PDCD10、POC1B、&TNFAIP3)中的突变与已知的人疾病相关联。

[0306] C)人肌腱细胞的研究

[0307] 为了鉴定是否发生了任何潜在预测的相互作用，在用100μg/ml CWT-001处理24小时的人肌腱细胞中，通过qPCR进行测量潜在的脱靶mRNA的表达水平。52个潜在的脱靶基因中仅12个在肌腱细胞中表达，并且这些中仅4个已知与人疾病相关联的基因(ANKLE2、SCP2、BPTF和EIFA3)在肌腱细胞中表达。显著地，用CWT-001的处理没有改变突出为CWT-001的潜在脱靶的任何基因的表达。

[0308] 数据表明用CWT-001处理不会在原代人肌腱细胞中产生脱靶效应。

[0309] 实施例3b-原代人巨噬细胞中CWT-001的免疫原性评估

[0310] 双链RNA(ds-RNA)可引发免疫响应(参考文献14)。为了测试CWT-001是否可能引发免疫响应，将作为对ds-RNA分子敏感的先天免疫系统的关键成分的培养的原代人巨噬细胞，用0.35μg/ml CWT-001处理24小时(n＝4)，并且通过ELISA测量促炎细胞因子肿瘤坏死因子-α(TNFα)的水平。结果显示在CWT-001处理的细胞中不诱导TNFα(图5)。

[0311] 另外对一组干扰素可诱导基因(OAS2、INFα、IFTM1、MX1、IRF9和OAS1)进行qPCR分析。将样本标准化至18S rRNA水平，并与未处理对照相比表达为倍数变化(n＝3)。qPCR分析显示CWT-001处理的巨噬细胞中表达没有变化(图6)。

[0312] 这些数据一起表明CWT-001在人巨噬细胞中不诱导免疫原性。

[0313] 实施例3c-小鼠中CWT-001的免疫原性评估

[0314] CWT-001的免疫原性在CWT-001注入髌腱之后的小鼠中测试。动物用50μl的0.35μg/ml的CWT-001或PBS注入肌腱内(n＝3)。已知的干扰素响应基因MX1、OAS2、IFITM1和IRF9的表达通过qPCR在第1、3和7天测量，并与PBS对照比较。所得数据显示不增加干扰素响应基因表达，这表明CWT-001是非免疫原性的(图7)。事实上，数据表明CWT-001具有抗炎活性，如与PBS对照相比用CWT-001处理的小鼠中干扰素响应基因的较低表达水平所反映的。

[0315] 这些数据表明CWT-001在小鼠肌腱损伤模型中不诱导免疫原性，并且看起来具有抗炎活性。

[0316] 实施例4:药代动力学/毒代动力学(图8-12)

[0317] 实施例4a-临床前模型中CWT-001的检测

[0318] 验证了在大鼠和犬RNA中检测CWT-001的两步反转录定量PCR(RT-QPCR)方法。在不存在基质RNA的情况下,在10^8-10^3拷贝之间测定是线性的。通过3个分析师对每个基质7个时机的测定内和测定间(Intra-and inter-assay)准确度和精度评估试验证明了该方法在所建立的范围内的稳健性。

[0319] 每个基质的RNA QC池样本被制备为内源性对照以评估内源性基线水平。在样本分析过程中,RNA QC池样本用于QC样本的数据标准化,并确定期望的Ct值和确定的拷贝数。RNA QC池样本被设置为在以下值内:

[0320] • Ct 24.771-26.697和/或6.67E+03-3.31E+04拷贝/反应大鼠血浆

[0321] • Ct 25.195-27.496和/或1.38E+03-2.79E+04拷贝/反应犬血浆

[0322] • Ct 23.284-24.352和/或5.45E+04-8.81E+04拷贝/对于大鼠肌腱的反应

[0323] • Ct 23.135-24.339和/或5.49E+04-9.88E+04拷贝/对于犬肌腱的反应

[0324] 评估了储存在冷冻装置中以维持-80℃的大鼠和犬的峰状(spiked)肌腱样本中CWT-001的稳定性,并显示达至1个月的稳定性。

[0325] 在这些研究中使用的方法被认为适合于在大鼠和犬RNA中提取和测量CWT-001。

[0326] 实施例4b-人血清中CWT-001可检测性和稳定性

[0327] 如果CWT-001进入全身循环,则测定CWT-001对人血清中内源性miR29a背景水平的可检测性的持续时间。将CWT-001稀释至与在成人中紧接在静脉内(IV)递送后所预测的那些相当的浓度(基于5升的平均成人血量,1ml血清中1:5,000)。将0、2、20和100μg/ml CWT-001的样本与新鲜的人血清在37℃下孵育0、6、12和24小时。在对照中通过qPCR测量miR29a水平,其标准化至对照中的Cel39峰,并且显示为相比于未处理样本的相对表达(n=3)(图8)。在加入CWT-001之后,仅在纯化小于1分钟的样本中观察到可归因于CWT-001的miR29a的增加,在6小时之后miR29a水平返回到接近未处理水平。该数据表明CWT-001在体外在人血清中迅速降解为不可检测的水平。

[0328] 为了进一步阐明CWT-001在人血清样本中的动力学,聚焦于较早的时间点(0、15、30和45分钟;1、6、12和24小时)进行了另外的研究。miR29a水平通过qPCR测量,值标准化至对照中的Cel39峰,并且显示为相比于与未处理样本的相对倍数变化(n=3)(图9)。数据显示了,当添加到血清后立即测量时的CWT-001的水平增加到背景的275倍的平均水平,然后在15分钟后下降到61倍背景。在1小时,水平已经下降到11倍背景,在12小时时下降到背景水平。

[0329] 实施例4c-在IV施用后CWT-001的药代动力学和分布

[0330] 为了研究在静脉内注入后探CWT-001的体内分布,将小鼠注入50μl的50mg/ml CWT-001并且在0、1、4和7天后收集血清、心脏、肝、肾、脾和肌肉。使用miR29a qPCR测定法测量CWT-001水平,将值标准化为GAPDH,并显示为相比于未处理对照的相对倍数变化。将血清样本标准化为对照中的峰化的Cel39,并显示为相比于未处理对照的倍数变化(n=4)(图10)。该数据显示,与盐水对照相比,血清或器官中的miR29a水平为小的增加或没有增加。在第1天观察到肺中miR29a水平的小的增加,其在第4天已回到基线。

[0331] 这些数据表明,CWT-001在静脉内施用后在组织中具有可忽略的分布,即使当在25倍典型的临床剂量水平(即25倍的50μl的2mg/ml,其是1ml的2mg/ml CWT-001的人临床剂量

的小鼠等同量)下施用时。

[0332] 实施例4d-在肌腱内注入后循环中CWT-001的全身暴露

[0333] 在小鼠髌键中注入25μl的2mg/ml CWT-001或PBS对照的小鼠中进行CWT-001全身暴露的测量(每组n＝4),并且在0、15和30分钟以及1、2、4、6、24和72小时收集血液。使用miR29a qPCR测定法测量CWT-001水平,将数值标准化至对照中的Cel39峰,并表达为相对于PBS对照的倍数变化(n＝4)。

[0334] 在肌腱内施用后,看到注入后2和4小时的血液中miR29a水平的增加。miR29a水平在6小时返回到背景水平(图11)。该数据表明,虽然CWT-001在肌腱内注入后确实进入循环,但是它被快速清除,可以是通过血清核酸酶的降解和通过肾脏的排泄。全身地所观察到的内源性miR29a的绝对水平非常低(例如,与存在于细胞中的浓度相比)。因此,CWT-001注入后在2和4小时观察到的全身miR29水平5-14倍的相对增加(图11)转化为仍然非常低的绝对全身miR29a水平。此外,如上所指出的,大部分血清CWT-001被快速清除。小于1％的CWT-001最终由通过血清被细胞吸收。总之,这意味着仅非常低的施用的CWT-001的绝对水平将经由全身暴露进入非靶细胞。因此,CWT-001中观察到的全身增加不太可能在除施用CWT-001的组织(例如,肌腱)内的靶细胞外的细胞中发挥任何药效学作用。

[0335] 该数据表明CWT-001在肌腱内注入后具有有限的全身分布。

[0336] 实施例4e-肌腱内施用后CWT-001的分布

[0337] 为了了解在肌腱内注入后的CWT-001组织分布,向小鼠的髌腱注入50μl的4、20、40和50mg/ml的CWT-001或PBS对照。7天后收集器官和外周血。使用miR29a qPCR测定法测量CWT-001水平,将值标准化至GAPDH,并显示为相比于未处理对照的相对倍数变化。将血清样本标准化至对照中峰化的Cel39,并显示为相对于安慰剂的倍数变化(n＝4)。所得数据(图12)显示,与安慰剂相比,在任何浓度下在任何器官中的miR29a水平没有显著增加。在脾中的两个最高剂量处注意到趋于显著性的趋势,其高于任何典型的等同的人临床剂量。

[0338] 这些数据表明CWT-001在组织中甚至在最高剂量下具有可忽略的分布,所述最高剂量达至最高典型的等同的人临床剂量的25倍。

[0339] 实施例4f-在单剂量毒性研究中肌腱内施用后大鼠中的毒代动力学

[0340] 将毒代动力学评估纳入在大鼠中通过腱内注入的CWT-001的单剂量毒性研究设计中,恢复期为14天(实施例5c)。

[0341] 用30μL注入盐水对照、10mg/ml或50mg/ml(即0、0.3或1.5mg总剂量)的CWT-001处理大鼠。在给药后0.5、1、2、4、8和24小时,从每组每种性别的3只动物的颈静脉中收集血液样本,并且制备血浆。使用验证的分析程序(RT-QPCR)分析血浆样本的CWT-001浓度。

[0342] 在该研究中,使用与施用的肌腱内途径一致的非房室模型方法(non-compartmental approach)来评估毒代动力学参数。在下表2中提供了毒代动力学参数的总结。

[0343] 表2-雄性和雌性大鼠血浆中CWT-001的毒代动力学参数

[0344]

性别	剂量 (mg)	T_{max} (h)	C_{max} (拷贝/mL) (SE)	C_{max}/D (拷贝/mL)/(mg)	AUC (0-t) (SE) (拷贝.h/mL)	AUC (0-t)/D (拷贝.h/mL)/(mg)
雄性	0.3	0.5	9.93E+09 (2.88E+09)	3.31E+10	1.56E+10 (5.58E+09)	5.20E+10
	1.5	0.5	3.43E+10 (9.73E+09)	2.29E+10	5.37E+10 (8.29E+09)	3.58E+10
雌性	0.3	0.5	1.01E+09 (1.01E+09)	3.36E+09	1.80E+09 (7.73E+08)	6.00E+09
	1.5	0.5	1.32E+10 (3.70E+09)	8.80E+09	1.70E+10 (1.10E+09)	1.13E+10

[0345] 对于雄性和雌性n＝9,每个时间点每种性别3只动物进行采样;一个综合的TK概况/性别/剂量。

[0346] 血浆CWT-001浓度相对于时间曲线展示了快速吸收阶段(所有曲线中的T_{max}是0.5小时)。给药后血浆CWT-001浓度以多相方式减少达至4小时,之后,在雌性中,浓度稍微增加达至8小时(最后可定量浓度,0.3mg)或保持在相对稳定状态,直到采样期(24小时)结束(1.5mg)。在雄性中,在两种剂量的浓度在4小时之后保持在稳定状态,直到采样期(24小时)结束。随着剂量从0.3mg增加到1.5mg,对CWT-001的全身暴露在雌性中以大体小于剂量-成比例的方式增加,并且在雄性中以大于剂量-成比例的方式增加。在0.3mg和1.5mg剂量水平全身暴露于CWT-001在雄性中比雌性中更大。

[0347] 实施例4g-在单剂量毒性研究中肌腱内施用后犬的毒代动力学

[0348] 将毒代动力学评估纳入在犬中通过腱内注入的CWT-001的单剂量毒性研究的设计中,恢复期为14天(实施例5d)。

[0349] 用250μL注入的盐水对照、10mg/ml或50mg/ml的CWT-001(即0、2.5或12.5mg总剂量)处理犬。在给药后0.5、1、2、4、6和48小时,从每组每种性别3只动物的颈静脉中收集血液样本,并制备血浆。使用验证的分析程序(RT-QPCR)分析血浆样本的CWT-001浓度。

[0350] 在该研究中,使用与施用的肌腱内途径一致的非房室模型方法来估计毒代动力学参数。毒代动力学参数的总结提供在下表中。

[0351] 表3-雄性和雌性犬血浆中CWT-001的单个和平均毒代动力学参数

[0352]

性别	剂量水平(mg)	动物	T_{max} (h)	C_{max} (拷贝/mL)	C_{max}/D (拷贝/mL)/(mg)	AUC (0-t) (拷贝.h/mL)	AUC (0-t)/D (拷贝.h/mL)/(mg)
雄性	2.5	n	3	3	3	3	3
		平均*	1	2.49E+09	9.97E+08	4.63E+09	1.85E+09
		SD	-	1.09E+09	4.37E+08	2.89E+09	1.16E+09
	12.5	n	5	5	5	4	4
		平均*	0.5	5.23E+09	4.19E+08	7.87E+09	6.30E+08
		SD	-	2.16E+09	1.73E+08	5.33E+09	4.26E+08
雌性	2.5	n	3	3	3	1	1
		平均*	0.5	1.26E+09	5.06E+08	1.44E+09	5.78E+08
		SD	-	2.64E+08	1.05E+08	-	-
	12.5	n	5	5	5	5	5
		平均*	0.5	7.33E+09	5.86E+08	8.94E+09	7.16E+08
		SD	-	6.57E+09	5.26E+08	3.55E+09	2.84E+08

[0353] “-”值不适用。

[0354] *对于T_{max}报告的中值。

[0355] [a]AUC达至6小时;计算的值用于计算描述性统计以协助解释。

[0356] ND＝未确定,少于三个连续浓度被定量。

[0357] 血浆CWT-001浓度相对于时间曲线展示了快速吸收阶段(0.5或1小时的中值T_{max})。这之后是浓度的双相下降,首先以给药后达至1或2小时的快速方式,以及其次以达至最后可定量的浓度的较慢速率(除了以12.5mg给药的雌性(其显示了给药后4和6小时之间的轻微增加)外)。随着剂量从2.5mg增加到12.5mg,对CWT 001的全身暴露在雌性中以大体上剂量-成比例方式增加,并且在雄性中是小于剂量-成比例的。在剂量水平为2.5mg时,雄性中对CWT-001的全身暴露大于雌性,但在12.5mg时,性别之间的全身暴露是相当的。

[0358] 实施例5:毒理学

[0359] 实施例5a-通过在大鼠中单一腱内注入的CWT-001的耐受性研究

[0360] 该研究的目的是确定当通过腱内注入给予大鼠时CWT-001的潜在毒性,目标是建立和确认最大可行剂量(MFD)。研究设计在下表4中列出。

[0361] 表4-大鼠单一腱内注入耐受性研究的实验设计

[0362]

组号	处理	剂量水平(mg)	剂量体积(μL)	剂量浓度(mg/mL)	动物数量	
					雄性	雌性
1	CWT-001	0.3	30	10	-	1501-1503
2	CWT-001	0.75	30	25	-	2501-2503
3	CWT-001	1.5	30	50	-	3501-3503
4	CWT-001	1.5	30	50	4001-4003	-

[0363] -＝不适用

[0364] 用PBS(138mM氯化钠;8mM磷酸钠)pH 6.8-7.6用于溶解测试项目

[0365] 每只动物使用0.5mL胰岛素注入器接收进入右跟腱中的单一腱内施用(30μL)的CWT-001。使用异氟烷麻醉动物,并且使用对后肢小的手术切口将肌腱暴露以允许放置CWT-001。在施用剂量后将动物缝合封闭。

[0366] 最高剂量水平(1.5mg)表示可通过该途径施用的最大可行剂量,其受测试项目的溶解性和可合理地注入到肌腱中的体积的限制。在该研究中评价以下参数和端点:临床观察、体重和大体尸检结果。没有被认为与CWT-001有关的临床体征、体重或大体尸检结果的变化。

[0367] 总之,通过单一腱内施用的CWT-001的施用在Han Wistar大鼠中良好耐受达至1.5mg而没有观察到的临床观察、体重或大体尸检结果的变化。

[0368] 实施例5b-通过在犬中单一腱内注入的CWT-001的耐受性研究

[0369] 该研究的目的是确定当作为单一腱内注入给予犬时CWT-001的潜在毒性,并提供数据以支持对后续14天毒性研究的剂量水平选择。研究设计在下表5中列出。

[0370] 表5-犬单一腱内注入耐受性研究的实验设计

[0371]

组号	测试项目	剂量水平(mg)	剂量体积(μL)	剂量浓度(mg/mL)	动物数量	
					雄性	雌性
1	CWT-001	12.5	250	50	1001	1501

[0372] 介质＝PBS(138mM氯化钠;8mM磷酸钠)

[0373] 每只动物使用注入器接收进入右跟腱中的单一腱内施用(250μL)的CWT-001。使用异氟烷麻醉动物,并且使用对后肢小的手术切口将肌腱暴露以允许放置CWT-001。在施用剂量后将动物缝合封闭。

[0374] 使用的剂量水平(12.5mg)表示可通过该途径施用的最大可行剂量,受测试项目的溶解性和可合理地注入到肌腱中的体积的限制。在该研究中评估以下参数和端点:临床观察、体重、食物消耗、临床病理参数(血液学、凝结和临床化学)、大体尸检结果和器官重量。

[0375] 没有CWT-001临床观察,并且没有体重、食物消耗、血液学、凝结或临床化学参数的变化。另外,没有被认为与CWT-001相关的大体尸检结果或器官重量的变化。总之,通过在比格犬中单一腱内施用的CWT-001施用在12.5mg很好地耐受,没有注明的临床观察,没有体重、食物消耗或临床病理血参数的变化,并且没有大体病理学或器官重量发现。

[0376] 实施例5c-具有14天恢复期的大鼠中通过腱内注入的CWT-001单剂量毒性研究

[0377] 该研究的目的是确定当经由单一肌腱内注入给予大鼠时CWT-001的潜在毒性，并在注入后的14天恢复期评估任何发现的潜在可逆性。此外，确定CWT-001的毒代动力学特性。研究设计在下表6中列出。

[0378] 表6-具有14天恢复期的大鼠中通过肌腱内注入的单剂量毒性研究的实验设计

[0379]

组号	处理	剂量水平 (mg)	剂量体积 (μL)	剂量浓度 (mg/mL)	动物数量			
					主研究		恢复/卫星	
					雄性	雌性	雄性	雌性
1	对照	0	30	0	10	10	5	5
2	CWT-001	0.3	30	10	10	10	4	-
4	CWT-001	1.5	30	50	10	10	5	5

[0380] 对照＝PBS(100mM氯化钠;20mM磷酸钠)pH 6.8-7.6-＝不适用。

[0381] 在该研究中评估以下参数和端点:临床观察、体重、食物消耗、眼科学、行为观察(Irwin评分)、呼吸测量、临床病理学参数(血液学、凝结、临床化学和尿分析)、生物分析和毒代动力学参数、大体尸检结果、器官重量和组织病理学检查。

[0382] 最高剂量水平(1.5mg)表示可由该途径施用的最大可行剂量，其受测试项目的溶解度和可合理地注入到大鼠的肌腱中的体积的限制(参见实施例5a)。发现所有制剂分析结果在它们理论浓度的±10％(单个值在±15％内或等于±15％)的接受标准内或等于它们理论浓度的±10％(单个值在±15％内或等于±15％)的接受标准。

[0383] 在该研究过程中没有计划外死亡。没有临床体征、体重或食物消耗的变化、检眼镜检查发现、行为观察、呼吸参数的变化、器官重量变化或被认为与CWT-001相关的总体或组织病理学发现。在雄性和雌性中在第3天，在0.3或1.5mg，红细胞质量(红血细胞、血细胞比容和血红蛋白)有轻微但剂量依赖性降低以及网织红细胞增加。所有的变化显示了第15天的恢复。

[0384] 总之，通过单一腱内施用的CWT-001施用在Han Wistar大鼠中良好耐受达至1.5mg，并且与瞬时稍低的红细胞质量相关联，并在第3天在网织红细胞中增加，其显示了在第15天的恢复。在寿命或与CWT-001有关的任何组织病理学发现中没有其它。

[0385] 基于以最大可行剂量给药的该研究结果，1.5mg CWT-001被认为是在大鼠中的未见不良影响水平(NOAEL)。

[0386] 实施例5d-在具有14天恢复期的犬中通过肌腱内注入的CWT-001单剂量毒性研究

[0387] 本研究的目的是确定当作为单一肌腱内注入给予犬时CWT-001的潜在毒性，并评估任何发现的潜在可逆性。此外，确定了CWT-001的毒代动力学特性。

[0388] 每只动物接受单剂量的CWT-001，主研究动物在第3天被安乐死并且恢复动物在第15天被安乐死。研究设计在下表7中列出。

[0389] 表7-具有14天恢复期的犬中通过肌腱内注入的单剂量毒性研究的实验设计

[0390]

组号	处理	剂量水平(mg)	剂量体积(μL)	剂量浓度(mg/mL)	调整的剂量浓度(mg/mL)	动物数量			
						主研究		恢复	
						M	F	M	F
1	对照	0	250	0	0	3	3	5	5
2	CWT-001	2.5	250	10	14.2	3	3	-	-
3	CWT-001	12.5	250	50	71	3	3	5	5

[0391] 对照项目＝PBS(138mM氯化钠;8mM磷酸钠)pH 6.8-7.6M＝雄性,F＝雌性,-＝不适用

[0392] 在该研究中评估以下参数和端点:临床观察、体重、食物消耗、眼科学、心血管数据、临床病理学参数(血液学、凝结、临床化学和尿分析)、生物分析(血浆和腱)和毒代动力学参数、大体尸检结果、器官重量和组织病理学检查。

[0393] 最高剂量水平(12.5mg)表示可通过该途径施用的最大可行剂量,其受测试项目的溶解度和可合理地注入到犬的肌腱中的体积的限制(参见实施例5b)。发现所有制剂分析结果在它们理论浓度的±10%(单个值在±15%内或等于±15%)的接受标准内或等于它们理论浓度的±10%(单个值在±15%内或等于±15%)的接受标准。

[0394] 在该研究过程中没有计划外死亡。没有临床体征、体重或食物消耗的变化、检眼镜检查发现、心电学发现、临床病理学发现(血液学、凝结、临床化学和尿分析)、器官重量变化或被认为与CWT-001相关的总体或组织病理学发现。

[0395] 总之,通过单一肌腱内施用的CWT-001施用在比格犬中良好地耐受达至12.5mg,并且仅与施用过程相关的发现相关联。没有与CWT-001相关的生命或组织病理学发现。基于以最大可行剂量给药的该研究的结果,12.5mg CWT-001被认为是在犬中的未见不良影响水平(NOAEL)。

[0396] 实施例6:安全药理学

[0397] 安全药理学端点被纳入到大鼠和犬单剂量毒性研究的设计中(分别为实施例5c和5d)以评估中枢神经系统、呼吸和心血管效应。

[0398] 实施例6a-大鼠中的中枢神经系统(改进的Irwin观察)

[0399] 在给药后2、24和48小时观察来自每组的前6只雄性主研究动物。以下参数包括在观察中:

[0400] • 发声(vocalisation)的出现、机械重复、攻击性、异常步态、管状尾(straub tail)、震颤、抽搐、惊厥、身体姿势、镇静、全身僵硬症、下垂、眼球突出、流涎、流泪、立毛、异常呼吸、排便、排尿和死亡。

[0401] • 增加或减少自发活动、触摸响应、身体痉挛和瞳孔大小。增加的嗅探、梳理、撕抓和竖起(rearing)。

[0402] • 减少的耳廓反射、异常牵引响应和异常抓握强度。还注意到观察到的任何另外的症状。

[0403] • 记录表现症状的动物的频率和症状的严重度。

[0404] • 瞳孔大小:使用指导图来测量以估计按毫米计的大小(在给药记录给药前瞳孔

大小数据)。

[0405] • 体温:通过使用插入肛门括约肌大约2cm的探针测量。还记录给药前体温。为了减少测量可变性,通过在记录给药前测量之前插入温度探针来进行温度习惯性试验,然而,在该试验期间没有收集体温数据。

[0406] 在被认为与施用CWT-001相关的改进的Irwin观察期间没有注意到的发现。在一些时间点在一些动物中观察到抓握强度降低的偶发情况,但是由于这些发现也在对照组中并且在单个时间点观察到,它们被认为与CWT-001的施用无关。没有与CWT-001施用相关的瞳孔大小或体温方面的变化。

[0407] 实施例6b-大鼠中的呼吸测量

[0408] 在测试日,将动物从其家笼中移出并放置在全身体积描记腔室(whole body plethysmograph chamber)中大约45分钟,该周期的最后15分钟被分类为对照期。然后将动物从腔室移出,用于对照或测试项目的给药。然后在给药后2-4、24和51小时进行测量,在任何测量之前将动物放入腔室内适应至少30分钟。在体积描记腔室内补偿腔室温度和湿度对潮气量的影响。从呼吸信号确定通气参数。采样频率固定在500Hz。

[0409] 在被认为与CWT-001施用相关的呼吸参数中没有变化。在研究期间呼吸参数的偶然统计学显著变化零星存在,但是这些被认为是由于在特定时间点的对照组的变化性,或者是最小的和/或瞬时的变化,因此被认为与CWT-001施用无关。

[0410] 实施例6c-犬中的心血管评估

[0411] 处理前(在第1天之前)至少一段26小时的时间、在给药期的第2天至少20小时(在给药后24小时至44小时之间获取数据)和在恢复期的第14天,测量心血管评估。通过套式外部遥测(JET™)系统结合PA-C10-TOX-LA传送器(Data Sciences International(DSI™),美国明尼苏达州圣保罗)记录每只动物的ECG和血压。在第一次录音场次之前,所有动物都被驯化适应JET套,并单个观察以确保它们耐受该过程。在数据采集的那些天,将动物从他们的家圈围栏取出,并取到用于放置ECG导联(lead)和装配套(和套管,如果需要的话)的操作室。将电极放置所需的区域剃刮并适当地制备。使用1分钟记录率连续地获取动脉血压、心率和导联II ECG变量。对于预处理和恢复,进行ECG和BP记录至少26小时。对于第2天,进行ECG和BP记录至少20小时(给药后24至44小时之间采集数据),(T=0等同于测试项目的施用结束)。除进行给药步骤外,动物不受约束。在研究的给药阶段开始之前,从所有动物记录至少26小时持续时间的预处理遥测数据获取。对于任何ECG形态异常、信号质量和心率的正常性、动脉血压和ECG值(包括QTca计算[对于心率校正的QT]),检查这些预处理信号的部分。

[0412] 报告了以下参数:

[0413] • 心脏收缩(SBP)、心脏舒张(DBP)和平均动脉血压(MAP)以及源自血压波形的心率(HR)。

[0414] • 分析ECG参数(RR、PR、QRS、针对个体动物校正的QT、QTca间隔QA间隔[从血压和ECG波形导出的])。打印和检查观察到的任何导联II ECG异常或心律失常。

[0415] 在研究的整个进程中被认为与CWT-001施用有关的心血管参数或波形形态没有变化。在个体动物中存在不被认为是相关测试项目的偶然或瞬时观察,因为它们在对照动物中也被观察到或被认为是由于正常的动物间变化性。

[0416] 实施例6d-生殖和发育毒性

[0417] 大鼠和犬中的单剂量毒性研究没有揭示生殖器官包括睾丸和卵巢的任何治疗有关的器官重量或组织病理学变化。

[0418] 实施例6e-局部耐受性

[0419] 在大鼠和犬中的单剂量毒性研究中已经评估了局部耐受性,并且在注入位点没有揭示任何出乎意料的效果。

[0420] 实施例7:向具有外上髁炎的人受试者施用(图13和14)

[0421] 来自上述实施例的结果表明,本文提供的miR-29化合物在体内(包括在肌腱病的小鼠模型中)减少或抑制胶原3表达是安全的和有效的。此外,发明人先前已经表明,马胶原酶诱导的肌腱病(SDFT)模型反映了人肌腱病,其中在肌腱损伤后miR-29a表达减少并伴随col3:col1比率增加。单个病灶内注入miR-29化合物(100nM,其转化为1.5ml总体积中的约2μg/ml,即3μg的总剂量)降低了胶原3表达和病变尺寸并改善了肌腱结构(参见参考文献3)。这些数据一起提供了使用miR-29化合物(包括本文提供的miR-29化合物)进行安全和有效的人治疗的根本原因。

[0422] 随机化、双盲、安慰剂对照的1期研究评估了在患有外上髁炎的受试者中单次提升剂量的CWT-001注入的安全性、耐受性和药代动力学(参见用于研究设计的图13)。

[0423] 即使长期益处仍有问题,但是当前保健治疗外上髁炎的第2条线(以下理疗)标准仍然将皮质类固醇局部注入到肌腱疼痛的区域。CWT-001局部注入到肘部的伸肌端的肌腱损伤区域,因此与当前护理标准保持一致,但显示出改进的安全性和功效。使用超声引导注入到肌腱损伤区域,因为超声检查通常用作选择的成像模态,不仅用于评估腱的状态,而且还用于引导注入疗法(参考文献15)。

[0424] 研究的主要目的是确定患有外上髁炎的人受试者中单次提升剂量的CWT-001的安全性和耐受性。

[0425] 研究的次要目的是确定患有外上髁炎的人受试者中CWT-001施用的单剂量药代动力学(PK),并评估患有外上髁炎的人受试者中CWT-001施用的功效。

[0426] 研究的主要端点是在注入后14天通过不良事件(AE)的发生、临床实验室异常、生命特征(血压、温度、呼吸率和脉搏率)的变化、12-导联心电图(ECG)参数、身体检查和皮肤评分评估测量的CWT-001与安慰剂之间的安全数据的比较。

[0427] 研究的次级端点是:

[0428] • 通过最大血浆浓度(C_{max})、到C_{max}的时间(t_{max})、血浆下的面积与浓度-时间曲线(AUC)所示的血浆PK浓度数据。

[0429] • 由给药前在第1天至第14天、第28天和第90天使用视觉模拟量表(VAS)测量的单剂量CWT-001对肘部疼痛的功效。

[0430] • 由给药前在第1天至第14天、第28天和第90天使用上肢功能评定表(DASH)评分所测量的单剂量CWT-001对障碍和症状的功效。

[0431] • 由给药前在第1天至第14天、第28天和第90天通过患者评分的网球肘评估(PRTEE)所测量的单剂量CWT-001对疼痛和障碍的功效。

[0432] • 由给药前在第1天至第28天和第90天通过从基线超声评估变化所测量的单剂量CWT-001对侧肘腱的功效。

[0433] 剂量基本原理

[0434] 鉴于上述实验，预期在μg和低mg范围中的miR-29剂量在动物物种中是有效的和良好耐受的，并且可以以能够容易且安全地注入的体积(例如，约1ml)施用。这些剂量水平还证实了靶向胶原的作用机制，例如在改善所使用的动物模型中的肌腱愈合中的作用机制。经由肌腱内施用以CWT-001在大鼠(达至1.5mg，参见实施例5a)和犬(达至12.5mg，参见实施例5b)中进行单剂量延长毒性研究，并且每个研究的未见不良影响水平是最大可行剂量。例如，对CWT-001的单一肌腱内施用的临床前评估并不导致在与2mg的人临床剂量相比在大鼠和犬中41和25倍各自剂量的水平的不利发现。

[0435] 将受试者分成群组(每群组8个受试者)并随机化以接收单个1ml剂量的CWT-001(使用生理盐水，即0.9％w/v NaCl将在PBS和EDTA中的5mg/mL CWT-001溶液稀释成各种终浓度)或匹配的安慰剂(生理盐水，即0.9％w/v NaCl)(3:1)，经由肌腱内注入施用。CWT-001的起始剂量为200μg/mL。将剂量提升为500μg/mL，并且然后是1500μg/mL。如果观察到VAS疼痛评估没有改善，则计划施用4500μg/mL的额外剂量(达至)4500μg/mL，然而这不是必需的。

[0436] 在每个群组中，在第一个给药日给予不超过2个受试者(1个活性;1个安慰剂)，使得不超过1个受试者在每个剂量水平下第一次接受活性CWT-001剂量。在评估先前给药的前哨(sentinel)受试者的安全性和耐受性之后，在每个群组中以相同剂量水平在其余受试者(6个受试者;5个活性，1个安慰剂)中继续给药。

[0437] 在对来自较低剂量的所有安全性、耐受性、血浆PK和功效数据(如果可得)进行满意的检查之后，以逐步上升的方式施用剂量。基于对安全性、耐受性、血浆PK和功效数据(如果可得)的持续评估来确定剂量。在超声引导下，将所有剂量作为1ml注入物给予受影响区域中。

[0438] 在LOGIQ E9超声系统上使用5-7.5MHz线性阵列传感器来应用超声检查。探针沿平行于伸肌总腱的纵向轴的肘部的侧向方向放置。可视化桡骨头、桡肱骨关节、外上髁和伸肌总腱。将皮肤灭菌，并将USG探针封闭在无菌罩中。在精确部位(低信号区域)的针尖端的可视化之后，注入1mL的CWT-001或安慰剂(参见图14)。

[0439] 使用密击技术(peppering technique)(参考文献11)将CWT-001施用于肌腱。所述“密击技术”是注入方法，其中在将针插入到嫩的区域中之后，通过撤回、重定向和重新插入针而不从皮肤露出来执行多次小注入。在受伤的/慢性肌腱情况下，这对于刺激愈合响应可以是优选的。

[0440] 研究群包括24个受试者。每个受试者满足该研究所有的纳入标准，并且没有排除标准。

[0441] 受试者满足该研究中纳入的以下标准：

[0442] 1.受试者是任何种族来源的男性或女性。

[0443] 2.受试者年龄在18至70岁之间(包括18岁和70岁)，没有骨骼不成熟的迹象。

[0444] 3.受试者具有18至35kg/m^2(包括18kg/m^2和35kg/$m^{2)}$的身体质量指数(BMI)。

[0445] 4.受试者≥50kg。

[0446] 5.受试者具有临床诊断的外上髁炎。

[0447] 6.除了外上髁炎和在下文的排除标准列出的任何病况之外，基于医疗历史、身体检查、伴随的药物、生命特征、12-导联ECG和临床实验室评估，受试者如由负责的医师确定的在其他方面是健康的。在研究者的判断下，实验室值可以被再次测试一次。

[0448] 7.受试者的症状可再现为抵抗性旋后或腕背屈(如通过外上髁压痛和积极的拿起椅背动作所证实的)。

[0449] 8.尽管包括以下的一个或组合的保守治疗,但受试者的症状持续至少6周至6个月:

[0450] a.物理疗法

[0451] b.用夹板固定

[0452] c.NSAID

[0453] 9.受试者是独立的、走动的,并且可以遵守所有的注入后评价和随访。

[0454] 10.如果男性受试者的伴侣是生育潜能的妇女,那么他们必须在试验期间使用安全套,并且持续到他们试验药物最终剂量之后3个月。此外,他们生育潜能的女性伴侣在给药前1个月直到给药后3个月必须使用另外的高度有效的避孕方法(当连续并正确地使用时可达到小于每年1%的失败率的避孕方法被认为是高效的生育控制方法)。

[0455] 11.生育潜能的女性受试者必须同意从给药前1个月使用高度有效的避孕方法,与男性伴侣在试验期间中使用安全套并持续到给药后3个月联合。受试者必须在筛查和第1天具有阴性妊娠测试。

[0456] 12.提供书面知情同意书,其包括符合同意书列出的要求和限制。将具有以下任一项的受试者从研究参与中排除:

[0457] 1.在登记之前少于6个月内,受试者已经历了对受影响的肘部的先前皮质类固醇注入疗法。

[0458] 2.受试者在IMP施用前至少1周不愿意或不能停止使用疼痛药物(麻醉剂或NSAID)。

[0459] 3.受试者已经接收了对受影响的肘部的先前的PRP注入。

[0460] 4.受试者使用或已最近使用已知影响骨架的药物(例如糖皮质激素使用>5mg/day,氟喹诺酮抗生素)。

[0461] 5.受试者已经经历了对受影响的肘部的外科手术,以用于治疗外上髁炎。

[0462] 6.受试者具有以下任一项的阳性医学历史:

[0463] a.内上髁炎

[0464] b.桡管综合征

[0465] c.腕管综合征

[0466] d.在登记前的前2年内受影响的肘部中的脓毒性或痛风性关节炎

[0467] e.登记前的前6个月内的颈神经根病

[0468] f.在过去6周内对受影响的肘部的创伤

[0469] g.神经肌肉或原发性/继发性肌肉缺陷,其限制了执行功能测量(例如,抓握强度测试)的能力

[0470] h.符合风湿病学的、炎性疾病,其包括但不限于轴性脊柱炎、银屑病关节炎和类风湿性关节炎

[0471] i.受影响的肘部的骨关节炎

[0472] j.判断为足以损害响应评价的纤维肌瘤

[0473] 7.受试者当前在注入部位具有急性感染。

[0474] 8.淋巴细胞增殖性疾病或任何已知恶性肿瘤的历史或任何器官系统的恶性肿瘤的历史(除了基底细胞癌、鳞状细胞癌或在过去5年中没有复发迹象已被治疗的皮肤的光化性角化病、子宫颈的原位癌或已被去除的非侵入性恶性结肠息肉),在基线之前的过去5年内被处理或未被处理,而不管是否存在局部复发或转移的迹象。

[0475] 9.受试者在身体上或精神上受到损害(例如,当前正治疗精神障碍、老年性痴呆、阿尔茨海默病等)到调查员判断受试者不能或不太可能保持顺从的程度。

[0476] 10.受试者已接收调查疗法或批准的疗法,用于在注入过程的30天内或在研究的后续阶段期间的研究用途。

[0477] 在每次随访前和在CRU中时,受试者应放弃剧烈运动48小时。在注入调查药物产品(IMP)之后至少24小时,也不允许受试者操作任何机动车辆。要求受试者遵守以下限制:

[0478] • 在每次随访之前受试者应放弃酒精48小时,直到从临床研究单元(CRU)撤出之后。

[0479] • 在给药之前90天,受试者应放弃烟草和含尼古丁产品(包括电子烟),贯穿整个研究直到研究完成。

[0480] • 在筛查和每次随访之前48小时,受试者应克制吃罂粟籽,以避免滥用药物筛查的阳性结果。

[0481] 给药前8小时受试者禁食过夜。此外,在进行临床实验室评估的任何随访之前至少4小时,建议受试者禁食。

[0482] 筛查时的超声评估在4周筛查周期期间的任何时间进行,并且包括对侧肘部对面(contra-lateral elbow)的扫描。在给药前至少1周,需要受试者已经中断了任何已用于疼痛管理的麻醉剂或NSAID药物的使用。从第-7天至第-1天,允许受试者服用扑热息痛(小于或等于4g/天)或使用冰包来管理疼痛。

[0483] 受试者在第-2/-1天参加CRU并在给药前第1天参加以确认资格并经历安全性和功效基线评估。在确认资格后,使受试者随机化并给予CWT-001或安慰剂。在注入后,将受试者休息30分钟。受试者经历给药后安全性和PK评估,并在同一天从CRU撤出。受试者在第2天返回CRU进行PK采样评估,以及在第7天进行安全性和PK评估。受试者在第14天、第28天和第90天返回CRU进行安全性和功效评估(以下提供的进一步细节)。受试者在第28天和第90天经历超声评估。每个受试者的研究持续时间为约16周。

[0484] 通过以下仪器来评估肌腱病对患者健康相关生活质量的各个方面的影响,所述仪器是在上肢肌腱病中时被接受、经验证的患者报告结果工具(参考文献16):在注入后第28和90天,肌腱病疼痛强度(VAS)的受试者评估、QuickDASH评分、ASES-E评分、PRTEE评分和肌腱的超声评估。

[0485] 停止标准包括:

[0486] • 在1个受试者中的"严重(serious)"不良反应,即被考虑至少可能与IMP施用有关的严重不良事件(SAE,以下定义的)。

[0487] • "重度(severe)"非严重不良反应,即在同一群组中的2个受试者中,至少可能与IMP施用有关的重度非严重AE,无论在同一系统器官类(SOC)内或不在同一系统器官类(SOC)内。

[0488] • 如果基于所观察到的AE的特性、频率和强度和/或临床安全监测存在不可接受

的耐受性特征。

[0489] 在临床研究期间,AE是在研究受试者中出现或者从筛查中恶化的任何不良医学事件(untoward medical occurrence),而不管其与药用产品的潜在关系。因此,AE可以是任何不利的或非预期的体征,包括临床上显著的异常实验室发现、症状或疾病。

[0490] SAE是在任何剂量下的不良医学事件:

[0491] • 导致死亡,

[0492] • 是威胁生命的,

[0493] o注意:在定义'严重的'中的术语'威胁生命的'是指受试者在事件时处于死亡风险的事件。它不是指如果它是更重度的,假设可能已导致死亡的事件

[0494] • 需要住院或延长现有住院,

[0495] o注意:一般来说,住院表示受试者已经在医院或急诊病房中被留下(通常涉及至少过夜停留)以进行观察和/或治疗,这在医生的办公室或外面的环境中将是不合适的。在住院期间发生的并发症是AE。如果并发症延长了住院或满足任何其它严重的标准,则事件是严重的。当怀疑"住院"是否发生或是必需的时,AE应被认为是严重的。

[0496] • 导致持久性或显著的障碍或无能。

[0497] o注意:术语'障碍'是指对人进行正常生活功能的能力的显著破坏。该定义并不旨在包括相对小的医学意义的经历,例如不复杂的头痛、恶心、呕吐、腹泻、流感和意外创伤(例如,扭伤的踝),这可能干扰或阻碍日常生活功能,但不构成实质性破坏。

[0498] • 是先天性异常或出生缺陷,

[0499] • 是重要的医学事件。

[0500] o注意:在决定报告是否在其它情况(诸如可能不会立即危及生命、或导致死亡或住院,但可能危及受试者或可能需要医学或外科干预以避免在上述定义中列出的其它结果中的一个的重要医学事件)下是适当的,应当运用医学或科学判断。这些也应该被认为是严重的。这些事件的实例是侵入性或恶性癌症,在急诊室中或在家庭中用于过敏性支气管痉挛的密集治疗,不导致住院治疗的血液恶质病或惊厥,或药物依赖或药物滥用的发展。

[0501] o注意:术语"严重的(serious)"和"重度的(severe")"不是同义的。术语"重度的"通常用于描述特定事件的强度(严重程度(severity))(如在轻度、中度或重度心肌梗死中);然而,事件本身可能具有相对较小的医学意义(例如重度头痛)。这并不与"严重的"相同,"严重的"是基于上述受试者/事件结果或动作标准的,并且通常与对受试者的生命或功能施加威胁的事件相关联。重度的AE不一定需要被认为是严重的。例如,几小时持续时间的持续恶心可以被认为是重度的恶心,但不是SAE。另一方面,导致仅小程度的障碍的中风可以被认为是温和的,但是基于上述标准将被定义为SAE。严重性(seriousness)(不是严重程度)用作限定监管报告义务的指导。

[0502] 在研究期间,没有一个受试者满足任何停止标准。

[0503] 药代动力学评估

[0504] 通过测量miR29a的连续血浆浓度来评估CWT-001的药代动力学。

[0505] 在给药前30分钟内收集基线PK血液样本。用于测定miR29a血浆浓度的血液样本在下表9中所述的时间点取得。通过非房室模型方法分析血浆浓度-时间数据。标称时间用于初步决定(interim decision),然而实际采样时间用于最终计算。在表8中提供了近似的采

样体积。

[0506] 表8-采样总结

[0507]

样本类型	样本目标	样本数(每样本的体积)	总体积(mL)
血液	血液学	5 (2.0 mL)	10.0 mL
血液	生物化学	5 (5.0 mL)	25.0 mL
血液	凝结	5 (4.5 mL)	22.5 mL
血液	药代动力学	12 (3.0 mL)	36.0 mL
	总血液:		93.5 mL

[0508] 出于安全原因,如果需要,抽取了另外的样本。如果需要,可以采用达至2个另外的药代动力学样本,以便阐明药代动力学曲线。

[0509] 收集药代动力学血浆样本,并使用在Thermo Fisher开发的经验证的定量实时PCR方法定量miR29a。

[0510] 表9-评估计划

[0511]

	筛查		治疗周期		FU	EOS
评 估 计 划	-4周	-1周	第1周	第2周	第4周[a]	第 13 周

[0512]

	第-28天至第-3天	第-2天/第-1天	第1天	第2天	第7天 (±1天)	第 14 天 (±2天)	第28天(±2天)	第90天(±2天)
药代动力学评估								
血液采样[l]			给药前，给药后0.5、1、2、3、4、6、8、12小时	给药后24和36小时	X			
功效评估								
肘部疼痛/肌腱疼痛调查表			X[m]			X	X	X
上肢功能评定调查表(DASH)			X[m]			X	X	X
美国肩肘外科协会评分(ASES-E)			X[m]			X	X	X
患者评分的网球肘评估(PRTEE)			X[m]			X	X	X
侧肘腱的超声评估	X[n]						X	X

[0513] 缩写:EOS-结束研究;FU-随访;PK-药代动力学。a在给药后28天,或在早期停药(如果适用)时进行随访。

[0514] 功效评估-视觉模拟量表

[0515] 受试者在治疗后的前14天每天以日记评估疼痛一次,对前24小时期间的疼痛进行评分。第14天后,受试者保持每周疼痛日记,直至注入后第90天。在“请用通过水平线的垂直标记(|)表示您在过去24小时期间因肌腱病变而具有的最大疼痛”的问题之后,使用100mm视觉模拟量表(VAS)对受试者的疼痛进行评估,范围从“无疼痛”到“难以忍受的疼痛”。VAS是经验证的测量工具,它试图测量被认为横跨连续值并且不容易被直接测量的特征或态度(attitude)。它常用于流行病学和临床研究,以测量各种症状的强度或频率(参考文献17)。

[0516] 结果显示在图17中。对于所有受试者组,接受200μg(图17A)、500μg(图17B)或1500μg(图17C)剂量的CWT-001的那些以及接受安慰剂盐水注入的那些,观察到VAS分数的减少。VAS分数的这些减少通常超过为-11的用于治疗肘部疼痛的VAS的最小临床意义差异(MCID)(参考文献18)。测定接受任何剂量的CWT-001的所有受试者的VAS分数的平均变化,并与安慰剂进行比较(图17D)。在第28天用CWT-001处理导致VAS分数的变化超过用安慰剂观察到的变化。对于CWT-001处理的受试者,在第90天观察到的VAS分数的平均变化是-33±7,其对应于3MCID的变化。

[0517] 整形外科中的随机控制试验(RCT)已经评估了使用生理盐水(NS)注入作为安慰剂/对照组,期望该物质没有生理影响。然而,如在本领域内的当前最佳证据所建议的(参考文献18、19、20、21),在本领域中提出了关于NS是否可以充当合适的安慰剂的问题。例如,关

节内盐水注入到患有骨关节炎的患者中的膝关节中的最近研究(参考文献22),表明了盐水可靠和潜在有益效果,诸如疼痛缓解和渗透压相关的变化。从分子和生理学观点,在用TNF-a和IL-1b诱导后,高渗盐水施用有助于减少促炎细胞因子(RANTES、MCP-1、IP-10、G-CSF)以及钠离子和渗透压如何有助于骨关节炎病理学,因此表明它是一种有效的抗炎媒介(mediator)。在肌腱内注入盐水用作对照的肌腱病临床试验中,已知存在VAS分数的70%降低的安慰剂效果(参考文献18)。

[0518] 对NS作为安慰剂特别在外上髁炎试验中的最近系统性综述(参考文献23)发现,在除了检查的一项RCT外的所有中,在盐水和非盐水(富血小板血浆(PRP)、自体条件血浆(ACP)、皮质类固醇和肉毒杆菌毒素)注入之间,在患者报告结果测量(PROMS)方面没有统计学上的显著差异,NS发挥与所测试的可注入疗法相似的治疗效果。基于这项工作,在本领域内提出,由于缺乏强有力的证据来阐明NS注入的原理、生理学特征、作用和潜在机制,替代的对照方法,诸如假注入器/针可作为更好的研究对照组(如Boesen等,2017中描述的;参考文献24)。

[0519] 鉴于与肌腱病研究中使用肌腱内盐水注入物作为安慰剂相关的已知问题,将接受任何剂量CWT-001的所有受试者的VAS分数的平均百分比变化另外与分开的研究中接受外上髁炎替代治疗的受试者的VAS分数的平均百分比变化进行比较(图17E;参考文献25)。该研究发现皮质类固醇、富血小板血浆(PRP)和昔罗卡因治疗外上髁炎均安全和有效。该研究中以CWT-001治疗观察到的VAS百分比变化超过了在所有时间点观察到的每个已知治疗的VAS百分比变化。

[0520] 功效评估-ASES-E评分

[0521] ASES评分是由美国肩肘外科医师协会开发用于评估肩和肘功能(参考文献26)。ASES-E评分是自填的,并且在症状和功能方面有17个问题。疼痛的严重程度在10cm视觉模拟量表上分级,范围从0(完全没有疼痛)到10(疼到不能再疼)。回忆期是受试者此时此刻的感觉。选择该经验证的工具是因为它结合了受试者报告结果和医生对肘部活动范围和力量变化的评估(参考文献27)。

[0522] 功效评估-上肢功能快速评定表(DASH)评分

[0523] Quick DASH是DASH的缩写形式,DASH是一种受试者报告结果工具,由美国骨科医师学会(American Academy of Orthopaedic Surgeons)与工作与健康研究所(the Institute for Work&Health)(加拿大安大略省多伦多)共同开发。Quick DASH指数是自填的,并且使用11个项目来测量患有上肢任何或多种肌肉骨骼紊乱的受试者的身体功能和症状。该经验证的结果测量(参考文献21)提供了CWT-001注入后受试者中功能性变化的核心信息。

[0524] QuickDASH的每个项目有五个回答选项:1=无难度;2=轻度难度;3=中度难度;4=重度难度;5=不能。

[0525] 结果如图18所示。观察到接受200μg(图18A)、500μg(图18B)、或1500μg(图18C)剂量的CWT-001的受试者的QuickDASH分数降低。在90天时,对于每个给药群组,接受CWT-001的受试者比接受安慰剂生理盐水注入的受试者在QuickDASH分数上的下降幅度更大。测定接受任何剂量CWT-001的所有受试者的QuickDASH分数的平均变化,并与安慰剂进行比较(图18D)。在所有时间点以CWT-001处理导致QuickDASH分数的变化超过用安慰剂观察到的

变化。已接受任何剂量CWT-001的受试者的QuickDASH分数的平均变化也超过了患有上肢肌肉骨骼紊乱的患者中为DASH建立的MCID,其是-20分(参考文献28)。已接受任何剂量CWT-001的受试者在第90天的QuickDASH分数相对于给药前分数的平均改善为-53±5分。

[0526] 功效评估-患者评分的网球肘评估(PRTEE)

[0527] 以前被称为患者评分的前臂评价调查表的PRTEE,是15项自我报告的调查表,用于测量具有网球肘的人中感知的疼痛和障碍。它有三个子标度:疼痛、日常活动和具体活动。疼痛子标度有五个项目关于不同活动期间的疼痛强度。具体活动子标度有六个项目涉及在进行具体活动比如举起咖啡杯时所经历的困难。"日常活动"子量表中的四个项目记录了在进行日常角色(包括在工作和娱乐中所进行的那些)中所经历的困难。PRTEE是特定疾病自我报告测量的一个极好的例子。这对于捕捉疼痛和功能方面非常有帮助,相比通常的关节特定或区域特定测量这对于网球肘更有针对性。这个经验证的结果测量(参考文献27)提供了CWT-001注入后受试者功能性变化的核心信息。

[0528] 结果如图19所示。对于接受200μg(图19A)、500μg(图19B)、或1500μg(图19C)剂量的CWT-001的受试者观察到PRTEE分数降低。在所有时间点,对于接受200μg剂量的CWT-001的受试者观察到的PRTEE分数的降低超过接受安慰剂的受试者的PRTEE分数的降低。

[0529] 测定所有接受任何剂量的CWT-001的受试者的PRTEE分数的平均变化,并与安慰剂进行比较(图19D)。接受任何剂量的CWT-001的受试者在第90天的PRTEE分数的平均改善为基线给药前分数的71±6%。这超过了定义为PRTEE"更好"或"完全恢复"的临床意义的MCID,其是基线分数的37%的改善(参考文献29)。

[0530] 功效评估-超声评估

[0531] 由于肘部水平的侧腱复合物位于皮下组织和筋膜的下方,因此很容易进行超声检查。通常,复合物被看作是在相应附着物之间排列的高回声线性结构。侧肘肌腱病的特征性超声发现包括肌腱内病灶低回声区域,这与正常的内部胶原纤维排列模式的丧失有关。重要地,研究已经表明超声特征与疾病过程一致,并且证明了在治疗后使用VAS和DASH评分的症状改善的解决(参考文献30)。基于临床前模型,分别于注入后第28天和第90天进行超声评估。重要地,这为CWT-001(改善胶原结构)的作用机制,治疗后恢复到正常肌腱结构提供了数据,这有利于受试者恢复和治疗的持久性。

[0532] 称为超声组织表征(UTC)的成像方式可用于可视化肌腱结构和量化肌腱基质完整性(参考文献31)。与二维超声和彩色多普勒不同,UTC客观地将灰色标度肌腱基质变化量化为与肌腱完整性相关的4种不同的回声类型。I型(绿色)和II型(蓝色)表示有组织的基质;III型(红色)和IV型(黑色)表示无序基质(图20A)。与传统超声相比,该工具的优势在于,它可以捕获肌腱的三维超声图像,并使用标准化参数(换能器倾斜角度、深度和增益设置)。双侧扫描(双侧肘)由一名具有执行UTC扫描经验的检查人员执行。使用放置在跟踪装置(UTC Tracker,UTC Imaging,荷兰,斯泰因(Stein))中的7-10MHz线性超声换能器(SmartProbe 12L5-V,Terason 2000+;Teratech;美国马里兰州伯灵顿),该跟踪装置沿着肌腱长轴自动移动5cm的距离,以0.2mm的间隔记录规则图像。换能器的倾斜、角度、增益、焦距和深度由跟踪装置标准化。来自矢状面、冠状面和横断面的图像被编译,以创建肌腱的三维视图。超声组织特征型评估在治疗前(4周内)和在第28天以及第90天进行。

[0533] 为在注入前(图20B)、第28天(图20C)和第90天(图20D)已经接受安慰剂的受试者,

以及在注入前(图20E)、第20天(图20F)和第90天(图20G)已经接受200μg CWT-001的受试者提供了侧肘的代表性超声图像。

[0534] 量化受试者的UTC I型、II型、III型和IV型肌腱组织的百分比以及修复肌腱(UTC I型和II型)对退行性肌腱(UTC III型和IV型)的总百分比。对于每个剂量群组,从第0天到第28天到第90天,接受CWT-001的受试者的修复肌腱组织特别是完整UTC I型肌腱的百分比增加,并且接受CWT-001的受试者比接受安慰剂的受试者高得多。在研究期间,相对于安慰剂组,退行性肌腱特别是受损最严重的UTC IV型肌腱有相应减少(见图20H、I为200μg CWT-001,图20J、K为μg CWT-001,图20L、M为1500μg CWT-001)。

[0535] 从第0天到第28天($P<0.05$)和到第90天($P<0.01$),接受任何剂量CWT-001的所有受试者的修复肌腱的平均百分比显著增加,而接受安慰剂的受试者没有观察到显著变化。在第28天($P<0.05$)和第90天($P<0.01$),已经接受CWT-001的受试者比已经接受安慰剂的受试者还具有显著更高水平的修复肌腱,并且在第28天($P<0.05$)和第90天($P<0.01$),已经接受CWT-001的受试者比已经接受安慰剂的受试者具有显著更低水平的退行性肌腱。

[0536] 因此,UTC数据表明,在以单一200μg、500μg或1500μg剂量的CWT-001处理后,患有外上髁炎的人受试者的肌腱结构中可量化的改善。

[0537] 实施例8-掌肌腱膜挛缩症(图15和16)

[0538] 对健康和掌肌腱膜挛缩症的筋膜组织中的miR-29表达进行qPCR分析(健康组4个样本,掌肌腱膜挛缩症组3个样本)。结果显示,相对于经历腕管释放手术的健康对照组,来自掌肌腱膜挛缩症组织样本的miR29a水平显著降低(图15)。这些实验表明,在掌肌腱膜挛缩症中观察到的纤维化生长与miR29a表达的降低相关联。该观察表明,miR-29替代疗法可以预防或减少掌肌腱膜挛缩症中胶原过度产生。

[0539] 为了进一步研究miR-29替代疗法是否可用于治疗掌肌腱膜挛缩症,将培养的掌肌腱膜挛缩症成纤维细胞用5μM的miR-29a模拟物、miR-29b模拟物、miR-29c模拟物、CWT-001、CWT-001拮抗剂或加扰的miR-29a对照处理。通过qPCR分析治疗后胶原1和胶原3的表达水平。

[0540] 结果显示,相对于以加扰的miR-29对照的处理,在以miR-29a模拟物、miR-29b模拟物、miR-29c模拟物或CWT-001处理后,胶原1(图16A)和胶原3(图16B)的表达均显著降低。这些数据表明,使用诸如CWT-001的miR-29模拟化合物处理在掌肌腱膜挛缩症的治疗中可以是有效的。

[0541] 实施例9-佩罗尼氏病

[0542] 将CWT-001施用至患有佩罗尼氏病的受试者进行单个病灶内(阴茎内)注入到阴茎白膜。受试者为具有早期(急性期或活动期)佩罗尼氏病的男性,阴茎曲度≤30°和/或明显的斑块范围<2cm(基于Kelami分类,参考文献32)。注入后随访受试者1年。功效评估包括阴茎曲度、阴茎双功能多普勒超声、疼痛VAS、IEFF调查表和PDQ调查表。

[0543] 应理解,本发明仅以实例的方式进行描述,并且可以在保留本发明的范围和精神的同时进行修改。

[0544] 参考文献

[0545] [1]Millar et al.(2015)Nature Communication.6:6674

[0546] [2]WO 2015/107340

[0547] [3]Watts et al.(2017)Mol Ther.25(10):2415-2426

[0548] [4]Maurer et al.(2010)Arthritis Rheum.62(6):1733-43

[0549] [5]Fabbri et al.(2012)PNAS109(31)E2110-E2116

[0550] [6]Menzel et al.(1979)Hand 11,243-248

[0551] [7]Tubiana et al.(1968)Surgical Clinics of North America,48(5):979-984

[0552] [8]Castiglione et al.(2019)Sex Med.Mar;7(1):94-103

[0553] [9]Ralph et al.(1997)J Urol Jan;157(1):291-294

[0554] [10]Somers et al.(1989)J Urol 141,629-631

[0555] [11]Nagraba et al.(2013)Ortop Traumatol Rehabil.15(2):109-116

[0556] [12]Lake et al.(2008)Disabil Rehabil 30:1530-1541

[0557] [13]Lindow et al.(2012)Nat Biotechnol.30(10):920-3

[0558] [14]Robbins et al.(2009)Oligonucleotides 19:89-102

[0559] [15]Sorani&Campbell(2016)Br J Radiol.89(1057);20150368

[0560] [16]Macdermid et al.(2015)J Orthop Sports Phys Ther.45(11):950-964

[0561] [17]Hjermstad et al.(2011)J Pain Symptom Manage.41(6):1073-1093

[0562] [18]Acosta-Olivo et al.(2020)Am J Sport Med.48(12):3094-3102

[0563] [19]Previtali et al.(2020)Cartilage 18:1-12

[0564] [20]Wolf et al.(2011)J Hand Surg Am 36(8):1269-72

[0565] [21]Gazendam et al.(2021)Brit J Sport Med.55:256-261

[0566] [22]Bar-Or et al.(2017)Open Rheumatol J.31;11:16-22

[0567] [23]Gao et al.(2019)Athroscopy.35(6):1847-1859

[0568] [24]Boesen et al.(2017)Am J Sports Med.45(9):2034-2043

[0569] [25]Reddy et al.(2016)J Trauma Treat 5:304

[0570] [26]Richards et al.(1994)J Shoulder Elbow Surg.3(6):347-352

[0571] [27]Longo et al.(2008)Br Med Bull.87:131-161

[0572] [28]Franchignoni et al.(2014)J Orthop Sport Phys.44(1):30-9

[0573] [29]Poltawski et al.(2011)Hand Therapy.16(3):52-57

[0574] [30]Clarke et al.(2010)Am J Sports Med.38(6):1209-1214

[0575] [31]van Schie et al.(2010)Br J Sports Med.44(16):1153-1159

[0576] [32]Kelâmi(1983)Urol Int.38(4):229-233

SEQUENCE LISTING
<110> 高士威治疗有限公司
<120> MICRORNA-29化合物、组合物及其治疗用途
<130> P076689WO
<140>未分配
<141>2021-10-25
<150>GB 2016863.9
<151>2020-10-23
<160> 8
<170> SeqWin2010, 版本1.0
<210> 1
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引导链
<400> 1
uagcaccauc ugaaaucggu ua 22
<210> 2
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 乘客链
<400> 2
acugauuucu uuugguguuc ag 22
<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 乘客链
<400> 3
acugauuucu uuugguguuc a 21
<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 乘客链
<400> 4
accgauuuca auuggugcua g 21
<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 乘客链
<400> 5
accgauuuca gauggugcua g 21
<210> 6
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 乘客链
<400> 6
accgauuuca gauggugcua 20
<210> 7
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 乘客链
<400> 7
gacuuguggu uuucuuuagu ca 22
<210> 8
<211> 7
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 种子序列
<400> 8
agcacca 7

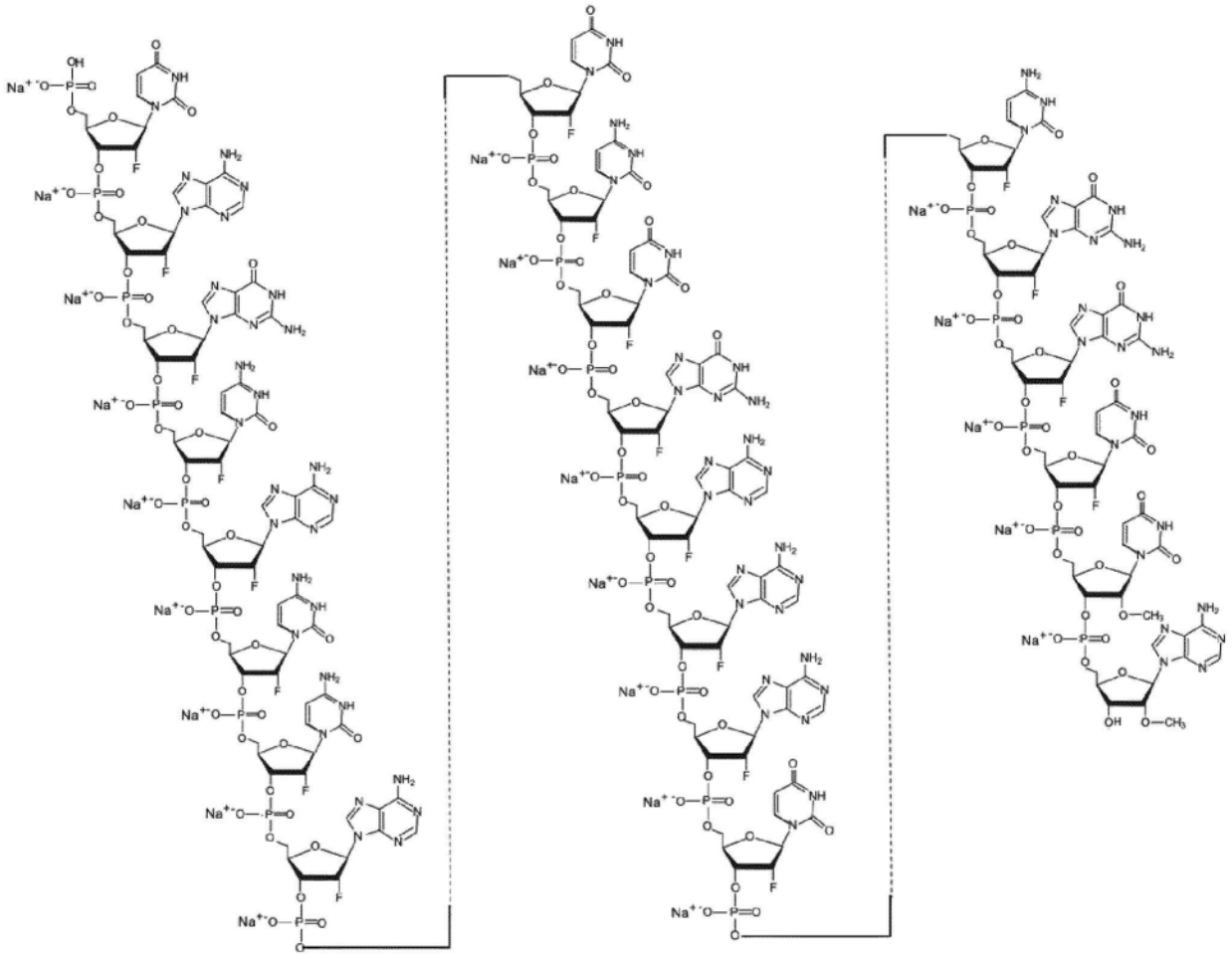


图1A

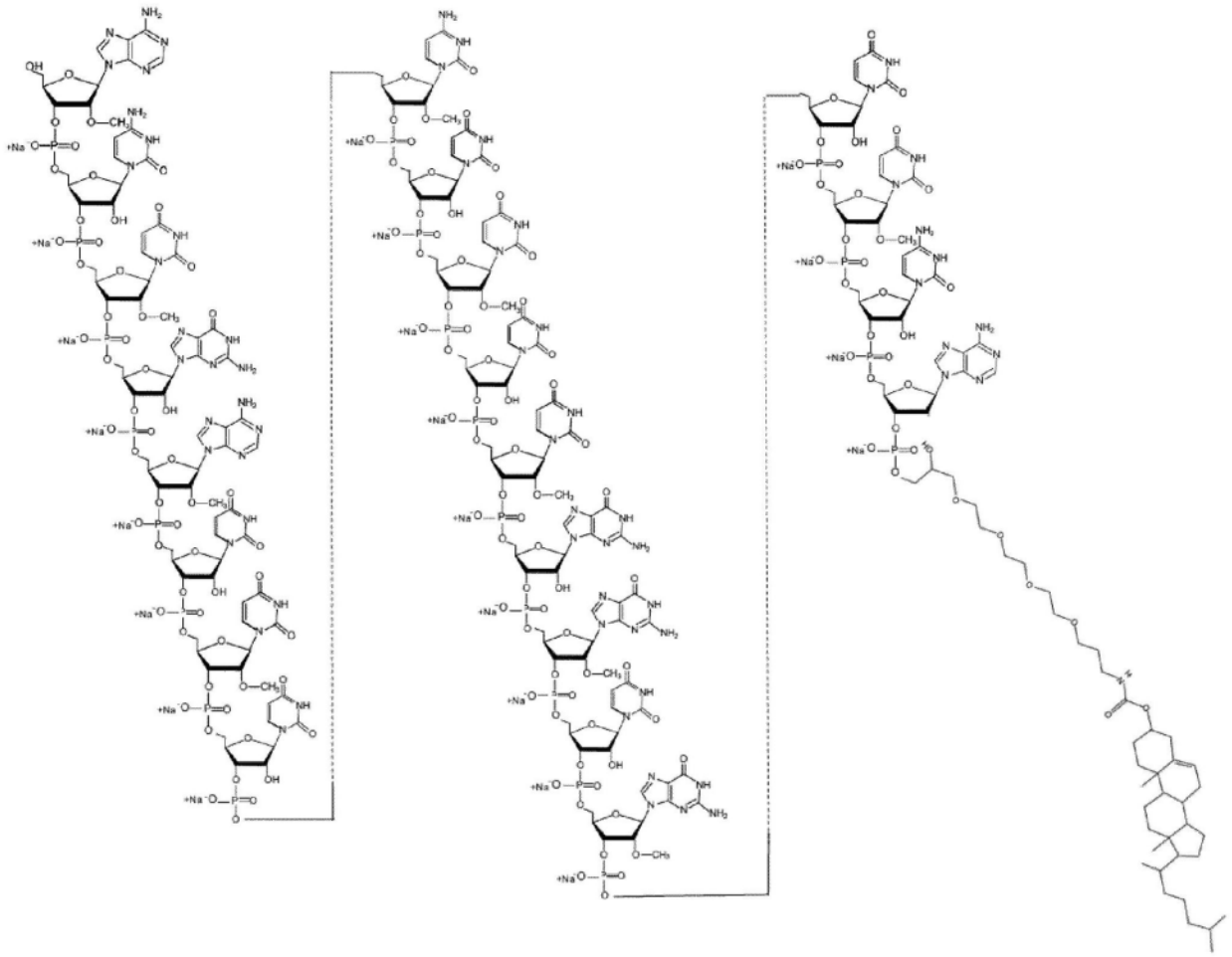


图1B

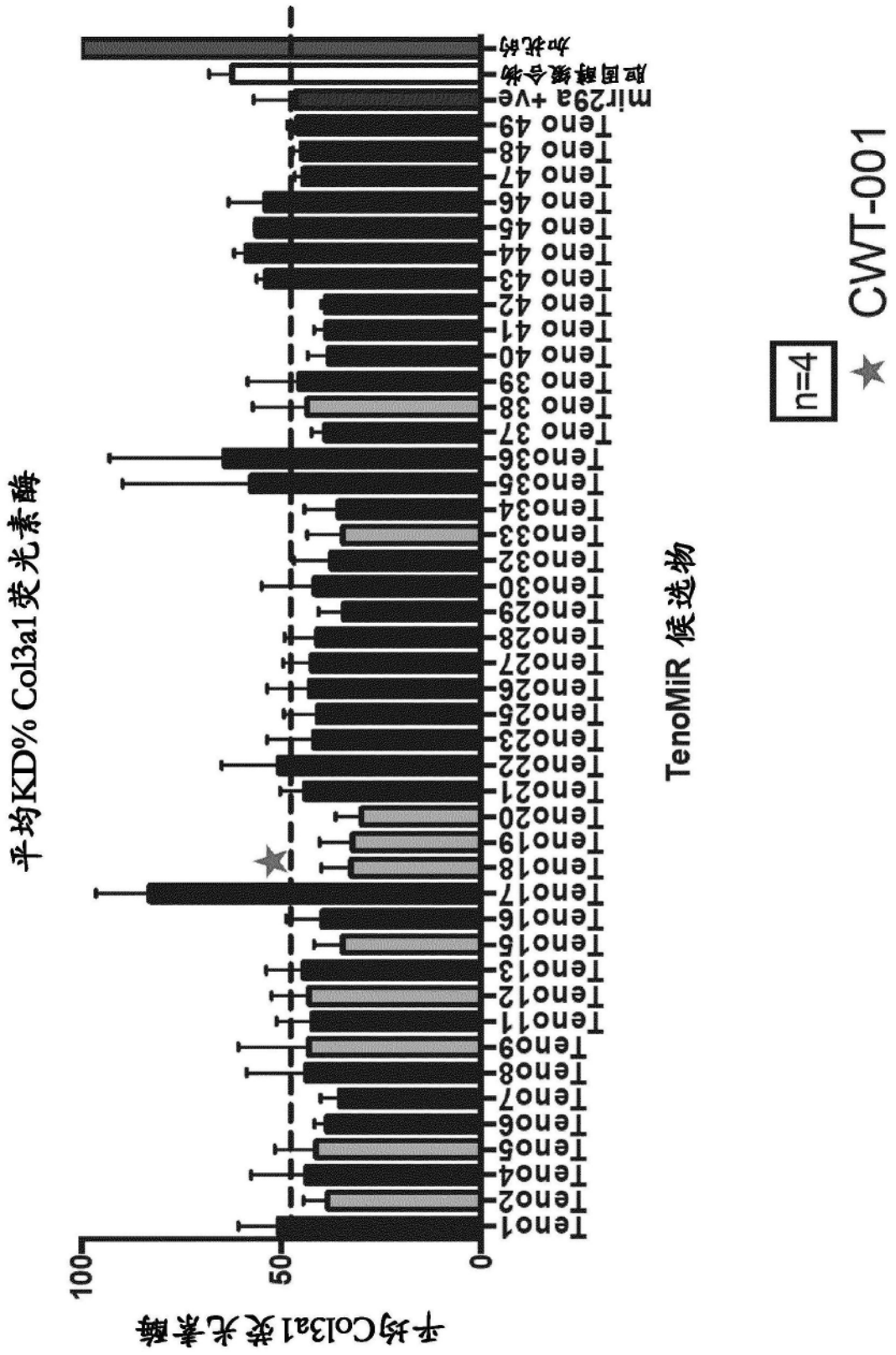

平均KD% Col3a1荧光素酶
TenoMiR 候选物
平均Col3a1荧光素酶
100
50
0
Teno1
Teno2
Teno4
Teno5
Teno6
Teno7
Teno8
Teno9
Teno11
Teno12
Teno13
Teno15
Teno16
Teno17
Teno18
Teno19
Teno20
Teno21
Teno22
Teno23
Teno25
Teno26
Teno27
Teno28
Teno29
Teno30
Teno32
Teno33
Teno34
Teno35
Teno36
Teno 37
Teno 38
Teno 39
Teno 40
Teno 41
Teno 42
Teno 43
Teno 44
Teno 45
Teno 46
Teno 47
Teno 48
Teno 49
miR29a +ve
胆固醇缀合物
加扰的
n=4
CWT-001

图2

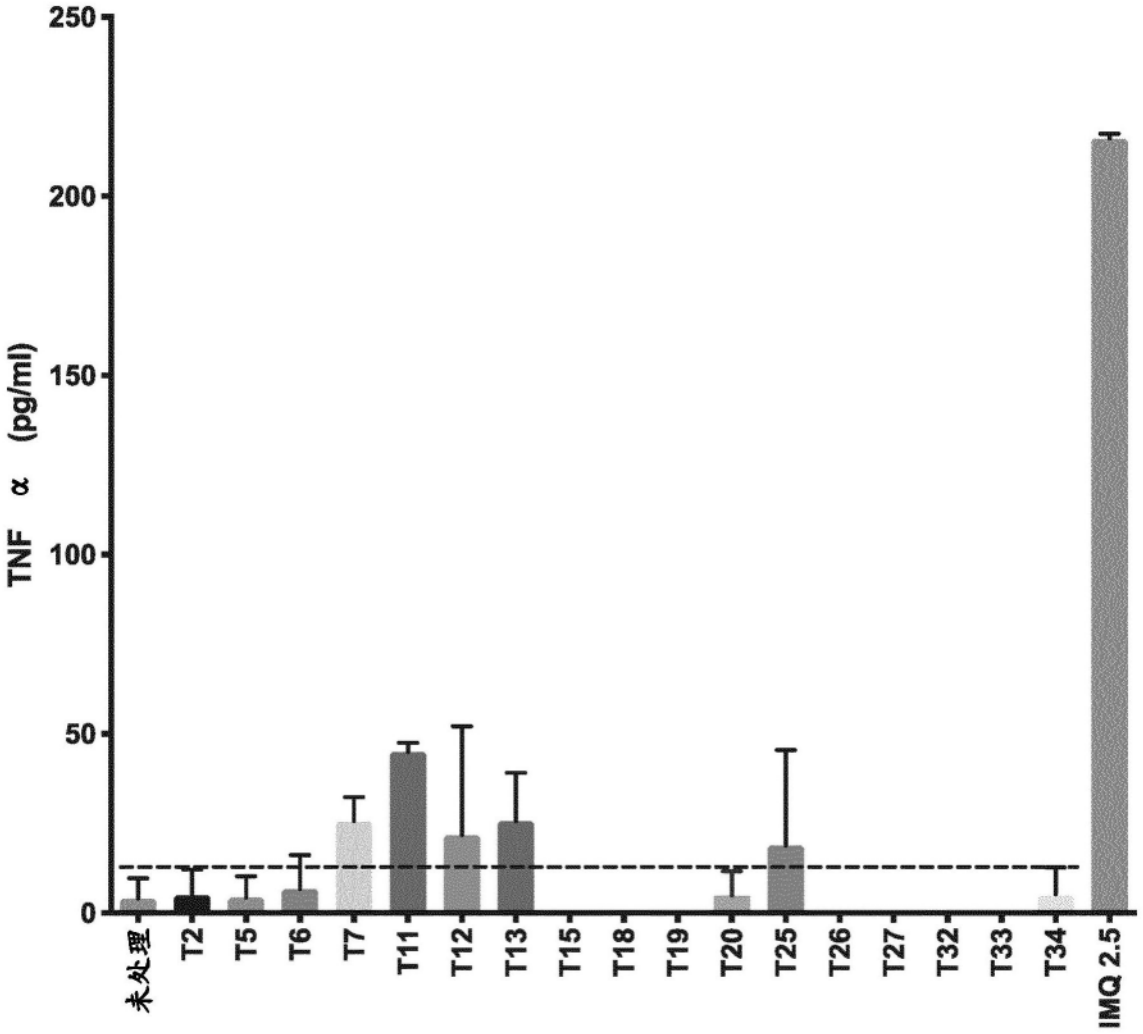

250
200
150
100
50
0
TNF α (pg/ml)
未处理
T2
T5
T6
T7
T11
T12
T13
T15
T18
T19
T20
T25
T26
T27
T32
T33
T34
IMQ 2.5

图3A

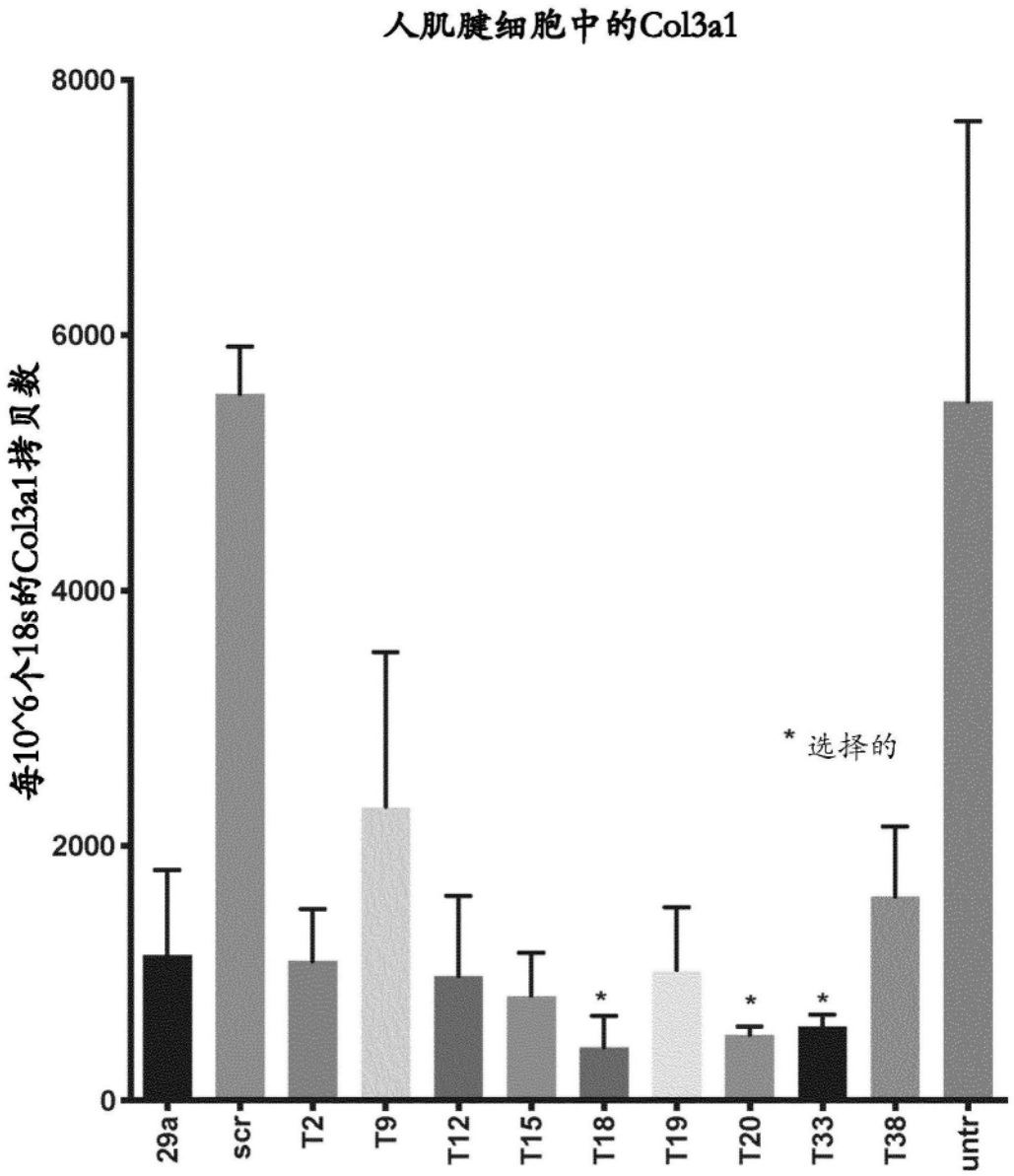

人肌腱细胞中的Col3a1
每10^6个18s的Col3a1拷贝数
8000
6000
4000
2000
0
* 选择的
29a
scr
T2
T9
T12
T15
T18
T19
T20
T33
T38
untr

图3B

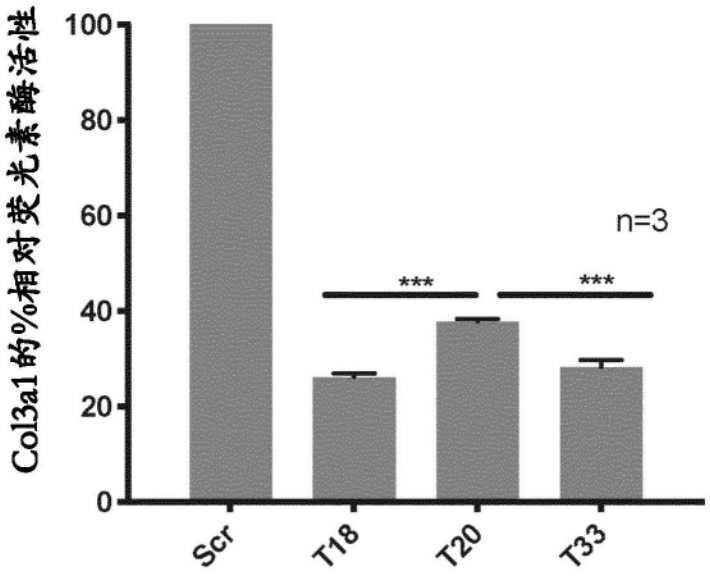

Col3a1的%相对荧光素酶活性
100
80
60
40
20
0
n=3
***
***
Scr
T18
T20
T33

图3C

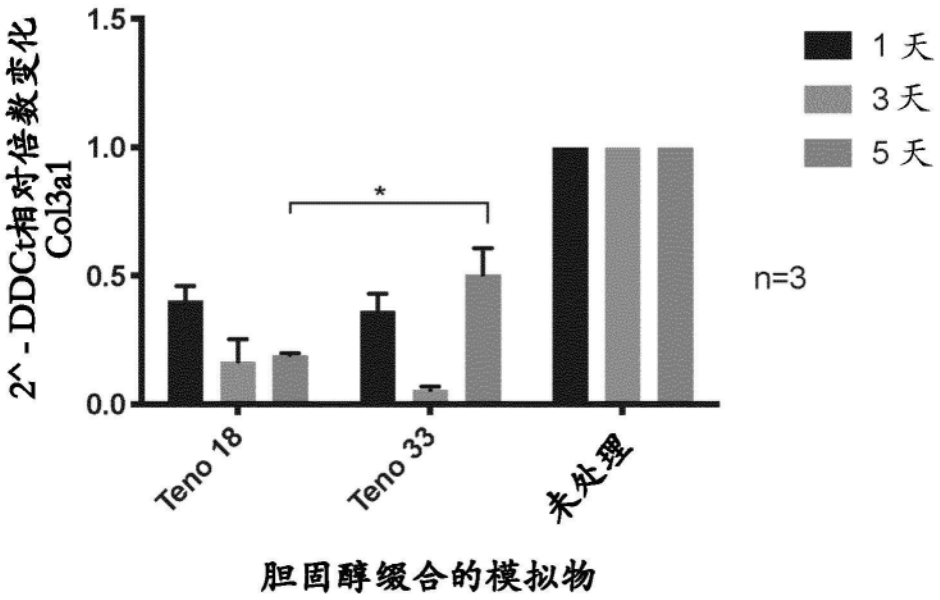

2^-DDCt相对倍数变化
Col3a1
1.5
1.0
0.5
0.0
*
n=3
1 天
3 天
5 天
Teno 18
Teno 33
未处理
胆固醇缀合的模拟物

图3D

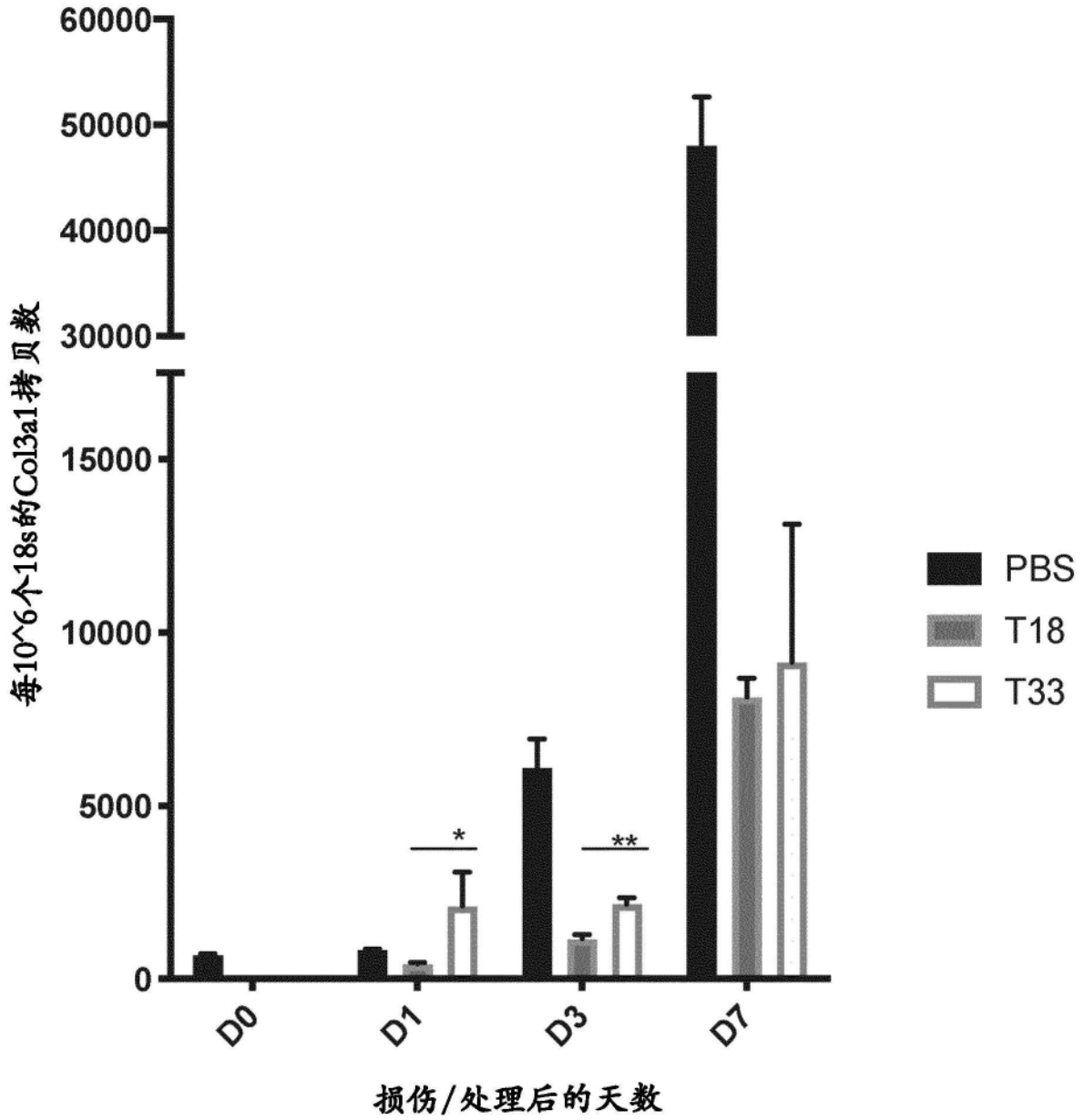

60000
50000
40000
30000
15000
10000
5000
0
每10^6个18s的Col3a1拷贝数
*
**
D0
D1
D3
D7
损伤/处理后的天数
PBS
T18
T33

图3E

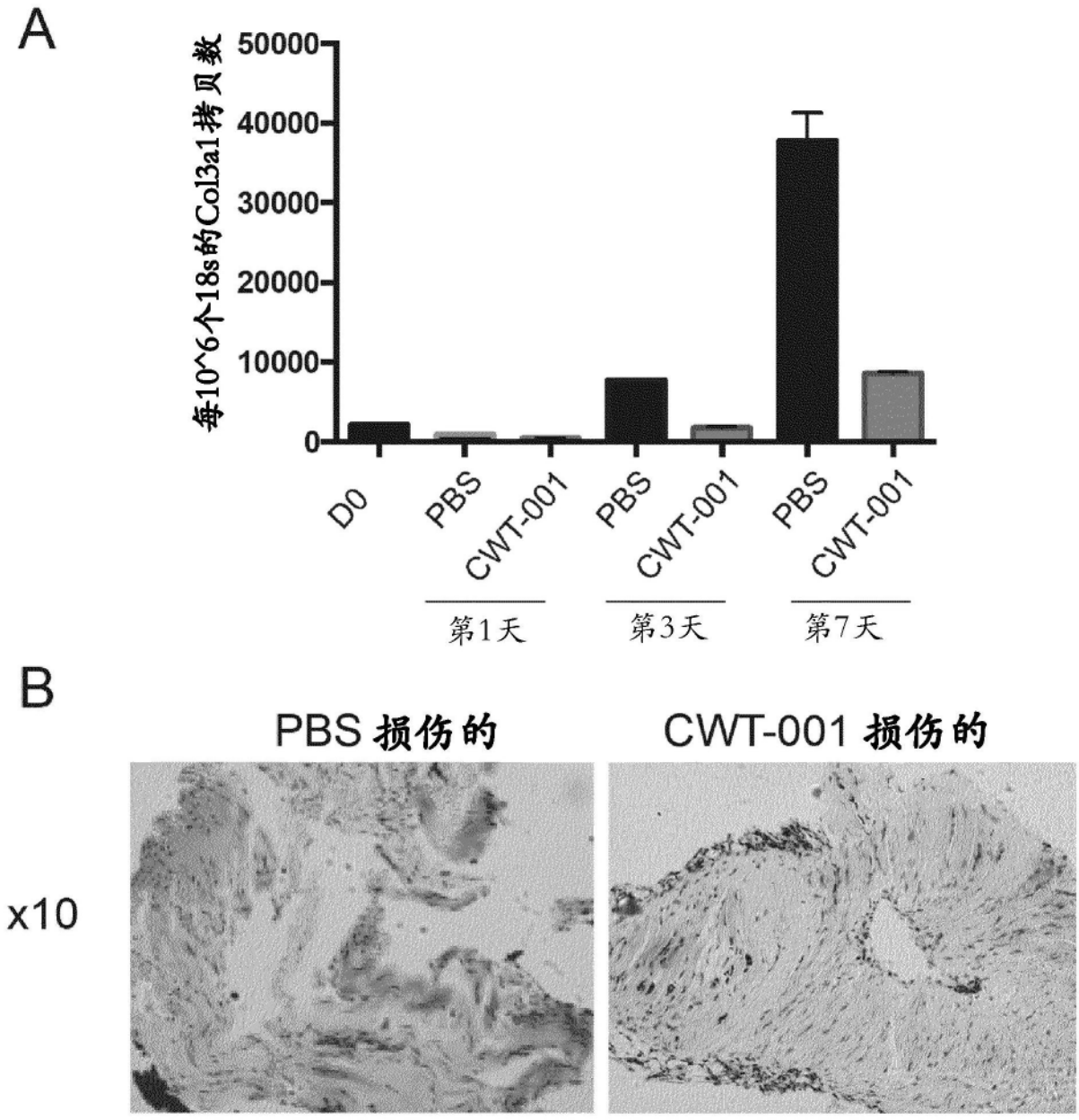

A
每10^6个18s的Col3a1拷贝数
50000
40000
30000
20000
10000
0
D0
PBS
CWT-001
PBS
CWT-001
PBS
CWT-001
第1天
第3天
第7天
B
PBS 损伤的
CWT-001 损伤的
x10

图4

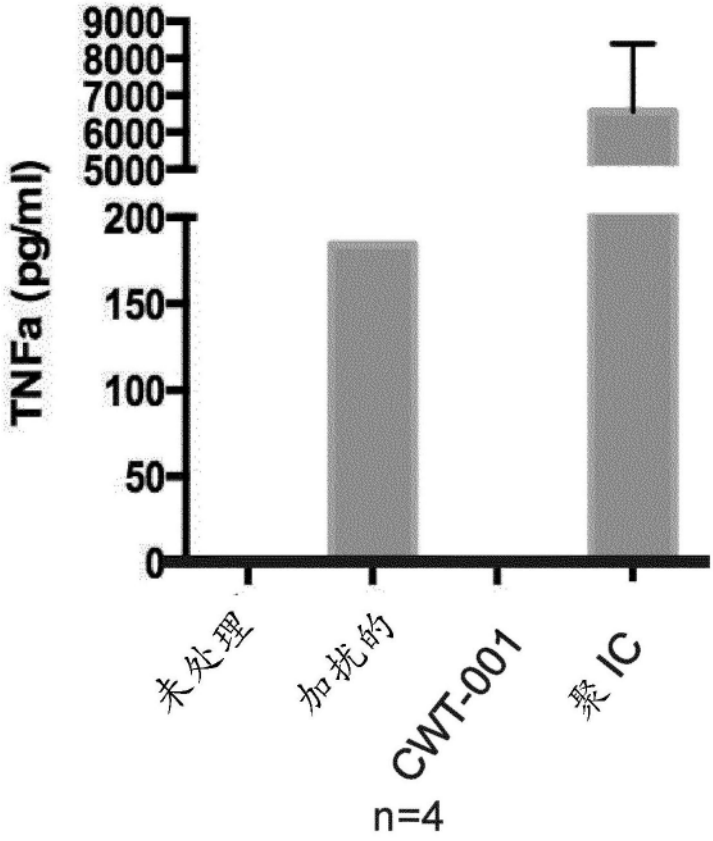

9000
8000
7000
6000
5000
200
150
100
50
0
TNFa (pg/ml)
未处理
加扰的
CWT-001
聚 IC
n=4

图5

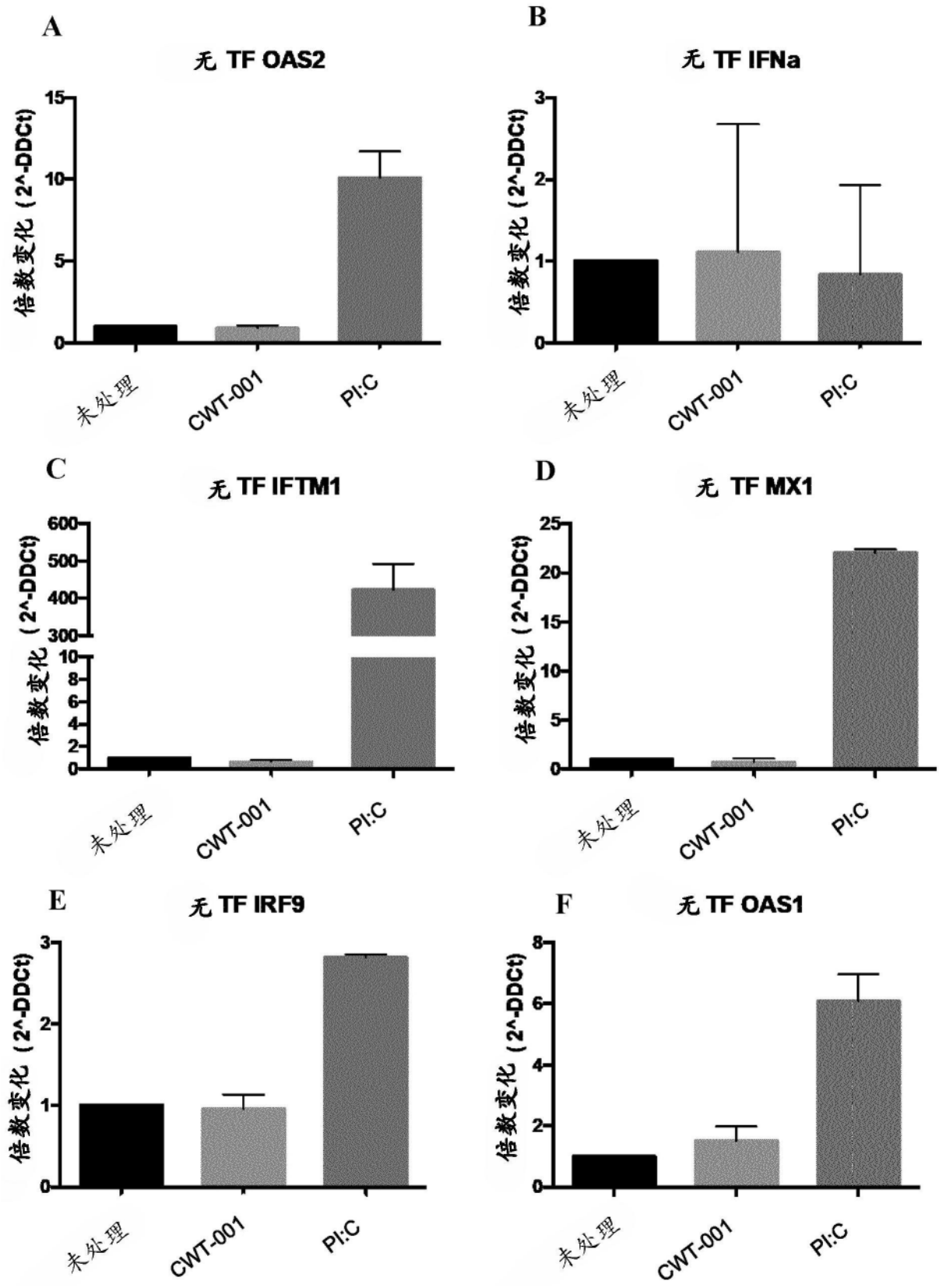

A
无 TF OAS2
倍数变化（2^-DDCt）
15
10
5
0
未处理
CWT-001
PI:C
B
无 TF IFNa
倍数变化（2^-DDCt）
3
2
1
0
未处理
CWT-001
PI:C
C
无 TF IFTM1
倍数变化（2^-DDCt）
600
500
400
300
10
8
6
4
2
0
未处理
CWT-001
PI:C
D
无 TF MX1
倍数变化（2^-DDCt）
25
20
15
10
5
0
未处理
CWT-001
PI:C
E
无 TF IRF9
倍数变化（2^-DDCt）
3
2
1
0
未处理
CWT-001
PI:C
F
无 TF OAS1
倍数变化（2^-DDCt）
8
6
4
2
0
未处理
CWT-001
PI:C

图6

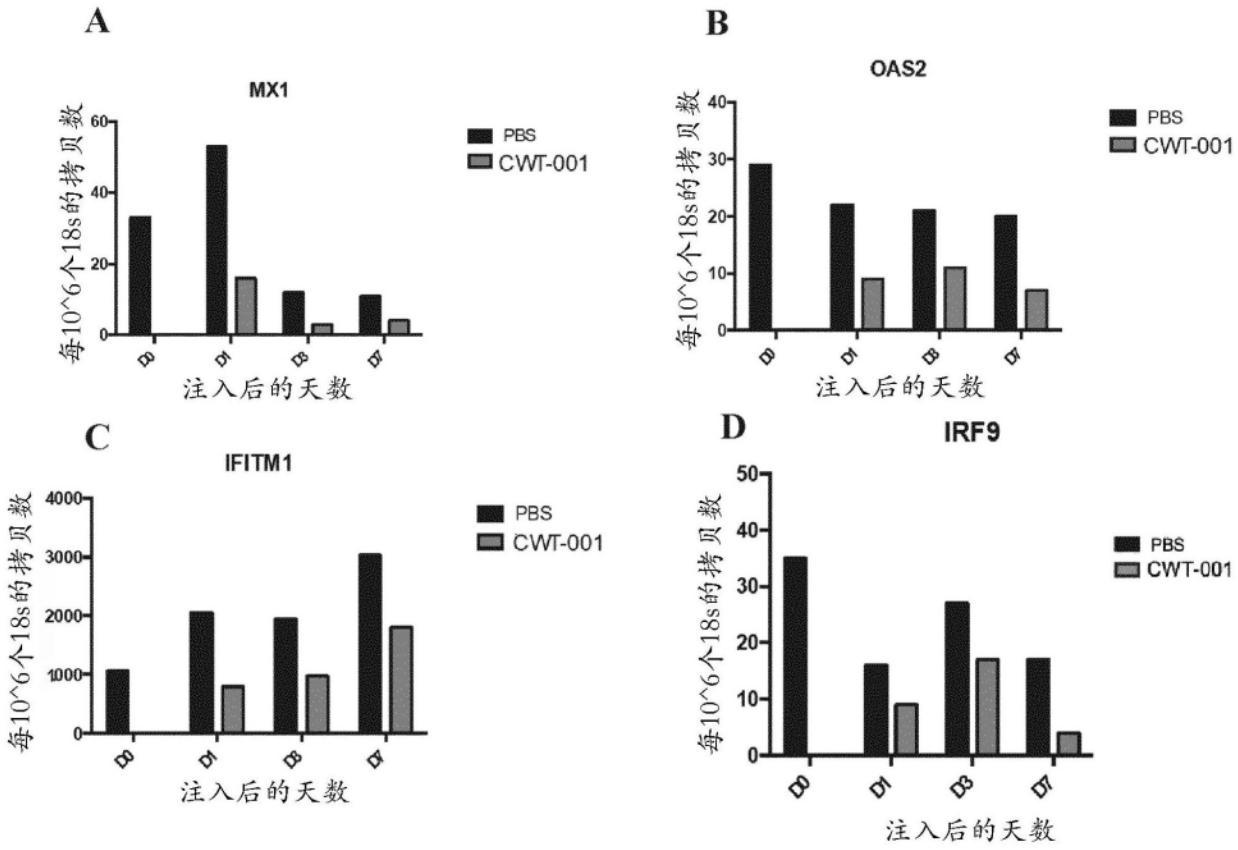

A
MX1
每10^6个18s的拷贝数
60
40
20
0
D0
D1
D3
D7
注入后的天数
PBS
CWT-001
B
OAS2
每10^6个18s的拷贝数
40
30
20
10
0
D0
D1
D3
D7
注入后的天数
PBS
CWT-001
C
IFITM1
每10^6个18s的拷贝数
4000
3000
2000
1000
0
D0
D1
D3
D7
注入后的天数
PBS
CWT-001
D
IRF9
每10^6个18s的拷贝数
50
40
30
20
10
0
D0
D1
D3
D7
注入后的天数
PBS
CWT-001

图7

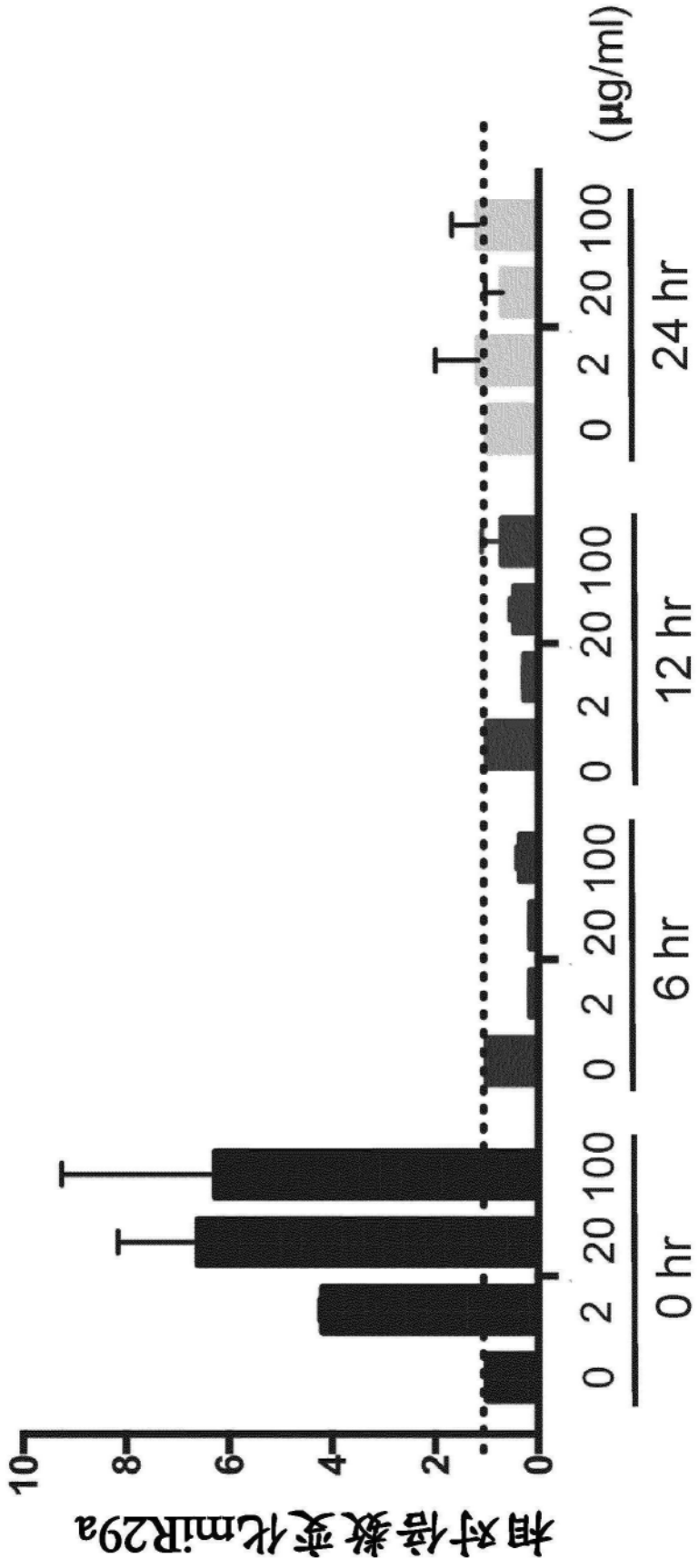

相对倍数变化miR29a
10
8
6
4
2
0
0 2 20 100
0 hr
0 2 20 100
6 hr
0 2 20 100
12 hr
0 2 20 100
24 hr
(μg/ml)

图8

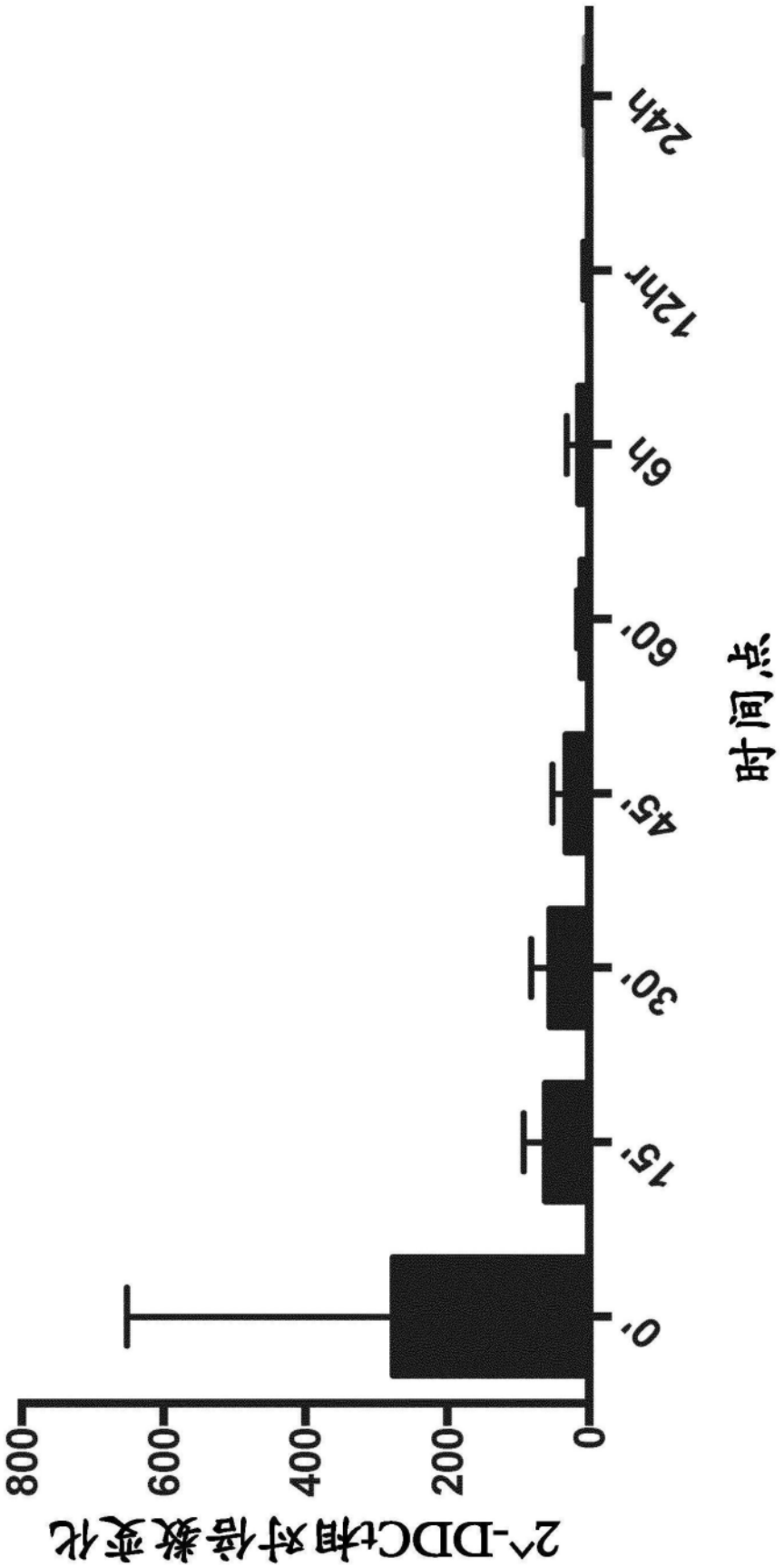


图9

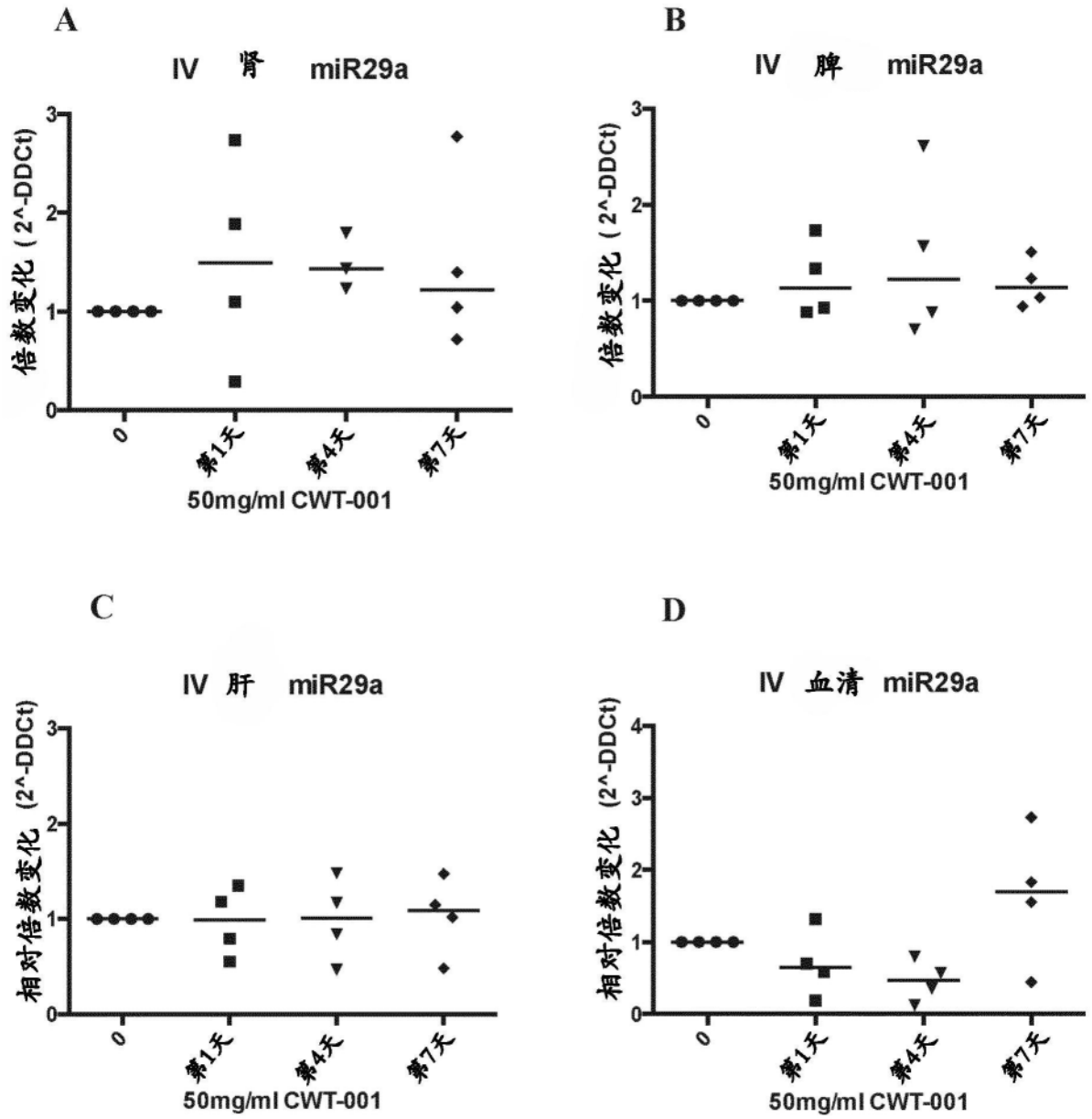

A
IV 肾 miR29a
倍数变化（2^-DDCt）
0
第1天
第4天
第7天
50mg/ml CWT-001
B
IV 脾 miR29a
倍数变化（2^-DDCt）
0
第1天
第4天
第7天
50mg/ml CWT-001
C
IV 肝 miR29a
相对倍数变化（2^-DDCt）
0
第1天
第4天
第7天
50mg/ml CWT-001
D
IV 血清 miR29a
相对倍数变化（2^-DDCt）
0
第1天
第4天
第7天
50mg/ml CWT-001

图10

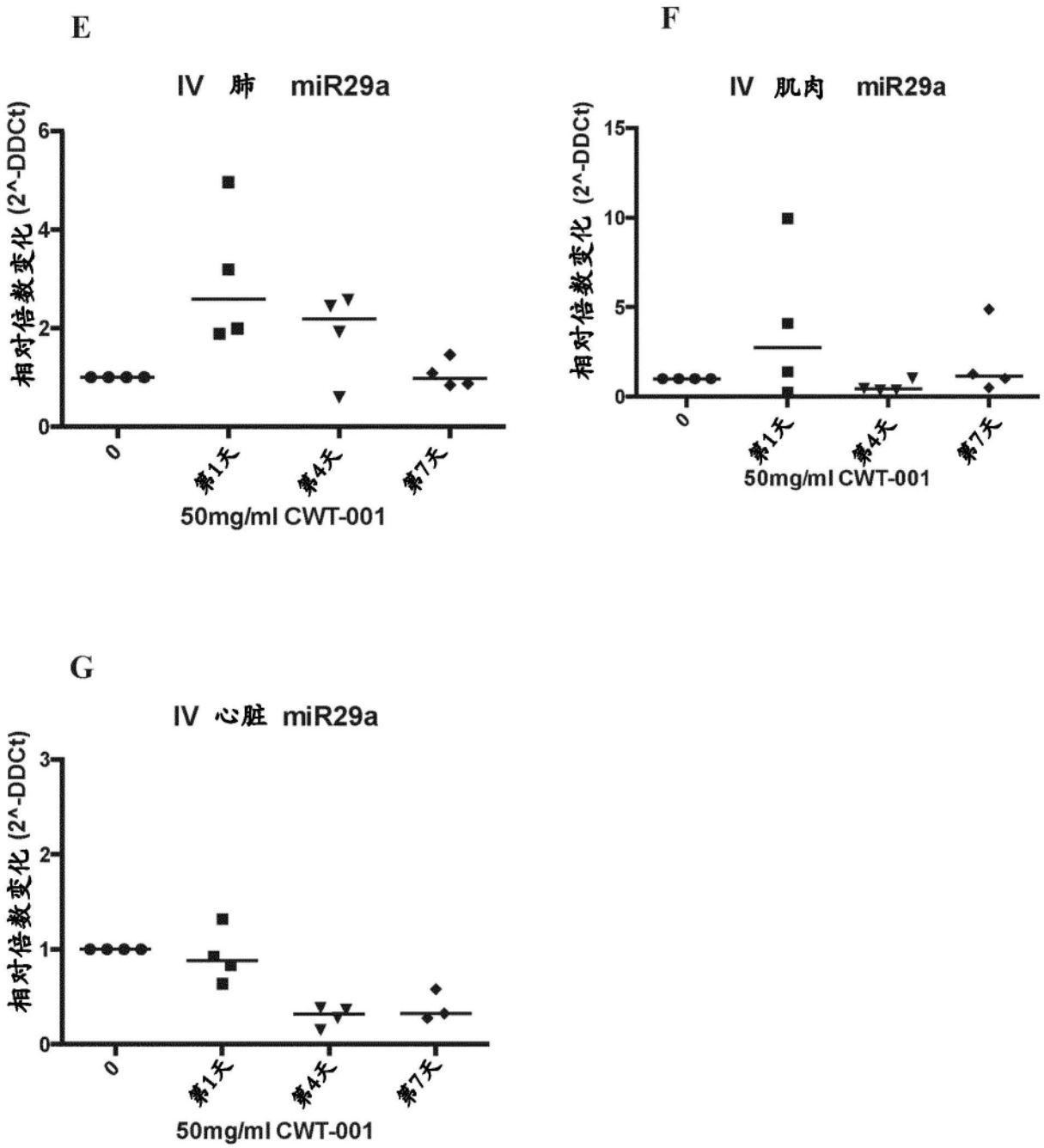

E
IV 肺 miR29a
相对倍数变化 (2^-DDCt)
0
2
4
6
0
第1天
第4天
第7天
50mg/ml CWT-001
F
IV 肌肉 miR29a
相对倍数变化 (2^-DDCt)
0
5
10
15
0
第1天
第4天
第7天
50mg/ml CWT-001
G
IV 心脏 miR29a
相对倍数变化 (2^-DDCt)
0
1
2
3
0
第1天
第4天
第7天
50mg/ml CWT-001

图10(续)

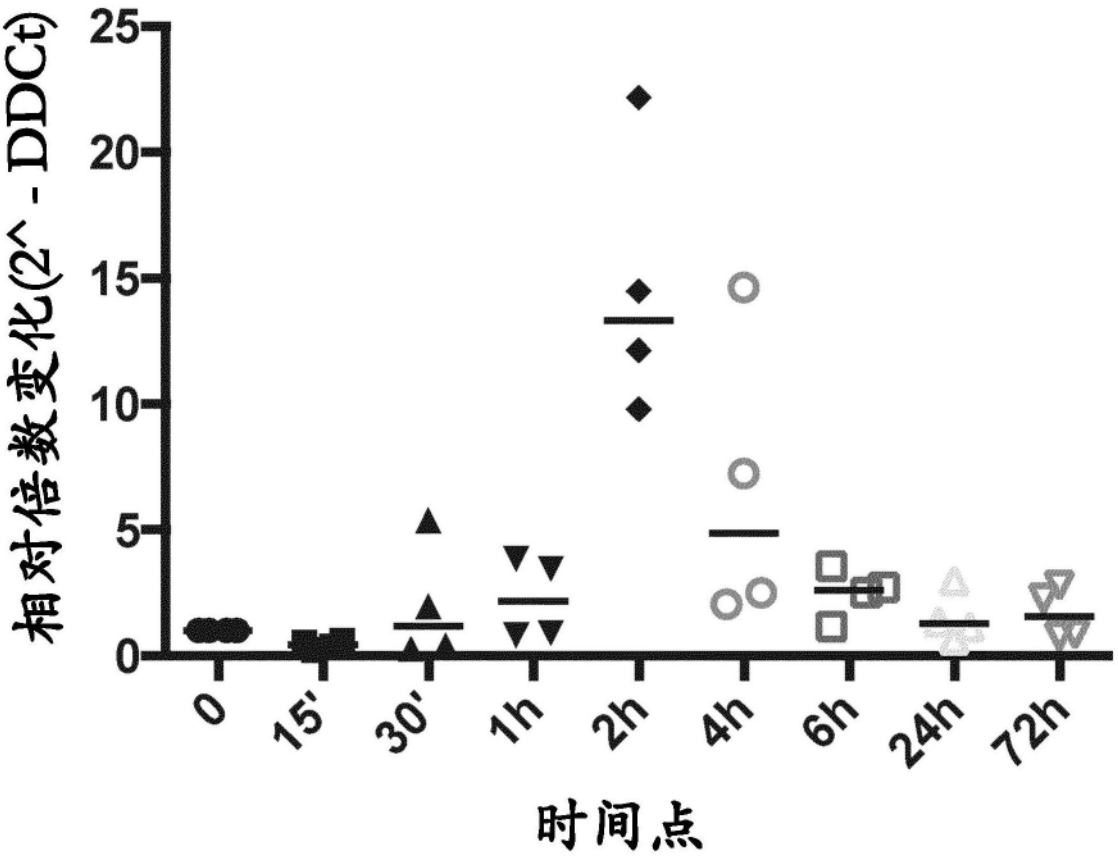


图11

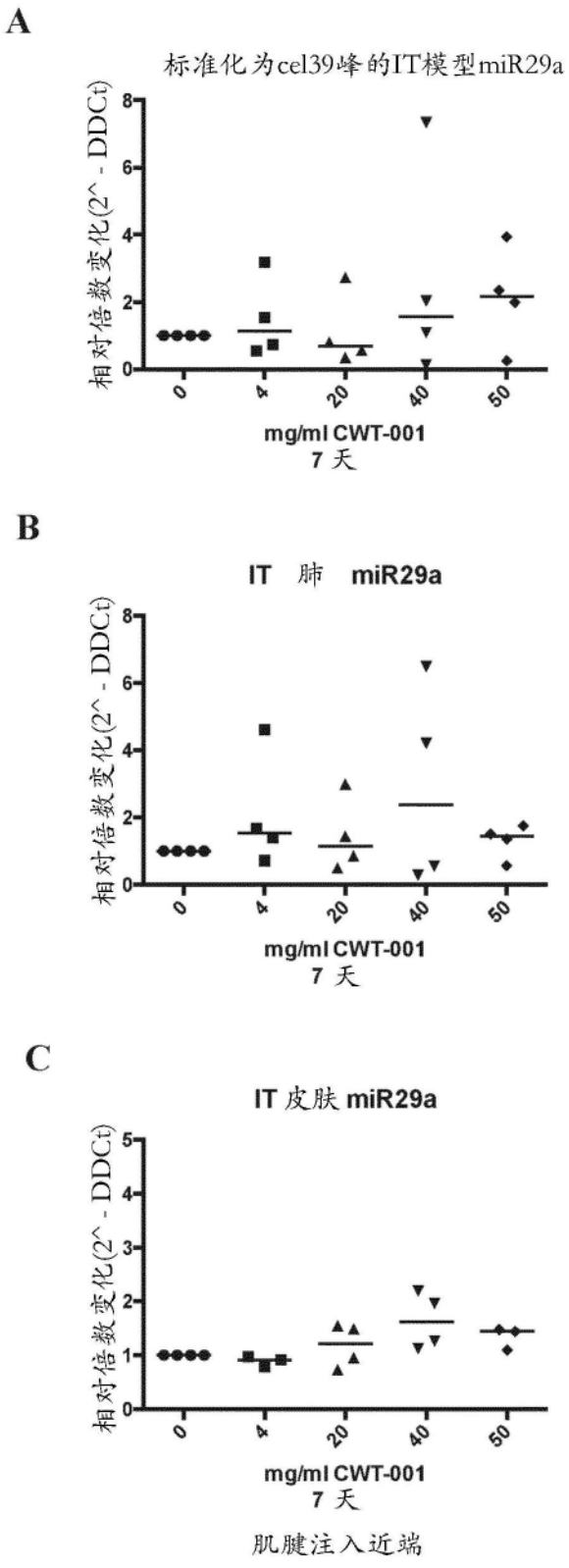

A
标准化为cel39峰的IT模型miR29a
相对倍数变化(2^ - DDCt)
0
2
4
6
8
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7 天
B
IT 肺 miR29a
相对倍数变化(2^ - DDCt)
0
2
4
6
8
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7 天
C
IT 皮肤 miR29a
相对倍数变化(2^ - DDCt)
0
1
2
3
4
5
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7 天
肌腱注入近端

图12

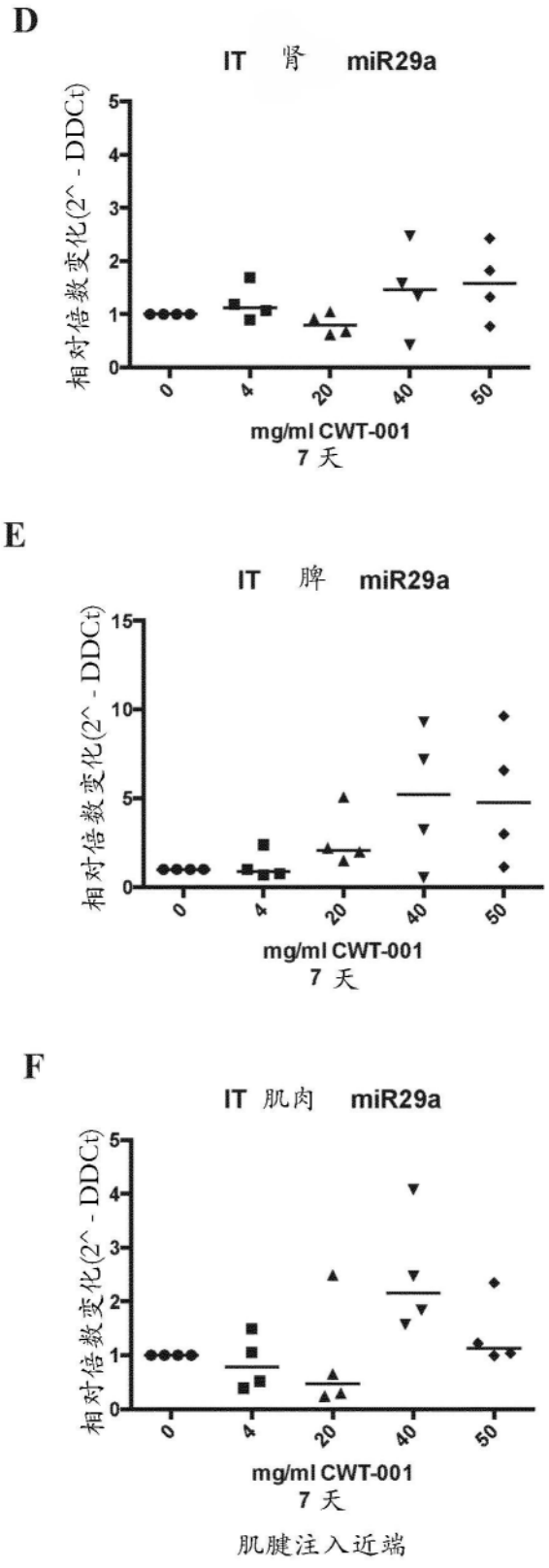

D
IT 肾 miR29a
相对倍数变化(2^ - DDCt)
0
1
2
3
4
5
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7 天
E
IT 脾 miR29a
相对倍数变化(2^ - DDCt)
0
5
10
15
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7 天
F
IT 肌肉 miR29a
相对倍数变化(2^ - DDCt)
0
1
2
3
4
5
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7 天
肌腱注入近端

图12(续)

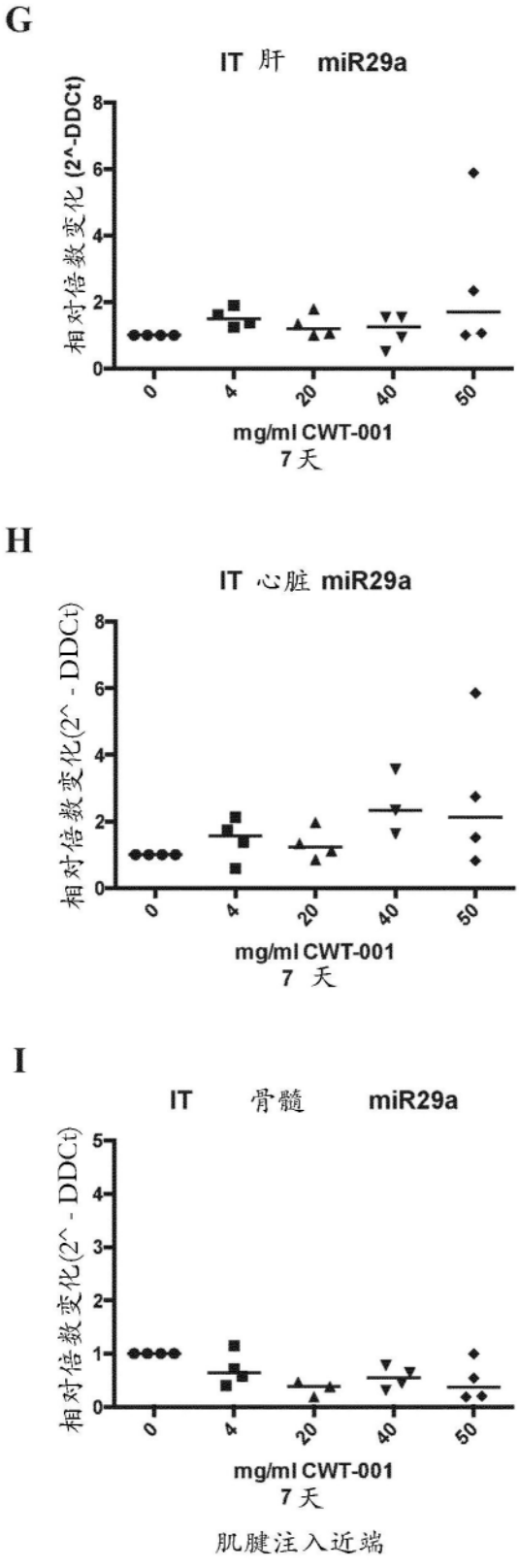

G
IT 肝 miR29a
相对倍数变化 (2^-DDCt)
0
2
4
6
8
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7天
H
IT 心脏 miR29a
相对倍数变化(2^ - DDCt)
0
2
4
6
8
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7 天
I
IT 骨髓 miR29a
相对倍数变化(2^ - DDCt)
0
1
2
3
4
5
0
4
20
40
50
mg/ml CWT-001
7天
肌腱注入近端

图12(续)

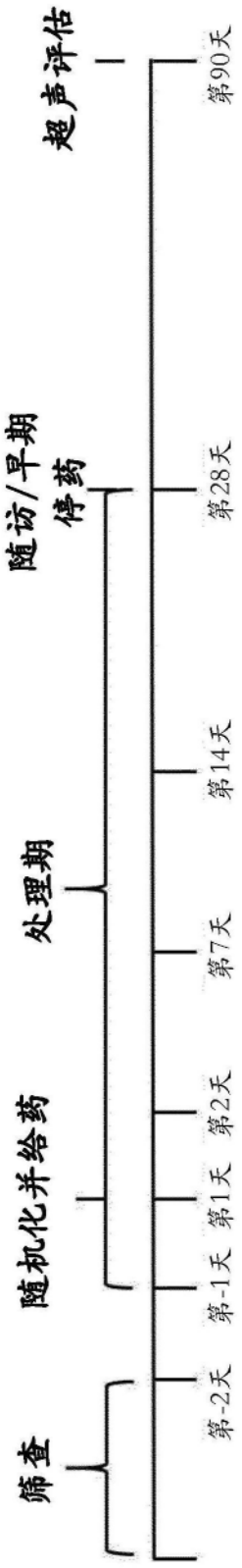
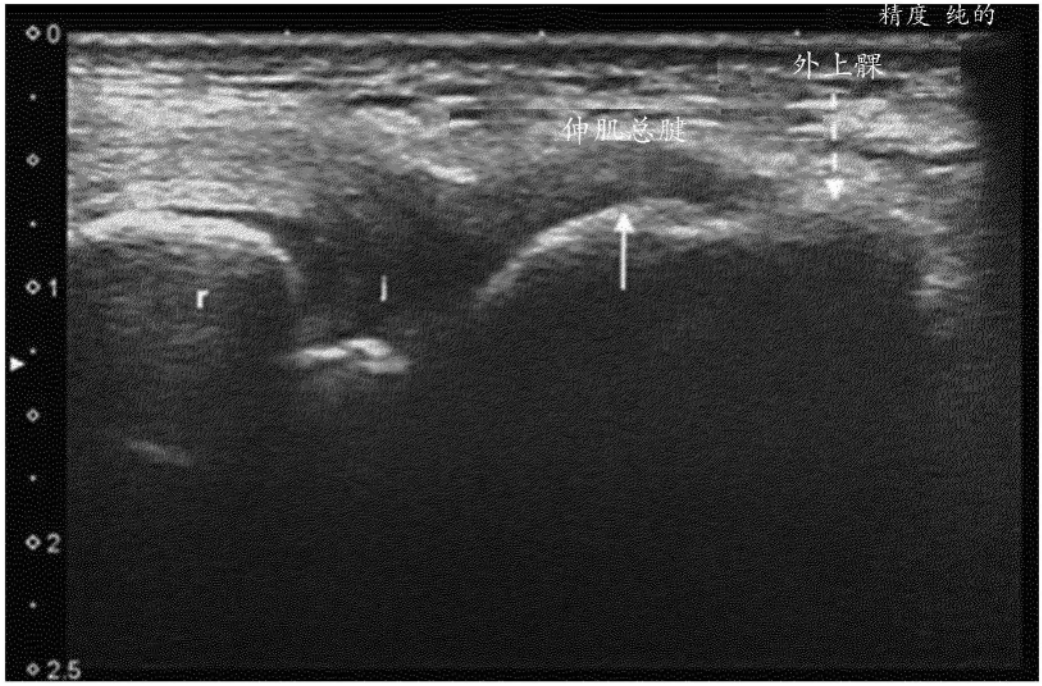


图13

A



B

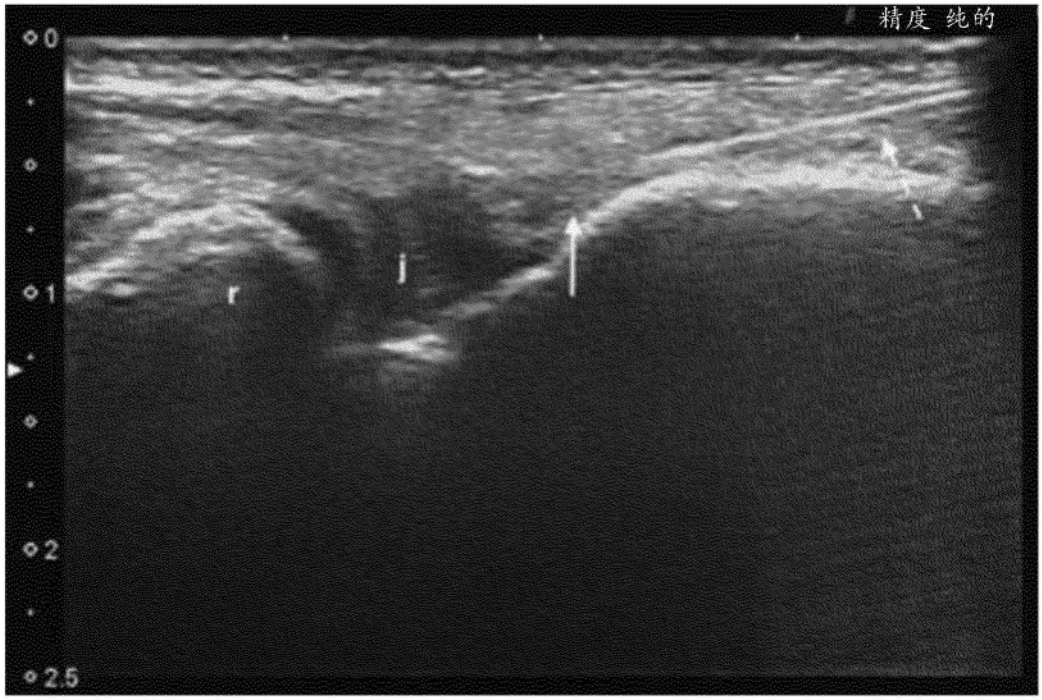


图14

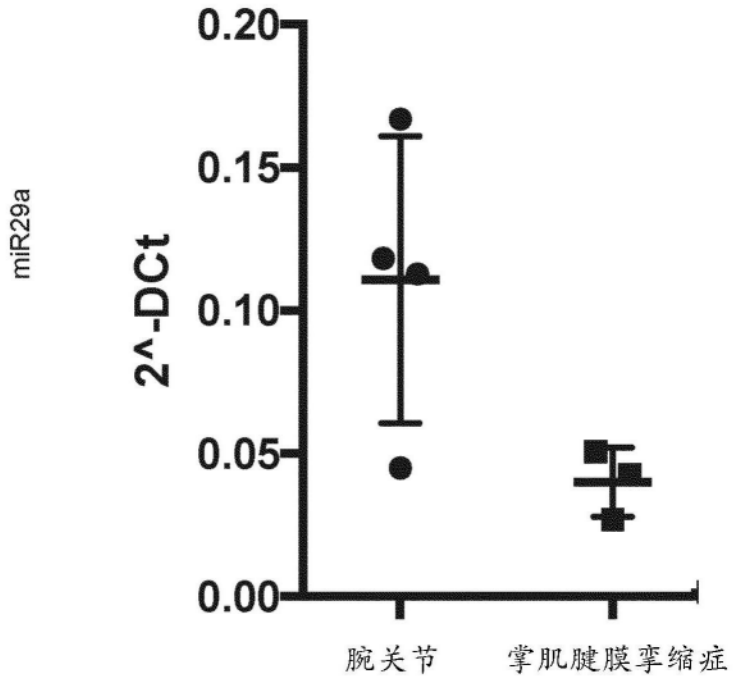


图15

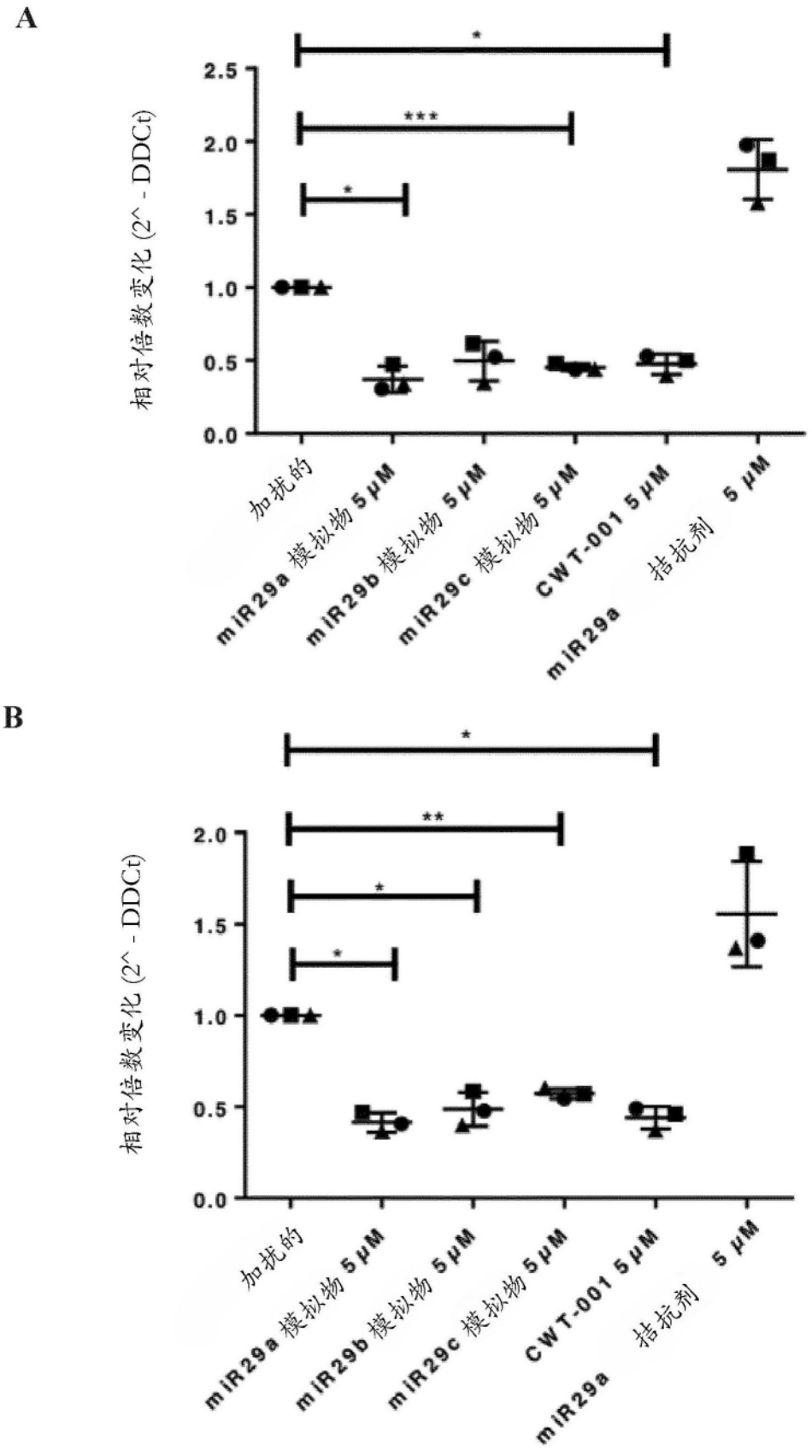

A
相对倍数变化 (2^ - DDCt)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
***
*
加扰的
miR29a 模拟物 5 μM
miR29b 模拟物 5 μM
miR29c 模拟物 5 μM
CWT-001 5 μM
miR29a
拮抗剂 5 μM
B
相对倍数变化 (2^ - DDCt)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
*
*
加扰的
miR29a 模拟物 5 μM
miR29b 模拟物 5 μM
miR29c 模拟物 5 μM
CWT-001 5 μM
miR29a
拮抗剂 5 μM

图16

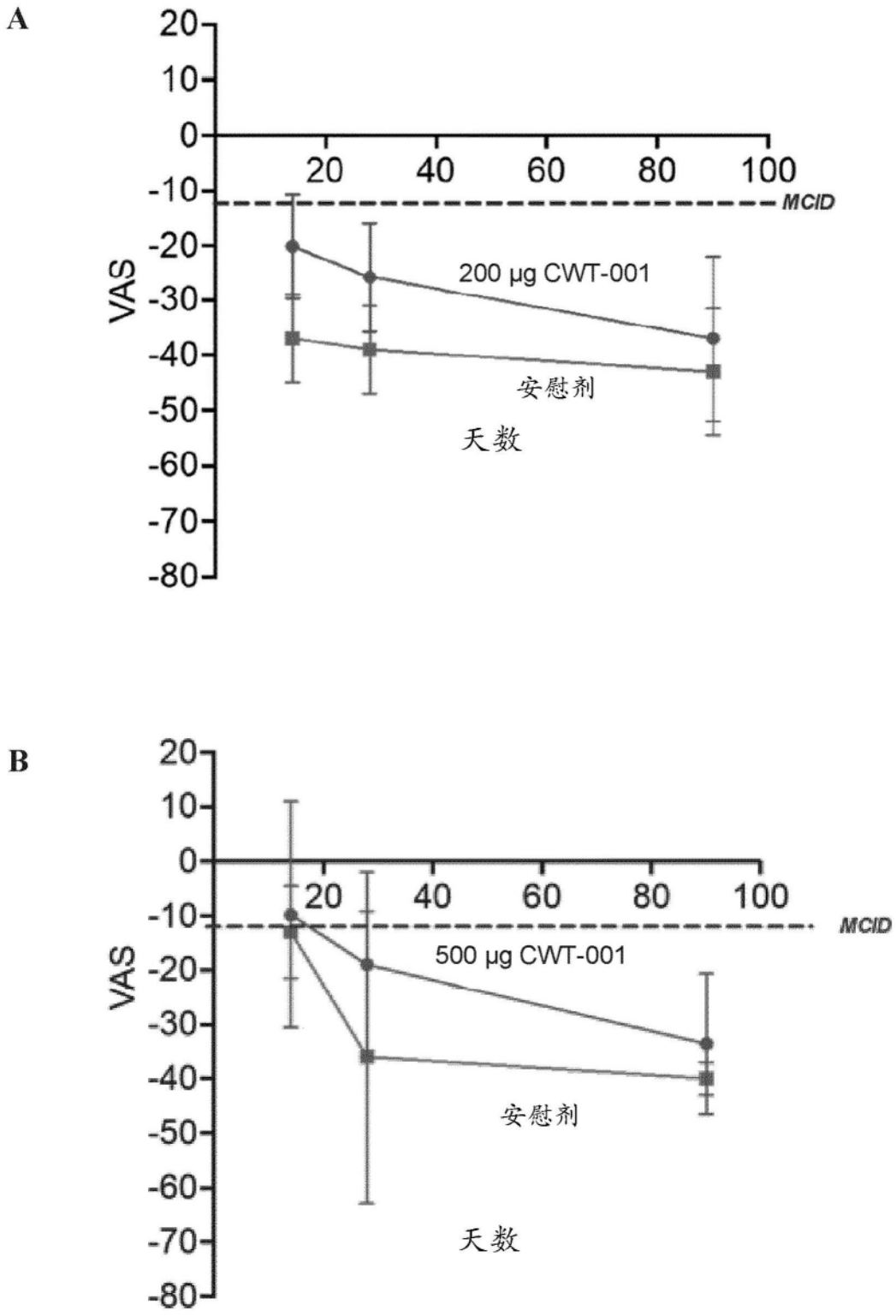

A
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
VAS
20
40
60
80
100
MCID
200 μg CWT-001
安慰剂
天数
B
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
VAS
20
40
60
80
100
MCID
500 μg CWT-001
安慰剂
天数

图17

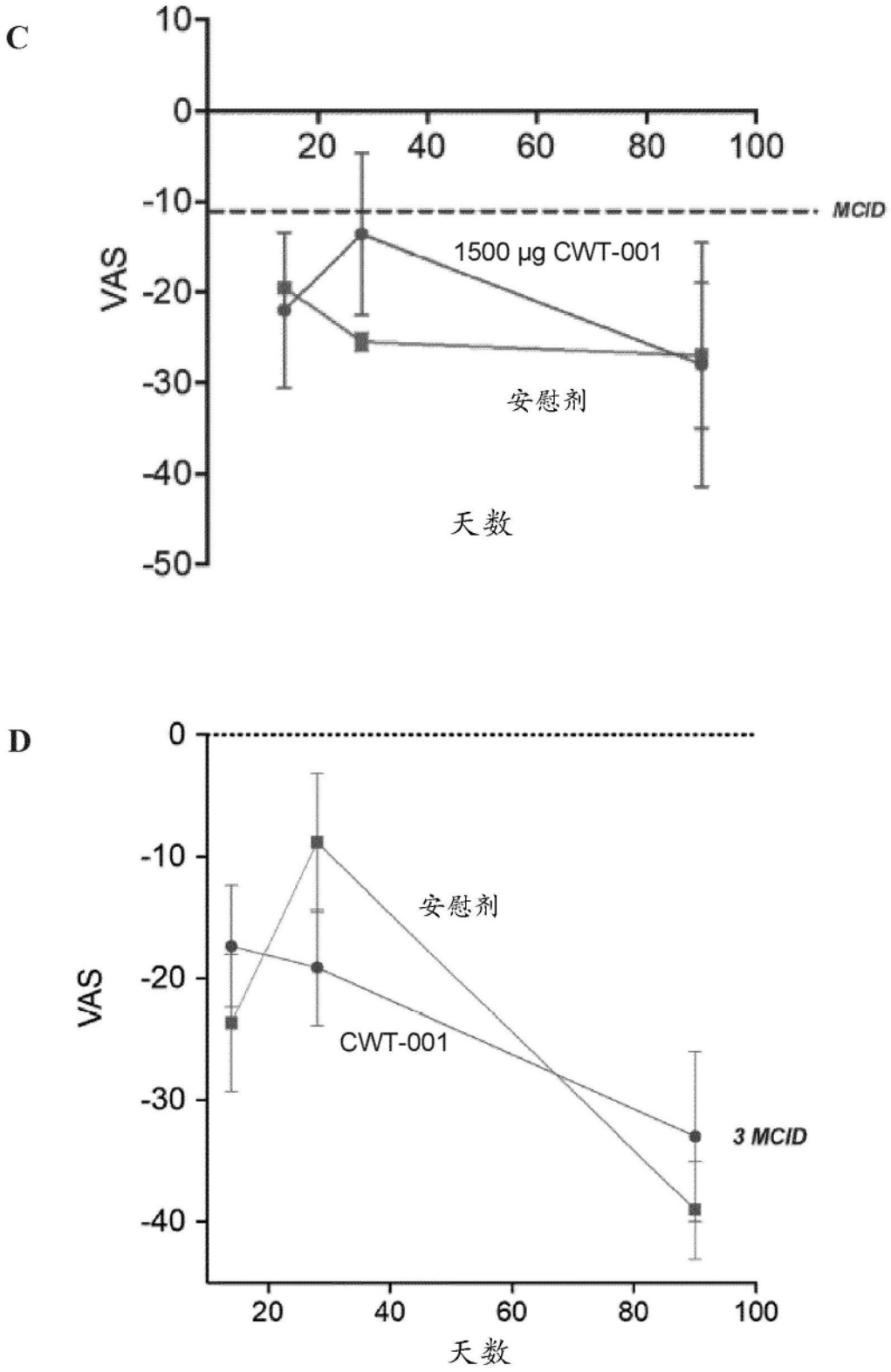

C
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
VAS
20
40
60
80
100
MCID
1500 μg CWT-001
安慰剂
天数
D
0
-10
-20
-30
-40
VAS
安慰剂
CWT-001
3 MCID
20
40
60
80
100
天数

图17(续)

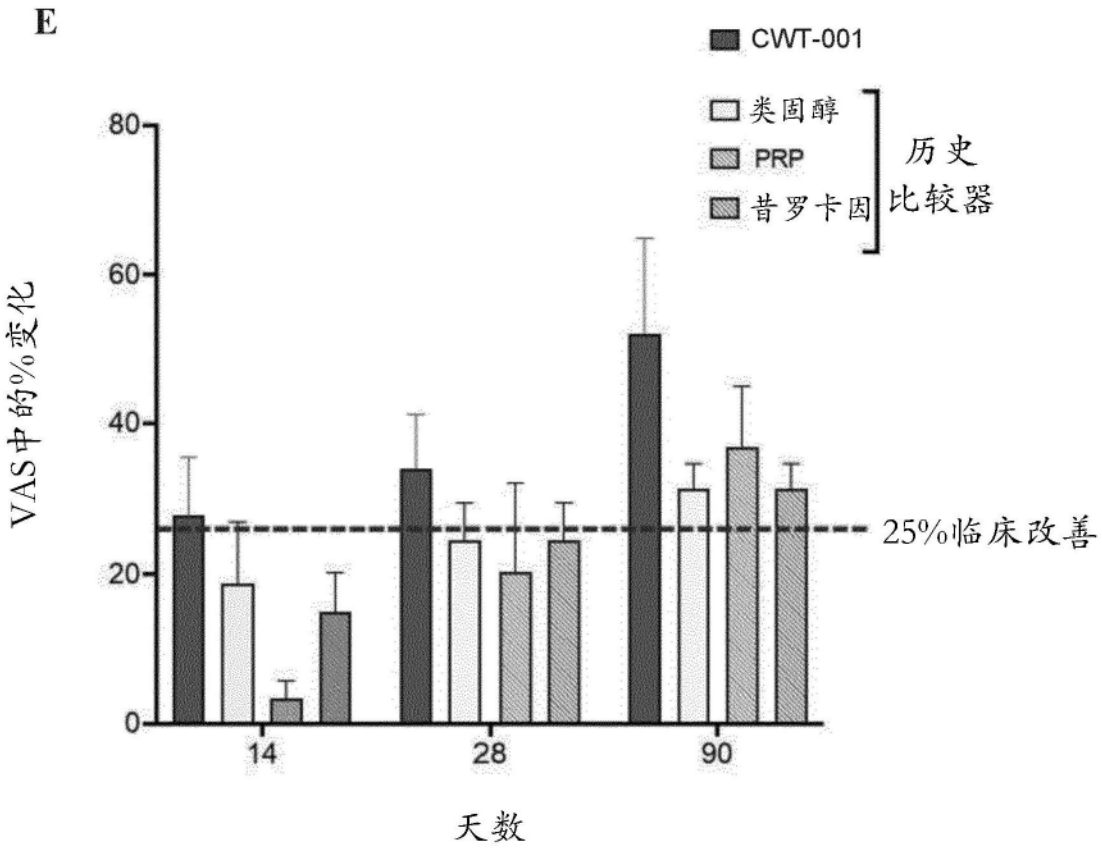

E
CWT-001
类固醇
PRP
昔罗卡因
历史
比较器
80
60
40
20
0
VAS中的%变化
25%临床改善
14
28
90
天数

图17(续)

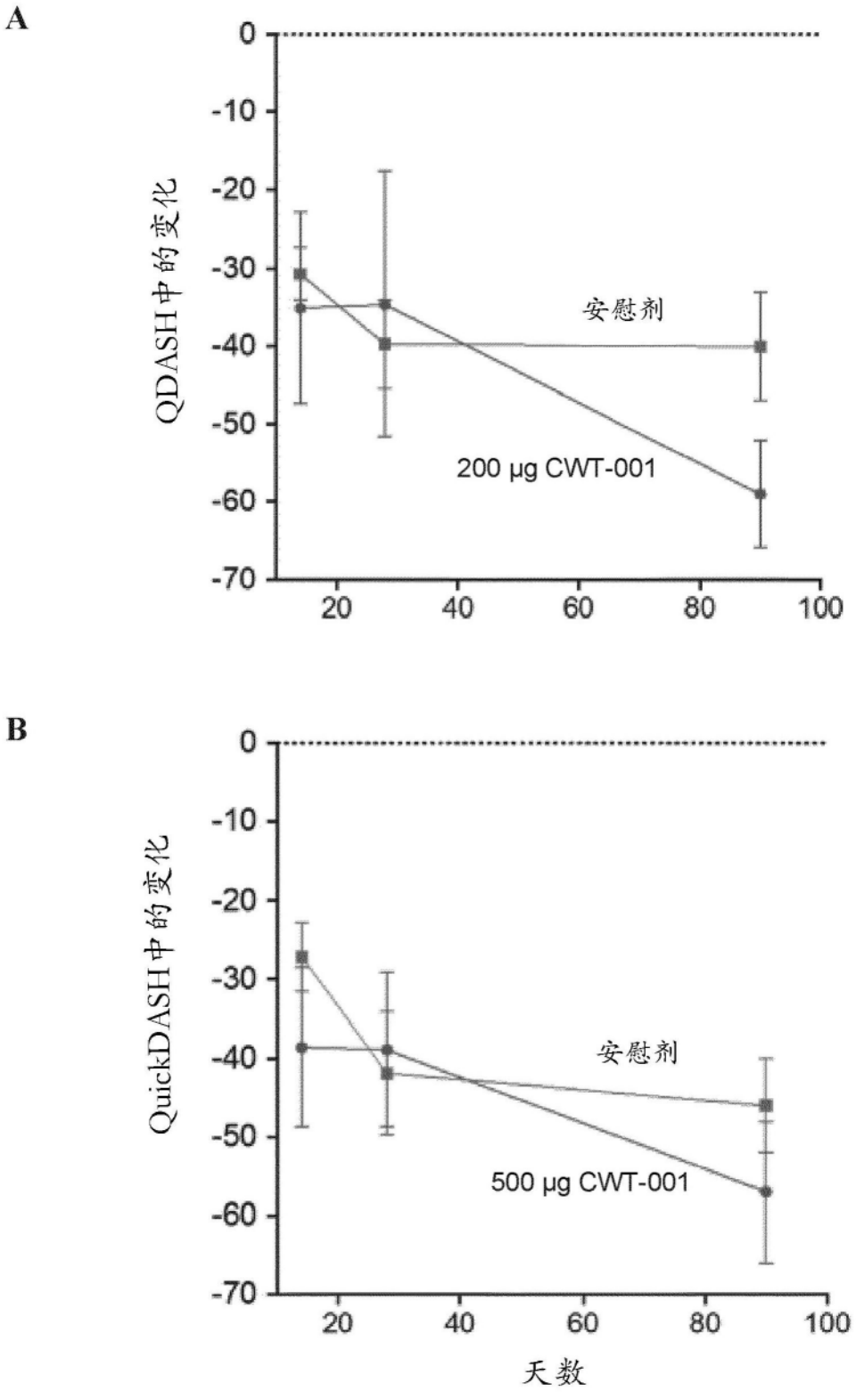

A
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
QDASH中的变化
安慰剂
200 μg CWT-001
20
40
60
80
100
B
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
QuickDASH中的变化
安慰剂
500 μg CWT-001
20
40
60
80
100
天数

图18

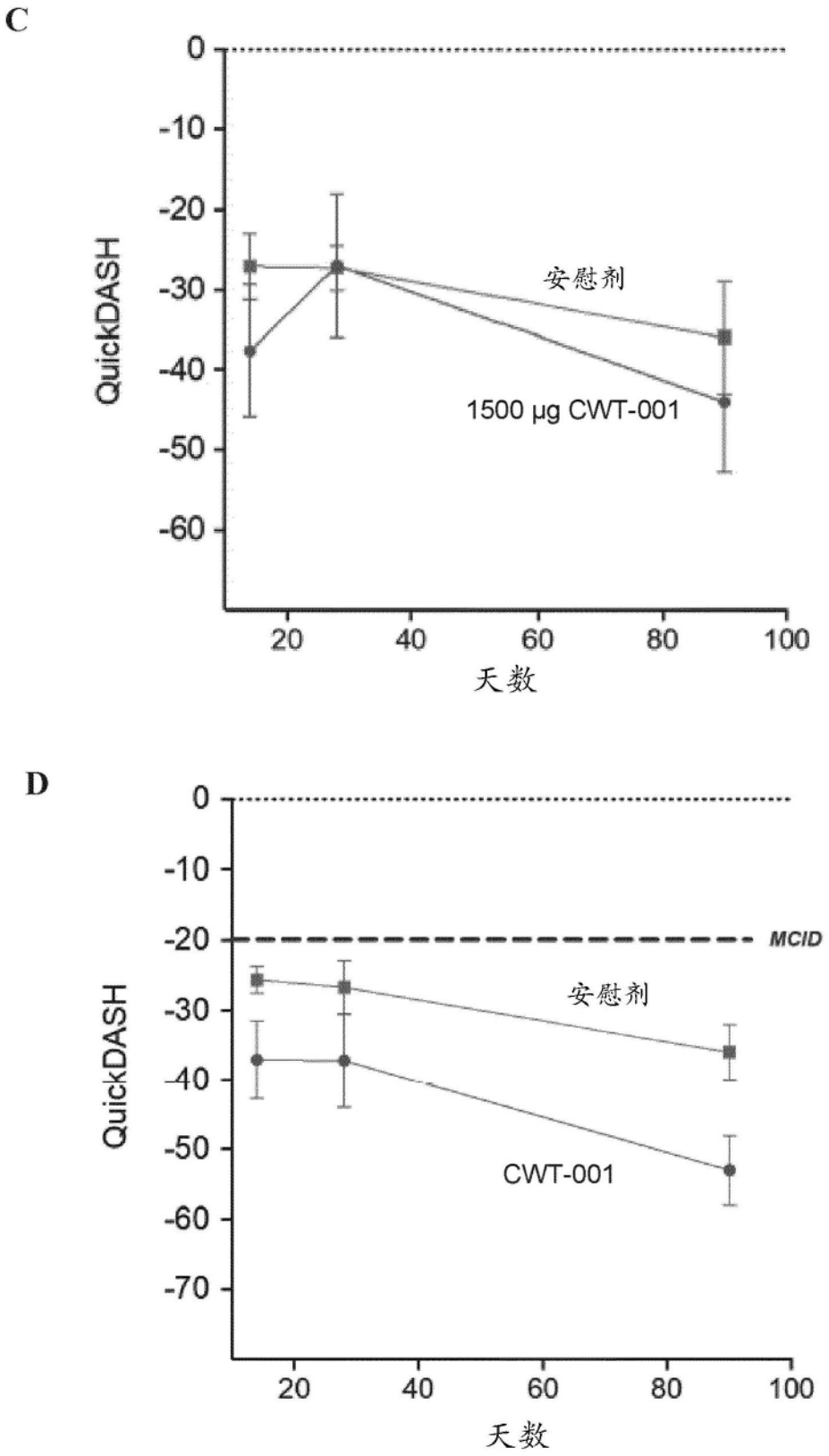

C
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
QuickDASH
安慰剂
1500 μg CWT-001
20
40
60
80
100
天数
D
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
MCID
QuickDASH
安慰剂
CWT-001
20
40
60
80
100
天数

图18(续)

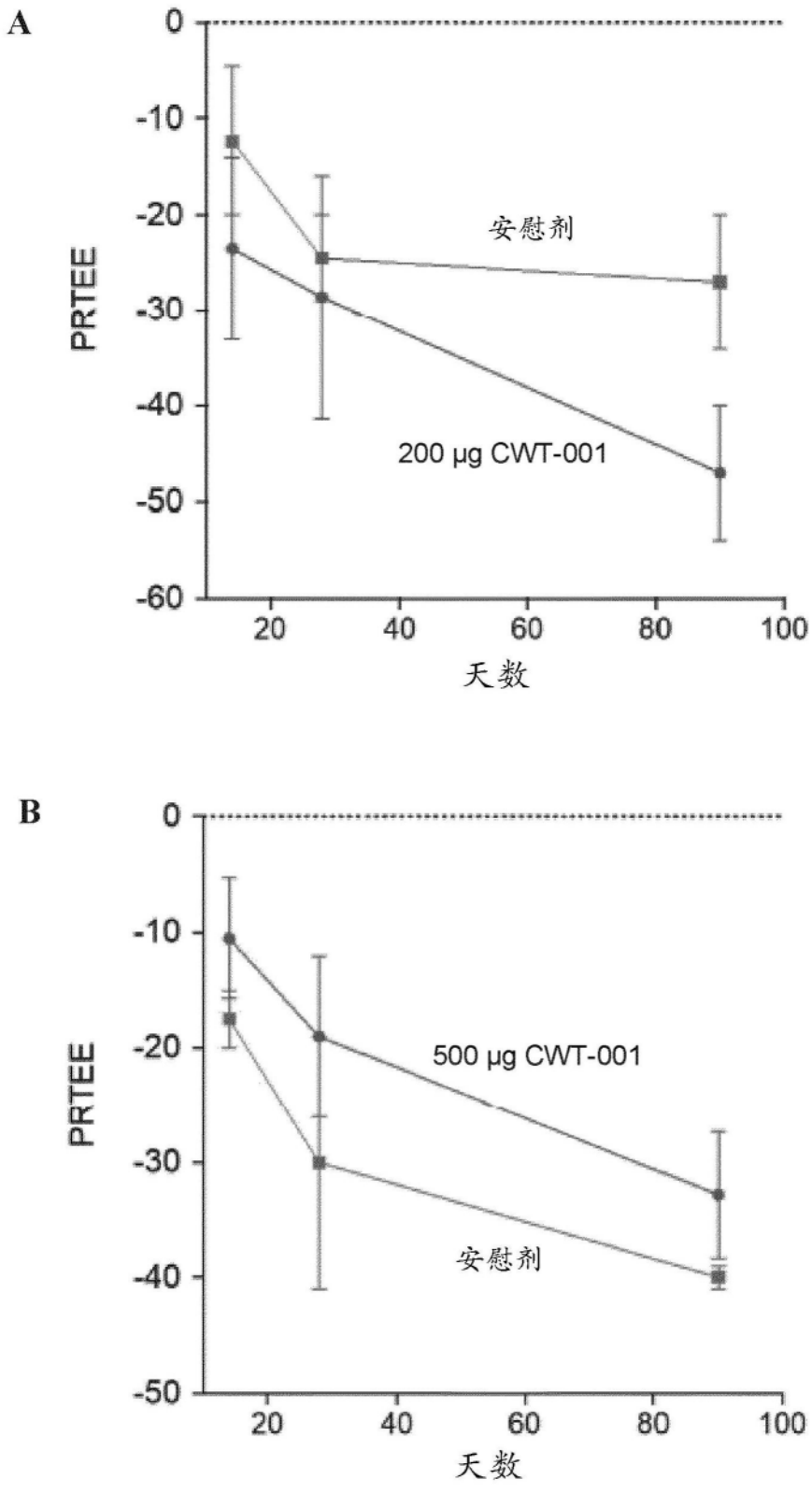

A
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
PRTEE
安慰剂
200 μg CWT-001
20
40
60
80
100
天数
B
0
-10
-20
-30
-40
-50
PRTEE
500 μg CWT-001
安慰剂
20
40
60
80
100
天数

图19

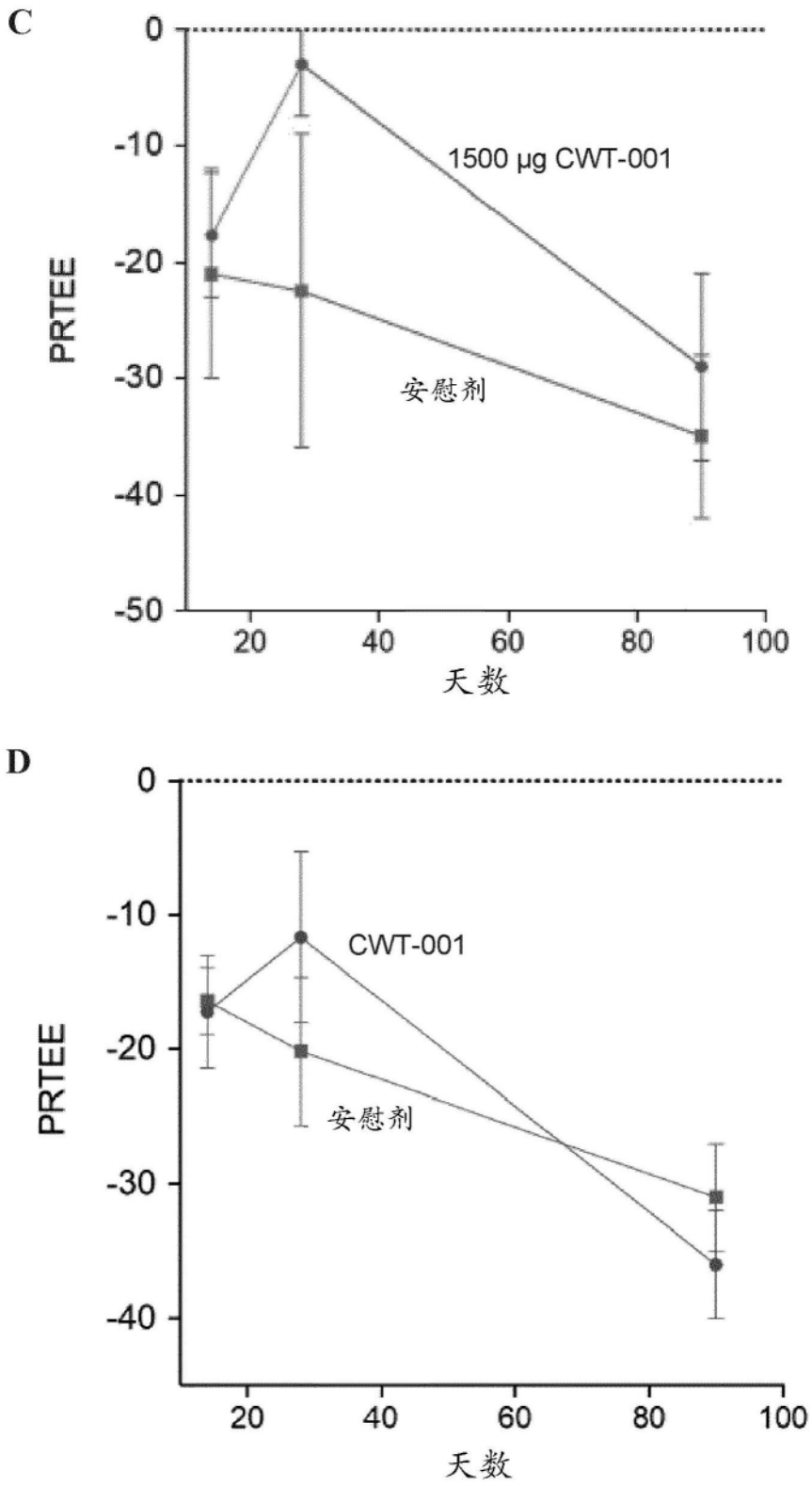

C
0
-10
-20
-30
-40
-50
PRTEE
1500 μg CWT-001
安慰剂
20
40
60
80
100
天数
D
0
-10
-20
-30
-40
PRTEE
CWT-001
安慰剂
20
40
60
80
100
天数

图19(续)

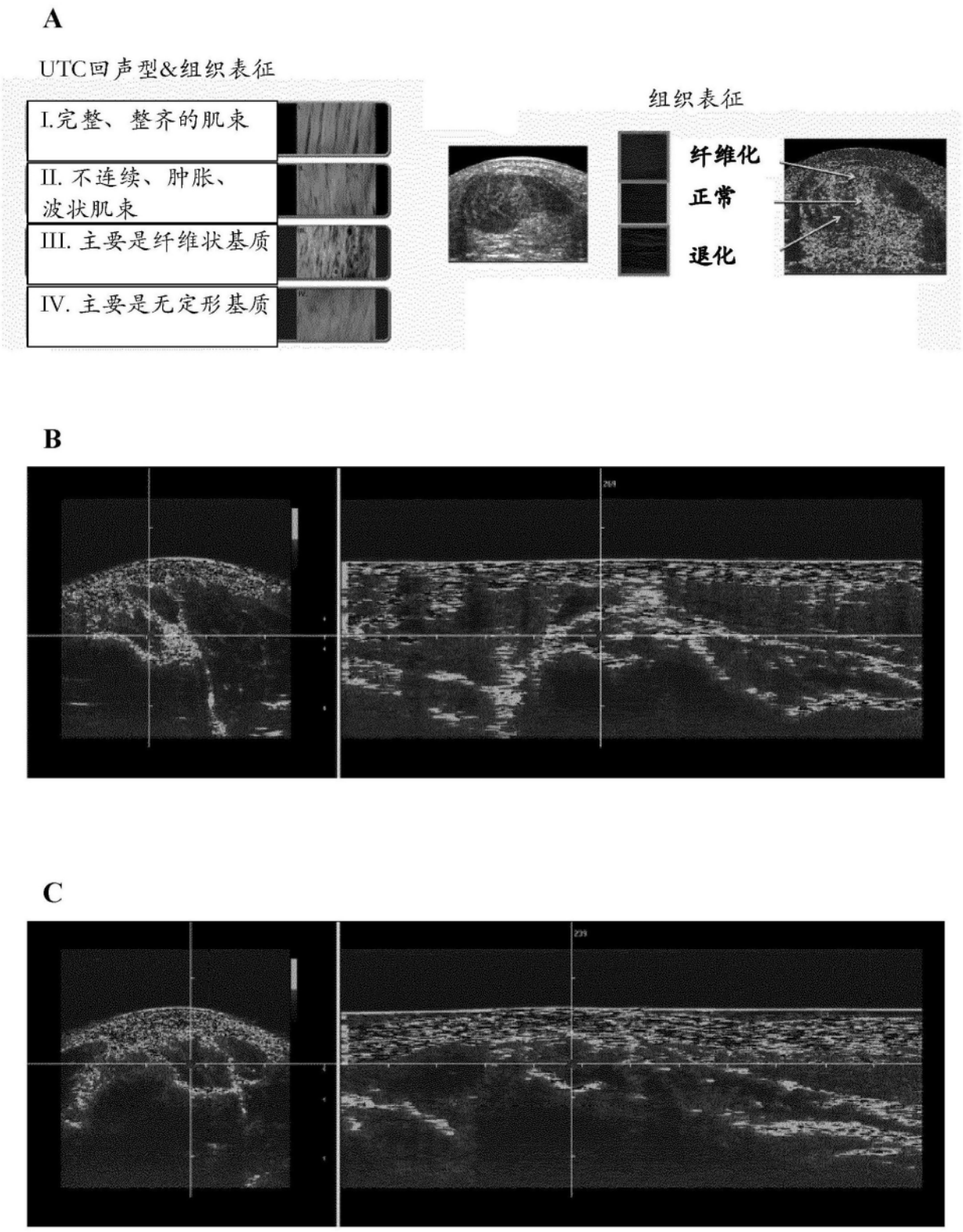
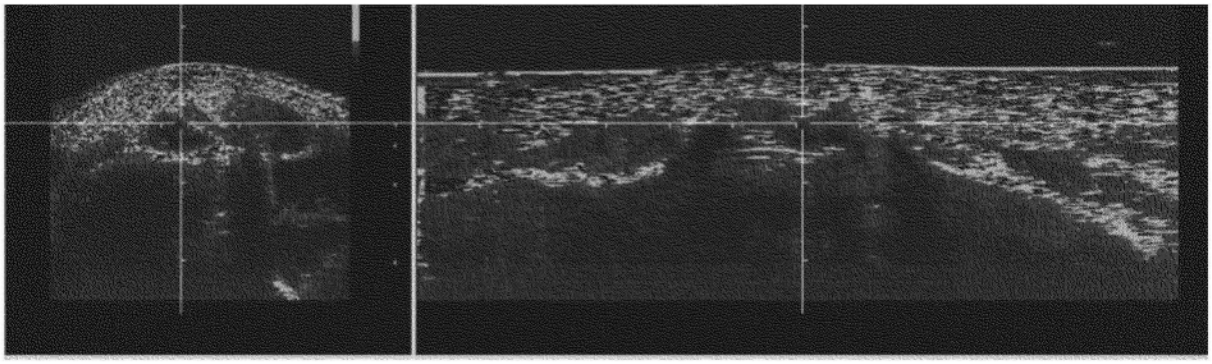
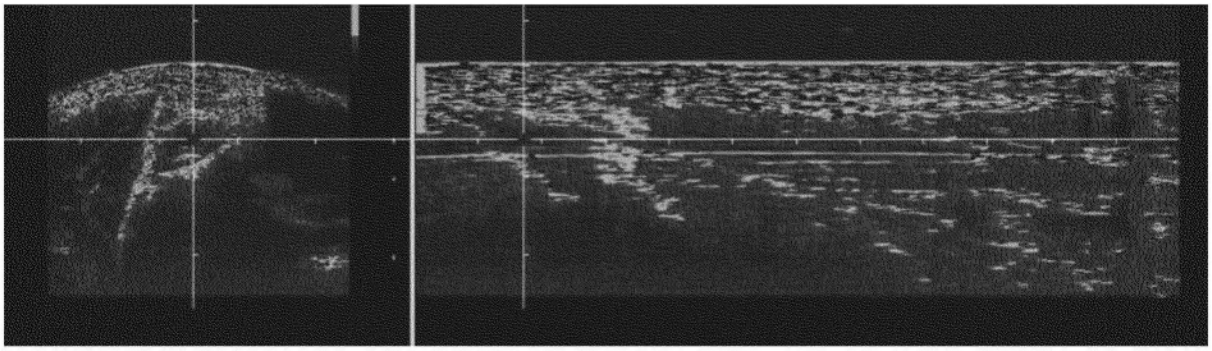

A
UTC回声型&组织表征
I.完整、整齐的肌束
II. 不连续、肿胀、波状肌束
III. 主要是纤维状基质
IV. 主要是无定形基质
组织表征
纤维化
正常
退化
B
C

图20

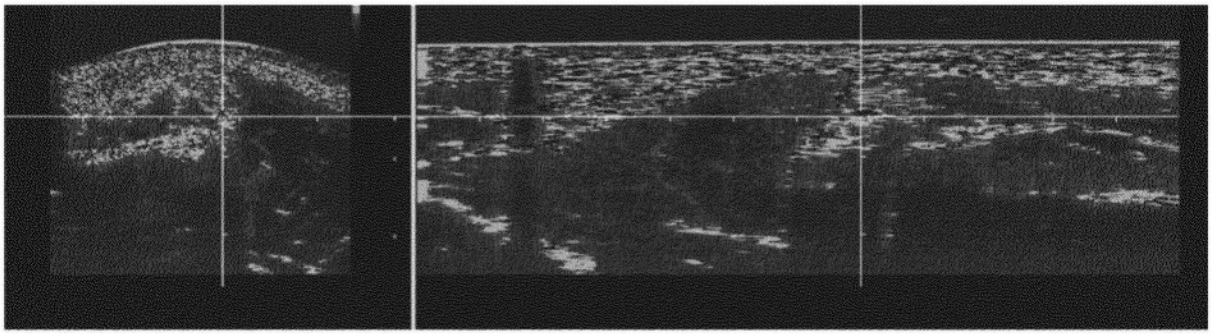
D



E



F



G

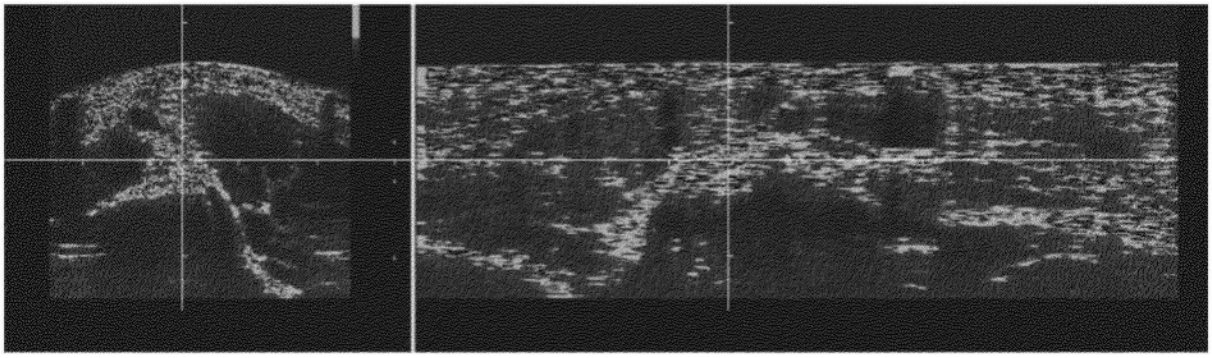
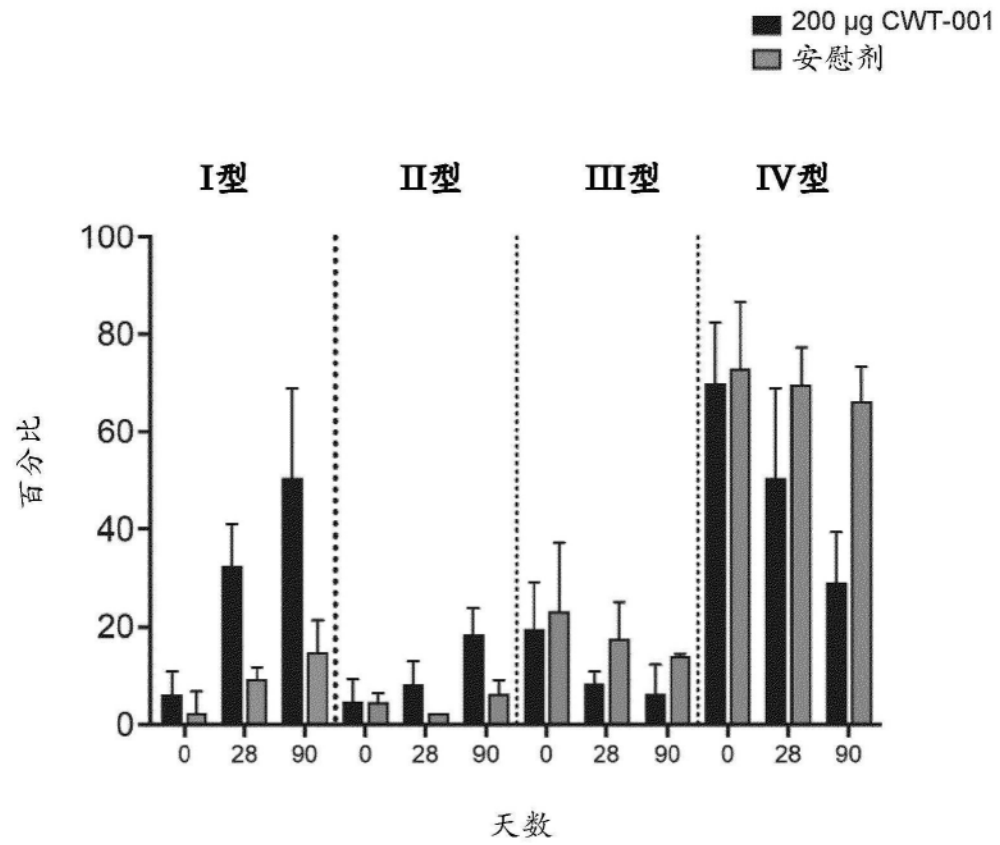


图20(续)

H


200 μg CWT-001
安慰剂
I型
II型
III型
IV型
100
80
60
40
20
0
百分比
0
28
90
0
28
90
0
28
90
0
28
90
天数

I

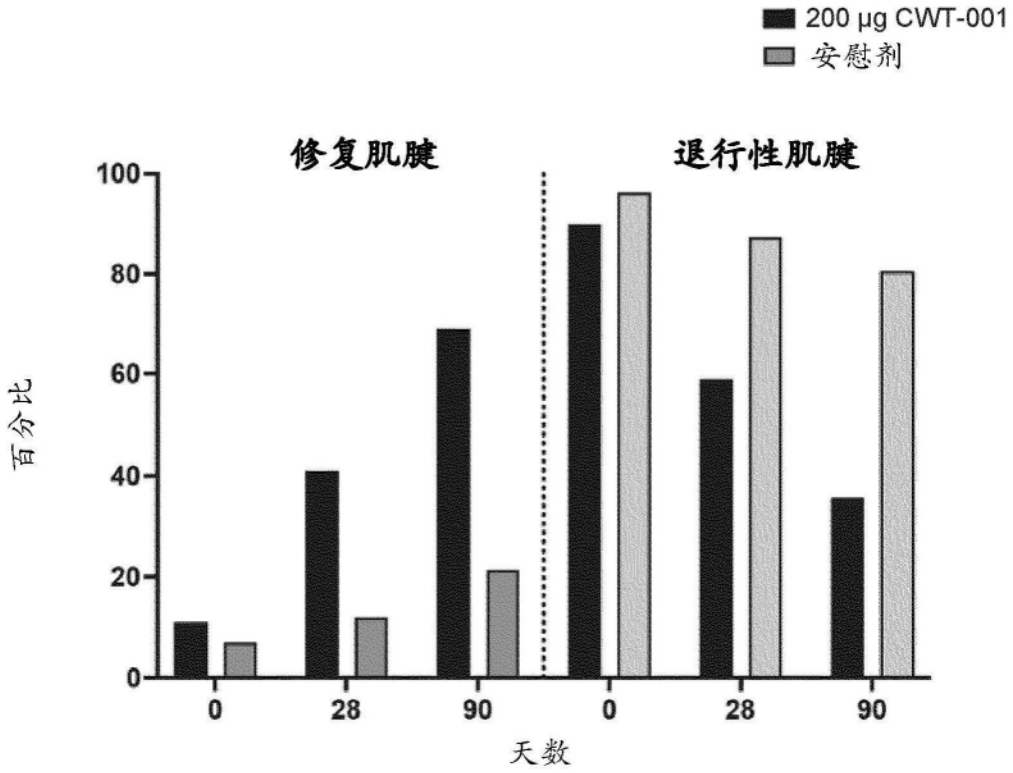

200 μg CWT-001
安慰剂
修复肌腱
退行性肌腱
100
80
60
40
20
0
百分比
0
28
90
0
28
90
天数

图20(续)

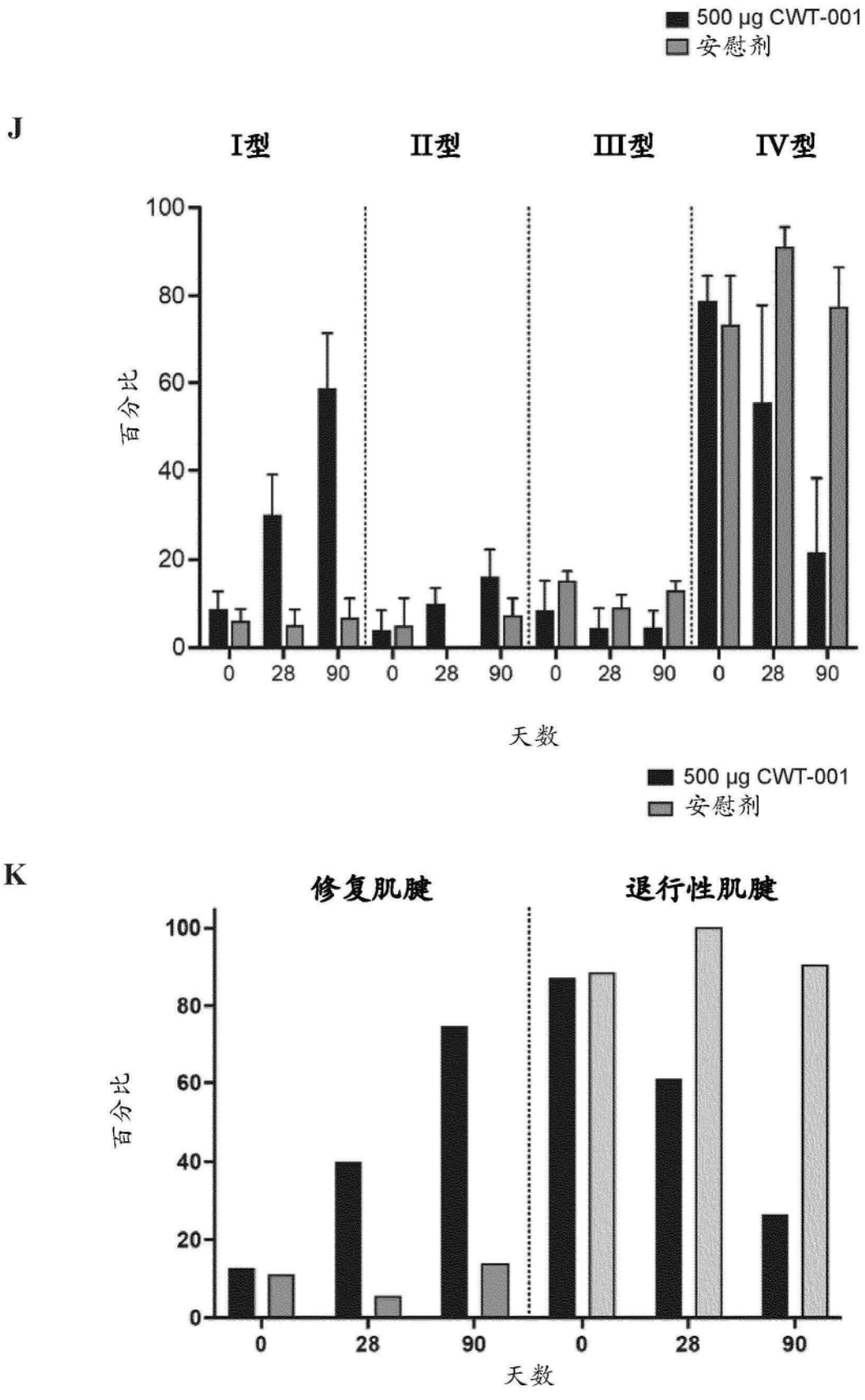

J
500 μg CWT-001
安慰剂
I型
II型
III型
IV型
百分比
天数
K
500 μg CWT-001
安慰剂
修复肌腱
退行性肌腱
百分比
天数

图20(续)

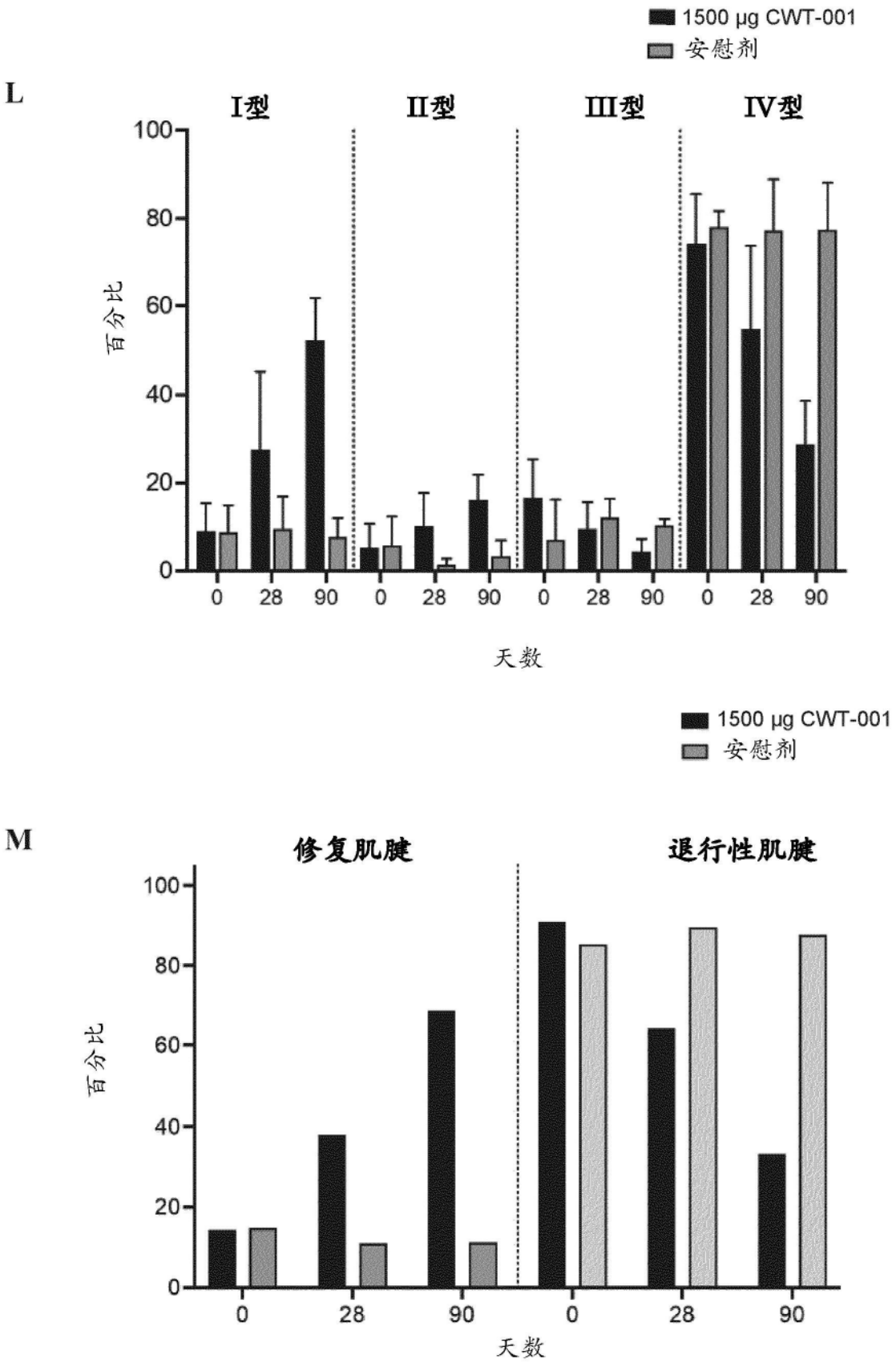

L
1500 μg CWT-001
安慰剂
I型
II型
III型
IV型
百分比
100
80
60
40
20
0
0 28 90 0 28 90 0 28 90 0 28 90
天数
1500 μg CWT-001
安慰剂
M
修复肌腱
退行性肌腱
百分比
100
80
60
40
20
0
0 28 90 0 28 90
天数

图20(续)

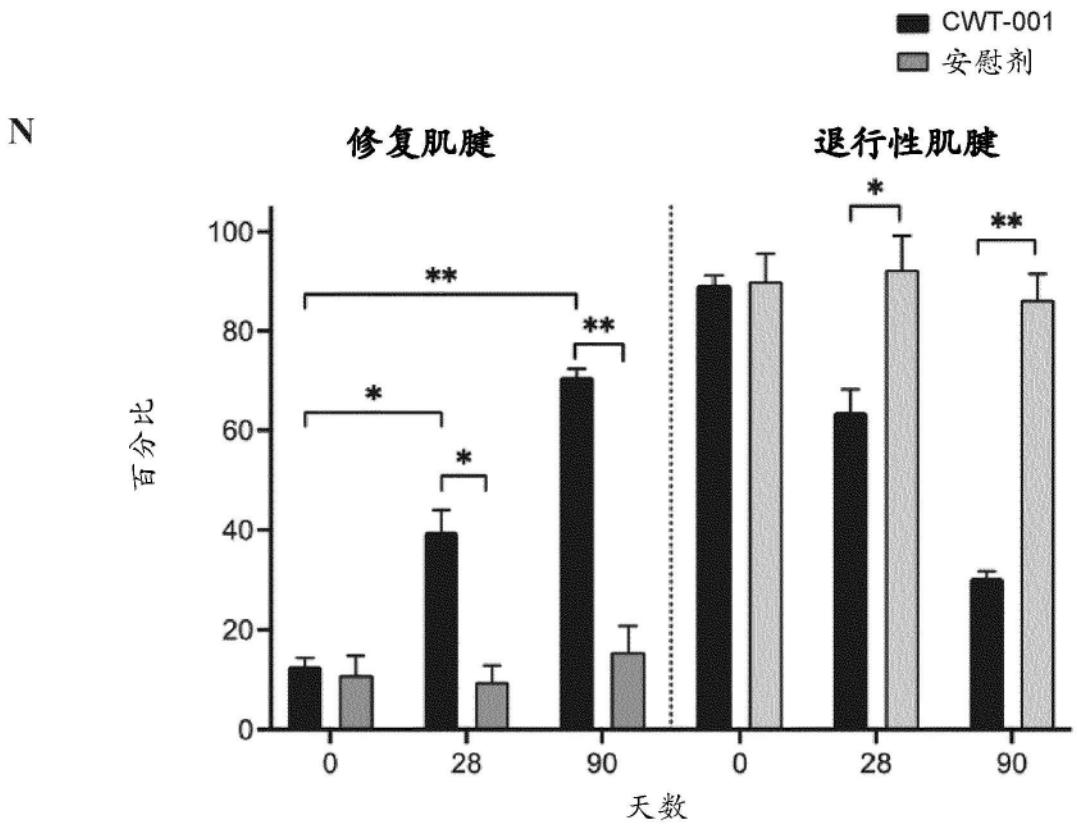


图20(续)