



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116639** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 04453</p> <p>(22) Дата подання заявки: 08.10.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.04.2018</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/711,514, 61/779,137</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 09.10.2012, 13.03.2013</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.06.2015, Бюл.№ 12</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2018, Бюл.№ 8</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2013/063884, 08.10.2013</p>	<p>(72) Винахідник(и): Даффілд Джеремі (US), Бхат Балкришен (US), Маккенна Дідре (US)</p> <p>(73) Власник(и): РЕГ'ЮЛЕС ТЕРАП'ЮТИКС ІНК., 10614 Science Center Drive, San Diego, CA 92121, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: DAMIEN NOONE ET AL, "An update on the pathomechanisms and future therapies of Alport syndrome", PEDIATRIC NEPHROLOGY, (20120818), vol. 28, no. 7, pages 1025 - 1036 X. ZHONG ET AL, "Smad3-Mediated Upregulation of miR-21 Promotes Renal Fibrosis", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, (20110818), vol. 22, no. 9, pages 1668 - 1681 JIN CHEN ET AL, "Relation between MicroRNA Expression in Peritoneal Dialysis Effluent and Peritoneal Transport Characteristics", DISEASE MARKERS, (201204), vol. 33, no. 1, pages 35 - 42 CHEUK-CHUN SZETO ET AL, "Micro-RNA Expression in the Urinary Sediment of Patients with Chronic Kidney Diseases", DISEASE MARKERS, (20120928), vol. 33, no. 3, pages 137 - 144 DOMINIC COSGROVE, "Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective", PEDIATRIC NEPHROLOGY, (20110401), vol. 27, no. 6, pages 885 - 890 OLIVER GROSS ET AL, "Treatment of Alport syndrome: beyond animal models", KIDNEY INTERNATIONAL, (20090617), vol. 76, no. 6, pages 599 - 603 SANJEEV AKKINA ET AL, "MicroRNAs in kidney function and disease", TRANSLATIONAL RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 157, no. 4, (20110203), pages 236 - 240 SAAL SAMUEL ET AL, "MicroRNAs and the kidney: coming of age", CURRENT OPINION IN NEPHROLOGY AND HYPERTENSION, RAPID SCIENCE, LONDON, GB, (20090703), vol. 18, no. 4, pages 317 - 323</p>
---	---

(54) СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ СИНДРОМУ АЛЬПОРТА

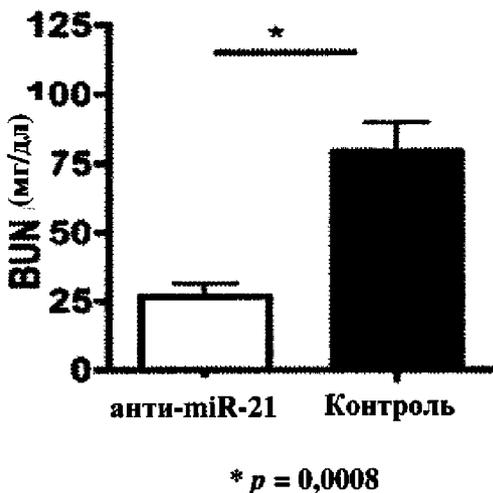
UA 116639 C2

(57) Реферат:

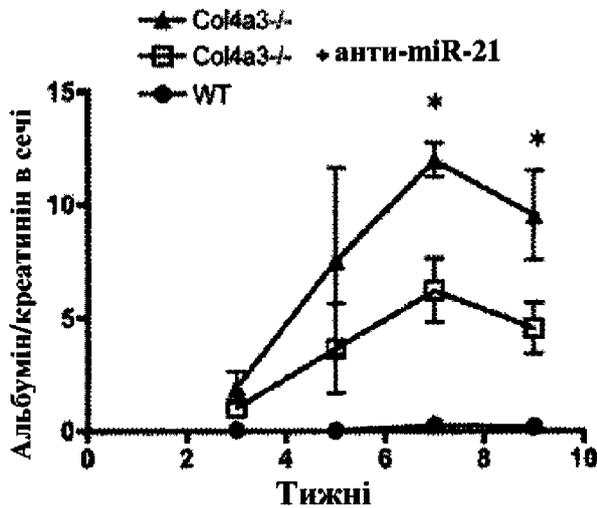
Винахід належить до застосування модифікованого олігонуклеотиду в одержанні лікарського засобу для застосування в способі лікування синдрому Альпорта, який включає введення суб'єкту, що має синдром Альпорта або з підозрою на нього, модифікованого олігонуклеотиду, де модифікований олігонуклеотид складається з 12-25 зв'язаних нуклеозидів, і де нуклеотидна послідовність модифікованого олігонуклеотиду комплементарна miR-21

Фігура 1

A.



B.



ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

У даному документі забезпечені способи та композиції для лікування синдрому Альпорта.

ОПИС ВІДОМОГО РІВНЯ ТЕХНІКИ

5 Колаген IV типу, головний компонент базальної мембрани, являє собою сукупність із шести альфа-ланцюгів: колаген альфа-1 (IV типу), колаген альфа-2 (IV типу), колаген альфа-3 (IV типу), колаген альфа-4 (IV типу), колаген альфа-5 (IV типу) та колаген альфа-6 (IV типу). Ланцюги альфа-3, альфа-4 та альфа-6 колагену IV є основними компонентами колагенової сітки гломерулярної базальної мембрани (GBM), яка здійснює важливу функцію фільтрації крові ниркою.

10 Синдром Альпорта являє собою спадкову форму захворювання нирок, за якої утворюється аномальний тип гломерулярної базальної мембрани, що призводить до інтерстиціального фіброзу, гломерулосклерозу та, у кінцевому результаті, втрати функції нирок. Захворювання також часто характеризується порушеннями слуху та аномаліями очей. Синдром Альпорта спричиняється мутацією Col4a3, Col4a4 або Col4a5, які кодують ланцюги альфа3(IV), 15 альфа4(IV) та альфа5(IV) колагену IV типу, відповідно. Мутації гена Col4a5 у X-хромосомі спричиняють X-зчеплену форму синдрому Альпорта, на яку припадає 85 % всіх випадків захворювання. Аутомно-рецесивна форма виникає внаслідок успадкування мутацій в кожній копії або Col4a3, або Col4a4, кожний з яких розташований у хромосомі 2. Рідкісна аутомно-домінантна форма виникає внаслідок успадкування домінантно-негативної мутації або гена 20 Col4a3, або Col4a4. X-зчеплена форма є більш важкою у чоловіків, ніж у жінок, причому у чоловіків більшість випадків прогресує до термінальної стадії ниркової недостатності (ESRD). Аутомно форма характеризується подібною важкістю у чоловіків та жінок. Більшість випадків захворювання виникає унаслідок спадкової мутації, але деякі випадки виникають унаслідок de novo мутації одного з генів Col4aA.

25 КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному документі забезпечені способи лікування синдрому Альпорта, які включають уведення суб'єктові, що має синдром Альпорта або з підозрою на нього, модифікованого олігонуклеотиду, який складається з 12-25 зв'язаних нуклеозидів, де нуклеотидна послідовність модифікованого олігонуклеотиду комплементарна miR-21. У конкретних варіантах здійснення у 30 суб'єкта був діагностований синдром Альпорта перед введенням модифікованого олігонуклеотиду. У конкретних варіантах здійснення перед введенням модифікованого олігонуклеотиду була визначена наявність підвищеного рівня miR-21 у тканині нирок суб'єкта. У конкретних варіантах здійснення перед введенням модифікованого олігонуклеотиду була визначена наявність підвищеного рівня miR-21 у сечі або крові суб'єкта.

35 У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, введення модифікованого олігонуклеотиду, комплементарного miR-21, суб'єктові, що має синдром Альпорта або з підозрою на нього, може поліпшити функцію нирок; відстрочити початок термінальної стадії ниркової недостатності; відстрочити час діалізу; відстрочити час трансплантації нирок та/або збільшити очікувану тривалість життя у суб'єкта.

40 У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, введення модифікованого олігонуклеотиду, комплементарного miR-21, суб'єктові, що має синдром Альпорта або з підозрою на нього, може знизити гематурію; відстрочити початок розвитку гематурії; знизити протеїнурію; відстрочити початок розвитку протеїнурії; знизити фіброз нирок; сповільнити подальше прогресування фіброзу та/або припинити подальше прогресування 45 фіброзу.

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, суб'єкт може мати мутацію, вибрану з мутації гена, який кодує ланцюг альфа 3 колагену IV типу, мутацію гена, який кодує ланцюг альфа 4 колагену IV типу, або мутацію гена, який кодує ланцюг альфа 5 колагену IV типу. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт є чоловіком. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт є жінкою. У конкретних варіантах здійснення суб'єкта ідентифікують як такого, який має гематурію та/або протеїнурію. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт має знижену функцію нирок. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт потребує поліпшеної функції нирок.

Будь-який з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, може передбачати вимірювання рівня азоту сечовини в крові суб'єкта; вимірювання рівня креатиніну в крові 55 суб'єкта; вимірювання у суб'єкта кліренсу креатиніну; вимірювання у суб'єкта ступеня протеїнурії; вимірювання у суб'єкта співвідношення альбумін:креатинін та/або вимірювання у суб'єкта швидкості гломерулярної фільтрації.

Будь-який з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, може передбачати вимірювання рівня білка N-ацетил-β-D-глюкозамінідаза (NAG) у сечі суб'єкта; вимірювання рівня 60 білка ліпокалін, асоційованого з желатиназою нейтрофілів (NGAL), у сечі суб'єкта; вимірювання

білка молекула ниркового ушкодження-1 (KIM-1) у сечі суб'єкта; вимірювання рівня білка інтерлейкін-18 (IL-18) у сечі суб'єкта; вимірювання рівнів моноцитарного хемоатрактантного білка (MCP1) у сечі суб'єкта; вимірювання рівнів фактора росту сполучної тканини (CTGF) у сечі суб'єкта; вимірювання рівня фрагментів колагену IV (Col IV) у сечі суб'єкта; вимірювання рівня фрагментів колагену III (Col III) у сечі суб'єкта та/або вимірювання рівнів білка подоцитів у сечі суб'єкта, де білок подоцитів вибраний з нефрину та подоцину. Будь-який з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, може передбачати вимірювання рівня цистатину С у крові суб'єкта; вимірювання рівня білка β -trace protein (BTP) у крові суб'єкта та вимірювання рівня 2-мікроглобуліну (B2M) у крові суб'єкта.

Будь-який зі способів, забезпечених у даному документі, може поліпшити один або декілька маркерів функції нирок, вибраних зі зниженого рівня азоту сечовини в крові суб'єкта; зниженого рівня креатиніну в крові суб'єкта; поліпшеного кліренсу креатиніну у суб'єкта; зниженої протеїнурії у суб'єкта; зниженого співвідношення альбумін:креатинін у суб'єкта та/або збільшеної швидкості гломерулярної фільтрації у суб'єкта. Будь-який зі способів, забезпечених у даному документі, може поліпшити один або декілька маркерів функції нирок у суб'єкта, вибраних зі зниженого рівня NAG у сечі суб'єкта; зниженого рівня NGAL у сечі суб'єкта; зниженого рівня KIM-1 у сечі суб'єкта; зниженого рівня IL-18 у сечі суб'єкта; зниженого рівня MCP1 у сечі суб'єкта; зниженого рівня CTGF у сечі суб'єкта; зниженого рівня фрагментів колагену IV у сечі суб'єкта; зниженого рівня фрагментів колагену III у сечі суб'єкта та знижених рівнів білка подоцитів у сечі суб'єкта, де білок подоцитів вибраний з нефрину та подоцину. Будь-який зі способів, забезпечених у даному документі, може поліпшити один або декілька маркерів функції нирок, вибраних зі зниженого рівня рівня цистатину С у крові суб'єкта; зниженого рівня білка β -trace protein (BTP) у крові суб'єкта та зниженого рівня 2-мікроглобуліну (B2M) у крові суб'єкта.

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, протеїнурія являє собою альбумінурію. Альбумінурія може являти собою альбумінурію на верхній межі норми, мікроальбумінурію або макроальбумінурію.

У конкретних варіантах здійснення синдром Альпорта являє собою X-зчеплену форму синдрому Альпорта. У конкретних варіантах здійснення синдром Альпорта являє собою аутосомну форму синдрому Альпорта.

Будь-який з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, може передбачати застосування щонайменше одного додаткового типу терапії, вибраного із застосування інгібітора ангіотензин-II-перетворюючого ферменту (ACE), блокатора рецепторів ангіотензину II (ARB), антигіпертензивного засобу, аналога вітаміну D, перорального засобу, що зв'язує фосфати, діалізу та трансплантації нирки. У будь-яких із цих варіантів здійснення інгібітори ангіотензин-II-перетворюючого ферменту (ACE) вибрані з каптоприлу, еналаприлу, лізиноприлу, беназеприлу, хінаприлу, фозиноприлу та раміприлу. У будь-яких із цих варіантів здійснення блокатори рецепторів ангіотензину II (ARB) вибрані з кандесартану, ірбесартану, олмесартану, лозартану, валсартану, телмісартану та епросартану. У будь-яких з цих варіантів здійснення інгібітор ACE вибраний з цилазаприлу, периндоприлу та трандолаприлу.

У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE вводять при дозі в діапазоні від 0,5 до 1 мг/м²/доба, від 1 до 6 мг/м²/доба, від 1 до 2 мг/м²/доба, від 2 до 4 мг/м²/доба або від 4 до 8 мг/м²/доба.

У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі в діапазоні від 6,25 до 150 мг/м²/доба. У будь-яких з цих варіантів здійснення ARB вводять при дозі 6,25 мг/м²/доба, 10 мг/м²/доба, 12,5 мг/м²/доба, 18,75 мг/м²/доба, 37,5 мг/м²/доба, 50 мг/м²/доба або 150 мг/м²/доба.

У конкретних варіантах здійснення щонайменше один додатковий тип терапії являє собою антагоніст альдостерону. У конкретних варіантах здійснення антагоніст альдостерону являє собою спіронолактон. У конкретних варіантах здійснення спіронолактон вводять при дозі в діапазоні від 10 до 35 мг щодня. У конкретних варіантах здійснення спіронолактон вводять при дозі 25 мг щодня.

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, нуклеотидна послідовність модифікованого олігонуклеотиду щонайменше на 90 % комплементарна, щонайменше на 95 % комплементарна або на 100 % комплементарна нуклеотидній послідовності miR-21 (SEQ ID NO: 1).

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, модифікований олігонуклеотид складається з 8-30, 12-25 або 15-25 зв'язаних нуклеозидів. У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, модифікований олігонуклеотид складається з 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 або 22 зв'язаних нуклеозидів. У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, модифікований олігонуклеотид

складається з 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 або 22 зв'язаних нуклеозидів.

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, модифікований олігонуклеотид містить щонайменше один модифікований нуклеозид. Модифікований нуклеозид може бути вибраний із S-cEt-нуклеозиду, 2'-O-метоксіетилнуклеозиду та LNA-нуклеозиду. Модифікований олігонуклеотид може містити щонайменше один модифікований міжнуклеозидний зв'язок. Кожний міжнуклеозидний зв'язок модифікованого олігонуклеотиду може являти собою модифікований міжнуклеозидний зв'язок. У конкретних варіантах здійснення модифікований міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, модифікований олігонуклеотид може мати структуру 5'-A_EC_SATC_SAGTC_STGAU_SAAGC_STA_E-3" (SEQ ID NO: 3), де нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-cEt-нуклеозиди; і кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У даному документі забезпечується застосування модифікованого олігонуклеотиду, який складається з 8-30, 12-25 або 15-25 зв'язаних нуклеозидів, де нуклеотидна послідовність модифікованого олігонуклеотиду комплементарна miR-21, для лікування синдрому Альпорта.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1. Анти-miR-21 поліпшує функцію нирок у мишей Col4a3^{-/-}. Рівень азоту сечовини в крові (BUN) в момент часу 9 тижнів (A) та співвідношення альбумін/креатинін у сечі у тижні 3, 5, 7 та 9 (B). * вказує на статистичну значущість.

Фігура 2. Анти-miR-21 попереджає розвиток гломерулосклерозу у мишей Col4a3^{-/-}. Гломерулосклероз оцінювали із використанням напівкількісного індексу склерозу в діапазоні від 0 (відсутність склерозу) до 4 (виражений склероз) (n=10).

Фігура 3. Анти-miR-21 знижує фіброз у мишей Col4a3^{-/-}. (A) Кількісне визначення фіброзу, зафарбованого у червоний колір із використанням піросиріусу (сиріусу), у нирці (n=6) та (B) кількісна ПЛР для транскриптів Col1a1, нормалізованих відносно GAPDH (n=6). * вказує на статистичну значущість.

Фігура 4. Анти-miR-21 знижує показник рангової оцінки ниркового ушкодження у мишей Col4a3^{-/-}. (A) Ранговий показник ниркового ушкодження із використанням зрізів нирок у мишей віком 9 тижнів. (B) Відносна кількість гломерулярних серпоподібних утворень (n=5). (C) Кількісне визначення ушкодження ниркових каналців (n=5). * вказує на статистичну значущість.

Фігура 5. Анти-miR-21 знижує інфільтрацію макрофагів (A) та зменшує кількість міофібробластів (B) у мишей Col4a3^{-/-}. (A) Кількісне визначення F4/80 з використанням барвника на зрізах нирок у мишей віком 9 тижнів (n=5). (B) Кількісне визначення αSMA з використанням барвника на зрізах нирок у мишей віком 9 тижнів (n=5). * вказує на статистичну значущість.

Фігура 6. Анти-miR-21 знижує кількість реакційнодатних частинок кисню у мишей Col4a3^{-/-}. (A) Кількісне визначення перекису водню у сечі мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21 або PBS-контролем (n=8; * вказує на статистичну значущість); (B) кількісне визначення DES у тканині нирок мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21 або PBS-контролем, та у мишей дикого типу (n=3 на групу; *вказує на статистичну значущість).

Фігура 7. Анти-miR-21 збільшує кількість подоцитів у мишей Col4a3^{-/-}. Кількісне визначення числа WT1-позитивних клітин у клубочку мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21 або PBS-контролем (n=3; p=0,005).

Фігура 8. Анти-miR-21 збільшує тривалість життя мишей Col4a3^{-/-}. (A) Вага мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21 або PBS-контролем (p < 0,01); (B) тривалість життя мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21 або PBS-контролем (p < 0,001).

Фігура 9. Анти-miR-21 поліпшує функцію нирок та збільшує тривалість життя мишей Col4a3^{-/-} дозозалежним чином (n=10-13 на групу обробки). (A) Рівень азоту сечовини у крові в момент часу 7 тижнів; (B) тривалість життя мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21 при декількох дозах, один раз на тиждень (QW) або двічі на тиждень (BIW), або PBS-контролем.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Якщо не зазначено інше, усі технічні та наукові терміни, використані в даному документі, мають те саме значення, яке звичайно розуміє фахівець у галузі техніки, до якої відноситься даний винахід. Якщо не наведені конкретні визначення, номенклатура, використовувана стосовно аналітичної хімії, синтетичної органічної хімії та медичної і фармацевтичної хімії, а також їх способи і методики, описані у даному документі, добре відомі та широко застосовуються в даній галузі техніки. У випадку, якщо в даному документі є декілька визначень

термінів, перевагу мають визначення з даного розділу. Для хімічного синтезу, хімічного аналізу, одержання, складання та доставки фармацевтичних препаратів, а також лікування суб'єктів можна застосовувати стандартні методики. Такі конкретні методики та способи можна знайти, наприклад, в "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" за редакцією Sangvi та Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; та в "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18-е видання, 1990; і при цьому вони включені в даний документ за допомогою посилання для будь-яких цілей. У припустимих випадках усі патенти, заявки на патенти, опубліковані заявки та публікації, послідовності з GENBANK, веб-сайти та інші опубліковані матеріали, на які посилаються по всьому повному розкриттю в даному документі, якщо не зазначено інше, включені за допомогою посилання у повному обсязі. Якщо посилання робиться на URL або інший подібний ідентифікатор або адресу, то розуміють, що такі ідентифікатори можуть змінюватися, і конкретна інформація в інтернеті може змінюватися, але шляхом пошуку в інтернеті можна знайти еквівалентну інформацію. Посилання на неї свідчать про доступність та публічне поширення такої інформації.

Перед тим, як будуть розкриті та опубліковані дані композиції та способи, слід розуміти, що термінологія, використана в даному документі, служить тільки для цілей опису конкретних варіантів здійснення та не призначена бути обмежувальною. Слід зазначити, що використані в описі та формулі винаходу, що додається, форми однини включають посилання на множину, якщо з контексту явно не випливає інше.

Визначення

"Синдром Альпорта" означає спадкову форму захворювання нирок, за якої утворюється аномальний рівень гломерулярної базальної мембрани (GBM), що призводить до інтерстиціального фіброзу, гломерулосклерозу та, у кінцевому результаті, втрати функції нирок. Захворювання також часто характеризується порушеннями слуху та аномаліями очей.

"Гематурія" означає присутність еритроцитів у сечі.

"Альбумінурія" означає присутність надлишкового альбуміну в сечі та без обмежень включає альбумінурію у межах норми, альбумінурію на верхній межі норми, мікроальбумінурію та макроальбумінурію. У нормі бар'єр проникності гломерулярної фільтрації, який складається з подоцитів, гломерулярної базальної мембрани та ендотеліальних клітин, запобігає витіканню сироваткового білка у сечу. Альбумінурія може відобразити ушкодження гломерулярного бар'єра проникності. Альбумінурію можна розраховувати виходячи зі зразка сечі, одержаного за 24 години, зразка сечі, одержаного за ніч, або разового зразка сечі.

"Альбумінурія на верхній межі норми" означає підвищену альбумінурію, яка характеризується (i) екскрецією від 15 до <30 мг альбуміну у сечу за 24 години та/або (ii) співвідношенням альбумін/креатинін від 1,25 до <2,5 мг/ммоль (або від 10 до <20 мг/г) у чоловіків або від 1,75 до <3,5 мг/ммоль (або від 15 до <30 мг/г) у жінок.

"Мікроальбумінурія" означає підвищену альбумінурію, яка характеризується (i) екскрецією від 30 до 300 мг альбуміну у сечу за 24 години та/або (ii) співвідношенням альбумін/креатинін від 2,5 до <25 мг/ммоль (або від 20 до <200 мг/г) у чоловіків або від 3,5 до <35 мг/ммоль (або від 30 до <300 мг/г) у жінок.

"Макроальбумінурія" означає підвищену альбумінурію, яка характеризується екскрецією більше 300 мг альбуміну у сечу за 24 години та/або (ii) співвідношенням альбумін/креатинін >25 мг/ммоль (або >200 мг/г) у чоловіків або >35 мг/ммоль (або >300 мг/г) у жінок.

"Співвідношення альбумін/креатинін" означає співвідношення альбуміну сечі (мг/дл) до креатиніну сечі (г/дл) та його виражають у вигляді мг/г. У конкретних варіантах здійснення співвідношення альбумін/креатинін можна розраховувати виходячи з разового зразка сечі та можна застосовувати для того, щоб оцінити екскрецію альбуміну протягом періоду 24 години.

"Розрахована швидкість гломерулярної фільтрації (eGFR) або "швидкість гломерулярної фільтрації (GFR)" означає вимірювання фільтрації креатиніну нирками і застосовується для того, щоб оцінити кількість крові, яка проходить через клубочки за хвилину. Результати у межах норми можуть знаходитися у діапазоні 90-120 мл/хв./1,73 м². Рівні нижче за 60 мл/хв./1,73 м² протягом 3 або більше місяців можуть вказувати на хронічне захворювання нирок. Рівні нижче за 15 мл/хв./1,73 м² можуть вказувати на ниркову недостатність.

"Протеїнурія" означає присутність надлишку сироваткових білків у сечі. Протеїнурія може характеризуватися екскрецією > 250 мг білка в сечу за 24 години та/або співвідношенням білка у сечі до креатиніну $\geq 0,20$ мг/мг. Сироваткові білки, рівень яких підвищений у зв'язку з протеїнурією, без обмеження включають альбумін.

"Рівень азоту сечовини в крові" або "BUN" означає міру кількості азоту в крові у формі сечовини. У печінці сечовина утворюється в циклі сечовини у якості побічного продукту розщеплення білка, і при цьому сечовина видаляється з крові нирками. У нормі кров дорослої

людини може містити 7-21 мг азоту сечовини на 100 мл (7–21 мг/дл) крові. Вимірювання азоту сечовини в крові використовують у якості показника здоров'я нирок. Якщо нирки не здатні видаляти сечовину з крові за нормальних умов, рівень BUN у суб'єкта підвищується.

5 "Термінальна стадія ниркової недостатності (ESRD)" означає повну або майже повну втрату функції нирок.

"Порушена функція нирок" означає знижену функцію нирок у порівнянні з нормальною функцією нирок.

10 "Фіброз" означає утворення або розвиток надлишкової фіброзної сполучної тканини в органі або тканині. У конкретних варіантах здійснення фіброз має місце як репаративний або реактивний процес. У конкретних варіантах здійснення фіброз має місце у відповідь на ураження або ушкодження. Вираз "фіброз" слід розуміти як утворення або розвиток надлишкової фіброзної сполучної тканини в органі або тканині в якості репаративного або реактивного процесу, на відміну від утворення фіброзної тканини як нормальної складової органа або тканини.

15 "Сповільнює подальше прогресування" означає зниження швидкості, з якою медичне порушення змінюється до запущеного стану.

"Припиняє подальше прогресування" означає зупинку прогресування медичного порушення до запущеного стану.

20 "Відстрочувати час діалізу" означає підтримання достатньої функції нирок таким чином, що потреба в лікуванні за допомогою діалізу стає відстроченою.

"Відстрочувати час трансплантації нирок" означає підтримання функції нирок таким чином, що потреба в нирці для трансплантації стає відстроченою.

"Збільшує очікувану тривалість життя" означає продовження життя суб'єкта за допомогою лікування одного або декількох симптомів захворювання у суб'єкта.

25 "Анти-miR" означає олігонуклеотид з нуклеотидною послідовністю, комплементарною мікроРНК. У конкретних варіантах здійснення анти-miR являє собою модифікований олігонуклеотид.

30 "Анти-miR-X", де "miR-X" позначає конкретну мікроРНК, означає олігонуклеотид з нуклеотидною послідовністю, комплементарною miR-X. У конкретних варіантах здійснення анти-miR-X повністю комплементарна (тобто на 100 % комплементарна) miR-X. У конкретних варіантах здійснення анти-miR-X щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % комплементарна miR-X. У конкретних варіантах здійснення анти-miR-X являє собою модифікований олігонуклеотид.

35 "miR-21" означає зрілу мікроРНК із нуклеотидною послідовністю UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO: 1).

"Послідовність miR-21 зі структурою типу стебло-петля" означає послідовність зі структурою типу стебло-петля з нуклеотидною послідовністю UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGG CUGUCUGACA (SEQ ID NO: 2).

40 "Цільова нуклеїнова кислота" означає нуклеїнову кислоту, з якою призначено гібридизувати олігомерну сполуку.

"Націлювання" означає процес конструювання та вибору нуклеотидної послідовності, яка буде гібридизуватися з цільовою нуклеїновою кислотою.

45 "Націлений на" означає наявність нуклеотидної послідовності, яка дозволить здійснювати гібридизацію з цільовою нуклеїновою кислотою.

"Модуляція" означає відхилення функції, кількості або активності. У конкретних варіантах здійснення модуляція означає збільшення функції, кількості або активності. У конкретних варіантах здійснення модуляція означає зменшення функції, кількості або активності.

50 "Експресія" означає будь-які функції та етапи, завдяки яким інформація, яка кодується геном, перетворюється на структури, що присутні та функціонують в клітині.

"Нуклеотидна послідовність" означає порядок суміжних нуклеїнових основ в олігомерній сполуці або нуклеїновій кислоті, як правило, перелічених в орієнтації 5'-3", незалежно від будь-якої модифікації цукрів, зв'язків та/або нуклеїнових основ.

55 "Суміжні нуклеїнові основи" означають нуклеїнові основи, що безпосередньо прилягають одна до одної в нуклеїновій кислоті.

"Комплементарність нуклеїнових основ" означає здатність двох нуклеїнових основ до нековалентного спарювання за допомогою утворення водневих зв'язків.

60 "Комплементарний" означає, що одна нуклеїнова кислота здатна гібридизуватися з іншою нуклеїновою кислотою або олігонуклеотидом. У конкретних варіантах здійснення комплементарний відноситься до олігонуклеотиду, здатного гібридизуватися із цільовою

нуклеїною кислотою.

"Повністю комплементарний" означає, що кожна нуклеїнова основа олігонуклеотиду здатна утворювати пару з нуклеїною основою в кожному відповідному положенні в цільовій нуклеїновій кислоті. У конкретних варіантах здійснення олігонуклеотид повністю комплементарний мікроРНК, тобто кожна нуклеїнова основа олігонуклеотиду комплементарна нуклеїновій основі у відповідному положенні в мікроРНК. У конкретних варіантах здійснення олігонуклеотид, де кожна нуклеїнова основа є комплементарною нуклеїновій основі у ділянці послідовності мікроРНК зі структурою типу стебло-петля, повністю комплементарний послідовності мікроРНК зі структурою типу стебло-петля.

"Процентна комплементарність" означає процентну частку нуклеїнових основ олігонуклеотиду, комплементарних частині цільової нуклеїнової кислоти, що має таку ж довжину. Процентну комплементарність обчислюють шляхом ділення числа нуклеїнових основ олігонуклеотиду, комплементарних нуклеїновим основам у відповідних положеннях у цільовий нуклеїновій кислоті, на загальне число нуклеїнових основ в олігонуклеотиді.

"Процентна ідентичність" означає число нуклеїнових основ у першій нуклеїновій кислоті, ідентичних нуклеїновим основам у відповідних положеннях у другій нуклеїновій кислоті, поділене на загальне число нуклеїнових основ у першій нуклеїновій кислоті. У конкретних варіантах здійснення перша нуклеїнова кислота являє собою мікроРНК, і друга нуклеїнова кислота являє собою мікроРНК. У конкретних варіантах здійснення перша нуклеїнова кислота являє собою олігонуклеотид, і друга нуклеїнова кислота являє собою олігонуклеотид.

"Гібридизувати" означає гібридизацію комплементарних нуклеїнових кислот, що відбувається в результаті комплементарності нуклеїнових основ.

"Незбіжність" означає нуклеїнову основу першої нуклеїнової кислоти, нездатну утворювати пару з нуклеїною основою у відповідному положенні другої нуклеїнової кислоти.

"Ідентична" стосовно нуклеотидних послідовностей означає наявність такої ж нуклеотидної послідовності незалежно від модифікацій цукрів, зв'язків та/або нуклеїнових основ і незалежно від метильованого стану будь-яких присутніх піримідинів.

"МікроРНК" означає ендегенну некодуючу РНК, що має довжину від 18 до 25 нуклеїнових основ, яка є продуктом розщеплення пре-мікроРНК за допомогою ферменту дайсер. Приклади зрілих мікроРНК знаходяться у базі даних мікроРНК, відомій як miRBase (<http://microna.sanger.ac.uk/>). У конкретних варіантах здійснення мікроРНК скорочують як "мікроРНК" або "miR".

"Пре-мікроРНК" або "пре-miR" означає некодуючу РНК, що має шпилькову структуру, яка є продуктом розщеплення при-miR за допомогою рибонуклеази, специфічної щодо дволанцюгових РНК, відомої як Drosha.

"Послідовність зі структурою типу стебло-петля" означає РНК, що має шпилькову структуру і містить послідовність зрілої мікроРНК. Послідовності пре-мікроРНК і послідовності зі структурами типу стебло-петля можуть перекриватися. Приклади послідовностей зі структурами типу стебло-петля знаходяться у базі даних мікроРНК, відомій як miRBase (<http://microna.sanger.ac.uk/>).

"При-мікроРНК" або "при-miR" означає некодуючу РНК, що має шпилькову структуру, яка є субстратом для рибонуклеази Drosha, специфічної щодо дволанцюгових РНК.

"Попередник мікроРНК" означає транскрипт, що походить від геномної ДНК та містить некодуючу структуровану РНК, яка містить одну або декілька послідовностей мікроРНК. Наприклад, у конкретних варіантах здійснення попередник мікроРНК являє собою пре-мікроРНК. У конкретних варіантах здійснення попередник мікроРНК являє собою при-мікроРНК.

"МікроРНК-регульований транскрипт" означає транскрипт, регульований за допомогою мікроРНК.

"Послідовність затравки" означає нуклеотидну послідовність, що містить від 6 до 8 суміжних нуклеїнових основ з нуклеїнових основ 1-9 5'-кінця послідовності зрілої мікроРНК.

"Відповідна послідовності затравки" означає нуклеотидну послідовність, комплементарну послідовності затравки, та таку, що має однакову довжину з послідовністю затравки.

"Олігомерна сполука" означає сполуку, що містить декілька зв'язаних мономерних субодиниць. Олігомерні сполуки включають олігонуклеотиди.

"Олігонуклеотид" означає сполуку, що містить декілька зв'язаних нуклеозидів, кожний з яких може бути модифікованим або немодифікованим незалежно один від одного.

"Міжнуклеозидний зв'язок, що зустрічається в природі" означає 3'-5'-фосфодієфірний зв'язок між нуклеозидами.

"Природний цукор" означає цукор, який виявляють в ДНК (2'-H) або РНК (2'-OH).

"Міжнуклеозидний зв'язок" означає ковалентний зв'язок між суміжними нуклеозидами.

"Зв'язані нуклеозиди" означають нуклеозиди, з'єднані за допомогою ковалентного зв'язку.

"Нуклеїнова основа" означає гетероциклічний фрагмент, здатний до нековалентного спарювання з іншою нуклеїновою основою.

"Нуклеозид" означає нуклеїнову основу, зв'язану із цукровим фрагментом.

5 "Нуклеотид" означає нуклеозид, що має фосфатну групу, ковалентно зв'язану із цукровою частиною нуклеозиду.

"Сполука, що містить модифікований олігонуклеотид, який складається з" ряду зв'язаних нуклеозидів, означає сполуку, що включає модифікований олігонуклеотид, який має встановлене число зв'язаних нуклеозидів. Таким чином, сполука може включати додаткові

10 замісники або кон'югати. Якщо не зазначено інше, сполука не включає будь-які додаткові нуклеозиди, окрім нуклеозидів модифікованого олігонуклеотиду.

"Модифікований олігонуклеотид" означає олігонуклеотид, що має одну або декілька модифікацій, що стосуються кінця, цукру, нуклеїнової основи та/або міжнуклеозидного зв'язку, що зустрічаються в природі. Модифікований олігонуклеотид може містити немодифіковані

15 нуклеозиди.

"Одноланцюговий модифікований олігонуклеотид" означає модифікований олігонуклеотид, що не гібридується з комплементарним ланцюгом.

"Модифікований нуклеозид" означає нуклеозид, що має будь-яку зміну в порівнянні з нуклеозидом, що зустрічається в природі. Модифікований нуклеозид може мати модифікований

20 цукор і немодифіковану нуклеїнову основу. Модифікований нуклеозид може мати модифікований цукор і модифіковану нуклеїнову основу. Модифікований нуклеозид може мати природний цукор і модифіковану нуклеїнову основу. У конкретних варіантах здійснення модифікований нуклеозид являє собою біциклічний нуклеозид. У конкретних варіантах здійснення модифікований нуклеозид являє собою нуклеозид, який відрізняється від

25 біциклічного.

"Модифікований міжнуклеозидний зв'язок" означає будь-яку зміну в порівнянні з міжнуклеозидним зв'язком, що зустрічається в природі.

"Фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок" означає зв'язок між нуклеозидами, де один з немістових атомів є атомом сірки.

30 "Модифікований цукровий фрагмент" означає заміщення та/або будь-яку зміну в порівнянні із природним цукром.

"Немодифікована нуклеїнова основа" означає гетероциклічні основи РНК або ДНК, що зустрічаються в природі, пуринові основи аденін (A) та гуанін (G) і піримідинові основи тимін (T), цитозин (C) (включаючи 5-метилцитозин) та урацил (U).

35 "5-метилцитозин" означає цитозин, що містить метильну групу, приєднану до положення 5.

"Неметильований цитозин" означає цитозин, що не має метильної групи, приєднаної до положення 5.

"Модифікована нуклеїнова основа" означає будь-яку нуклеїнову основу, що не є немодифікованою нуклеїновою основою.

40 "Цукровий фрагмент" означає фуранозил, що зустрічається в природі, або модифікований цукровий фрагмент.

"Модифікований цукровий фрагмент" означає заміщений цукровий фрагмент або замітник цукру.

45 "2'-О-метиловий цукор" або "2'-ОМе-цукор" означає цукор, що має О-метилу модифікацію в 2'-положенні.

"2'-О-метоксіетилу цукор" або "2'-МОЕ-цукор" означає цукор, що має О-метоксіетилу модифікацію в 2'-положенні.

"2'-фтор" або "2'-F" означає цукор, що має модифікацію фтором в 2'-положенні.

50 "Біциклічний цукровий фрагмент" означає модифікований цукровий фрагмент, що містить 4-7-членне кільце (включаючи без обмежень фуранозил), яке містить місток, що з'єднує два атоми 4-7-членного кільця з утворенням другого кільця, що дає в результаті біциклічну структуру. У конкретних варіантах здійснення 4-7-членне кільце є кільцем цукру. У конкретних варіантах здійснення 4-7-членне кільце являє собою фуранозил. У таких конкретних варіантах здійснення місток з'єднує 2'-вуглець і 4'-вуглець фуранозилу. Необмежуючі ілюстративні біциклічні цукрові фрагменти включають LNA, ENA, cEt, S-cEt та R-cEt.

55 "Цукровий фрагмент закритої нуклеїнової кислоти (LNA)" означає заміщений цукровий фрагмент, що містить місток (CH₂)-О між 4" і 2" атомами кільця фуранози.

"Цукровий фрагмент ENA" означає заміщений цукровий фрагмент, що містить місток (CH₂)₂-О між 4" і 2" атомами кільця фуранози.

60 "Цукровий фрагмент із закріпленим етилом (cEt)" означає заміщений цукровий фрагмент,

який містить місток $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ між 4" і 2" атомами кільця фуранози. У конкретних варіантах здійснення місток $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ закріплений в S-орієнтації. У конкретних варіантах здійснення $(\text{CH}_2)_2\text{-O}$ закріплений в R-орієнтації.

5 "Цукровий фрагмент S-cEt" означає заміщений цукровий фрагмент, що містить S-закріплений місток $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ між 4" і 2" атомами кільця фуранози.

"Цукровий фрагмент R-cEt" означає заміщений цукровий фрагмент, що містить R-закріплений місток $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ між 4" і 2" атомами кільця фуранози.

"2'-О-метилнуклеозид" означає 2'-модифікований нуклеозид, що має 2'-О-метилу модифікацію цукру.

10 "2'-О-метоксіетилнуклеозид" означає 2'-модифікований нуклеозид, що має 2'-О-метоксіетилу модифікацію цукру. 2'-О-метоксіетилнуклеозид може містити модифіковану або немодифіковану нуклеїнову основу.

"2'-фторнуклеозид" означає 2'-модифікований нуклеозид, що має 2'-фтормодифікацію цукру. 2'-фторнуклеозид може містити модифіковану або немодифіковану нуклеїнову основу.

15 "Біциклічний нуклеозид" означає 2'-модифікований нуклеозид, що має біциклічний цукровий фрагмент. Біциклічний нуклеозид може мати модифіковану або немодифіковану нуклеїнову основу.

"cEt-нуклеозид" означає нуклеозид, що містить цукровий фрагмент cEt. cEt-нуклеозид може містити модифіковану або немодифіковану нуклеїнову основу.

20 "S-cEt-нуклеозид" означає нуклеозид, що містить цукровий фрагмент S-cEt.

"R-cEt-нуклеозид" означає нуклеозид, що містить цукровий фрагмент R-cEt.

"β-D-дезоксирибонуклеозид" означає ДНК-нуклеозид, що зустрічається в природі.

"β-D-рибонуклеозид" означає РНК-нуклеозид, що зустрічається в природі.

"LNA-нуклеозид" означає нуклеозид, що містить цукровий фрагмент LNA.

25 "ENA-нуклеозид" означає нуклеозид, що містить цукровий фрагмент ENA.

"Суб'єкт" означає людину або тварину, відмінну від людини, відібрану для лікування або терапії.

"Суб'єкт, що потребує цього" означає суб'єкта, якого ідентифікують як такого, який потребує терапії або лікування.

30 "Суб'єкт, що імовірно має" означає суб'єкта, у якого проявляється один або декілька клінічних індикаторів захворювання.

"Введення" означає надання суб'єктові фармацевтичного засобу або композиції та включає, без обмежень, введення медичним працівником і самостійне введення.

"Парентеральне введення" означає введення за допомогою ін'єкції або інфузії.

35 Парентеральне введення включає, без обмежень, підшкірне введення, внутрішньовенне введення та внутрішньом'язове введення.

"Підшкірне введення" означає введення безпосередньо під шкіру.

"Внутрішньовенне введення" означає введення у вену.

40 "Що вводяться одночасно" відноситься до спільного введення двох або більше засобів будь-яким способом, за якого фармакологічні ефекти обох проявляються у пацієнта в один і той же час. При одночасному введенні не потрібно, щоб обидва засоби вводили в одній фармацевтичній композиції, в одній і тій же лікарській формі або одним і тим же шляхом уведення. Не потрібно, щоб ефекти обох засобів проявлялися в один і той же час. Потрібно тільки, щоб ефекти перекривалися протягом певного періоду часу, і не потрібно, щоб вони були однакової протяжності в часі.

45 "Тривалість" означає період часу, протягом якого триває активність або подія. У конкретних варіантах здійснення тривалість лікування являє собою період часу, протягом якого вводять дози фармацевтичного засобу або фармацевтичної композиції.

50 "Терапія" означає спосіб лікування захворювання. У конкретних варіантах здійснення терапія включає без обмежень хіміотерапію, променеву терапію або введення фармацевтичного засобу.

"Лікування" означає застосування однієї або декількох конкретних процедур, застосовуваних для лікування або полегшення перебігу захворювання. У конкретних варіантах здійснення конкретна процедура являє собою введення одного або декількох фармацевтичних засобів.

55 "Полегшення перебігу" означає зменшення тяжкості щонайменше одного індикатора стану або захворювання. У конкретних варіантах здійснення полегшення перебігу включає відстрочку або вповільнення прогресування одного або декількох індикаторів стану або захворювання. Тяжкість індикаторів може визначатися за допомогою суб'єктивних або об'єктивних заходів, відомих фахівцям у даній галузі техніки.

60 "З підвищеним ризиком розвитку" означає статус, при якому суб'єкт схильний до розвитку

стану або захворювання. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт з підвищеним ризиком розвитку стану або захворювання проявляє один або декілька симптомів стану або захворювання, але не проявляє достатнього числа симптомів, щоб у нього можна було діагностувати стан або захворювання. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт з підвищеним ризиком розвитку стану або захворювання проявляє один або декілька симптомів стану або захворювання, але меншою мірою, ніж потрібно для діагностування стану або захворювання.

"Попередити початок" означає попередити розвиток стану або захворювання у суб'єкта з підвищеним ризиком розвитку захворювання або стану. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт з підвищеним ризиком розвитку захворювання або стану одержує лікування, подібне лікуванню, яке одержує суб'єкт, у якого вже є захворювання або стан.

"Відстрочити початок" означає відстрочити розвиток стану або захворювання у суб'єкта з підвищеним ризиком розвитку захворювання або стану. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт з підвищеним ризиком розвитку захворювання або стану одержує лікування, подібне лікуванню, яке одержує суб'єкт, у якого вже є захворювання або стан.

"Терапевтичний засіб" означає фармацевтичний засіб, застосовуваний для лікування, полегшення перебігу або попередження захворювання.

"Доза" означає встановлену кількість фармацевтичного засобу, передбачену в одному введенні. У конкретних варіантах здійснення дозу можна вводити у двох або більше болюсах, таблетках або ін'єкціях. Наприклад, у конкретних варіантах здійснення, де необхідне підшкірне введення, для необхідної дози потрібний об'єм, який нелегко надати за допомогою однієї ін'єкції. У таких варіантах здійснення можна застосовувати дві або більше ін'єкцій для досягнення необхідної дози. У конкретних варіантах здійснення дозу можна вводити у двох або більше ін'єкціях для того, щоб звести до мінімуму реакцію в місці ін'єкції у індивіда. У конкретних варіантах здійснення дозу вводять за допомогою повільної інфузії.

"Одиниця дозування" означає форму, у якій забезпечений фармацевтичний засіб. У конкретних варіантах здійснення одиниця дозування являє собою флакон, що містить ліофілізований олігонуклеотид. У конкретних варіантах здійснення одиниця дозування являє собою флакон, що містить відновлений олігонуклеотид.

"Терапевтично ефективна кількість" відноситься до кількості фармацевтичного засобу, що забезпечує терапевтичну користь тварині.

"Фармацевтична композиція" означає суміш речовин, придатну для введення індивідові, що включає фармацевтичний засіб. Наприклад, фармацевтична композиція може містити стерильний водний розчин.

"Фармацевтичний засіб" означає речовину, що забезпечує терапевтичний ефект при введенні суб'єктові.

"Активний фармацевтичний інгредієнт" означає речовину у фармацевтичній композиції, що забезпечує необхідний ефект.

"Поліпшена функція органа" означає зміну функції органа убік нормального діапазону значень. У конкретних варіантах здійснення функцію органа визначають шляхом вимірювання рівня молекул, що виявляються в крові або сечі суб'єкта. Наприклад, у конкретних варіантах здійснення поліпшену функцію нирок визначають за зниженням рівня азоту сечовини в крові, зниженням протеїнурії, зниженням альбумінурії і т.п.

"Прийнятний профіль безпеки" означає картину побічних ефектів, що перебуває в клінічно прийнятних межах.

"Побічний ефект" означає фізіологічну відповідь, пов'язану з лікуванням, відмінну від необхідних ефектів. У конкретних варіантах здійснення побічні ефекти включають, без обмежень, реакції в місці ін'єкції, аномалії функціональних проб печінки, аномалії ниркової функції, гепатотоксичність, нефротоксичність, аномалії центральної нервової системи та види міопатії. Такі побічні ефекти можна виявити прямо або опосередковано. Наприклад, підвищені рівні амінотрансферази в сироватці можуть вказувати на гепатотоксичність або аномалію функції печінки. Наприклад, підвищений рівень білірубину може вказувати на гепатотоксичність або аномалію функції печінки.

"Дотримання суб'єктом схеми лікування" означає дотримання суб'єктом вказівок щодо рекомендованої або призначеної терапії.

"Додержуватися припису" означає дотримання суб'єктом вказівок щодо рекомендованої терапії.

"Рекомендована терапія" означає лікування, рекомендоване медичним працівником для лікування, полегшення перебігу або попередження захворювання.

Вираз "кров", використовуваний у даному документі, охоплює цільну кров та фракції крові, наприклад, сироватку та плазму.

Огляд

"Синдром Альпорта" являє собою спадкову форму захворювання нирок, за якої утворюється аномальний рівень гломерулярної базальної мембрани (GBM), що призводить до інтерстиціального фіброзу, гломерулосклерозу та, як правило, призводить до термінальної стадії ниркової недостатності. При терапії синдрому Альпорта первинною метою лікування є підтримання функції нирок та попередження початку розвитку термінальної стадії ниркової недостатності (ESRD), що, у свою чергу, збільшує очікувану тривалість життя суб'єктів з синдромом Альпорта.

Синдром Альпорта характеризується фіброзом, що прогресує, внаслідок порушень структури GBM, таким чином, поліпшення морфології та функції GBM є необхідними. У даному документі продемонстрували, що модифікований олігонуклеотид, націлений на miR-21, поліпшує функцію нирок в експериментальній моделі синдрому Альпорта. Крім того, знижується вираженість гломерулосклерозу та фіброзу після обробки анти-miR-21. Також у даному документі продемонстрували, що анти-miR-21 поліпшує виживання в експериментальній моделі синдрому Альпорта. Тому дані модифіковані олігонуклеотиди, націлені на miR-21, придатні для лікування синдрому Альпорта.

Конкретні шляхи застосування даного винаходу

У даному документі забезпечені способи лікування синдрому Альпорта, які включають уведення суб'єктів, що має синдром Альпорта або з підозрою на нього, модифікованого олігонуклеотиду, комплементарного miR-21.

У конкретних варіантах здійснення у суб'єкта був діагностований синдром Альпорта перед введенням модифікованого олігонуклеотиду. Діагноз синдрому Альпорта можна встановити за допомогою оцінки параметрів, включаючи, без обмежень, сімейний анамнез суб'єкта, клінічні ознаки (включаючи, без обмежень, протеїнурію, альбумінурію, гематурію, порушену GFR, глухоту та/або зміни очей) та результати біопсії тканини. Зразки із біопсії нирок можна тестувати на присутність або відсутність ланцюгів альфа-3, альфа-4 та альфа-5 колагену IV типу. Крім того, структурні зміни в клубочку можна виявляти за допомогою електронної мікроскопії матеріалу з біопсії нирок. Зразки із біопсії шкіри можна тестувати на присутність ланцюга альфа-5 колагену IV типу, який у нормі присутній у шкірі та звичайно відсутній у суб'єктів чоловічої статі з X-зчепленою формою синдрому Альпорта. Встановлення діагнозу синдрому Альпорта також може передбачати скринінг щодо мутацій одного або декількох генів Col4a3, Col4a4 або Col4a5.

У конкретних варіантах здійснення рівні miR-21 підвищуються у нирці суб'єкта, що має синдром Альпорта. У конкретних варіантах здійснення перед введенням визначають, що суб'єкт має підвищений рівень miR-21 у нирці. Рівні miR-21 можна вимірювати виходячи з матеріалу з біопсії нирок. У конкретних варіантах здійснення перед введенням визначають, що суб'єкт має підвищений рівень miR-21 у сечі або крові суб'єкта.

У конкретних варіантах здійснення введення модифікованого олігонуклеотиду, комплементарного miR-21, приводить до одного або декількох сприятливих клінічних результатів. У конкретних варіантах здійснення введення поліпшує функцію нирок. У конкретних варіантах здійснення введення відстрочує початок розвитку термінальної стадії ниркової недостатності. У конкретних варіантах здійснення введення відстрочує час діалізу. У конкретних варіантах здійснення введення відстрочує час трансплантації нирок. У конкретних варіантах здійснення застосування збільшує очікувану тривалість життя суб'єкта.

У конкретних варіантах здійснення введення знижує фіброз нирок. У конкретних варіантах здійснення введення сповільнює подальше прогресування фіброзу нирок. У конкретних варіантах здійснення введення припиняє подальше прогресування фіброзу нирок. У конкретних варіантах здійснення застосування знижує гематурію. У конкретних варіантах здійснення застосування відстрочує початок розвитку гематурії. У конкретних варіантах здійснення застосування знижує протеїнурію. У конкретних варіантах здійснення застосування відстрочує початок розвитку протеїнурії.

Суб'єкт, що має синдром Альпорта або з підозрою на нього, може мати мутацію гена, який кодує ланцюг альфа 3 колагену IV типу (Col4a3), мутацію гена, який кодує ланцюг альфа 4 колагену IV типу (Col4a4), або мутацію гена, який кодує ланцюг альфа 5 колагену IV типу (Col4a5). У конкретних варіантах здійснення суб'єкт є чоловіком. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт є жінкою.

У конкретних варіантах здійснення суб'єкт має порушення функції нирок. У конкретних варіантах здійснення суб'єкт потребує поліпшеної функції нирок. У конкретних варіантах здійснення суб'єкта ідентифікують як такого, який має порушення функції нирок. У конкретних варіантах здійснення суб'єкта ідентифікують як такого, який має гематурію. У конкретних

варіантах здійснення суб'єкта ідентифікують як такого, який має протеїнурію.

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, щодо суб'єкта можна здійснювати певні дослідження для оцінки функції нирок. Такі дослідження включають без обмеження вимірювання рівня азоту сечовини в крові суб'єкта; вимірювання рівня креатиніну в крові суб'єкта; вимірювання кліренсу креатиніну в крові суб'єкта; вимірювання у суб'єкта ступеня протеїнурії; вимірювання у суб'єкта співвідношення альбумін:креатинін; вимірювання у суб'єкта швидкості гломерулярної фільтрації та вимірювання у суб'єкта кількості виділеної сечі.

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, білки, присутні у сечі або крові, можна використовувати для оцінки функції нирок. Такі дослідження включають без обмеження вимірювання рівня білка N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза (NAG) у сечі суб'єкта; вимірювання рівня білка ліпокалін, асоційованого з желатиназою нейтрофілів (NGAL), у сечі суб'єкта; вимірювання білка молекула ниркового ушкодження-1 (KIM-1) у сечі суб'єкта; вимірювання рівня білка інтерлейкін-18 (IL-18) у сечі суб'єкта; вимірювання рівнів фактора росту сполучної тканини (CTGF) у сечі суб'єкта; вимірювання рівнів моноцитарного хемоатрактантного білка 1 (MCP1) у сечі суб'єкта; вимірювання рівня фрагментів колагену IV (Col IV) у сечі суб'єкта; вимірювання рівнів фрагментів колагену III (Col III) у сечі суб'єкта; вимірювання рівня цистатину C у крові суб'єкта; вимірювання рівня білка β -trace protein (BTP) у крові суб'єкта та вимірювання рівня 2-мікроглобуліну (B2M) в крові суб'єкта. У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, маркери ушкодження подоцитів можна вимірювати у сечі. Такі білки включають нефрин та подоцин. Кількісний аналіз білків, наприклад, за допомогою ферментного імуносорбентного аналізу (ELISA) або радіоімуноаналізу (RIA) із використанням комерційно доступних наборів.

У будь-якому з варіантів здійснення, забезпечених у даному документі, введення модифікованого олігонуклеотиду, націленого на miR-21, поліпшує один або декілька маркерів функції нирок у суб'єкта. Поліпшення маркерів функції нирок включають без обмеження знижений рівень азоту сечовини в крові суб'єкта; знижений рівень креатиніну в крові суб'єкта; поліпшений кліренс креатиніну у суб'єкта; знижену протеїнурію у суб'єкта; знижене співвідношення альбумін:креатинін у суб'єкта; збільшену швидкість гломерулярної фільтрації у суб'єкта та підвищену кількість виділеної сечі у суб'єкта.

Конкретні додаткові типи терапії

Способи лікування синдрому Альпорта або будь-якого зі станів, перерахованих у даному документі, можуть включати застосування більше одного типу терапії. Відповідно, у конкретних варіантах здійснення в даному документі забезпечені способи лікування суб'єкта, що має синдром Альпорта або з підозрою на нього, які включають застосування щонайменше одного типу терапії на додаток до введення модифікованого олігонуклеотиду, що має нуклеотидну послідовність, комплементарну miR-21.

У конкретних варіантах здійснення щонайменше один додатковий тип терапії включає фармацевтичний засіб.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають блокатори рецепторів ангіотензину II (ARB). У конкретних варіантах здійснення блокатор рецепторів ангіотензину II являє собою кандесартан, ірбесартан, олмесартан, лозартан, валсартан, телмісартан або епросартан.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають інгібітори ангіотензин-II-перетворюючого ферменту (ACE). У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE являє собою каптоприл, еналаприл, лізиноприл, беназеприл, хінаприл, фозиноприл або раміприл.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою антигіпертензивний засіб. Антигіпертензивні засоби застосовують для регуляції тиску крові у суб'єкта.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою аналог вітаміну D. Аналоги вітаміну D можна застосовувати для обмеження утворення паратироїдного гормону у суб'єкта.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою пероральний засіб, що зв'язує фосфати, який знижує всмоктування фосфатів, що надходять з їжею.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають імуносупресивні засоби. У конкретних варіантах здійснення імуносупресивний засіб являє собою кортикостероїд, циклофосфамід або мікофенолату мофетил.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою циклоспорин, інгібітор HMG-коензиму A, інгібітор вазопептидази або антагоніст TGF-бета.

У конкретних варіантах здійснення додатковий тип терапії являє собою генну терапію. У конкретних варіантах здійснення генна терапія забезпечує нормальний ген Col4a3. У конкретних варіантах здійснення генна терапія забезпечує нормальний ген Col4a4. У конкретних варіантах

здійснення генна терапія забезпечує нормальний ген Col4a5.

У конкретних варіантах здійснення додатковий тип терапії являє собою діаліз. У конкретних варіантах здійснення додатковий тип терапії являє собою трансплантацію нирок.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають протизапальні засоби.
 5 У конкретних варіантах здійснення протизапальний засіб являє собою стероїдний протизапальний засіб. У конкретних варіантах здійснення стероїдний протизапальний засіб являє собою кортикостероїд. У конкретних варіантах здійснення кортикостероїд являє собою преднізон. У конкретних варіантах здійснення протизапальний засіб являє собою нестероїдний протизапальний лікарський засіб. У конкретних варіантах здійснення нестероїдний протизапальний засіб являє собою ібупрофен, інгібітор COX-1 або інгібітор COX-2.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою фармацевтичний засіб, який блокує одну або декілька відповідей на фіброгенні сигнали.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають протидіабетичний засіб. Протидіабетичні засоби включають без обмеження бігуаніди, інгібітори глюкозидази, інсуліни, сульфонілсечовини та тіазолідендіони.
 15

Конкретні нуклеотидні послідовності мікроРНК

Модифіковані олігонуклеотиди, описані у даному документі, мають нуклеотидну послідовність, комплементарну miR-21 (SEQ ID NO: 1) або її попередникові (SEQ ID NO: 2). У конкретних варіантах здійснення кожна нуклеїнова основа модифікованого олігонуклеотиду здатна піддаватися спарюванню основ з нуклеїною основою в кожному відповідному положенні в нуклеотидній послідовності miR-21 або її попередника. У конкретних варіантах здійснення нуклеотидна послідовність модифікованого олігонуклеотиду може мати одну або декілька пар основ з порушенням комплементарності стосовно нуклеотидної послідовності miR-21 або послідовності попередника і залишається здатною гібридизуватися з її цільовою послідовністю.
 20

Оскільки послідовність miR-21 міститься в послідовності попередника miR-21, модифікований олігонуклеотид, що має нуклеотидну послідовність, комплементарну miR-21, також комплементарний ділянці попередника miR-21.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з числа зв'язаних нуклеозидів, яке дорівнює довжині miR-21.
 30

У конкретних варіантах здійснення число зв'язаних нуклеозидів модифікованого олігонуклеотиду менше довжини miR-21. Модифікований олігонуклеотид із числом зв'язаних нуклеозидів, яке менше довжини miR-21, де кожна нуклеїнова основа модифікованого олігонуклеотиду є комплементарною кожній нуклеїновій основі у відповідному положенні miR-21, вважається модифікованим олігонуклеотидом з нуклеотидною послідовністю, яка повністю комплементарна ділянці послідовності miR-21. Наприклад, модифікований олігонуклеотид, що складається з 19 зв'язаних нуклеозидів, де кожна нуклеїнова основа комплементарна відповідному положенню miR-21, яка має довжину 22 нуклеїнові основи, є повністю комплементарним ділянці miR-21 довжиною 19 нуклеїнових основ. Такий модифікований олігонуклеотид характеризується 100 % комплементарністю до частини miR-21 довжиною 19 нуклеїнових основ та вважається на 100 % комплементарним miR-21.
 35

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка є комплементарною послідовності затравки, тобто модифікований олігонуклеотид містить послідовність, відповідну послідовності затравки. У конкретних варіантах здійснення послідовність затравки являє собою послідовність затравки з шести нуклеїнових основ. У таких конкретних варіантах здійснення послідовність затравки є нуклеїновими основами 1-6 miR-21. У таких конкретних варіантах здійснення послідовність затравки є нуклеїновими основами 2-7 miR-21. У таких конкретних варіантах здійснення послідовність затравки є нуклеїновими основами 3-8 miR-21. У конкретних варіантах здійснення послідовність затравки являє собою послідовність затравки із семи нуклеїнових основ. У таких конкретних варіантах здійснення послідовність затравки із семи нуклеїнових основ є нуклеїновими основами 1-7 miR-21. У таких конкретних варіантах здійснення послідовність затравки із семи нуклеїнових основ є нуклеїновими основами 2-8 miR-21. У конкретних варіантах здійснення послідовність затравки являє собою послідовність затравки із восьми нуклеїнових основ. У таких конкретних варіантах здійснення послідовність затравки із восьми нуклеїнових основ є нуклеїновими основами 1-8 miR-21. У конкретних варіантах здійснення послідовність затравки із восьми нуклеїнових основ є нуклеїновими основами 2-9 miR-21.
 40

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид має нуклеотидну послідовність з однією незбіжністю стосовно нуклеотидної послідовності miR-21 або її попередника. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид має
 60

нуклеотидну послідовність з двома незбіжностями стосовно нуклеотидної послідовності miR-21 або її попередника. У таких конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид має нуклеотидну послідовність з не більш ніж двома незбіжностями стосовно нуклеотидної послідовності miR-21 або її попередника. У таких конкретних варіантах здійснення незбіжні нуклеїнові основи є суміжними. У таких конкретних варіантах здійснення незбіжні нуклеїнові основи не є суміжними.

У конкретних варіантах здійснення число зв'язаних нуклеозидів модифікованого олігонуклеотиду більше довжини miR-21. У таких конкретних варіантах здійснення нуклеїнова основа додаткового нуклеозиду є комплементарною нуклеїновій основі послідовності miR-21 зі структурою типу стебло-петля. У конкретних варіантах здійснення число зв'язаних нуклеозидів модифікованого олігонуклеотиду на одну одиницю більше довжини miR-21. У таких конкретних варіантах здійснення додатковий нуклеозид перебуває на 5'-кінці олігонуклеотиду. У таких конкретних варіантах здійснення додатковий нуклеозид перебуває на 3'-кінці олігонуклеотиду. У конкретних варіантах здійснення число зв'язаних нуклеозидів модифікованого олігонуклеотиду на дві одиниці більше довжини miR-21. У таких конкретних варіантах здійснення два додаткові нуклеозиди перебувають на 5'-кінці олігонуклеотиду. У таких конкретних варіантах здійснення два додаткові нуклеозиди перебувають на 3'-кінці олігонуклеотиду. У таких конкретних варіантах здійснення один додатковий нуклеозид розташований на 5'-кінці, і один додатковий нуклеозид розташований на 3'-кінці олігонуклеотиду. У конкретних варіантах здійснення ділянка олігонуклеотиду може бути повністю комплементарною нуклеотидній послідовності miR-21, але весь модифікований олігонуклеотид не є повністю комплементарним miR-21. Наприклад, модифікований олігонуклеотид, що складається з 24 зв'язаних нуклеозидів, де кожна нуклеїнова основа нуклеозидів 1-22 комплементарна відповідному положенню miR-21, яка має довжину 22 нуклеїнові основи, має частину з 22 нуклеозидів, яка є повністю комплементарною нуклеотидній послідовності miR-21 і характеризується приблизно 92 % загальною комплементарністю з нуклеотидною послідовністю miR-21.

Конкретні модифіковані олігонуклеотиди

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид має структуру 5'-A_EC_SATC_SAGTC_STGAU_SAAGC_STA_E-3" (SEQ ID NO: 3), де нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-cEt-нуклеозиди; і кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид має структуру 5'-A_EC_SATC_SAsGTC_SUsGAU_SAsAGC_SUsA_E-3" (SEQ ID NO: 3), де нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-cEt-нуклеозиди; і кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид має структуру 5'-MeC_EAsAsT_EC_SUsA_EU_SAsA_EGeC_STeAs-3" (SEQ ID NO: 4), де нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-cEt-нуклеозиди; верхній індекс "Me" означає 5-метильну групу при основі нуклеозиду; і кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид має структуру 5'-A_EC_SA_ET_EC_SA_EGeT_EC_STGAU_SAAGC_SUsAs-3" (SEQ ID NO: 3), де нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-cEt-нуклеозиди; і кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид містить один або декілька 5-метилцитозинів. У конкретних варіантах здійснення кожний цитозин модифікованого олігонуклеотиду передбачає 5-метилцитозин.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 8-30 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 12-25 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 15-30 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 15-25 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 15-19 зв'язаних нуклеозидів.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 15-16 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 19-24 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 21-24 зв'язаних нуклеозидів.

5 У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 8 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 9 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 10 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 11 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 12 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 13 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 14 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 15 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 16 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 17 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 18 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 19 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 20 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 21 зв'язаного нуклеозиду. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 22 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 23 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 24 зв'язаних нуклеозидів. У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид складається з 25 зв'язаних нуклеозидів.

Конкретні модифікації

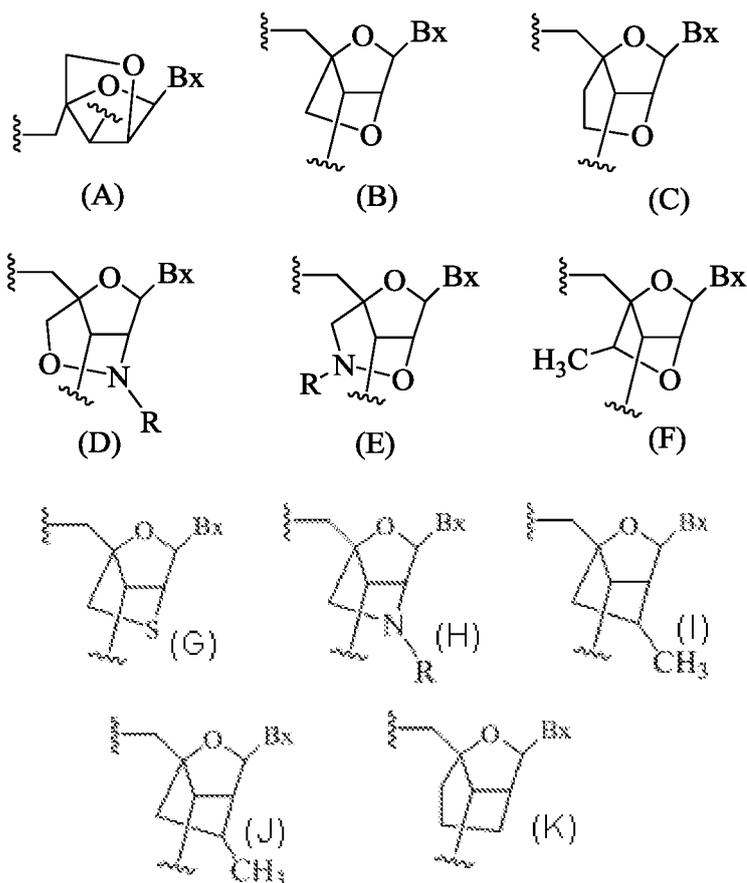
У конкретних варіантах здійснення олігонуклеотиди, забезпечені в даному документі, можуть містити одну або декілька модифікацій нуклеїнової основи, цукру та/або міжнуклеозидного зв'язку, і тому являють собою модифікований олігонуклеотид. Модифіковані нуклеїнова основа, цукор та/або міжнуклеозидний зв'язок можуть бути вибрані з перевагою над немодифікованою формою завдяки необхідним властивостям, таким як, наприклад, підвищене поглинання клітиною, підвищена спорідненість щодо інших олігонуклеотидів або мішеней, що відносяться до нуклеїнових кислот, та підвищена стабільність у присутності нуклеаз.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид містить один або декілька модифікованих нуклеозидів. У таких конкретних варіантах здійснення модифікований нуклеозид являє собою стабілізуючий нуклеозид. Прикладом стабілізуючого нуклеозиду є нуклеозид з модифікованим цукром.

У конкретних варіантах здійснення модифікований нуклеозид являє собою нуклеозид з модифікованим цукром. У таких конкретних варіантах здійснення нуклеозиди з модифікованим цукром можуть додатково містити природний або модифікований фрагмент гетероциклічної основи та/або природний або модифікований міжнуклеозидний зв'язок і можуть включати додаткові модифікації незалежно від модифікації цукру. У конкретних варіантах здійснення нуклеозид з модифікованим цукром являє собою 2'-модифікований нуклеозид, де цукрове кільце є модифікованим при 2" атомі вуглецю природної рибози або 2'-дезоксирибози.

45 У конкретних варіантах здійснення 2'-модифікований нуклеозид має біциклічний цукровий фрагмент. У таких конкретних варіантах здійснення біциклічний цукровий фрагмент являє собою D-цукор в альфа-конфігурації. У таких конкретних варіантах здійснення біциклічний цукровий фрагмент являє собою D-цукор у бета-конфігурації. У таких конкретних варіантах здійснення біциклічний цукровий фрагмент являє собою L-цукор в альфа-конфігурації. У таких конкретних варіантах здійснення біциклічний цукровий фрагмент являє собою L-цукор у бета-конфігурації.

Нуклеозиди, що містять такі біциклічні цукрові фрагменти, називають біциклічними нуклеозидами або BNA. У конкретних варіантах здійснення біциклічні нуклеозиди включають, без обмеження, (A) α -L-метиленоксі (4'-CH₂-O-2") BNA; (B) β -D-метиленоксі (4'-CH₂-O-2") BNA; (C) етиленоксі (4'-(CH₂)₂-O-2") BNA; (D) амінооксі (4'-CH₂-O-N(R)-2") BNA; (E) оксіаміно (4'-CH₂-N(R)-O-2") BNA; (F) метил(метиленоксі) (4'-CH(CH₃)-O-2") BNA (що також називають закріпленим етилом або cEt); (G) метилентіо (4'-CH₂-S-2") BNA; (H) метиленаміно (4'-CH₂-N(R)-2") BNA; (I) метилкарбоциклічний (4'-CH₂-CH(CH₃)-2") BNA; (J) c-MOE (4'-CH₂-OMe-2") BNA та (K) пропіленкарбоциклічний (4'-(CH₂)₃-2") BNA, як зображено нижче.



де Bx являє собою фрагмент нуклеїнової основи, і R незалежно являє собою H, захисну групу або C₁-C₁₂алкіл.

У конкретних варіантах здійснення 2'-модифікований нуклеозид містить групу, що є замісником в 2'-положенні, вибрану з F, OCF₃, O-CH₃, OCH₂CH₂OCH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ і O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃.

У конкретних варіантах здійснення 2'-модифікований нуклеозид містить групу, що є замісником в 2'-положенні, вибрану з F, O-CH₃ і OCH₂CH₂OCH₃.

У конкретних варіантах здійснення нуклеозид з модифікованим цукром являє собою 4'-тіо-модифікований нуклеозид. У конкретних варіантах здійснення нуклеозид з модифікованим цукром являє собою 4'-тіо-2'-модифікований нуклеозид. 4'-Тіо-модифікований нуклеозид містить β-D-рибонуклеозид, де 4'-O замінений 4'-S. 4'-Тіо-2'-модифікований нуклеозид являє собою 4'-тіо-модифікований нуклеозид, у якого 2'-ОН замінений групою, що є замісником в 2'-положенні. Придатні групи, що є замісниками в 2'-положенні, включають 2'-OCH₃, 2'-O-(CH₂)₂-OCH₃ та 2'-F.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид містить одну або декілька міжнуклеозидних модифікацій. У таких конкретних варіантах здійснення кожний міжнуклеозидний зв'язок модифікованого олігонуклеотиду являє собою модифікований міжнуклеозидний зв'язок. У конкретних варіантах здійснення модифікований міжнуклеозидний зв'язок містить атом фосфору.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид містить щонайменше один фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок. У конкретних варіантах здійснення кожний міжнуклеозидний зв'язок модифікованого олігонуклеотиду являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид містить одну або декілька модифікованих нуклеїнових основ. У конкретних варіантах здійснення модифікована нуклеїнова основа вибрана з 5-гідроксиметилцитозину, 7-деазагуаніну та 7-деазааденіну. У конкретних варіантах здійснення модифікована нуклеїнова основа вибрана з 7-деазааденіну, 7-деазагуанозину, 2-амінопіридину та 2-піридону. У конкретних варіантах здійснення модифікована нуклеїнова основа вибрана з 5-заміщених піримідинів, 6-азапіримідинів і N-2, N-6 і O-6-заміщених пуринів, включаючи 2-амінопропіладенін, 5-пропінілурацил та 5-пропінілцитозин.

У конкретних варіантах здійснення модифікована нуклеїнова основа містить поліциклічний

гетероцикл. У конкретних варіантах здійснення модифікована нуклеїнова основа містить трициклічний гетероцикл. У конкретних варіантах здійснення модифікована нуклеїнова основа містить похідну феноксазину. У конкретних варіантах здійснення феноксазин може бути додатково модифікованим з утворенням нуклеїнової основи, відомої з рівня техніки як G-clamp.

5 У конкретних варіантах здійснення модифікований олігонуклеотид сполучений з одним або декількома фрагментами, які підвищують активність, впливають на розподіл у клітині або поглинання клітиною одержаних у результаті антисенсових олігонуклеотидів. У таких конкретних варіантах здійснення фрагмент являє собою фрагмент холестерину. У конкретних варіантах здійснення фрагмент являє собою ліпідний фрагмент. Додаткові фрагменти для сполучення включають вуглеводи, фосфоліпіди, біотин, феназин, фолат, фенантридин, антрахінон, акридин, флуоресцеїни, родаміни, кумарини та барвники. У конкретних варіантах здійснення вуглеводний фрагмент являє собою N-ацетил-D-галактозамін (GalNac). У конкретних варіантах здійснення сполучена група приєднана безпосередньо до олігонуклеотиду. У конкретних варіантах здійснення сполучена група приєднана до модифікованого олігонуклеотиду за допомогою з'єднувального фрагмента, вибраного з аміно, гідроксилу, карбонової кислоти, тіолу, ненасичених зв'язків (наприклад, подвійних або потрійних зв'язків), 8-аміно-3,6-діоксаоктанової кислоти (ADO), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбоксилату (SMCC), 6-аміногексанової кислоти (AHEX або АНА), заміщеного C1-C10алкілу, заміщеного або незаміщеного C2-C10алкенілу та заміщеного або незаміщеного C2-C10алкінілу. У таких конкретних варіантах здійснення група, що є замісником, вибрана з гідроксилу, аміно, алкокси, карбокси, бензилу, фенілу, нітро, тіолу, тіоалкокси, галогену, алкілу, арилу, алкенілу та алкінілу.

У таких конкретних варіантах здійснення сполука містить модифікований олігонуклеотид, що має одну або декілька стабілізуючих груп, які приєднані до одного або обох кінців модифікованого олігонуклеотиду для поліпшення властивостей, таких як, наприклад, стабільності стосовно впливу нуклеаз. Стабілізуючі групи включають сар-структури. Ці кінцеві модифікації захищають модифікований олігонуклеотид від руйнування екзонуклеазами та можуть сприяти доставці та/або розташуванню в клітині. Сар може бути присутньою на 5'-кінці (5'-сар), або на 3'-кінці (3'-сар), або може бути присутньою на обох кінцях. Сар-структури включають, наприклад, сар з інвертованої послідовності дезоксирибози без азотистих основ.

Конкретні фармацевтичні композиції

У даному документі забезпечені фармацевтичні композиції, що містять олігонуклеотиди. У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному документі, містить сполуку, яка містить модифікований олігонуклеотид, що складається з 15-25 зв'язаних нуклеозидів та має нуклеотидну послідовність, комплементарну miR-21 або її попередників. У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному документі, містить сполуку, яка складається з модифікованого олігонуклеотиду, що складається з 8-30 зв'язаних нуклеозидів та має нуклеотидну послідовність, комплементарну miR-21 або її попередників. У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному документі, містить сполуку, яка містить модифікований олігонуклеотид, що складається з 12-25 зв'язаних нуклеозидів та має нуклеотидну послідовність, комплементарну miR-21 або її попередників.

Прийнятні шляхи введення включають, без обмеження, пероральний, ректальний, трансмукозальний, інтестинальний, ентеральний, місцевий, у вигляді супозиторіїв, за допомогою інгаляції, інтратекальний, інтракардіальний, інтравентрикулярний, інтраперитонеальний, інтраназальний, інтраокулярний, внутрішньопухлинний та парентеральний (наприклад, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, інтрамедулярний та підшкірний). У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні препарати для інтратекального введення вводять для досягнення локальних, а не системних впливів. Наприклад, фармацевтичні композиції можна вводити безпосередньо в ділянку для необхідного ефекту (наприклад, у нирку).

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичну композицію вводять у формі одиниці дозування (наприклад, таблетки, капсули, болюса і т.п.). У деяких варіантах здійснення фармацевтичні композиції містять модифікований олігонуклеотид при дозі в межах діапазону, вибраного з від 25 мг до 800 мг, від 25 мг до 700 мг, від 25 мг до 600 мг, від 25 мг до 500 мг, від 25 мг до 400 мг, від 25 мг до 300 мг, від 25 мг до 200 мг, від 25 мг до 100 мг, від 100 мг до 800 мг, від 200 мг до 800 мг, від 300 мг до 800 мг, від 400 мг до 800 мг, від 500 мг до 800 мг, від 600 мг до 800 мг, від 100 мг до 700 мг, від 150 мг до 650 мг, від 200 мг до 600 мг, від 250 мг до 550 мг, від 300 мг до 500 мг, від 300 мг до 400 мг та від 400 мг до 600 мг. У конкретних варіантах здійснення такі фармацевтичні композиції містять модифікований олігонуклеотид у дозі,

вибраній з 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг, 140 мг, 145 мг, 150 мг, 155 мг, 160 мг, 165 мг, 170 мг, 175 мг, 180 мг, 185 мг, 190 мг, 195 мг, 200 мг, 205 мг, 210 мг, 215 мг, 220 мг, 225 мг, 230 мг, 235 мг, 240 мг, 245 мг, 250 мг, 255 мг, 260 мг, 265 мг, 270 мг, 270 мг, 280 мг, 285 мг, 290 мг, 295 мг, 300 мг, 305 мг, 310 мг, 315 мг, 320 мг, 325 мг, 330 мг, 335 мг, 340 мг, 345 мг, 350 мг, 355 мг, 360 мг, 365 мг, 370 мг, 375 мг, 380 мг, 385 мг, 390 мг, 395 мг, 400 мг, 405 мг, 410 мг, 415 мг, 420 мг, 425 мг, 430 мг, 435 мг, 440 мг, 445 мг, 450 мг, 455 мг, 460 мг, 465 мг, 470 мг, 475 мг, 480 мг, 485 мг, 490 мг, 495 мг, 500 мг, 505 мг, 510 мг, 515 мг, 520 мг, 525 мг, 530 мг, 535 мг, 540 мг, 545 мг, 550 мг, 555 мг, 560 мг, 565 мг, 570 мг, 575 мг, 580 мг, 585 мг, 590 мг, 595 мг, 600 мг, 605 мг, 610 мг, 615 мг, 620 мг, 625 мг, 630 мг, 635 мг, 640 мг, 645 мг, 650 мг, 655 мг, 660 мг, 665 мг, 670 мг, 675 мг, 680 мг, 685 мг, 690 мг, 695 мг, 700 мг, 705 мг, 710 мг, 715 мг, 720 мг, 725 мг, 730 мг, 735 мг, 740 мг, 745 мг, 750 мг, 755 мг, 760 мг, 765 мг, 770 мг, 775 мг, 780 мг, 785 мг, 790 мг, 795 мг і 800 мг. У таких конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція містить дозу модифікованого олігонуклеотиду, вибрану з 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг і 800 мг.

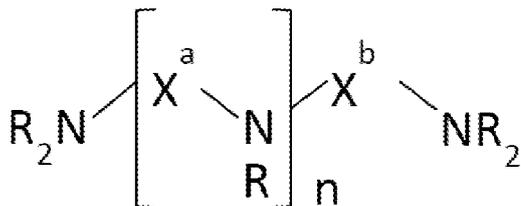
У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою стерильний ліофілізований модифікований олігонуклеотид, який відновлюють придатним розчинником, наприклад, стерильною водою для ін'єкцій або стерильним сольовим розчином для ін'єкцій. Відновлений продукт вводять як підшкірну ін'єкцію або як внутрішньовенну інфузію після розведення в сольовому розчині. Продукт на основі ліофілізованого лікарського засобу складається з модифікованого олігонуклеотиду, який одержували у воді для ін'єкцій або в сольовому розчині для ін'єкцій, доводили до рН 7,0-9,0 за допомогою кислоти або основи під час одержання, а потім ліофілізували. Ліофілізований модифікований олігонуклеотид може складати 25-800 мг олігонуклеотиду. Зрозуміло, що діапазон включає 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775 і 800 мг модифікованого ліофілізованого олігонуклеотиду. Крім того, у деяких варіантах здійснення ліофілізований модифікований олігонуклеотид означає кількість олігонуклеотиду в межах діапазону, вибраного з від 25 мг до 800 мг, від 25 мг до 700 мг, від 25 мг до 600 мг, від 25 мг до 500 мг, від 25 мг до 400 мг, від 25 мг до 300 мг, від 25 мг до 200 мг, від 25 мг до 100 мг, від 100 мг до 800 мг, від 200 мг до 800 мг, від 300 мг до 800 мг, від 400 мг до 800 мг, від 500 мг до 800 мг, від 600 мг до 800 мг, від 100 мг до 700 мг, від 150 мг до 650 мг, від 200 мг до 600 мг, від 250 мг до 550 мг, від 300 мг до 500 мг, від 300 мг до 400 мг та від 400 мг до 600 мг. Продукт на основі ліофілізованого лікарського засобу може бути упакований в 2 мл флакон типу I із прозорого скла (оброблений сульфатом амонію), закритий пробкою із бромбутилової гуми та ущільнений алюмінієвою кришкою FLIP-OFF®.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні композиції, забезпечені в даному документі, можуть додатково містити інші допоміжні компоненти, які традиційно мають місце у фармацевтичних композиціях, при їхніх рівнях застосування, встановлених у галузі техніки. Таким чином, наприклад, композиції можуть містити додаткові сумісні фармацевтично активні матеріали, такі як, наприклад, протисвербіжні засоби, в'язучі засоби, місцеві анестетики або протизапальні засоби, або можуть містити додаткові матеріали, застосовувані при фізичному складанні різних лікарських форм композицій згідно з даним винаходом, такі як барвники, ароматизуючі засоби, консерванти, антиоксиданти, замутнювачі, загусники та стабілізатори. Однак такі матеріали при додаванні не повинні надмірно перешкоджати біологічним активностям компонентів композицій згідно з даним винаходом. Склади можна стерилізувати та при необхідності змішувати з допоміжними засобами, наприклад, змащувальними речовинами, консервантами, стабілізаторами, змочувальними засобами, емульгаторами, солями, що впливають на осмотичний тиск, буферами, барвниками, віддушками та/або ароматичними речовинами та т.п., які не мають шкідливого впливу на олігонуклеотид(и) складу.

Ліпідні фрагменти застосовувалися при різних видах терапії нуклеїновими кислотами в різноманітних способах. В одному способі нуклеїнову кислоту вводять у попередньо утворені ліпосоми або ліпоплекси, одержані із сумішей катіонних ліпідів та нейтральних ліпідів. В іншому способі ДНК-комплекси з моно- або полікатіонними ліпідами утворюються без присутності нейтрального ліпіда. У конкретних варіантах здійснення ліпідний фрагмент вибирають для підвищення розподілу фармацевтичного засобу у визначеній клітині або тканині. У конкретних варіантах здійснення ліпідний фрагмент вибирають для поліпшення розподілу фармацевтичного засобу в жировій тканині. У конкретних варіантах здійснення ліпідний фрагмент вибирають для поліпшення розподілу фармацевтичного засобу в м'язовій тканині.

У конкретних варіантах здійснення INTRALIPID застосовують для одержання фармацевтичної композиції, що містить олігонуклеотид. Intralipid є жировою емульсією,

одержаною для внутрішньовенного введення. В її складі міститься 10 % соєвої олії, 1,2 % фосфоліпідів яєчного жовтка, 2,25 % гліцерину та вода для ін'єкцій. Крім того, для доведення рН так, щоб рН кінцевого продукту перебував у діапазоні 6-8,9, додавали гідроксид натрію.



5 У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена у даному документі, містить сполуку поліаміну або ліпідний фрагмент, що утворює комплекс із нуклеїновою кислотою. У конкретних варіантах здійснення такі препарати містять одну або декілька сполук, при цьому кожна окремо має структуру, визначену формулою (Z), або їх фармацевтично прийнятну сіль,

10 де кожний X^a та X^b для кожного випадку незалежно являє собою C_{1-6} алкілен; n дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5; кожний R незалежно являє собою H, де щонайменше n+2 R-фрагментів у щонайменше приблизно 80 % молекул сполуки формули (Z) у препараті не є H; m дорівнює 1, 2, 3 або 4; Y являє собою O, NR^2 або S; R^1 являє собою алкіл, алкеніл або алкініл; кожний з яких необов'язково заміщений одним або декількома замісниками; і R^2 являє собою H, алкіл, алкеніл або алкініл; кожний з яких необов'язково заміщений одним або декількома замісниками; за умови, що якщо n=0, тоді щонайменше n+3 R-фрагментів не є H. Такі препарати описані в публікації РСТ WO/2008/042973, яка включена в даний документ за допомогою посилання у всій повноті для розкриття ліпідних препаратів. Деякі додаткові препарати описані в Atkins et al., Nature Biotechnology 26, 561-569 (1 травня 2008 року), яка включена в даний документ за допомогою посилання у всій повноті для розкриття ліпідних препаратів.

20 У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні композиції, забезпечені у даному документі, містять один або декілька модифікованих олігонуклеотидів та один або декілька наповнювачів. У таких конкретних варіантах здійснення наповнювачі вибирають з води, сольових розчинів, спирту, поліетиленгліколів, желатину, лактози, амілази, стеарату магнію, тальку, кремневої кислоти, в'язкого парафіну, гідроксиметилцелюлози та полівінілпіролідону.

25 У конкретних варіантах здійснення фармацевтичну композицію, забезпечену в даному документі, одержують із використанням відомих способів, включаючи без обмеження способи змішування, розчинення, гранулювання, одержання драже, розтирання в порошок, емульгування, інкапсуляції, захоплювання або таблетування.

30 У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному документі, являє собою рідину (наприклад, суспензію, міцний настій та/або розчин). У таких конкретних варіантах здійснення рідку фармацевтичну композицію одержують із використанням інгредієнтів, відомих з рівня техніки, включаючи без обмеження воду, гліколі, масла, спирти, ароматизуючі засоби, консерванти та барвники.

35 У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена у даному документі, являє собою тверду речовину (наприклад, порошок, таблетку та/або капсулу). У таких конкретних варіантах здійснення тверду фармацевтичну композицію, що містить один або декілька олігонуклеотидів, одержують із використанням інгредієнтів, відомих з рівня техніки, включаючи без обмеження крохмалі, цукри, розріджувачі, засоби для грануляції, змащувальні речовини, зв'язувальні речовини та засоби для поліпшення розпадання.

40 У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному документі, складена у вигляді депо-препарату. Такі визначені депо-препарати, як правило, мають більш тривалу дію, ніж препарати, що не відносяться до депо-препаратів. У конкретних варіантах здійснення такі препарати вводять шляхом імплантації (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. У конкретних варіантах здійснення депо-препарати одержують із використанням придатних полімерних або гідрофобних матеріалів (наприклад, емульсія в прийнятному маслі) або іонообмінних смол, або у вигляді важкорозчинних похідних, наприклад, у вигляді важкорозчинної солі.

45 У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному документі, містить систему доставки. Приклади систем доставки включають без обмеження ліпосоми та емульсії. Деякі системи доставки застосовують для одержання деяких фармацевтичних композицій, включаючи такі, що містять гідрофобні сполуки. У конкретних варіантах здійснення використовують деякі органічні розчинники, такі як диметилсульфоксид.

50 У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному

документі, містить одну або декілька тканинспецифічних молекул для доставки, розроблених для доставки одного або декількох фармацевтичних засобів згідно з даним винаходом до конкретних типів тканин або клітин. Наприклад, у конкретних варіантах здійснення фармацевтичні композиції включають ліпосоми, покриті тканинспецифічним антитілом.

5 У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному документі, містить систему сповільненого вивільнення. Необмежуючий приклад такої системи сповільненого вивільнення являє собою напівпроникну матрицю із твердих гідрофобних полімерів. У конкретних варіантах здійснення системи сповільненого вивільнення можуть, залежно від їхньої хімічної природи, вивільняти фармацевтичні засоби протягом декількох

10 годин, днів, тижнів або місяців.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичну композицію одержують для введення шляхом ін'єкції (наприклад, внутрішньовенної, підшкірної, внутрішньом'язової і т. д.). У таких конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція містить носій і складена у водному розчині, такому як вода або фізіологічно сумісні буфери, такі як розчин Хенкса, розчин Рингера або фізіологічний сольовий буфер. У конкретних варіантах здійснення включають інші інгредієнти (наприклад, інгредієнти, які сприяють розчинності або служать у якості консервантів). У конкретних варіантах здійснення суспензії, які ін'єктують, одержують із застосуванням придатних рідких носіїв, суспендувальних засобів і т.п. Деякі фармацевтичні композиції для ін'єкцій представлені в стандартній лікарській формі, наприклад, в ампулах або в багатодозових контейнерах. Деякі фармацевтичні композиції для ін'єкцій є суспензіями, розчинами або емульсіями в масляних або водних середовищах і можуть містити засоби для складання, такі як суспендувальні, стабілізуючі та/або диспергувальні засоби. Деякі розчинники, прийнятні для застосування у фармацевтичних композиціях для ін'єкцій, включають без обмеження ліпофільні розчинники та жирні олії, такі як кунжутна олія, синтетичні ефіри жирних кислот, такі як етилолеат або тригліцериди, та ліпосоми. Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити речовини, які підвищують в'язкість суспензії, такі як натрію карбоксиметилцелюлоза, сорбіт або декстран. Необов'язково такі суспензії можуть також містити придатні стабілізатори або засоби, які підвищують розчинність фармацевтичних засобів, що дозволяє одержувати висококонцентровані розчини.

20 У конкретних варіантах здійснення фармацевтична композиція, забезпечена в даному документі, містить модифікований олігонуклеотид у терапевтично ефективній кількості. У конкретних варіантах здійснення терапевтично ефективна кількість є достатньою для попередження, полегшення або зменшення інтенсивності симптомів захворювання або для подовження виживання суб'єкта, який підлягає лікуванню. Визначення терапевтично ефективної кількості знаходиться в межах можливостей фахівця в даній галузі техніки.

35 У конкретних варіантах здійснення один або декілька модифікованих олігонуклеотидів, забезпечених у даному документі, складають у вигляді проліків. У конкретних варіантах здійснення при введенні *in vivo* проліки хімічним шляхом перетворюються на біологічно, фармацевтично або терапевтично більш активну форму олігонуклеотиду. У конкретних варіантах здійснення проліки придатні з огляду на те, що їх легше вводити, аніж відповідну активну форму. Наприклад, у деяких випадках проліки можуть бути більш біодоступними (наприклад, при пероральному введенні), ніж відповідна активна форма. У деяких випадках проліки можуть мати поліпшену розчинність у порівнянні з відповідною активною формою. У конкретних варіантах здійснення проліки менш водорозчинні, ніж відповідна активна форма. У деяких випадках таким пролікам властива відмінна передача через клітинні мембрани, причому водорозчинність шкідливо впливає на рухливість. У конкретних варіантах здійснення проліки являють собою складний ефір. У таких конкретних варіантах здійснення після введення складний ефір метаболічно гідролізується до карбонової кислоти. У конкретних випадках сполука, що містить карбонову кислоту, перебуває у відповідній активній формі. У конкретних варіантах здійснення проліки містять короткий пептид (поліамінокислоту), зв'язаний з кислотною групою. У таких конкретних варіантах здійснення пептид розщеплюється після введення з утворенням відповідної активної форми.

45 У конкретних варіантах здійснення проліки одержують шляхом модифікації фармацевтично активної сполуки так, щоб активна сполука утворювалася після введення *in vivo*. Проліки можуть бути розроблені для того, щоб змінити метаболічну стабільність або транспортні характеристики лікарського засобу для того, щоб захистити від побічних ефектів або токсичності, поліпшити запах лікарського засобу або змінити інші характеристики або властивості лікарського засобу. Виходячи зі знань щодо фармакодинамічних процесів і метаболізму лікарського засобу *in vivo* фахівець у даній галузі техніки, як тільки фармацевтично

50 активна сполука стала відомою, може розробити проліки сполуки (див., наприклад, Nogrady

(1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

Конкретні додаткові типи терапії

5 Лікування захворювання, асоційованого з miR-21, може передбачати більш ніж один тип терапії. Тому, у конкретних варіантах здійснення в даному документі передбачені способи лікування суб'єкта, що має захворювання або з підозрою на захворювання, асоційоване з miR-21, які включають застосування щонайменше одного типу терапії додатково до введення модифікованого олігонуклеотиду, що має нуклеотидну послідовність, комплементарну мікроРНК.

10 У конкретних варіантах здійснення щонайменше один додатковий тип терапії включає фармацевтичний засіб.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають протизапальні засоби. У конкретних варіантах здійснення протизапальний засіб являє собою стероїдний протизапальний засіб. У конкретних варіантах здійснення стероїдний протизапальний засіб являє собою кортикостероїд. У конкретних варіантах здійснення кортикостероїд являє собою преднізон. У конкретних варіантах здійснення протизапальний засіб являє собою нестероїдні протизапальні лікарські засоби. У конкретних варіантах здійснення нестероїдний протизапальний засіб являє собою ібупрофен, інгібітор COX-1 або інгібітор COX-2.

15 У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають протидіабетичні засоби. Протидіабетичні засоби включають без обмеження бігуаніди, інгібітори глюкозидази, інсуліни, сульфонілсечовини та тіазолідендіони.

20 У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають без обмеження діуретики (наприклад, спіронолактон, еплеренон, фуросемід), інотропні препарати (наприклад, добутамін, мілринон), дигоксин, вазодилататори, інгібітори ангіотензин-II-перетворюючого ферменту (ACE) (наприклад, каптоприл, еналаприл, лізиноприл, беназеприл, хінаприл, фозиноприл та раміприл), блокатори рецептора ангіотензину II (ARB) (наприклад, кандесартан, ірбесартан, олмесартан, лозартан, валсартан, телмісартан, епросартан), блокатори кальцієвих каналів, динітрат ізосорбїду, гідралазин, нітрати (наприклад, мононітрат ізосорбїду, динітрат ізосорбїду), гідралазин, бета-блокатори (наприклад, карведилол, метопролол) та натрійуретичні пептиди (наприклад, незиритид). У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE вибраний з

30 цилазаприлу, периндоприлу та трандолаприлу. У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE вводять при дозі 0,025-0,1 мг/кг маси тіла. У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE вводять при дозі 0,125-1,0 мг/кг маси тіла. У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE вводять при дозі в діапазоні від 1 до 6 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE вводять при дозі в діапазоні від 1 до 2 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE вводять при дозі в діапазоні від 2 до 4 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення інгібітор ACE вводять при дозі в діапазоні від 0,5 до 1 мг/м²/доба.

40 У конкретних варіантах здійснення раміприл вводять при дозі в діапазоні від 1 до 6 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення раміприл вводять при дозі в діапазоні від 1 до 2 мг/м²/доба. У конкретному варіанті здійснення еналаприл вводять при дозі в діапазоні від 2 до 4 мг/м²/доба. У конкретному варіанті здійснення лізиноприл вводять при дозі в діапазоні від 4 до 8 мг/м²/доба. У конкретному варіанті здійснення беназеприл вводять при дозі в діапазоні від 4 до 8 мг/м²/доба. У конкретному варіанті здійснення фозиноприл вводять при дозі в діапазоні від 4 до 8 мг/м²/доба. У конкретному варіанті здійснення хінаприл вводять при дозі в діапазоні від 4 до 8 мг/м²/доба. У конкретному варіанті здійснення цилазаприл вводять при дозі в діапазоні від 1 до 2 мг/м²/доба. У конкретному варіанті здійснення перинприл вводять при дозі в діапазоні від 1 до 2 мг/м²/доба. У конкретному варіанті здійснення трандолаприл вводять при дозі в діапазоні від 0,5 до 1 мг/м²/доба.

50 У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі в діапазоні від 6,25 до 150 мг/м²/доба.

У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі 6,25 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі 10 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі 12,5 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі

55 18,75 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі 37,5 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі 50 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення ARB вводять при дозі 150 мг/м²/доба.

60 У конкретних варіантах здійснення лозартан вводять при дозі 12,5 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення лозартан вводять при дозі 12,5 мг/м²/доба. У конкретних варіантах

здійснення кандесартан вводять при дозі 6,25 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення ірбесартан вводять при дозі 37,5 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення телмісартан вводять при дозі 10 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення валсартан вводять при дозі 18,75 мг/м²/доба. У конкретних варіантах здійснення еспресартан вводять при дозі 150 мг/м²/доба.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою антагоніст альдостерону. У конкретних варіантах здійснення антагоніст альдостерону являє собою спіронолактон. У конкретних варіантах здійснення спіронолактон вводять при дозі в діапазоні від 10 до 35 мг щодобово. У конкретних варіантах здійснення спіронолактон вводять при дозі 25 мг щодня.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичні засоби включають гепариніди. У конкретних варіантах здійснення гепаринід являє собою полісульфат пентозану.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою фармацевтичний засіб, який блокує одну або декілька відповідей на фіброгенні сигнали.

У конкретних варіантах здійснення фармацевтичний засіб являє собою тип терапії на основі антитіла до фактора росту сполучної тканини. У конкретних варіантах здійснення тип терапії на основі антитіла до CTGF являє собою моноклональне антитіло до CTGF.

У конкретних варіантах здійснення додатковий тип терапії може являти собою фармацевтичний засіб, який підсилює імунну систему організму, в тому числі низькодозовий циклофосфамід, тимостимулін, вітаміни та харчові добавки (наприклад, антиоксиданти, в тому числі вітаміни А, С, Е, бета-каротин, цинк, селен, глутатіон, кофермент Q-10 та ехінацея), а також вакцини, наприклад, імуностимулюючий комплекс (ISCOM), що містить вакцинний склад, у якому об'єднані мультимерна система презентації антигену та ад'ювант.

У конкретних варіантах здійснення додатковий тип терапії вибирають для лікування або зменшення інтенсивності побічного ефекту однієї або декількох фармацевтичних композицій за даним винаходом. Такі побічні ефекти включають, без обмеження, реакції в місці ін'єкції, аномалії функціональних проб печінки, аномалії ниркової функції, гепатотоксичність, нефротоксичність, аномалії центральної нервової системи та форми міопатії. Наприклад, підвищені рівні амінотрансферази в сироватці можуть вказувати на гепатотоксичність або аномалію функції печінки. Наприклад, підвищений рівень білірубіну може вказувати на гепатотоксичність або аномалію функції печінки.

Інші приклади додаткових фармацевтичних засобів включають, без обмежень, імуноглобуліни, включаючи, без обмежень, імуноглобулін для внутрішньовенного введення (IVIg); анальгетики (наприклад, ацетаминофен); саліцилати; антибіотики; противірусні засоби; протигрибкові засоби; модифікатори адренергічних рецепторів; гормони (наприклад, анаболічні стероїди, андроген, естроген, кальцитонін, прогестин, соматостатин і тироїдні гормони); імуномодулятори; міорелаксанти; антигістамінні засоби; засоби проти остеопорозу (наприклад, біфосфонати, кальцитонін та естрогени); простагландини, протипухлинні засоби; психотерапевтичні засоби; седативні засоби; продукти, отримані із сумаха, що вкорінюється, або сумаха отруйного; антитіла та вакцини.

Конкретні набори

Даний винахід також передбачає набори. У деяких варіантах здійснення набори містять одну або декілька сполук за даним винаходом, що містять модифікований олігонуклеотид, де нуклеотидна послідовність олігонуклеотиду комплементарна нуклеотидній послідовності miR-21. Сполуки, комплементарні miR-21, можуть містити будь-який з нуклеозидних патернів, описаних у даному документі. У деяких варіантах здійснення сполуки, комплементарні miR-21, можуть знаходитися у флаконі. Декілька флаконів, наприклад 10, можуть знаходитися, наприклад, в розподільних упаковках. У деяких варіантах здійснення флакон виготовлений таким чином, щоб було зручно використовувати шприц. Набір також може містити інструкції щодо застосування сполук, комплементарних miR-21.

У деяких варіантах здійснення набори можна застосовувати для введення суб'єкту сполуки, комплементарної miR-21. У таких випадках на додаток до сполук, комплементарних miR-21, набір також може містити одне або декілька з наступного: шприц, тампон, просочений спиртом, ватяну кульку та/або марлеву прокладку. У деяких варіантах здійснення сполуки, комплементарні miR-21, можуть знаходитися в попередньо заповненому шприці (такому як шприци з разовою дозою, наприклад, з калібром голки 27, голкою ½ дюйма з ковпачком для голки), а не у флаконі. Декілька попередньо заповнених шприців, наприклад 10, можуть знаходитися, наприклад, в розподільних упаковках. Набір також може містити інструкції щодо введення сполук, комплементарних miR-21.

Конкретні експериментальні моделі

У конкретних варіантах здійснення даних винахід передбачає способи застосування та/або тестування модифікованих олігонуклеотидів за даним винаходом в експериментальній моделі. Фахівці в даній галузі техніки мають можливість вибирати та модифікувати протоколи для таких експериментальних моделей для оцінки фармацевтичного засобу за даним винаходом.

5 Зазвичай модифіковані олігонуклеотиди спочатку випробовують на клітинах, які культивуються. Прийнятні типи клітин включають ті, які належать до типу клітин, для якого необхідна доставка модифікованого олігонуклеотиду *in vivo*. Наприклад типи клітин, що є прийнятними для дослідження способів, описаних у даному документі, включають клітини первинної культури або клітини, які культивуються.

10 У конкретних варіантах здійснення ступінь, до якого модифікований олігонуклеотид перешкоджає активності miR-21, оцінюють на клітинах, які культивуються. У конкретних варіантах здійснення інгібування активності мікроРНК можна оцінювати шляхом вимірювання рівнів мікроРНК. В альтернативному випадку, можна виміряти рівень передбаченого або підтвердженого мікроРНК-регульованого транскрипту. Інгібування активності мікроРНК може
15 привести в результаті до підвищення кількості miR-21-регульованого транскрипту та/або білка, кодованого miR-21-регульованим транскриптом. Крім того, у конкретних варіантах здійснення можна вимірювати деякі фенотипічні результати.

Фахівцям у даній галузі техніки для дослідження miR-21 на моделях захворювання людини доступні декілька тваринних моделей. Наприклад, інгібітори miR-21 можна досліджувати в
20 експериментальній моделі синдрому Альпорта, наприклад, миші, нокаутні за Col4a3 (миші Col4a3^{-/-}). Важкість захворювання у мишиній моделі залежить від генетичного фону миші, що має мутацію Col4a3. Наприклад, початок розвитку та прогресування захворювання, як правило, є більш швидкими при 129 × 1/SvJ у порівнянні з фоном C57BL/6J. Відповідно, генетичний фон миші Col4a3^{-/-} можна вибирати так, щоб змінювати початок розвитку та прогресування
25 захворювання. Додаткові моделі включають собачі моделі Х-зчепленого, аутосомно-рецесивного або аутосомно-домінантного синдрому Альпорта. Див., наприклад, Kashtan, Nephrol. Dial. Transplant, 2002, 17: 1359-1361.

Конкретні кількісні аналізи

Ефекти антисенсового інгібування miR-21 після введення модифікованих олігонуклеотидів
30 можна оцінювати за допомогою різноманітних способів, відомих з рівня техніки. У конкретних варіантах здійснення такі способи застосовують для проведення кількісного аналізу рівнів мікроРНК у клітинах або тканинах *in vitro* або *in vivo*. У конкретних варіантах здійснення зміни рівнів мікроРНК вимірюють за допомогою мікроматричного аналізу. У конкретних варіантах здійснення зміни рівнів мікроРНК вимірюють за допомогою одного з декількох комерційно
35 доступних ПЛР-аналізів, наприклад, аналіз мікроРНК TaqMan® (Applied Biosystems). У конкретних варіантах здійснення антисенсове інгібування miR-21 оцінюють за допомогою вимірювання рівня мРНК та/або білка мішені miR-21. Антисенсове інгібування miR-21, як правило, приводить у результаті до підвищення рівня мРНК та/або білка мішені мікроРНК.

Аналіз дії на мішень

40 Модуляцію активності мікроРНК за допомогою анти-miR або імітатора мікроРНК можна оцінювати шляхом вимірювання дії на мішень. У конкретних варіантах здійснення дію на мішень вимірюють за допомогою мікроматричного визначення профілю мРНК. Для послідовностей мРНК, які модулюються (активність або підвищується, або знижується) за допомогою анти-miR або імітатора мікроРНК, виконується пошук послідовностей затравок мікроРНК для порівняння
45 модуляції мРНК, які є мішенями мікроРНК, з модуляцією мРНК, які не є мішенями мікроРНК. Таким чином, можна оцінювати взаємодію анти-miR з miR-21 або імітатора miR-21 з його мішенями. У випадку анти-miR проводиться скринінг послідовностей мРНК, рівні експресії яких підвищуються, відносно послідовностей мРНК, які містять збіг затравки з мікроРНК, до якої комплементарна анти-miR.

50 ПРИКЛАДИ

Наступні приклади представлені для того, щоб більш повно проілюструвати деякі варіанти здійснення даного винаходу. Однак їх не слід розглядати як такі, що обмежують широкий об'єм даного винаходу.

Фахівцеві в даній галузі техніки буде легко застосовувати основні принципи даного розкриття для розробки різних сполук без відхилення від сутності даного винаходу.

Приклад 1. Анти-miR-21 у моделі синдрому Альпорта

У мишей Col4a3^{-/-} на генетичному фоні 129sv спонтанно розвивається важке захворювання нирок, подібне до синдрому Альпорта у людини. Тому мишей Col4a3^{-/-} використовують у якості експериментальної моделі синдрому Альпорта.

60 Модифіковані олігонуклеотиди, комплементарні miR-21 (сполуки анти-miR-21), тестували у

моделі Col4a3^{-/-} синдрому Альпорта. Мишей дикого типу використовували у якості контрольних мишей.

Структура сполуки анти-miR-21 являє собою 5'-AeCsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAe-3" (SEQ ID NO: 3), де нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-cEt-нуклеозиди. Кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У віці 3 тижні мишей генотипували для ідентифікації мишей Col4a3^{-/-}. Починаючи з віку 3 тижні до віку 9 тижнів підібраних за статтю мишей з одного приплоду обробляли анти-miR-21 або PBS. Анти-miR-21 вводили підшкірно при дозі 25 мг/кг двічі на тиждень. Група обробки були наступними: (1) миші дикого типу, введення PBS, n=8; (2) миші Col4a3^{-/-}, введення PBS, n=12; (3) миші Col4a3^{-/-}, введення анти-miR-21, n=12. Мишей дикого типу з одного приплоду з мишами Col4a3^{-/-} використовували у якості контрольних мишей дикого типу. Зразок сечі, одержаний за ніч (приблизно 16 годин) збирали раз на тиждень. Плазму та нирки відбирали наприкінці тижня 9. Зразки рідини та тканини аналізували для визначення змін функції нирок, ураження нирок, а також гломерулосклерозу та інтерстиціального фіброзу.

Кінцеві показники у крові або сечі включали вимірювання рівня азоту сечовини в крові (BUN), альбумінурії, співвідношення альбумін/креатинін, швидкості гломерулярної фільтрації. Гістологічний аналіз включав оцінку гломерулосклерозу, інтерстиціального фіброзу, ушкодження каналців, інфільтрації макрофагів та присутності міофібробластів.

Рівень азоту сечовини в крові (BUN) вимірювали у тиждень 9. Статистичну значущість розраховували за допомогою критерію Манна-Уїтні. Як показано на фігурі 1A, статистично значуще зниження BUN спостерігали у тварин, яких обробляли анти-miR-21, у порівнянні з обробленими PBS контрольними тваринами наприкінці дослідження. Знижений BUN спостерігали взагалі (фігура 1A), так само, як і у тільки самців миші (приблизно 90 мг/дл порівняно з приблизно 25 мг/дл у контрольних самців миші) та у тільки самок миші (приблизно 70 мг/дл порівняно з приблизно 25 мг/дл у контрольних самок миші), що не показано). BUN у мишей Col4a3^{+/+} складав приблизно 12,5 мг/кл (у межах нормального діапазону значень; не показано). BUN являє собою маркер функції нирок, який визначають у крові. Більш високий BUN корелює з гіршою функцією нирок. Зниження BUN вказує на знижене ушкодження та ураження нирок та поліпшену функцію.

Альбумінурію оцінювали шляхом вимірювання альбуміну у зразках сечі, які збирали протягом 16 годин з частотою один раз на тиждень, за допомогою ELISA та за допомогою нормалізації до рівня екскреції креатиніну з сечею. Всі аналізи проводили в один і той же час наприкінці дослідження. Як показано на фігурі 1B, у мишей Col4a3^{-/-} розвивається важка альбумінурія. Однак у мишей, яких обробляли анти-miR-21, розвивалася значно менша альбумінурія, що виявляли за допомогою зниження співвідношення альбуміну до креатиніну в сечі. Це зниження спостерігали після тижня 7 та воно зберігалось до тижня 9. У мишей дикого типу з одного приплоду з мишами Col4a3^{-/-} альбумінурія не виявлялася, як і очікувалось. Альбумінурія є чутливою мірою ураження клубочків та каналців. Зниження співвідношення альбуміну до креатиніну в сечі вказує на зниження вираженості захворювання клубочків та/або каналців.

Синдром Альпорта також характеризується прогресуючим розвитком гломерулосклерозу та значним інтерстиціальним фіброзом нирок, що має місце одночасно з невідповідним виотоком з клубочків. Відповідно, гломерулосклероз оцінювали із визначенням сліпим способом показника клубочків щодо склеротичних уражень (втрата капілярної петлі+фіброз або гіаліноз). Дослідник послідовно визначав показник для тридцяти клубочків від кожної миші сліпим способом. Показник складав 0-4, де 0 = нормальний; 1 = <25 % клубочка уражені склерозом; 2=25-50 % клубочка уражені склерозом; 3=50-75 % клубочка уражені склерозом; 4=75-100 % клубочка уражені склерозом. Відносна кількість клубочків, не уражених захворюванням, була набагато більшою у мишей, яких обробляли анти-miR-21, та відносна кількість клубочків з помірним або важким ураженням клубочків (показник 2-4) була значно більшою у мишей, яких обробляли PBS (фігура 2). Показник клубочків також визначали у мишей дикого типу (WT) з одного приплоду з мишами Col4a3^{-/-}. Інтерстиціальний фіброз вимірювали морфометрично на цілих сагітальний зрізах, зафарбованих у червоний колір із використанням піросиріусу, від оброблених PBS та анти-miR-21 тварин Col4a3^{-/-}. Як показано на фігурі 3A, статистично значуще зниження інтерстиціального фіброзу спостерігали у оброблених анти-miR-21 мишей Col4a3^{-/-}. Крім того, кількісна ПЛР для транскриптів основного патологічного білка матриксу колагену Іα(1) (Col1a1) продемонструвала, що тканина нирок від оброблених анти-miR-21 мишей Col4a3^{-/-} характеризувалася значно меншим утворенням цього патологічного колагену (фігура 3B).

Ушкодження ниркової тканини оцінювали на залитих парафіном та зафіксованих параформальдегідом (4 %) зрізах тканини, зафарбованих шляхом реакції з реактивом Шифа та йодною кислотою (PAS). Спочатку визначали ранговий показник зрізів нирок щодо загального ушкодження виходячи із ушкодження каналців та клубочків, а також запалення. Ураження оцінювали виходячи з різних факторів, у тому числі розширення каналців, втрати щіткової облямівки, інфільтрації клітин, запалення клубочків, інтерстиціального набряку та некрозу клітин. Сліпим способом визначали ранговий показник зрізів нирок щодо загального ушкодження та присвоювали ранговий показник ниркового ушкодження. Зрізи нирок від мишей Col4a3^{-/-} характеризувалися значно нижчим ранговим показником ниркового ушкодження, що вказувало на менше ниркове ушкодження (фігура 4A). Для того, щоб проаналізувати це більш детально, дослідник сліпим способом оцінював клубочки щодо відносної кількості таких, що мали гломерулярні серпоподібні утворення. Серпоподібні утворення відносяться до проліферації клітин у капсулі Боумена і їх визначають як ≥ 2 шарів клітин у межах простору Боумена. Серпоподібні утворення є загальноприйнятим маркером ушкодження клубочків. У мишей Col4a3^{-/-}, які одержували анти-miR-21, відносна кількість клубочків із серпоподібними утвореннями складала приблизно 44 %, тоді як у мишей, які одержували обробку PBS-контролем, відносна кількість клубочків із серпоподібними утвореннями складала приблизно 19 % (фігура 4B). У мишей Col4a3^{+/+} з одного приплоду відносна кількість клубочків із серпоподібними утвореннями складала менше 5 % (не показано). Канальці нефронів нирки також є місцем ураження. Ураження каналців оцінювали за допомогою накладання сітки на послідовні зображення, що охоплюють цілий сагітальний зріз кожної нирки. Ураження каналців оцінювали у кожному квадраті сітки. Ураження каналців оцінювали виходячи з наявності розширення каналців/сплюснення, втрати щіткової облямівки, інфільтрації клітин та некрозу клітин. Наявність цих ознак приводить у результаті до позитивного показника для цього квадрата на сітці. Загальний показник застосовують щодо кожного зображення, причому він являє собою % квадратів, які характеризуються ураженням каналців. Здійснюють усереднення для всіх зображень від цієї нирки. Потім проводять статистичний аналіз середнього показника для кожної нирки. Як показано, показник ушкодження каналців був значно нижчим у мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21, у порівнянні з Col4a3^{-/-}, які одержували PBS (фігура 4C). Показник ушкодження каналців у мишей Col4a3^{+/+} з одного приплоду складав менше 10 % (не показано).

Додатковий гістологічний аналіз зразків нирок проводили для оцінки інфільтрації макрофагів, стабільності ендотелію та відкладення міофібробластів. Виходячи з фарбування F4/80, інфільтрація макрофагів була зниженою у мишей Col4a3^{-/-}, оброблених анти-miR-21, порівняно з контрольними мишами Col4a3^{-/-}, обробленими PBS (фігура 5A). Імуноцитохімічне фарбування щодо CD31 продемонструвало поліпшення стабільності ендотелію у мишей Col4a3^{-/-}, оброблених анти-miR-21, порівняно з контрольними мишами Col4a3^{-/-}, обробленими PBS (не показано). Виявлення альфа-SMA продемонструвало зниження відкладення міофібробластів у мишей Col4a3^{-/-}, оброблених анти-miR-21, порівняно з контрольними мишами Col4a3^{-/-}, обробленими PBS (фігура 5B). У мишей Col4a3^{+/+} фарбування альфа-SMA складало приблизно 5 % (не показано).

Реакційноздатні частинки кисню (ROS) є побічним продуктом нормального клітинного метаболізму. Під час клітинного стресу надлишок ROS може спричинити перекисне окиснення ліпідів мембран клітини та органел, що призводить у результаті до порушення структурної цілісності та здатності до клітинного транспорту та вироблення енергії. У нирці ROS, що утворилися під час клітинного стресу, можуть спричинити ушкодження нирки. Для того, щоб оцінити, чи відбувалося зниження утворення ROS після інгібування miR-21 у мишей Col4a3^{-/-}, рівні перекису водню в сечі вимірювали у мишей, оброблених анти-miR-21 та PBS. Рівні перекису водню в сечі були значно зниженими у мишей, які одержували анти-miR-21 (фігура 6A). У мишей Col4a3^{+/+} рівні перекису водню в сечі складала менше 5 мкМ (не показано). Крім того, імуноцитохімічне фарбування тканини нирок дигідроетидієм (DHE), що є мірою ROS, продемонструвало зниження ROS у тканині нирок мишей Col4a3^{-/-}, оброблених анти-miR-21, порівняно з контрольними мишами, обробленими PBS (фігура 6B). У мишей Col4a3^{+/+} спостерігали менше 10 % фарбування DHE (не показано). Ці дані продемонстрували зниження ROS, як у сечі, так і у тканині нирок у мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21. Відповідно, один механізм, за допомогою якого анти-miR-21 може знижувати ниркове ушкодження, може включати зниження утворення реакційноздатних частинок кисню.

Імуноблотинг білка із нирок мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли анти-miR-21, продемонстрував збільшення кількості білка MPV17L у нирці у порівнянні з мишами Col4a3^{-/-}. MPV17L являє собою білок внутрішньої мембрани мітохондрій, пов'язаний з метаболізмом реакційноздатних

частинок кисню, та забезпечує захист від окисного стресу. Відповідно, знижене утворення ROS після обробки анти-miR-21 може відбуватися, щонайменше частково, завдяки підвищеним рівням MPV17L. Для додаткового дослідження механістичних ефектів анти-miR-21 рівень білка PPAR-альфа вимірювали за допомогою імуноблотингу в нирках мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли PBS або обробляли анти-miR-21. Обробка анти-miR-21 приводила до підвищення рівня білка PPAR-alpha, що дозволяє припустити стимуляцію метаболічних шляхів.

Подоцити є високоспеціалізованими епітеліальними клітинами, які є необхідним компонентом бар'єра гломерулярної фільтрації. Втрата подоцитів може призвести до протеїнурії, а при деяких хворобливих станах - до гломерулосклерозу. Для того, щоб оцінити, чи впливало інгібування miR-21 у мишей Col4a3^{-/-} на кількість подоцитів, у мишей, оброблених анти-miR-21 та PBS, вимірювали кількість подоцитів. Кількість подоцитів значно збільшувалась у мишей Col4a3^{-/-}, які одержували анти-miR-21, у порівнянні з мишами, обробленими PBS, та була аналогічною до кількості подоцитів, що спостерігали у мишей дикого типу з одного приплоду, з мишами Col4a3^{-/-} (фігура 7). Відповідно, один механізм, за допомогою якого анти-miR-21 може знижувати ниркове ушкодження у моделі синдрому Альпорта, являє собою попередження або зниження втрати подоцитів.

Аналогічне дослідження проводили із застосуванням наступних сполук анти-miR-21.

Сполука анти-miR-21 № 1 (описана вище): 5'-AECsATCsAGTCsTGAUsAAGCsTAE-3" (SEQ ID NO:3);

сполука анти-miR-21 № 2: 5'-AECsATCsAsGTCsUsGAUsAsAGCsUsAE-3" (SEQ ID NO: 3);

сполука анти-miR-21 № 3: 5'-^{Me}CEAsAsTECsUsAEAEUsAsAEGECsTEAs-3" (SEQ ID NO: 4) та

сполука анти-miR-21 № 4: 5'-AECsAETECsAEGTECsTGAUsAAGCsUsAs-3" (SEQ ID NO: 3); де

нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-сEt-нуклеозиди; та верхній індекс "Me" означає 5-метильну групу при основі нуклеозиду. Кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

Кожну сполуку вводили мишам Col4a3^{-/-} віком три тижні при дозі 25 мг/кг двічі на тиждень протягом дев'яти тижнів. Контрольні групи включали мишей Col4a3^{-/-}, яких обробляли PBS, та мишей дикого типу з одного приплоду з мишами Col4a3^{-/-}. Кожна група обробки включала від 10 до 12 мишей. Для сполук № 1, 2 та 4 кінцеві показники оцінювали як описано вище та вони включали BUN, співвідношення альбуміну до креатиніну в сечі, ниркове ушкодження (фарбування PAS), гломерулосклероз та відносну кількість клубочків із серпоподібними утвореннями. Для сполуки № 3 кінцеві показники включали BUN, співвідношення альбуміну до креатиніну в сечі та експресію гена колагену (у якості міри фіброзу), причому їх оцінювали як описано вище.

Відповідно до результатів, описаних вище, сполука анти-miR-21 № 1 забезпечувала поліпшення всіх кінцевих показників, які оцінювали. Ефективність обох сполук анти-miR-21 № 2 була аналогічною до ефективності сполуки № 1, причому з поліпшеннями, які спостерігали щодо BUN, співвідношення альбуміну до креатиніну в сечі, ниркового ушкодження, ступеня гломерулосклерозу та процентної частки клубочків із серпоподібними утвореннями. Ефективність сполуки № 3 була аналогічною до ефективності сполуки № 1, причому з поліпшеннями BUN, співвідношення альбуміну до креатиніну в сечі та експресії Col1a1. Сполука анти-miR-21 № 4, хоча і була менш ефективною, ніж інші сполуки, які тестували, все ще приводила у результаті до поліпшення BUN, ниркового ушкодження, ступеня гломерулосклерозу та процентної частки клубочків із серпоподібними утвореннями.

Разом узяті, ці дані ілюструють, що у моделі синдрому Альпорта обробка анти-miR-21 зменшує втрату функції нирок та розвиток альбумінурії. Гломерулосклероз та інтерстиціальний фіброз значно зменшувалися, а проксимальні канальці залишалися функціональними. Оскільки анти-miR-21 попереджає прогресуючу втрату функції нирок у миші Col4a3^{-/-} та зменшує вираженість як гломерулярного, так і тубулоінтерстиціального захворювання, анти-miR-21 являє собою терапевтичний засіб для лікування синдрому Альпорта у людини.

Приклад 2. Підвищення рівня miR-21 у моделі синдрому Альпорта

Для оцінки дисрегуляції miR-21 в експериментальній моделі синдрому Альпорта вимірювали рівні miR-21 у тканині нирок, відібраній від мишей. РНК виділяли з цілої нирки та вимірювали miR-21 за допомогою кількісної ПЛР. У мишей Col4a3^{-/-} рівні miR-21 були підвищеними приблизно у три рази у порівнянні з рівнями miR-21 у мишей дикого типу.

Відповідно, можна ідентифікувати суб'єкта, лікування якого від синдрому Альпорта здійснюють, як такого, який має підвищений рівень miR-21 у матеріалі з біопсії нирок, сечі або крові, перед введенням засобу для лікування.

Приклад 3. Дослідження виживання у моделі синдрому Альпорта

Миші дикого типу зазвичай живуть 2-3 роки (або 730-1095 днів). У мишей Col4a3^{-/-} на фоні 129 × 1/SvJ термінальна стадія ниркової недостатності може проявлятися вже у віці 2 місяці. У Col4a3^{-/-} на фоні C57BL/6J термінальна стадія ниркової недостатності може проявлятися вже у віці 6 місяців. Незалежно від фону тривалість життя мишей Col4a3^{-/-} є значно коротшою, ніж у мишей дикого типу. Тому миші Col4a3^{-/-} при будь-якому генетичному фоні можуть служити у якості моделі термінальної стадії ниркової недостатності при синдромі Альпорта та їх можна використовувати для оцінки ефектів кандидатних терапевтичних засобів на очікувану тривалість життя.

Мишей генотипували для ідентифікації мишей Col4a3^{-/-}. Анти-miR-21 вводили підшкірно при дозі в діапазоні від 10 до 25 мг/кг один раз або двічі на тиждень протягом до одного року. PBS можна вводити у якості контрольної обробки. Зразок сечі, одержаний за ніч (приблизно 16 годин), збирали при тижневому або місячному графіку протягом усього дослідження. Фіксували вік кожної миші на момент смерті. Плазму та нирки збирали на момент смерті або наприкінці дослідження. Зразки рідини та тканини аналізували для визначення змін функції нирок, гломерулосклерозу та фіброзу.

Зразки рідини та тканини аналізували для визначення змін функції нирок, ураження нирок, а також гломерулосклерозу та інтерстиціального фіброзу. Кінцеві показники у крові або сечі включали вимірювання рівня азоту сечовини в крові (BUN), альбумінурії, співвідношення альбумін/креатинін, швидкості гломерулярної фільтрації. Гістологічний аналіз включав оцінку гломерулосклерозу, інтерстиціального фіброзу, ушкодження каналців, інфільтрації макрофагів та присутності міофібробластів.

Спостерігали відстрочений початок розвитку термінальної стадії ниркової недостатності та збільшену очікувану тривалість життя у мишей, оброблених анти-miR-21, у порівнянні з контрольними мишами, обробленими PBS, причому можна припустити, що анти-miR-21 являє собою терапевтичний засіб, який може збільшувати очікувану тривалість життя суб'єктів з синдромом Альпорта.

Анти-miR-21 збільшує показник виживання при дослідженні у моделі синдрому Альпорта з одноразовим введенням дози

Для оцінки ефектів анти-miR-21 на виживання в експериментальній моделі синдрому Альпорта сполуку анти-miR-21 вводили мишам Col4a3^{-/-}.

Структура сполуки анти-miR-21 являє собою 5'-AEC_sATC_sAGTC_sTGAU_sAAGC_sTA_E-3" (SEQ ID NO: 3), де нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-cEt-нуклеозиди. Кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

Мишей Col4a3⁺¹ (гетерозиготи) при фоні 129 × 1/SvJ схрещували з одержанням мишей Col4a3^{-/-}. У віці 3 тижні мишей генотипували для ідентифікації мишей Col4a3^{-/-}. Групи обробки були наступними: (1) миші Col4a3⁺¹ (дикого типу з одного приплоду), введення PBS двічі на тиждень, n=12; (2) миші Col4a3^{-/-}, введення PBS двічі на тиждень, n=12; (3) миші Col4a3^{-/-}, підшкірно введення 25 мг/кг анти-miR-21 двічі на тиждень, n=12. Засоби для обробки вводили двічі на тиждень від тижня 3 до тижня 16. Значення ваги тварин вимірювали раз на тиждень та фіксували тривалість життя.

Як і очікувалось, у мишей Col4a3^{-/-} спостерігалася втрата ваги, починаючи з віку приблизно 9 тижнів та смерть наставала у віці від 9 до 11 тижнів. Як показано на фігурі 8A, анти-miR-21 збільшувала максимальну масу тіла та статистично значуще відстрочувала втрату ваги (p < 0,01). Як показано на фігурі 8B, анти-miR-21 статистично значуще збільшувала тривалість життя (p < 0,001). Таким чином, обробка анти-miR-21 не тільки відстрочувала втрату ваги, але і значно поліпшувала виживання мишей Col4a3^{-/-}.

Анти-miR-21 збільшує показник виживання при дослідженні залежності доза-ефект у моделі синдрому Альпорта

Для оцінки дозозалежних ефектів анти-miR-21 на виживання в експериментальній моделі синдрому Альпорта декілька доз сполуки анти-miR-21 вводили мишам Col4a3^{-/-}.

Структура сполуки анти-miR-21 являє собою 5'-AEC_sATC_sAGTC_sTGAU_sAAGC_sTA_E-3" (SEQ ID NO: 3), де нуклеозиди, за якими не йде нижній індекс, означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "E", означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди, за якими йде нижній індекс "S", означають S-cEt-нуклеозиди. Кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

У віці 3 тижні мишей генотипували для ідентифікації мишей Col4a3^{-/-}. Групи обробки були наступними:

- (1) миші Col4a3^{-/-}, введення PBS один раз на тиждень, n=13;
 (2) миші Col4a3^{-/-}, введення 12,5 мг/кг анти-miR-21 один раз на тиждень, n=12;
 (3) миші Col4a3^{-/-}, введення 25 мг/кг анти-miR-21 один раз на тиждень, n=13;
 (4) миші Col4a3^{-/-}, введення 50 мг/кг анти-miR-21 один раз на тиждень, n=12;
 (5) миші Col4a3^{-/-}, введення 25 мг/кг анти-miR-21 двічі на тиждень, n=12.

Засоби для обробки вводили, починаючи з дня 24. Значення ваги тварин вимірювали раз на тиждень та фіксували тривалість життя. У тиждень 7 кров збирали для вимірювання BUN.

Як показано на фігурі 9A, зниження BUN спостерігали у тварин, яких обробляли анти-miR-21, у порівнянні з обробленими PBS контрольними тваринами. Хоча спостерігали зниження BUN, воно не було переконливо дозозалежним, можливо внаслідок того, що захворювання було більш важким у мишей Col4a3^{-/-}, використовуваних у цьому експерименті (миші були одержані від іншого постачальника, ніж миші Col4a3^{-/-}, описані в попередніх прикладах). Зниження BUN, яке спостерігали, вказує на знижене ушкодження та ураження нирок та поліпшену функцію.

Як показано на фігурі 9B, обробка анти-miR-21 збільшувала тривалість життя мишей Col4a3^{-/-} дозозалежним чином. Збільшену тривалість життя спостерігали як для обробки двічі на тиждень, так і для обробки один раз на тиждень. Значення медіанного виживання були наступними: PBS, 62 дні; 12,5 мг/кг анти-miR-21 один раз на тиждень (QW), 72,5 дні; 25 мг/кг анти-miR-21 один раз на тиждень (QW), 77 днів; 50 мг/кг анти-miR-21 один раз на тиждень (QW), 89 днів; 25 мг/кг анти-miR-21 двічі на тиждень (BIW), 82,5 дні.

Спостерігали відстрочений початок розвитку ниркової дисфункції та збільшену очікувану тривалість життя у мишей, оброблених анти-miR-21, у порівнянні з контрольними мишами, обробленими PBS, причому можна припустити, що анти-miR-21 являє собою терапевтичний засіб, який може збільшувати очікувану тривалість життя суб'єктів з синдромом Альпорта.

Приклад 4. Розподіл анти-miR у нирці мишей Col4a3^{-/-}

Олігонуклеотиди, у тому числі сполуки анти-miR, як відомо, розподіляються у декількох типах клітин у нирці. Як повідомлялося Chau et al., *Sci Transl Med.*, 2012, 121ra18, після введення Су3-міченого анти-miR або нормальним мишам, або мишам, які зазнали ниркового ушкодження (однобічна обструкція сечоводу, модель інтерстиціального фіброзу), найбільша інтенсивність флуоресценції у нирці спостерігалася в епітелії проксимальних каналців. Всі вказані з ендотелію, перицитів, міофібробластів та макрофагів також містили кількості, які можуть бути виявлені, Су3-мічених анти-miR. Однак, клубочок, зокрема

подоцити, вочевидь, не поглинають значні кількості анти-miR, що узгоджується з відомим розподілом хімічно модифікованих олігонуклеотидів (Masarjian et al., *Oligonucleotides*, 2004, 14, 299-310).

Для дослідження розподілу анти-miR у мишиній моделі синдрому Альпорта Су3-мічену сполуку анти-miR вводили мишам Col4a3^{-/-} із двох різних груп, у одній миші віком 6 тижнів (n=3), а в іншій віком 8 тижнів (n=4), а також мишам дикого типу віком 8 тижнів з однієї групи (n=3). Через два дні після введення сполуки анти-miR тварин забивали та відбирали нирки і обробляли для гістологічного аналізу.

Зрізи тканини нирок спільно мітили антитілами, специфічними до деяких різних клітинних маркерів, для ідентифікації поглинання анти-miR конкретними типами клітин. Фарбування здійснювали для виявлення альфа-SMA (маркера міофібробластів), PDGFR-бета (маркера перицитів/міофібробластів), CD31 (маркера ендотеліальних клітин), F4/80 (маркера макрофагів) та GP38 (маркера подоцитів). Як і очікувалось, сполука анти-miR поглиналась епітелієм проксимальних каналців, перицитами, міофібробластами та макрофагами. На противагу попереднім спостереженням щодо нормальних мишей та мишей з інтерстиціальним фіброзом, у мишей Col4a3^{-/-} анти-miR поглиналась клубочком, у тому числі подоцитами.

Як описано у даному документі, ефективність, яку спостерігали після введення анти-miR-21 в експериментальній моделі синдрому Альпорта, супроводжується поліпшеннями, що стосуються не тільки інтерстиціального фіброзу, що оточує каналці, але також і фіброзу в клубочках (відомого як гломерулосклероз). Ці дані дозволяють припустити, що ці поліпшення можуть бути безпосередньо пов'язані з ефектами анти-miR-21 у клубочках, на додаток до або замість відповіді, пов'язаної з поліпшеною структурою та функцією каналців.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> Регулус Терапевтікс Інк.
- <120> СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ СИНДРОМУ АЛЬПОРТА
- <130> REGUL-32930/WO-1/ORD
- <150> US 61/779137
- <151> 2013-03-13
- <150> US 61/711514
- <151> 2012-10-09
- <160> 4
- <170> PatentIn версія 3.5
- <210> 1
- <211> 22
- <212> РНК
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
uagcuuauca gacugauguu ga 22
- <210> 2
- <211> 72
- <212> РНК
- <213> Homo sapiens
- <400> 2
ugucggguag cuuaucauac ugauguuuac uguuuaauuu cauggucaaca ccagucgaug 60
ggcuugucua ca 72
- <210> 3
- <211> 19
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- <223> Синтетична
- <400> 3
acatcagtct gataagcta 19
- <210> 4
- <211> 15
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- <223> Синтетична

<400> 4
caatctaata agcta

15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Застосування модифікованого олігонуклеотиду в одержанні лікарського засобу для застосування в способі лікування синдрому Альпорта, який включає введення суб'єкту, що має синдром Альпорта або з підозрою на нього, модифікованого олігонуклеотиду, де модифікований олігонуклеотид складається з 12-25 зв'язаних нуклеозидів, і де нуклеотидна послідовність модифікованого олігонуклеотиду комплементарна miR-21.
- 10 2. Застосування за п. 1, де перед введенням модифікованого олігонуклеотиду суб'єкту був поставлений діагноз синдрому Альпорта.
3. Застосування за п. 1, де у суб'єкта перед введенням модифікованого олігонуклеотиду була визначена наявність підвищеного рівня miR-21 у нирці, сечі або крові суб'єкта.
4. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де введення:
- 15 а) поліпшує функцію нирок;
 б) дозволяє відстрочити початок розвитку термінальної стадії ниркової недостатності;
 в) дозволяє відстрочити час діалізу;
 г) дозволяє відстрочити час трансплантації нирки і/або
 е) збільшує очікувану тривалість життя.
- 20 5. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де введення:
- а) знижує ступінь гематурії;
 б) дозволяє відстрочити початок розвитку гематурії;
 в) знижує ступінь протеїнурії;
 г) дозволяє відстрочити початок розвитку протеїнурії;
 25 е) знижує ступінь фіброзу нирок;
 ф) сповільнює подальше прогресування фіброзу і/або
 г) припиняє подальше прогресування фіброзу.
6. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де суб'єкт має мутацію, вибрану з мутації гена, який кодує ланцюг альфа-3 колагену IV типу, мутацію гена, який кодує ланцюг альфа-4 колагену IV типу, або мутацію гена, який кодує ланцюг альфа-5 колагену IV типу.
- 30 7. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де суб'єктом є чоловік.
8. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де суб'єктом є жінка.
9. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де суб'єкта ідентифікують як такого, що має гематурію і/або протеїнурію.
- 35 10. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де суб'єкт має знижену функцію нирок.
11. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де суб'єкт потребує поліпшеної функції нирок.
12. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де спосіб включає:
- 40 а) вимірювання рівня азоту сечовини в крові суб'єкта;
 б) вимірювання рівня креатиніну в крові суб'єкта;
 в) вимірювання у суб'єкта кліренсу креатиніну;
 г) вимірювання у суб'єкта ступеня протеїнурії;
 е) вимірювання у суб'єкта співвідношення альбумін:креатинін;
 ф) вимірювання у суб'єкта швидкості клубочкової фільтрації;
 45 г) вимірювання у суб'єкта рівня цистатину С;
 г) вимірювання рівня білка β -trace protein (BTP) в крові суб'єкта;
 і) вимірювання рівня 2-мікроглобуліну в крові суб'єкта;
 ж) вимірювання рівня білка N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза (NAG) у сечі суб'єкта;
 к) вимірювання рівня білка нейтрофільний желатиназа-асоційований ліпокалін (NGAL) у сечі суб'єкта;
 50 л) вимірювання рівня білка молекула ушкодження нирок-1 (KIM-1) у сечі суб'єкта;
 м) вимірювання рівня білка інтерлейкін-18 (IL-18) у сечі суб'єкта;
 н) вимірювання рівнів моноцитарного хемоатрактантного білка (MCP1) у сечі суб'єкта;
 о) вимірювання рівнів фактора росту сполучної тканини (CTGF) у сечі суб'єкта;
 55 р) вимірювання рівня фрагментів колагену IV у сечі суб'єкта;
 қ) вимірювання рівня фрагментів колагену III у сечі суб'єкта і/або
 г) вимірювання рівнів білка подоцитів у сечі суб'єкта, при цьому білок подоцитів вибраний з нефрину і подоцину.

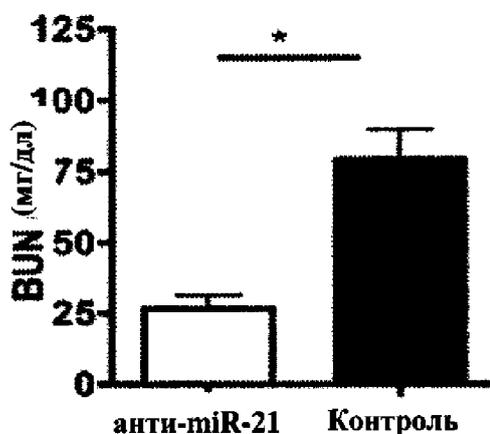
13. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де введення поліпшує у суб'єкта один або декілька маркерів функції нирок, що вибрані з:
- a) зниженого рівня азоту сечовини в крові суб'єкта;
 - b) зниженого рівня креатиніну в крові суб'єкта;
 - 5 c) поліпшеного кліренсу креатиніну у суб'єкта;
 - d) зниженого ступеня протеїнурії у суб'єкта;
 - e) зниженого співвідношення альбумін:креатинін у суб'єкта;
 - f) збільшеної швидкості клубочкової фільтрації у суб'єкта;
 - 10 g) зниженого рівня цистатину С в крові суб'єкта;
 - h) зниженого рівня білка β -trace protein (BTP) в крові суб'єкта;
 - i) зниженого рівня 2-мікроглобуліну (B2M) в крові суб'єкта;
 - j) зниженого рівня білка NAG у сечі суб'єкта;
 - k) зниженого рівня білка NGAL у сечі суб'єкта;
 - 15 l) зниженого рівня білка KIM-1 у сечі суб'єкта;
 - m) зниженого рівня білка IL-18 у сечі суб'єкта;
 - n) знижених рівнів моноцитарного хемоатрактантного білка (MCP1) у сечі суб'єкта;
 - o) знижених рівнів фактора росту сполучної тканини (CTGF) у сечі суб'єкта;
 - p) зниженого рівня фрагментів колагену IV у сечі суб'єкта;
 - q) зниженого рівня фрагментів колагену III у сечі суб'єкта і/або
 - 20 r) знижених рівнів білка подоцитів у сечі суб'єкта, де білок подоцитів вибраний з нефрину та подоцину.
14. Застосування за будь-яким з пп. 5, 9, 12 або 13, де протеїнурією є альбумінурія.
15. Застосування за п. 14, де альбумінурія являє собою альбумінурію з верхньою межею норми, мікроальбумінурію або макроальбумінурію.
- 25 16. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де синдром Альпорта являє собою Х-зчеплену форму синдрому Альпорта.
17. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де синдром Альпорта являє собою аутосомну форму синдрому Альпорта.
18. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де спосіб включає застосування щонайменше одного додаткового типу терапії, вибраного із інгібітора ангіотензин-II-перетворюючого ферменту (ACE), блокатора рецепторів ангіотензину II (ARB), антигіпертензивного засобу, аналога вітаміну D, перорального засобу, що зв'язує фосфати, діалізу та трансплантації нирки.
- 30 19. Застосування за п. 18, де інгібітори ангіотензин-II-перетворюючого ферменту (ACE) вибирають з каптоприлу, еналаприлу, лізиноприлу, беназеприлу, хінаприлу, фозиноприлу і раміприлу.
20. Застосування за п. 18, де блокатори рецепторів ангіотензину II (ARB) вибирають з кандесартану, ірбесартану, олмесартану, лозартану, валсартану, телмісартану і епросартану.
- 40 21. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де нуклеотидна послідовність модифікованого олігонуклеотиду щонайменше на 90 % комплементарна, щонайменше на 95 % комплементарна або на 100 % комплементарна нуклеотидній послідовності miR-21 (SEQ ID NO: 1).
22. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де модифікований олігонуклеотид складається з 15-25 зв'язаних нуклеозидів.
- 45 23. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де модифікований олігонуклеотид складається з 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 або 22 зв'язаних нуклеозидів.
24. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де модифікований олігонуклеотид містить щонайменше один модифікований нуклеозид.
25. Застосування за п. 24, де модифікований нуклеозид вибирають із S-cEt-нуклеозиду, 2'-O-метоксіетилнуклеозиду і LNA-нуклеозиду.
- 50 26. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де модифікований олігонуклеотид містить щонайменше один модифікований міжнуклеозидний зв'язок.
27. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де кожний міжнуклеозидний зв'язок модифікованого олігонуклеотиду являє собою модифікований міжнуклеозидний зв'язок.
- 55 28. Застосування за п. 26 або п. 27, де модифікований міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.
29. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де модифікований олігонуклеотид має структуру 5'-A_EC_sATC_sAGTC_sTGAU_sAAGC_sTA_E-3', де нуклеозиди без подальшого нижнього індексу означають β -D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди з подальшим нижнім індексом "E" означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди з подальшим нижнім індексом "S" означають S-cEt-
- 60

нуклеозиди; і кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний зв'язок.

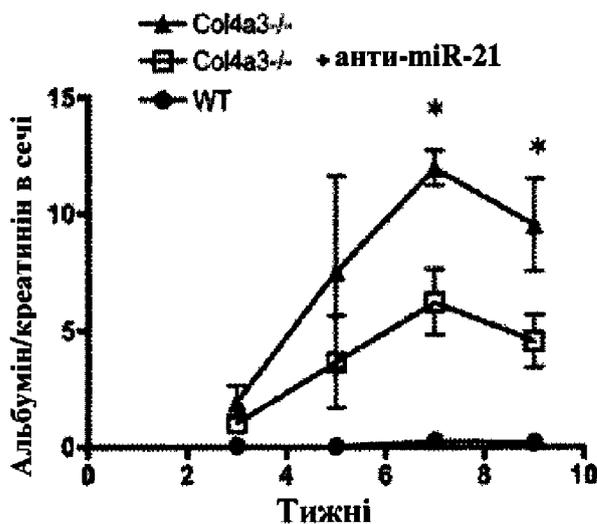
30. Застосування модифікованого олігонуклеотиду структури 5'-
 АЕC_sATC_sAGTC_sTGAU_sAAGC_sTA_E-3' в одержанні лікарського засобу для застосування в способі
 5 лікування синдрому Альпорта, що включає введення суб'єкту, який має синдром Альпорта або з
 підозрою на нього, модифікованого олігонуклеотиду структури 5'-
 АЕC_sATC_sAGTC_sTGAU_sAAGC_sTA_E-3', де нуклеозиди без подальшого нижнього індексу
 10 означають β-D-дезоксирибонуклеозиди; нуклеозиди з подальшим нижнім індексом "E"
 означають 2'-МОЕ-нуклеозиди; нуклеозиди з подальшим індексом "S" означають S-cEt-
 нуклеозиди, і кожний міжнуклеозидний зв'язок являє собою фосфоротіоатний міжнуклеозидний
 зв'язок.

Фігура 1

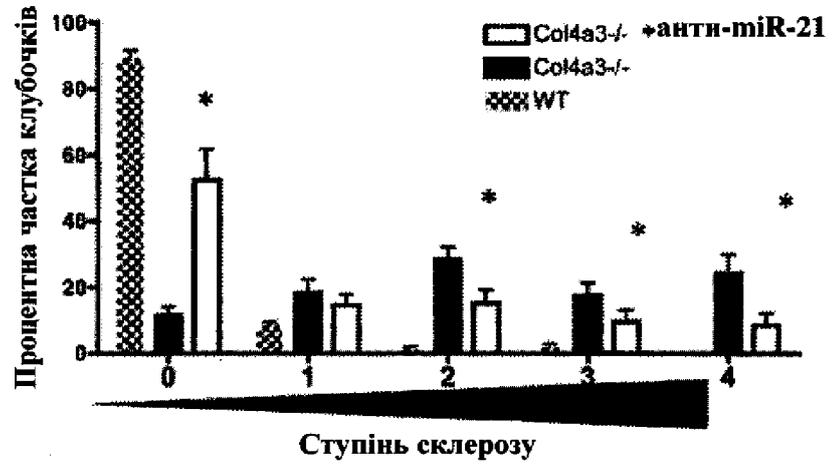
A.



B.

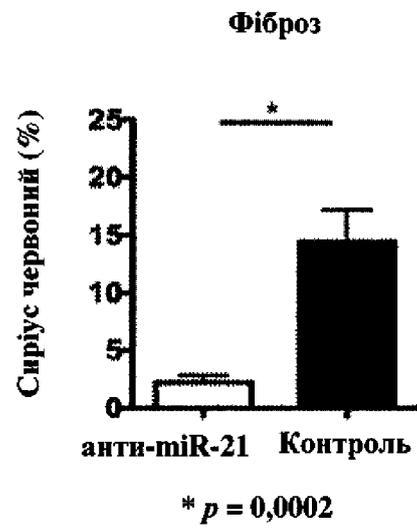


Фігура 2

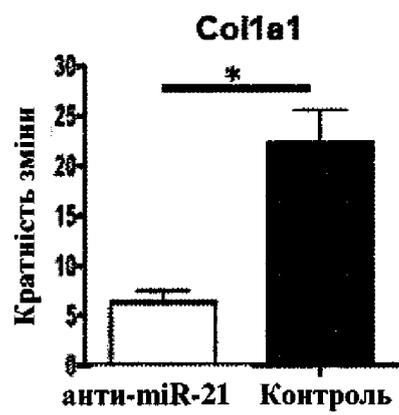


Фігура 3

А.



В.

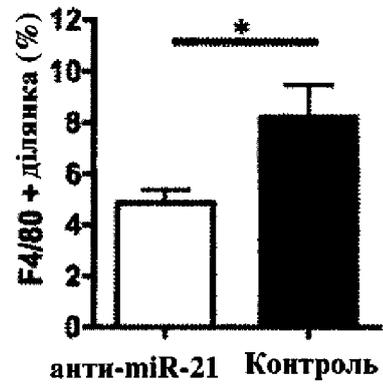


Фігура 4

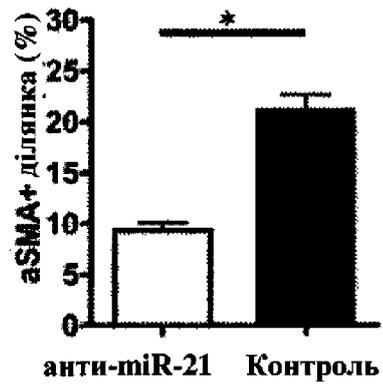


Фігура 5

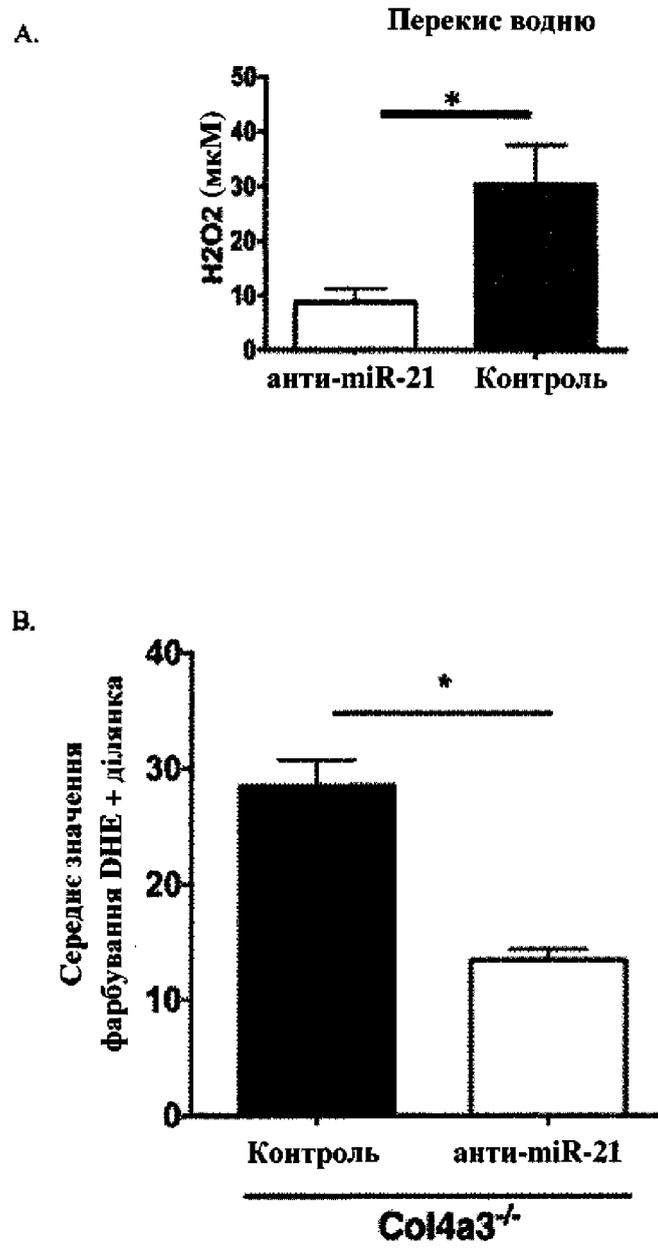
А.



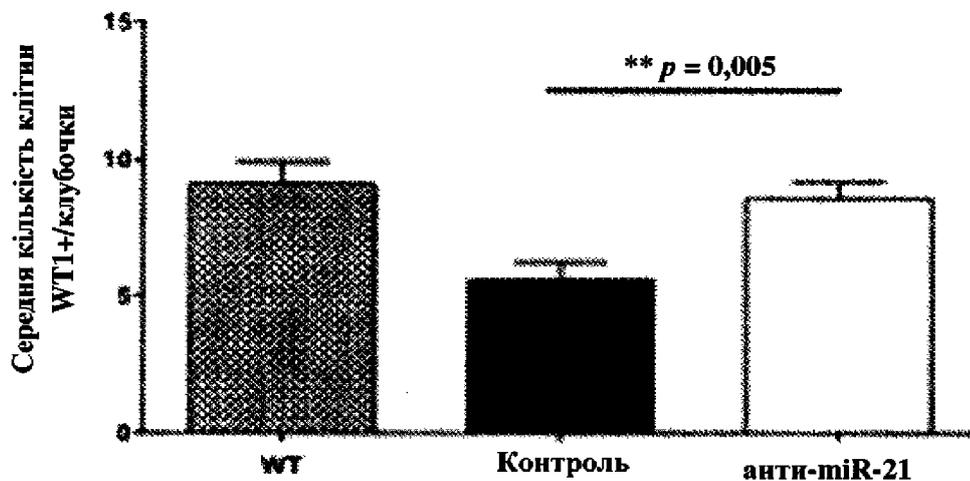
В.



Фігура 6

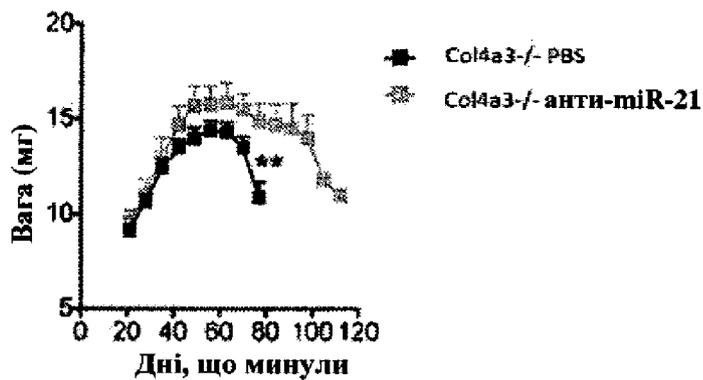


Фігура 7

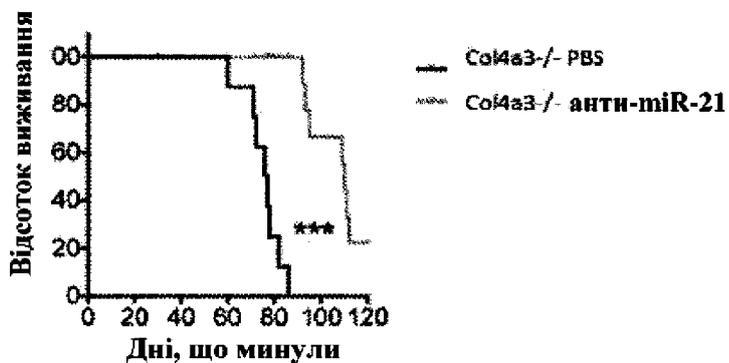


Фігура 8

А.

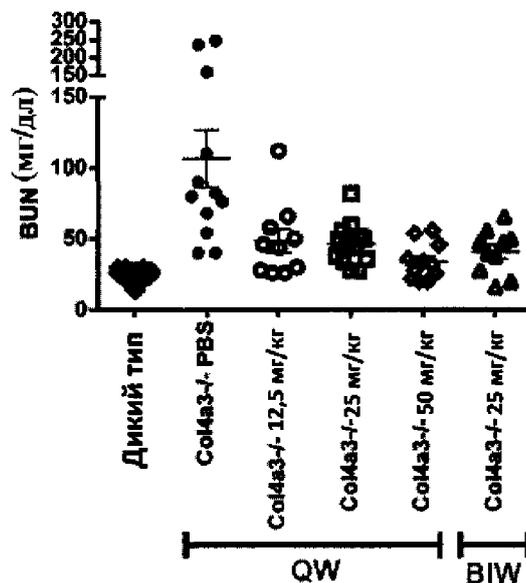


В.

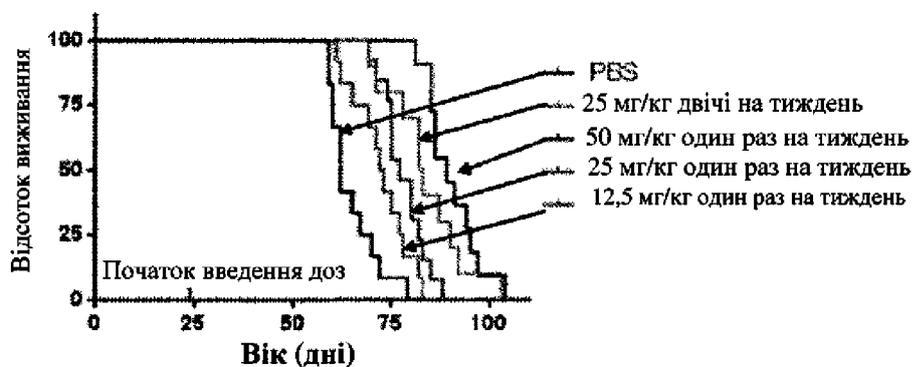


Фігура 9

А.



В.



Комп'ютерна верстка О. Рябо

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601