

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **015570**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2011.10.31

(21) Номер заявки
200870402

(22) Дата подачи заявки
2007.03.30

(51) Int. Cl. **C12N 15/11** (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(31) **РА 2006 00478; 60/788,995; РА 2006 00615; 60/796,813; 60/838,710; РА 2006 01401**

(32) **2006.04.03; 2006.04.03; 2006.05.01; 2006.05.01; 2006.08.18; 2006.10.30**

(33) **DK; US; DK; US; US; DK**

(43) **2009.04.28**

(86) **PCT/DK2007/000168**

(87) **WO 2007/112753 2007.10.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНТАРИС ФАРМА А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Элмен Йоаким (SE), Кирни Фил (AU), Кауппинен Сакарн (DK)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A-2005013901**
WO-A-2004046160
WO-A-2005061710
WEILER O. ET AL.: "Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease". GENE THERAPY, vol. 13, no. 6, March 2006 (2006-03), pages 496-502, XP002395138, ISSN: 0969-7128
BRENNECKE JULIUS ET AL.: "Principles of microRNA-target recognition". PLOS BIOLOGY, vol. 3, no. 3, March 2005 (2005-03), pages E85/0404-E85/0418, XP002395136, ISSN: 1545-7885
JEPSEN JAN STENVANG ET AL.: "Locked nucleic acid: A potent nucleic acid analog in therapeutics and biotechnology". OLIGONUCLEOTIDES, vol. 14, no. 2, 2004, pages 130-146, XP002395137, ISSN: 1545-4576
WO-A-2006069584

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим короткие одноцепочечные олигонуклеотиды длиной 8-26 нуклеотидов, комплементарных человеческим микроРНК, выбранным из группы, состоящей из miR-19b, miR-21, miR-122a, miR-155 и miR-375. Короткие олигонуклеотиды особенно эффективно способствуют подавлению микроРНК in vivo. Было обнаружено, что включение высокоаффинных нуклеотидных аналогов в олигонуклеотиды приводит к образованию высокоэффективных молекул, которые подавляют микроРНК и, очевидно, действуют посредством образования почти необратимых дуплексов с микроРНК-мишенью, но не посредством механизмов на основе расщепления РНК, таких как механизмы, ассоциированные с действием РНКазы Н или RISC.

B1**015570****015570****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим LNA-содержащие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные ингибировать вызывающие заболевания микроРНК, в частности человеческие микроРНК miR-19b, miR-21, miR-122a, miR-155 и miR-375.

Предшествующий уровень техники

МикроРНК - новые регуляторы экспрессии генов.

МикроРНК (миРНК) принадлежат к широкому классу коротких эндогенных РНК, которые действуют как посттранскрипционные регуляторы экспрессии генов посредством спаривания оснований с основаниями их мРНК-мишеней. Зрелые миРНК последовательно процессируются из более длинных шпилечных транскриптов под действием рибонуклеаз РНКазы III Drosha (Lee et al., 2003) и Dicer (Hutvagner et al., 2001, Ketting et al., 2001). На октябрь 2005 г. в базе данных микроРНК, miRBase, версия 7.1, имеется более чем 3400 миРНК позвоночных, беспозвоночных и растений (Griffith-Jones 2004, Griffith-Jones et al., 2006), а также были идентифицированы многие миРНК, соответствующие предполагаемым генам.

У большинства животных миРНК распознают свои сайты-мишени, локализованные в 3'-UTR, посредством неполного спаривания оснований, что приводит к подавлению трансляции генов-мишеней (Bartel, 2004). Более широкомасштабные исследования показали, что миРНК животных играют фундаментальную биологическую роль в росте и апоптозе клеток (Brennecke et al., 2003), в дифференцировке гемопоэтических клеток (Chen et al., 2004), в регуляции продолжительности жизни клеток (Boehm and Slack, 2005), в дифференцировке фоторецепторов (Li and Carthew, 2005), в регуляции генов гомеобокса (Yekta et al., 2004, Hornstein et al., 2005), в формировании асимметрии нейронов (Johnston et al., 2004), в секреции инсулина (Poy et al., 2004), в морфогенезе головного мозга (Giraldez et al., 2005), в пролиферации и дифференцировке мышечных клеток (Chen, Mandel et al., 2005, Kwon et al., 2005, Sokol and Ambros, 2005), в кардиогенезе (Zhao et al., 2005) и в позднем эмбриональном развитии позвоночных (Wienholds et al., 2005).

МикроРНК, участвующие в развитии заболеваний человека.

миРНК участвуют в развитии человеческих заболеваний широкого ряда. Одним из таких заболеваний является мышечная атрофия спинного мозга (SMA), нейродегенеративные заболевания у детей, вызываемые снижением уровней белка или мутацией, что обусловлено потерей функции гена, ответственного за выживание двигательных нейронов (SMN) (Paushkin et al., 2002). Недавно было обнаружено, что мутация в сайте-мишени miR-189 человеческого гена SLITRK1 ассоциируется с развитием синдрома Туретта (Abelson et al., 2005), хотя в других недавно проведенных исследованиях сообщалось, что РНК-содержащий геном вируса гепатита С взаимодействует с микроРНК клетки-хозяина, т.е. с печень-специфической miR-122a, и, тем самым, облегчает ее репликацию в хозяине (Jopling et al., 2005). Другим заболеванием, в развитии которого участвуют миРНК или которое вызвано механизмами их процессинга, является умственная отсталость, ассоциированная с синдромом ломкой X-хромосомы (FXMR) и вызываемая отсутствием белка, ответственного за развитие указанного синдрома ломкой X-хромосомы, приводящего к снижению продолжительности жизни (FMRP) (Nelson et al., 2003, Jin et al. 2004), и синдрома Ди Георга (Landthaler et al., 2004).

Кроме того, сообщалось, что при многих раковых заболеваниях человека наблюдалось нарушение профилей экспрессии миРНК. Так, например, в большинстве случаев хронического В-клеточного лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) человеческие гены миРНК miR-15a и miR-16-1 подвергаются делеции или ингибированию, и недавно было показано, что уникальная "сигнатура" из 13 генов миРНК может быть использована для прогноза и прогрессирования заболевания (Calin et al., 2002, Calin et al. 2005). Роль миРНК в развитии рака подтверждается тем фактом, что более 50% человеческих генов миРНК расположено в ассоциированных с раком геномных областях или в "ломких" сайтах (Calin et al., 2004). Недавно проведенный анализ системной экспрессии у людей с различными злокачественными заболеваниями показал, что в опухолях, по сравнению с нормальными тканями, происходит общее ингибирование миРНК (Lu et al., 2005). Интересно отметить, что классификация низкодифференцированных опухолей на основе миРНК была проведена успешно, тогда как в тех же самых образцах профили миРНК оказались в высокой степени неточными. Было также обнаружено, что нарушение регуляции миРНК происходит при раке молочной железы (Iorio et al., 2005), раке легких (Johnson et al., 2005) и раке толстой кишки (Michael et al., 2004), и сообщалось, что кластер miR-17-92, который амплифицируется в человеческих В-клеточных лимфомах, а также miR-155, который активируется в лимфоме Беркитта, являются главными человеческими миРНК-онкогенами (Eis et al., 2005, He et al., 2005). Таким образом, в будущем человеческие миРНК могут быть с успехом использованы не только в качестве биомаркеров для диагностики рака, но также, как уже обсуждается в последнее время, в качестве привлекательных мишеней для лечения заболеваний с применением олигонуклеотидной технологии.

Ингибирование микроРНК с использованием одноцепочечных олигонуклеотидов.

Для ингибирования микроРНК было описано несколько способов с применением олигонуклеотидной технологии.

В WO 03/029459 (Tuschl) заявлены олигонуклеотиды, кодирующие микроРНК и их комплементы длиной в 18-25 нуклеотидов, которые могут включать нуклеотидные аналоги. Было также высказано предположение, что возможным нуклеотидным аналогом является LNA, хотя в данной заявке LNA-содержащие олигонуклеотиды не описаны. В заявке Tuschl указывается, что олигонуклеотиды микроРНК могут быть использованы в терапии.

В заявке US2005/0182005 описан 24-мерный олигорибонуклеотид 2'-ОМЕ-РНК, комплементарный самой длинной форме miR-21, который, как было обнаружено, снижает уровень miR-21-индуцированной репрессии, тогда как эквивалентный ДНК-содержащий олигонуклеотид не обладает такой функцией. Термин "2'-ОМЕ-РНК" означает аналог РНК, где во 2-положении имеется замещение метилом (2'-О-метил).

Заявка US2005/0227934 (Tuschl) относится к miR-ингибирующим молекулам (antimir), содержащим до 50% остатков ДНК. Также сообщалось, что 2'-ОМЕ-РНК, содержащие молекулы antimir, могут быть использованы для подавления микроРНК поджелудочной железы, однако фактические структуры этих олигонуклеотидов не описаны.

В US200/50261218 (ISIS) заявлено олигомерное соединение, включающее первую область и вторую область, где по меньшей мере одна область содержит модификацию, а часть олигомерного соединения нацелена на небольшую некодирующую нуклеиновую кислоту, являющуюся РНК-мишенью, где указанный небольшой некодирующей нуклеиновой кислотой, которая представляет собой РНК-мишень, является микроРНК. Были также заявлены олигомерные соединения, имеющие длину 17-25 нуклеотидов. Примеры относятся, главным образом, к 2'-ОМЕ-PS-соединениям, 21-мерам, 20-мерам и к 2'-ОМЕ-гэп-мерным олигонуклеотидам, нацеленным на ряд пре-микроРНК и зрелых микроРНК-мишеней.

В работе Boutla et al., 2003 (Nucleic Acids Research, 31: 4973-4980) описано использование антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов, комплементарных 11 различным микроРНК у дрозофил (*Drosophila*), а также их использование для инактивации микроРНК путем введения ДНК-олигонуклеотидов в эмбрионы мух. Из 11 антисмысловых ДНК-олигонуклеотидов лишь 4 конструкции вызвали значительное подавление нормального развития, а остальные 7 олигонуклеотидов не давали какого-либо изменения фенотипа, что, вероятно, обусловлено их неспособностью ингибировать рассматриваемую микроРНК.

Hutvagner et al. (2004) и Leaman et al. (2005) был описан альтернативный метод, в котором антисмысловые 2'-О-метил-олигонуклеотиды, комплементарные зрелой микроРНК, могут быть использованы в качестве сильнодействующих и необратимых ингибиторов функций короткой интерферирующей РНК (кРНК) и микроРНК *in vitro* и *in vivo* у *Drosophila* и *C.elegans* и, следовательно, в качестве индукторов фенотипа, характеризующихся отсутствием таких функций. Недостатком такого метода является необходимость проведения экспериментов по трансфекции и инъекции высоких концентраций 2'-О-метил-олигонуклеотидов (100 мкмоль), которые могут быть токсичными для животного. Этот метод был недавно применен в исследованиях на мышах и включает конъюгирование антисмысловых 2'-О-метил-олигонуклеотидов, комплементарных четырем различным микроРНК, с холестерином для сайленсинга РНК *in vivo* (Krützfeldt et al., 2005). Эти так называемые антагонисты miR (antagomir) были введены мышам путем внутривенных инъекций. Хотя такие эксперименты приводили к эффективному сайленсингу эндогенных микроРНК *in vivo*, который, как было обнаружено, был специфическим, эффективным и продолжительным, однако главным недостатком такого метода является то, что для эффективного сайленсинга необходимо вводить высокую дозу (80 мг/кг) 2'-ОМЕ-antagomir.

Ингибирование микроРНК с использованием LNA-модифицированных олигонуклеотидов было описано в работах Chan et al. Cancer Research, 2005, 65 (14), 6029-6033, Lecellier et al. Science, 2005, 308, 557-560, Naguibneva et al. Nature Cell Biology, 2006, 8 (3), 278-84 и Ørum et al. Gene 2006 (доступных онлайн с 24 февраля 2006 г.). Во всех случаях LNA-модифицированные олигонуклеотиды-антагонисты miR были комплементарны полноразмерной зрелой микроРНК, т.е. имели длину в 20-23 нуклеотида, что препятствовало эффективному поглощению этих молекул *in vivo* и их широкому биологическому распределению.

В работе Naguibneva (Naguibneva et al. Nature Cell Biology, 2006, 8) описано использование смешанного антисмыслового олигонуклеотида "ДНК-LNA-ДНК", направленного против miR, для ингибирования функции микроРНК miR-181 *in vitro*, где блок из 8 нуклеотидов LNA расположен в центре молекулы, фланкированной 6 нуклеотидами ДНК у 5'-конца и 9 нуклеотидами ДНК у 3'-конца соответственно. Главным недостатком такой антисмысловой конструкции является ее низкая стабильность *in vivo*, обусловленная низкой резистентностью фланкирующих ДНК-концов к нуклеазе.

В своих исследованиях Chan et al. (Chan et al. Cancer Research, 2005, 65 (14), 6029-6033) и Ørum et al. (Ørum et al. Gene, 2006) (доступных онлайн с 24 февраля 2006 г.) не описывают конструирования LNA-модифицированных молекул-антагонистов miR, а Lecellier et al. (Lecellier et al. Science, 2005, 308, 557-560) описывают использование гэп-мерного антисмыслового LNA-ДНК-LNA-олигонуклеотида, являющегося антагонистом miR, в целях ингибирования функций микроРНК, где в указанном олигонуклеотиде

блок из 4 LNA-нуклеотидов расположен у 5'- и 3'-конца соответственно, при этом в центре данной молекулы имеется "окно" из 13 ДНК-нуклеотидов. Главными недостатками такой антисмысловой конструкции являются низкий уровень поглощения *in vivo*, а также низкая стабильность *in vivo*, обусловленные присутствием в указанном олигонуклеотиде-антагонисте *mir* ДНК-фрагмента из 13 нуклеотидов.

Таким образом, необходимость в повышении способности олигонуклеотидов ингибировать микроРНК остается актуальной.

Описание сущности изобретения

Настоящее изобретение основано на обнаружении того факта, что использование коротких олигонуклеотидов, сконструированных для высокоаффинного связывания с микроРНК-мишенями, является в высокой степени эффективным для ослабления репрессии микроРНК под действием микроРНК *in vivo*.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, следует лишь отметить, что высокоэффективное нацеливание на микроРНК *in vivo* может быть осуществлено путем конструирования олигонуклеотидов для получения в высокой степени стабильного дуплекса с микроРНК-мишенью *in vivo*. Это может быть достигнуто с использованием высокоаффинных нуклеотидных аналогов, таких как по меньшей мере один из LNA-остатков, и других подходящих высокоаффинных аналогов нуклеотидных аналогов, таких как, LNA, 2'-МОе-РНК, состоящие из 2'-фтор-нуклеотидных аналогов, короче, таких как олигонуклеотиды, состоящие из 10-17 или 10-16 нуклеотидных оснований. В одном из аспектов целью изобретения является получение олигонуклеотида, имеющего длину, недостаточную для образования микроРНК-комплекса (т.е. короткого олигонуклеотида), и содержащего достаточное количество высокоаффинных нуклеотидных аналогов, благодаря которым такой олигонуклеотид почти всегда связывается со своей микроРНК-мишенью, что приводит к эффективному образованию стабильного и нефункционального дуплекса с микроРНК-мишенью. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что такие конструкции являются значительно более эффективными, чем известные олигонуклеотиды, а в частности гзп-мерные и блок-мерные конструкции, и олигонуклеотиды, имеющие длинную последовательность, например 20-23-меры. Термин "2'-фтор-ДНК" означает аналог ДНК, в котором во 2'-положении имеется замещение фтора (2'F).

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей олигонуклеотид, имеющий длину 8-17, например 10-17, а именно 8-16 или 10-16 нуклеотидных остатков, фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или адъювант, где по меньшей мере одно из нуклеотидных остатков одноцепочечного олигонуклеотида представляет собой высокоаффинный нуклеотидный аналог, такой как остаток нуклеотидного основания блокированной нуклеиновой кислоты (LNA), и где указанный одноцепочечный олигонуклеотид комплементарен человеческой последовательности микроРНК, выбранной из группы, состоящей из человеческих микро-РНК miR-19b, miR-21, miR-122a, miR-155 и miR-375.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей олигонуклеотид, имеющий длину в 10-26 нуклеотидов, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или адъювант, где указанный олигонуклеотид содержит коровую ДНК-последовательность в положениях 2-7 или от положений 3-8, если считать от 3'-конца, 3'-acgttt-5' (SEQ ID NO: 6, 5'-tttgca-3'), где по меньшей мере один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, ДНК-остатка в указанной последовательности были замещены соответствующими нуклеотидами LNA и где, но необязательно, указанный олигонуклеотид не содержит область из более чем 7 смежных остатков ДНК.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей олигонуклеотид, имеющий длину в 10-26 нуклеотидов, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или адъювант, где указанный олигонуклеотид содержит коровую ДНК-последовательность в положениях 2-7 или от положений 3-8, если считать от 3'-конца, 3'-ctcaca-5' (SEQ ID NO: 7, 5'-acactc-3'), где по меньшей мере один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, ДНК-остатка в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA и где указанный олигонуклеотид, но необязательно, не содержит область из более чем 7 смежных остатков ДНК.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей олигонуклеотид, имеющий длину в 10-26 нуклеотидов, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или адъювант, где указанный олигонуклеотид содержит коровую ДНК-последовательность в положениях 2-7 или от положений 3-8, если считать от 3'-конца, 3'-ttacga-5' (SEQ ID NO: 8, 5'-agcatt-3'), где по меньшей мере один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, ДНК-остатка в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA и где, но необязательно, указанный олигонуклеотид не содержит область из более чем 7 смежных остатков ДНК.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей одноцепочечный олигонуклеотид, имеющий длину в 10-26 нуклеотидов, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или адъювант, где указанный олигонуклеотид содержит коровую ДНК-последовательность в положениях 2-7 или от положений 3-8, если считать от 3'-конца, 3'-acaagc-5' (SEQ ID NO: 9, 5'-cgaaca-3'), где по меньшей мере один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, ДНК-остатка в указанной последовательности были заменены соответствующими нуклеотидами LNA и где указанный олигонуклеотид, необязательно, не содержит область из более чем 7 смежных остатков ДНК.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей одноцепочечный олигонуклеотид, имеющий длину в 10-26 нуклеотидов, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или адъювант, где указанный олигонуклеотид содержит коровью ДНК-последовательность в положениях 2-7 или от положений 3-8, если считать от 3'-конца, 3'-sgaata-5' (SEQ ID NO: 10, 5'-ataagc-3'), где по меньшей мере один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, ДНК-остатка в указанной последовательности были замещены соответствующими остатками LNA и где указанный олигонуклеотид, необязательно, не содержит область из более чем 7 смежных остатков ДНК.

Высокоаффинными нуклеотидными аналогами являются нуклеотидные аналоги, образующие олигонуклеотид, который, в случае если он образует дуплекс с комплементарным нуклеотидом РНК, имеет более высокую термостабильность, чем в случае его аффинного связывания с эквивалентным нуклеотидом ДНК. Такое свойство обычно определяют путем измерения T_m .

Авторы настоящего изобретения при использовании указанных коротких высокоаффинных олигонуклеотидов, направленных против специфичных миРНК, не обнаружили каких-либо нежелательных эффектов. Действительно, данные, приведенные в настоящем описании, указывают на то, что влияние на экспрессию мРНК обусловлено присутствием последовательности, комплементарной миРНК-мишени (первичной мРНК-мишени), в мРНК или вторичным действием на мРНК, которые регулируются первичными мРНК-мишенями (вторичными мРНК-мишенями). При этом не было обнаружено какого-либо токсического действия, что указывало на отсутствие каких-либо явных негативных побочных эффектов.

Настоящее изобретение также относится к применению олигонуклеотида согласно изобретению, такого как олигонуклеотид, который может образовывать часть фармацевтической композиции, в целях приготовления лекарственного средства для лечения заболевания или патологического расстройства, ассоциированного с присутствием или со сверхэкспрессией (активацией) микроРНК.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания или патологического расстройства, ассоциированного с присутствием или со сверхэкспрессией микроРНК, где указанный способ включает стадию введения композиции (такой как фармацевтическая композиция) согласно изобретению индивидууму, нуждающемуся в таком лечении.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения эффективного количества миРНК в клетке или в организме, включающему введение композиции (такой как фармацевтическая композиция) согласно изобретению или одноцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению в указанную клетку или в указанный микроорганизм. В контексте настоящего описания снижение эффективного количества означает снижение количества функциональной миРНК, присутствующей в данной клетке или в данном организме. При этом следует отметить, что предпочтительные олигонуклеотиды согласно изобретению не всегда могут значительно снижать фактическое количество миРНК, присутствующей в клетке или в организме, поскольку они обычно образуют в высокой степени стабильные дуплексы со своими миРНК-мишенями.

Настоящее изобретение также относится к способу дерепрессии мРНК-мишени для миРНК в клетке или организме, включающему введение композиции (такой как фармацевтическая композиция) или одноцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению в клетку или организм.

Настоящее изобретение также относится к использованию одноцепочечного олигонуклеотида длиной в 8-16, например 10-16, нуклеотидных оснований в целях приготовления лекарственного препарата для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с присутствием или со сверхэкспрессией микроРНК.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания или патологического расстройства, ассоциированного с присутствием или со сверхэкспрессией микроРНК, где указанный способ включает введение композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей одноцепочечный олигонуклеотид длиной 8-16, например 10-16, нуклеотидных оснований индивидууму, нуждающемуся в таком лечении.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения эффективного количества миРНК-мишени (т.е. количества миРНК, которое является достаточным для ингибирования мРНК-мишеней) в клетке или в организме, где указанный способ включает введение композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей одноцепочечный олигонуклеотид длиной в 8-16, например 10-16, нуклеотидных оснований в клетку или организм.

Настоящее изобретение также относится к способу дерепрессии мРНК-мишени для миРНК в клетке или организме, включающему введение одноцепочечного олигонуклеотида длиной в 8-16, например 10-16, нуклеотидных оснований (или композиции, содержащей указанный олигонуклеотид) в клетку или в организм.

Настоящее изобретение также относится к способу синтеза одноцепочечного олигонуклеотида, направленного против человеческой микроРНК, выбранной из группы, состоящей из человеческих микроРНК miR-19b, miR-21, miR-122a, miR-155 и miR-375, такого как описанный здесь одноцепочечный олигонуклеотид, где указанный способ включает стадии:

- a) необязательного выбора первого, считая с 3'-конца, нуклеотидного основания, которое представляет собой нуклеотидный аналог, такой как нуклеотидное основание LNA;
- b) необязательного выбора второго, считая с 3'-конца, нуклеотидного основания, которое представляет собой нуклеотидный аналог, такой как нуклеотидное основание LNA;
- c) выбора области одноцепочечного олигонуклеотида, которая соответствует уникальной области (seed-области) миРНК, где указанная область определена в настоящем изобретении;
- d) необязательного выбора 7- и 8-го нуклеотидного основания, определенного в настоящем изобретении;
- e) необязательного выбора 1-10 дополнительных нуклеотидных оснований, которые могут быть выбраны из группы, состоящей из нуклеотидов (x) и нуклеотидных аналогов (X), таких как LNA;
- f) необязательного выбора 5'-области одноцепочечного олигонуклеотида, определенного в настоящем изобретении;
- g) необязательного выбора 5'-концевого одноцепочечного олигонуклеотида, определенного в настоящем изобретении.

Если указанный синтез осуществляют путем последовательного присоединения областей, определенных в стадиях a)-g), то этот синтез может быть проведен либо в направлении 3'-5' (a-g), либо в направлении 5'-3' (g-a), где указанный одноцепочечный олигонуклеотид комплементарен последовательности миРНК-мишени.

В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид согласно изобретению конструируют так, чтобы он не подвергался связыванию под действием RISC или не мог опосредовать RISC-направленное расщепление миРНК-мишени. При этом считается, что при использовании длинных олигонуклеотидов, например 21- или 22-меров, в частности РНК-олигонуклеотидов или РНК-олигонуклеотидов-"аналогов", которые комплементарны миРНК-мишени, указанный олигонуклеотид может конкурировать с мРНК-мишенью за связывание с RISC-комплексом и тем самым ослаблять репрессию мРНК, являющейся мишенью для миРНК, посредством включения олигонуклеотида, который конкурирует как субстрат за связывание с миРНК.

Однако настоящее изобретение было разработано для предупреждения такого нежелательного расщепления мРНК-мишени или ингибирования ее трансляции путем создания олигонуклеотидов, способных к комплементарному, а в некоторых случаях, вероятно, почти к необратимому их связыванию со зрелой микроРНК. Это, очевидно, приводит к запуску механизма защиты от деградации или расщепления (например, под действием RISC или РНКазы Н или других эндо- или экзонуклеаз), и такой запуск не может приводить к значительному или даже значимому снижению уровней миРНК в клетке (например, как было определено с помощью нозерн-блот-анализа, проводимого с использованием LNA-зондов), но гарантирует значительное снижение эффективного количества миРНК, как было определено в анализе на дерепрессию. Поэтому в одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, которые были специально сконструированы так, чтобы они были несовместимы с RISC-комплексом и чтобы миРНК можно было удалять путем титрования олигонуклеотидом. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, объясняющей причину такой эффективности олигонуклеотидов согласно изобретению, можно лишь отметить, что если провести аналогию с РНК-олигонуклеотидами (или полноразмерными 2'ОМе-олигонуклеотидами), то становится очевидным, что олигонуклеотиды согласно изобретению действуют по механизму неконкурентного ингибирования функции миРНК, поскольку они эффективно удаляют имеющуюся миРНК из цитоплазмы, тогда как известные олигонуклеотиды являются альтернативными субстратами для миРНК, которые могут действовать как конкурентные ингибиторы, эффективность которых должна в высокой степени зависеть от концентрации олигонуклеотида в цитоплазме, а также от концентрации мРНК- и миРНК-мишени.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, следует отметить, что еще одной проблемой, которая может возникать в случае использования олигонуклеотидов, имеющих длину, приблизительно аналогичную длине миРНК-мишеней (т.е. миРНК), является то, что эти олигонуклеотиды могут образовывать кРНК-подобный дуплекс с миРНК-мишенью, а это приводит к снижению эффективности олигонуклеотида. Возможно также, что сами олигонуклеотиды могут быть использованы в качестве ведущей цепи в RISC-комплексе, в результате чего возникает возможность осуществления RISC-направленной деградации неспецифических мишеней, которые чисто случайно могут быть достаточно комплементарными "ведущему" олигонуклеотиду.

Эти проблемы можно решить путем выбора коротких олигонуклеотидов для нацеливания на последовательности миРНК.

Короткие олигонуклеотиды, которые включают LNA, известны специалистам, работающим с такими реагентами, как LNA (см., например, WO 2005/098029 и WO 2006/069584). Однако молекулы, предназначенные для их использования в целях диагностики или в качестве реагентов, по своей конструкции значительно отличаются от олигонуклеотидов, используемых в фармацевтических целях. Так, например, концевыми нуклеотидными основаниями этих олигонуклеотидных реагентов обычно являются ДНК, а не LNA, а межнуклеозидными связями обычно являются другие, нефосфортиоатные связи, т.е. связи, которые не являются предпочтительными для использования в олигонуклеотидах согласно изобретению. Поэтому настоящее изобретение, по существу, относится к новому классу олигонуклеотидов.

Настоящее изобретение также относится к (одноцепочечному) олигонуклеотиду, описанному в разделе, посвященном фармацевтической композиции согласно изобретению, где указанный олигонуклеотид включает:

- (i) по меньшей мере одну фосфортиоатную связь, и/или
- (ii) по меньшей мере один 3'-концевой остаток LNA, и/или
- (iii) по меньшей мере один 5'-концевой остаток LNA.

Для большинства терапевтических применений предпочтительно, чтобы олигонуклеотид был полностью фосфортиолирован, за исключением терапевтических олигонуклеотидов, применяемых для лечения заболеваний ЦНС, таких как заболевания головного мозга или позвоночника, где такое фосфортиолирование может быть токсичным, что обусловлено отсутствием нуклеаз, при этом фосфордиэфирные связи могут быть использованы даже между смежными ДНК-остатками. Как указывается в настоящем изобретении, в соответствии с другими предпочтительными аспектами изобретения олигонуклеотидом согласно изобретению является олигонуклеотид, в котором второе нуклеотидное основание и/или 9- и 10-е нуклеотидные основания (от 3'-конца) могут также представлять собой LNA.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что могут быть также применены и другие методы предотвращения расщепления РНК (такого как деградация под действием экзонуклеаз в сыворотке крови или RISC-ассоциированное расщепление олигонуклеотида согласно изобретению), а поэтому настоящее изобретение также относится к одноцепочечному олигонуклеотиду, который содержит:

- a) остаток LNA в положении 1 и 2 от 3'-конца; и/или
- b) остаток LNA в положениях 9 и/или 10, также считая от 3'-конца; и/или
- c) любой один или два остатка 5'-LNA.

Хотя преимущества указанных других аспектов можно продемонстрировать на примере более длинных олигонуклеотидов, таких как нуклеотиды длиной до 26 нуклеотидных оснований, однако, принимая во внимание указанные отличительные признаки, можно также использовать и более короткие олигонуклеотиды, описанные в настоящем изобретении, такие как олигонуклеотиды, имеющие 8-17, 8-16, 10-17 или 10-16 нуклеотидных оснований. Особенно предпочтительно, чтобы олигонуклеотиды содержали высокоаффинные нуклеотидные аналоги, такие как аналоги, описанные в настоящем изобретении, а наиболее предпочтительно остатки LNA.

Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что правильно сконструированные одноцепочечные олигонуклеотиды, содержащие остатки блокированной нуклеиновой кислоты (LNA) в определенном порядке, играют важную роль в сайленсинге микроРНК, что приводит к снижению уровней микроРНК. Было обнаружено, что важное значение имеет жесткое связывание указанных олигонуклеотидов с так называемой уникальной (seed) последовательностью микроРНК-мишеней в положении нуклеотидов 2-8 или 2-7 от 5'-конца. Нуклеотид 1 микроРНК-мишеней представляет собой неспаривающееся основание и, по всей вероятности, скрытое в связывающем кармане белка Ago 2. Не высказывая какой-либо конкретной теории, авторы настоящего изобретения лишь отмечают, что посредством отбора последовательностей уникальной области, в частности области, включающей олигонуклеотиды, содержащие LNA, а предпочтительно остатки LNA в области, комплементарной уникальной области, т.е. где дуплекс, образованный между микроРНК и олигонуклеотидом, является особенно эффективным для нацеливания на микроРНК, можно избежать возникновения побочных эффектов и сообщать олигонуклеотиду другое отличительное свойство, которое позволяло бы предотвращать RISC-направленное действие на микроРНК.

Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что сайленсинг микроРНК может оказаться даже еще более сильным в том случае, если LNA-модифицированные одноцепочечные олигонуклеотиды не содержат нуклеотида у 3'-конца, соответствующего данному неспаренному нуклеотиду 1. Было также обнаружено, что два остатка LNA у 3'-конца олигонуклеотидов согласно изобретению придают указанным олигонуклеотидам высокий уровень резистентности к нуклеазе.

Было также обнаружено, что олигонуклеотиды согласно изобретению, которые имеют по меньшей мере один нуклеотидный аналог, такой как нуклеотид LNA в положениях, соответствующих положениям 10 и 11 от 5'-конца микроРНК-мишени, могут предупреждать расщепление олигонуклеотидов согласно изобретению.

В соответствии с этим в одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду, имеющему длину от 12 до 26 нуклеотидов, где:

i) первый нуклеотид, от 3'-конца, представляет собой остаток блокированной нуклеиновой кислоты (LNA);

ii) второй нуклеотид, от 3'-конца, представляет собой остаток LNA;

iii) девятый и/или десятый нуклеотиды, от 3'-конца, представляют собой остаток LNA.

Настоящее изобретение также относится к определенным здесь олигонуклеотидам, которые могут быть использованы в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим определенные здесь олигонуклеотиды и фармацевтически приемлемый носитель.

Как упоминалось выше, микроРНК ассоциируются с развитием ряда заболеваний. Следовательно, в своем четвертом аспекте настоящее изобретение относится к применению определенного здесь олигонуклеотида в целях получения лекарственного средства для лечения заболеваний, ассоциированных с экспрессией микроРНК и выбранных из группы, состоящей из атрофии мышц позвоночника, синдрома Туретта, заболевания, вызываемого вирусом гепатита С, умственной отсталости, т.е. синдрома "ломкой" X-хромосомы, синдрома Ди Георга и рака, такого как хронический лимфоцитарный лейкоз, рак молочной железы, рак легких и рак толстой кишки.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения уровней микроРНК-мишени, который включает контактирование микроРНК-мишени с определенным здесь олигонуклеотидом, где указанный олигонуклеотид:

1) является комплементарным микроРНК-мишени;

2) не содержит нуклеотида у 3'-конца, соответствующего первому нуклеотиду у 5'-конца микроРНК-мишени.

Настоящее изобретение также относится к олигонуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89; где строчные буквы обозначают азотистые основания остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистые основания остатка LNA и где цитозины LNA являются, но необязательно, метилированными, или к его конъюгату.

Настоящее изобретение также относится к олигонуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 101; где строчные буквы обозначают азотистые основания остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистые основания остатка LNA и где цитозины LNA являются, но необязательно, метилированными, или к его конъюгату.

Настоящее изобретение также относится к олигонуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 и SEQ ID NO: 105; где строчные буквы обозначают азотистые основания остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистые основания остатка LNA и где цитозины LNA являются, но необязательно, метилированными, или к его конъюгату.

Настоящее изобретение также относится к олигонуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109; где строчные буквы обозначают азотистые основания остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистые основания остатка LNA и где цитозины LNA являются, но необязательно, метилированными, или к его конъюгату.

Настоящее изобретение также относится к олигонуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, где строчные буквы обозначают азотистые основания остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистые основания остатка LNA и где цитозины LNA являются, но необязательно, метилированными, или к его конъюгату.

В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид может иметь нуклеотидную последовательность из 1-17 нуклеотидных оснований, например из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидных оснований, и в таком варианте изобретения олигонуклеотидные основания могут составлять непрерывную подпоследовательность в описанных здесь олигонуклеотидах.

Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что антисмысловые олигонуклеотиды определенной длины, содержащие конкретную коровую ДНК-последовательность и блокированные нуклеиновые кислоты (LNA) в указанной коровой последовательности, обладают превосходными микроРНК-ингибирующими свойствами.

Краткое описание графического материала

Фиг. 1. Влияние обработки различными LNA-олигонуклеотидами, направленными против miR, на экспрессию нуклеиновой кислоты-мишени в miR-122a-экспрессирующей клеточной линии HuH-7. Указаны также количества miR-122a (в условных единицах), полученные в результате проведения miR-122a-специфической количественной ОТ-ПЦР, по сравнению с необработанными клетками (контроль). LNA-олигонуклеотиды, направленные против miR, были использованы в двух концентрациях, 1 и 100 нМ соответственно. Был также включен контроль с несоответствиями (SPC3350) по сравнению с SPC3349 (также обозначенный здесь SPC3549).

Фиг. 2. Оценка дозозависимого ингибирования нуклеиновой кислотой LNA против miR-122a, SPC3548 и SPC3549 по сравнению с SPC3372, где указанную оценку проводили *in vivo* в мышинной печени с помощью miR-122a-специфической ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Фиг. 2b. Уровни miR-122 в мышинной печени после обработки различными LNA, направленными против miR (LNA-antimiR). Молекулы LNA-antimiR, SPC3372 и SPC3649, вводили здоровым мышам посредством трех *i.p.*-инъекций через день в течение шести дней в указанных дозах и мышей умерщвляли через 48 ч после введения последней дозы. Полноразмерную РНК экстрагировали из мышинной печени, а уровни miR-122 определяли с помощью miR-122-специфической количественной ПЦР.

Фиг. 3. Оценка уровней холестерина в плазме у мышей, обработанных LNA против miR-122a, по сравнению с уровнями холестерина у контрольных мышей, которым вводили физиологический раствор.

Фиг. 4a. Оценка относительных уровней мРНК Bckdk у мышей, обработанных LNA против miR-122a, по сравнению с уровнями у контрольных мышей, которым вводили физиологический раствор, где указанную оценку проводили с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени.

Фиг. 4b. Оценка относительных уровней мРНК альдолазы А у мышей, обработанных LNA против miR-122a, по сравнению с уровнями у контрольных мышей, которым вводили физиологический раствор, где указанную оценку проводили с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени.

Фиг. 4c. Оценка относительных уровней мРНК GAPDH у мышей, обработанных LNA против miR-122a (животные 4-30), по сравнению с уровнями у контрольных мышей, которым вводили физиологический раствор (животные 1-3), где указанную оценку проводили с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени.

Фиг. 5. Оценка дозозависимого ингибирования miRTM-122a нуклеиновой кислотой LNA, проводимая *in vivo* в мышинной печени с помощью miR-122a-специфической ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Шесть групп животных (5 мышей на группу) обрабатывали следующим образом. Животным группы 1 вводили *i.v.* 0,2 мл физиологического раствора каждый день в течение 3 дней, животным группы 2 вводили 2,5 мг/кг SPC3372, животным группы 3 вводили 6,25 мг/кг SPC3372, животным группы 4 вводили 12,5 мг/кг SPC3372, животным группы 5 вводили 25 мг/кг SPC3372, а животным группы 6 вводили 25 мг/кг SPC3373 (олигонуклеотида LNA против miRTM с несоответствующими основаниями), где каждую инъекцию вводили одним и тем же способом. Этот эксперимент повторяли (n=10) и результаты объединяли.

Фиг. 6. Проводили сравнение нозерн-блотов SPC3649 и SPC3372. Полноразмерную РНК от одной мыши в каждой группе подвергали miR-122-специфическому нозерн-блоттингу. Показаны зрелый miR-122 и дуплекс (блокированной микроРНК), образованный между LNA-antimiR и miR-122.

Фиг. 7. Мышей обрабатывали 25 мг/кг/день LNA-antimiR или физиологическим раствором каждый день в течение трех дней и умерщвляли через 1, 2 или 3 недели после введения последней дозы. Включены также значения, полученные для животных, умерщвленных через 24 ч после введения последней дозы (пример 11, "старая конструкция"). Уровни miR-122 оценивали с помощью количественной ПЦР и нормализовали по среднему значению, полученному для группы мышей, которым вводили физиологический раствор в каждый выбранный момент времени. Включены также значения, полученные для животных, умерщвленных через 24 ч после введения последней дозы (указано среднее и среднеквадратическая ошибка, n=7, 24 ч, n=10). Умерщвление на дни 9, 16 или 23 соответствует умерщвлению через 1, 2 или 3 недели после введения последней дозы.

Фиг. 8. Мышей обрабатывали 25 мг/кг/день LNA-antimiR или физиологическим раствором каждый день в течение трех дней и умерщвляли через 1, 2 или 3 недели после введения последней дозы. Включены также значения, полученные для животных, умерщвленных через 24 ч после введения последней дозы (пример 11, "старая конструкция"). Измеряли уровень холестерина в плазме и нормализовали по значению, полученному для группы мышей, которым вводили физиологический раствор в каждый выбранный момент времени (указано среднее и среднеквадратическая ошибка, n=7, 24 ч, n=10).

Фиг. 9. Дозозависимое индуцирование мРНК, являющейся мишенью для miR-122a, путем ингибирования miR-122a под действием SPC3372. Мышей обрабатывали различными дозами SPC3372 каждый день в течение трех дней, как описано выше, и умерщвляли через 24 ч после введения последней дозы. Полноразмерную РНК, экстрагированную из печени, подвергали количественной ПЦР. Гены, которые имели предсказанный сайт-мишень для miR-122 и активировались, как наблюдалось в анализе, проводимом на микромассах, оценивали с помощью количественной ПЦР на дозозависимое индуцирование путем увеличения доз SPC3372. Полноразмерную РНК печени, взятую от 2-3 мышей на группу, умерщвленных через 24 ч после введения последней дозы, подвергали количественной ПЦР для указанных генов. На фиг. 9 показаны уровни мРНК по сравнению с уровнями мРНК у животных в группе, которой вводили физиологический раствор, $n=2-3$ (2,5-12,5 мг/кг/день: $n=2$, без среднеквадратической ошибки). Показан также контроль с несоответствиями (mm, SPC3373).

Фиг. 10. Временное индуцирование мРНК-мишеней для miR-122a-мишени после обработки молекулой SPC3372. Самок мышей NMRI обрабатывали 25 мг/кг/день SPC3372, а контрольным животным вводили физиологический раствор каждый день в течение трех дней и умерщвляли через 1, 2 или 3 недели после введения последней дозы соответственно. РНК экстрагировали из печени и уровни предсказанных мРНК, которые являются мишенью для miR-122a и которые были отобраны исходя из данных анализа на микромассах, оценивали с помощью количественной ПЦР. Были проанализированы по три животных от каждой группы.

Фиг. 11. Индуцирование Vldlr в печени путем SPC3372-обработки. Те же самые образцы РНК печени, которые были использованы в предыдущем примере (фиг. 10), оценивали на индуцирование Vldlr.

Фиг. 12. Стабильность дуплекса miR-122a/SPC3372 в плазме мышей. Стабильность SPC3372 и дуплекса SPC3372/miR-122a анализировали в плазме мышей при 37°C в течение 96 ч. На фиг. 12 проиллюстрирован электрофорез в ПААГ, окрашенном SYBR-золотом.

Фиг. 13. Секвестрация зрелой miR-122a под действием SPC3372 приводит к образованию дуплекса. На фиг. 13 показана мембрана, зондированная miR-122a-специфическим зондом (верхняя панель) и повторно зондированная Let-7-специфическим зондом (нижняя панель). С использованием miR-122-специфического зонда были детектированы две полосы, где одна полоса соответствовала зрелой miR-122, а другая полоса соответствовала дуплексу, образованному между SPC3372 и miR-122.

Фиг. 14. Секвестрацию miR-122a под действием SPC3372, а также распределение SPC3372 оценивали с помощью *in situ* гибридизации срезов печени. На фигуре представлены криосрезы печени обработанных животных.

Фиг. 15. Экспрессия генов печени у мышей, обработанных LNA против miR-122. Мышей, обработанных физиологическим раствором и LNA-antimiR, сравнивали по профилю экспрессии всего генома с помощью программ типа массивов Affymetrix Mouse Genome 430 2.0.

(a,1) Показан ряд зондов, отображающих дифференциальную экспрессию в образцах печени мышей, обработанных LNA против miR-122 и физиологическим раствором, через 24 ч после обработки.

(b,2) Показано присутствие уникальной последовательности (последовательности-"зерна" или seed-последовательности) miR-122 в дифференциально экспрессируемых генах. На графике указано процентное содержание транскриптов по меньшей мере с одной уникальной последовательностью распознавания miR-122 в их 3'UTR. Рандомизация: были генерированы произвольные последовательности, которые были исследованы на присутствие уникальных последовательностей распознавания miR-122. Представлены профили временной экспрессии генов в печени у мышей, обработанных LNA-antimiR. Мышей обрабатывали 25 мг/кг/день LNA-antimiR, а контрольным животным в течение трех дней вводили физиологический раствор каждый день и через 1, 2 или 3 недели после введения последней дозы умерщвляли. Включены также величины, полученные от животных, умерщвленных через 24 ч после введения последней дозы.

(c,3) РНК-образцы, полученные в различные промежутки времени, также анализировали на профили экспрессии.

Иерархический кластерный анализ профилей экспрессии генов, идентифицированных как дифференциально экспрессируемые гены, проводили у мышей, обработанных LNA против miR, и у мышей, обработанных физиологическим раствором через 24 ч, через одну неделю или через три недели после обработки.

(d,4) Во время всего эксперимента у мышей, обработанных LNA-antimiR, и у мышей, обработанных физиологическим раствором, проводили мониторинг профилей экспрессии генов, идентифицированных как дифференциально экспрессируемые гены. Во время всего эксперимента отношение уровней экспрессии активируемых и ингибируемых генов у мышей, обработанных LNA-antimiR, составляло приблизительно 1, что указывало на обратимый эффект обработки LNA-antimiR.

Фиг. 16. Влияние обработки молекулами SPC3372 и 3595 на уровни miR-122 в мышечной печени.

Фиг. 17. Влияние обработки молекулами SPC3372 и 3595 на уровни альдолазы А в мышечной печени.

Фиг. 18. Влияние обработки молекулами SPC3372 и 3595 на уровни Bckdk в мышечной печени.

Фиг. 19. Влияние обработки молекулами SPC3372 и 3595 на уровни CD320 в мышечной печени.

Фиг. 20. Влияние обработки молекулами SPC3372 и 3595 на уровни Ndr3 в мышечной печени.

Фиг. 21. Влияние длительной обработки молекулой SPC3649 на общий уровень холестерина в плазме у мышей с гиперхолестеринемией и у нормальных мышей. Пробы плазмы крови брали ежедневно у мышей, обработанных молекулой SPC3649, и у контрольных мышей, обработанных физиологическим раствором, а затем проводили оценку общего уровня холестерина в плазме. Мышей обрабатывали 5 мг/кг SPC3649, SPC3744 или физиологического раствора два раза в неделю. Одновременно проводили обработку нормальных мышей.

Фиг. 22. Влияние длительной обработки молекулой SPC3649 на уровни miR-122 у мышей с гиперхолестеринемией и у нормальных мышей.

Фиг. 23. Влияние длительной обработки молекулой SPC3649 на уровни альдолазы А у мышей с гиперхолестеринемией и у нормальных мышей.

Фиг. 24. Влияние длительной обработки молекулой SPC3649 на уровни Bckdk у мышей с гиперхолестеринемией и у нормальных мышей.

Фиг. 25. Влияние длительной обработки молекулой SPC3649 на уровни AST у мышей с гиперхолестеринемией и у нормальных мышей.

Фиг. 26. Влияние длительной обработки молекулой SPC3649 на уровни ALT у мышей с гиперхолестеринемией и у нормальных мышей.

Фиг. 27. Модуляция репликации HCV под действием SPC3649 в клеточной модели HuH-7. Нозерн-блот-анализ РНК HCV в клетках HuH-7 после трансфекции различными молекулами LNA против miR (SPC3648, SPC3649 и SPC3550) и 2'ОМе-молекулами-антагонистами miR-122 (верхняя панель). Интенсивности сигналов гибридизации количественно оценивали и нормализовали по сигналам мРНК спектрина на каждой дорожке (нижняя панель).

Фиг. 28. Функциональная дерепрессия репрессированной люциферазы коралла (Renilla) под действием miR-19b-блокирующих олигонуклеотидов в клеточной линии Hela, эндогенно экспрессирующей miR-19b. "miR-19b-мишень" представляет собой плазмиду, содержащую miR-19b-мишень, но не котрансфицированную олигонуклеотидом, блокирующим miR-19b, а поэтому она представляет miR-19b, которая полностью подавляет экспрессию люциферазы Renilla.

Фиг. 29. Функциональная дерепрессия репрессированной люциферазы коралла (Renilla) под действием miR-122-блокирующих олигонуклеотидов в клеточной линии HuH-7, эндогенно экспрессирующей miR-122. "miR-122-мишень" представляет собой соответствующую плазмиду, содержащую miR-122-мишень, но не котрансфицированную олигонуклеотидом, блокирующим miR-122, а поэтому она представляет miR-122, которая полностью подавляет экспрессию люциферазы Renilla.

Фиг. 30. Диаграмма, иллюстрирующая выравнивание олигонуклеотида согласно изобретению и микроРНК-мишени.

Подробное описание изобретения

Олигонуклеотид согласно изобретению обычно является одноцепочечным. Поэтому следует отметить, что в соответствии с настоящим изобретением термин "олигонуклеотид" может быть синонимом термина "одноцепочечный олигонуклеотид".

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим короткие (одноцепочечные) олигонуклеотиды длиной в 8-17 нуклеотидных оснований, например 10-17 нуклеотидных оснований, комплементарных человеческим микроРНК. Короткие олигонуклеотиды особенно эффективно способствуют подавлению микроРНК *in vivo*. Было обнаружено, что включение высокоаффинных нуклеотидных аналогов в олигонуклеотиды приводит к образованию высокоэффективных молекул, которые подавляют микроРНК и, очевидно, действуют посредством образования почти необратимых дуплексов с микроРНК-мишенью, а не посредством механизмов на основе расщепления РНК, таких как механизмы, ассоциированные с действием РНКазы Н или RISC.

При этом особенно предпочтительно, чтобы одноцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению содержал область из последовательности смежных нуклеотидных оснований, которая на 100% комплементарна человеческой уникальной области микроРНК.

Предпочтительно, чтобы одноцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению был комплементарен зрелой человеческой последовательности микроРНК.

Предпочтительные олигонуклеотиды согласно изобретению комплементарны последовательности микроРНК, выбранной из группы, состоящей из hsa-miR-19b, hsa-miR-21, hsa-miR-122, hsa-miR-142 a7b, hsa-miR-155, hsa-miR-375.

В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид согласно изобретению не содержит нуклеотидного основания у 3'-конца, соответствующего первому 5'-концевому нуклеотиду микроРНК-мишени.

В одном из вариантов изобретения первым нуклеотидным основанием одноцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению, если считать от 3'-конца, является нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA.

В одном из вариантов изобретения вторым нуклеотидным основанием одноцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению, если считать от 3'-конца, является нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA.

В одном из вариантов изобретения нуклеотидная последовательность одноцепочечного олигонуклеотида, которая является комплементарной последовательности уникальной области микроРНК, выбрана из группы, состоящей из (X)Xxxxxx, (X)xXxxxx, (X)xxXxxx, (X)xxxXxx, (X)xxxxXx и (X)xxxxxX, расположенных в направлении 3'-5', где "X" обозначает нуклеотидный аналог, (X) обозначает необязательный нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере два остатка нуклеотидного аналога, такие как по меньшей мере два остатка LNA, в положениях, комплементарных уникальной области миРНК.

В одном из вариантов изобретения нуклеотидная последовательность одноцепочечного олигонуклеотида, которая является комплементарной последовательности уникальной области микроРНК, выбрана из группы, состоящей из (X)XXxxxx, (X)xXXxxx, (X)xxXXxx, (X)xxxXXx, (X)xxxxXx, (X)xXXxxx, (X)xXxXxx, (X)xXxxXx, (X)xXXXXX, (X)xxXXxx, (X)xxXxXx, (X)xxXxxX, (X)xxxxXX, (X)xxxXxX и (X)xxxxXX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, (X) обозначает необязательный нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере три остатка нуклеотидного аналога, такие как по меньшей мере три остатка LNA, в положениях, комплементарных уникальной области миРНК.

В одном из вариантов изобретения нуклеотидная последовательность одноцепочечного олигонуклеотида, которая является комплементарной последовательности уникальной области микроРНК, выбрана из группы, состоящей из (X)XXXxxx, (X)xXXXxx, (X)xxXXXx, (X)xxxXXX, (X)XXxXxx, (X)XXxxXx, (X)XXxxxX, (X)xXxXxx, (X)xXxxXx, (X)xxXXxx, (X)XxXXxx, (X)XXxxXX, (X)XxxxXX, (X)xXxXXx, (X)xXxxXX, (X)xxXxXX, (X)xXxXxX и (X)XxXxXx, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, (X) обозначает необязательный нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере четыре остатка нуклеотидного аналога, такие как по меньшей мере четыре остатка LNA, в положениях, комплементарных уникальной области миРНК.

В одном из вариантов изобретения нуклеотидная последовательность одноцепочечного олигонуклеотида, которая является комплементарной последовательности уникальной области микроРНК, выбрана из группы, состоящей из (X)xxXXX, (X)xXxxxX, (X)xXXxXX, (X)xXXXxX, (X)xxxxXx, (X)XxxXXX, (X)XxXxXX, (X)XxXXxX, (X)XxXXx, (X)XXxxXX, (X)XXxXxX, (X)XXxXXx, (X)XXXxxX, (X)XXXxXx и (X)XXXXxx, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, (X) обозначает необязательный нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере пять остатков нуклеотидного аналога, такие как по меньшей мере пять остатков LNA, в положениях, комплементарных уникальной области миРНК.

В одном из вариантов изобретения нуклеотидная последовательность одноцепочечного олигонуклеотида, которая является комплементарной последовательности уникальной области микроРНК, выбрана из группы, состоящей из (X)xxxxxx, (X)xxxxxx, (X)XXxxxX, (X)XXXxXX, (X)XXXXxX и (X)XXXXXx, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, (X) обозначает необязательный нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает шесть или семь остатков нуклеотидного аналога, такие как шесть или семь остатков LNA, в положениях, комплементарных уникальной области миРНК.

В одном из вариантов изобретения нуклеотидная последовательность одноцепочечного олигонуклеотида, которая является комплементарной последовательности уникальной области микроРНК, выбрана из группы, состоящей из XXXXXX, Xxxxxx, XXxxxx, XXXxxx, XXXxXX, XXXXXx и XXXXXXx, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения мотив из двух нуклеотидных оснований в положениях 7-8, если считать от 3'-конца, одноцепочечного олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из xx, XX, xX и Xx, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения мотив из двух нуклеотидных оснований в положениях 7-8, если считать от 3'-конца, одноцепочечного олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из XX, xX и Xx, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере 12 нуклеотидных оснований, где мотив из двух нуклеотидных оснований в положениях 11-12, если считать от 3'-конца, одноцепочечного олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из xx, XX, xX и Xx, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере 12 нуклеотидных оснований, где мотив из двух нуклеотидных оснований в положениях 11-12, если считать от 3'-конца, одноцепочечного олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из XX, xX и Xx, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере 13 нуклеотидных оснований, где мотив из трех нуклеотидных оснований в положениях 11-13, если считать от 3'-конца, выбран из группы, состоящей из xxx, Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX и XXX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения мотив из трех нуклеотидных оснований в положениях 11-13, если считать от 3'-конца, одноцепочечного олигонуклеотида выбран из группы, состоящей из Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX и XXX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере 14 нуклеотидных оснований, где мотив из четырех нуклеотидных оснований в положениях 11-14, если считать от 3'-конца, выбран из группы, состоящей из xxxx, Hxxx, xHxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, HxxX, xXXx, xXxX, xxXX, XXXx, XxXX, xXXX, XXxX и XXXX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения мотив из четырех нуклеотидных оснований в положениях 11-14 одноцепочечного олигонуклеотида, если считать от 3'-конца, выбран из группы, состоящей из Hxxx, xHxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, HxxX, xXXx, xXxX, xxXX, XXXx, XxXX, xXXX, XXxX и XXXX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает 15 нуклеотидных оснований, где мотив из пяти нуклеотидных оснований в положениях 11-15, если считать от 3'-конца, выбран из группы, состоящей из Hxxxx, xHxxx, xxHxx, xxxXx, xxxxX, XXxxx, XxHxx, HxxXx, HxxxX, xXXxx, xXxXx, xxXXx, xxXxx, xxxXX, XXXxx, XXxxX, HxXXX, xXXXx, xxXXX, XXxXX, HxHxx, HxHxx, HxxXX, HxxXx, HxxxXX, xXXXxx, xXXxXx, xXXxxX, xHxXXx, xXxXxX, xHxxXX, xxXXXx, xxXXxX, xxXxXX, xxxXXX, XXXHxx, XXXxxX, XXxxXX, HxxXXX, xxXXXX, xHxXXX, XxHxXX, HxxXxx, XXXxXx, xXXxXX, HxXXxX, XXxXXx, xXXXxX, HxXXXX, xXXXXX, HxXXXX, XXxXXX, XXXxXX, XXXHxX, XXXHxx и XXXXXX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает 16 нуклеотидных оснований, а мотив из шести нуклеотидных оснований в положениях 11-16, если считать от 3'-конца, выбран из группы, состоящей из Hxxxxx, xHxxxx, xxHxxx, xxxXxx, xxxxXx, HxxxxX, XXxxxx, XxHxxx, HxxXxx, HxxxXx, xXXxxx, xXxXxx, xxXXxx, xxXxxX, xxxXXX, xxxXxx, xxxxXX, XXXxxx, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, HxXXxx, HxHxxX, HxHxxX, HxxXXX, HxxXxx, HxxxXX, HxxxXX, xXXXxx, xXXxXx, xXXxxX, xHxXXx, xXxXxx, xHxxXX, xxXXXx, xxXXxX, xxXxXX, xxxXXX, XXXHxx, XXXxxX, XXxxXX, HxxXXX, xxXXXX, xHxXXX, XxHxXX, HxxXxx, XXXxXx, xXXxXX, HxXXxX, XXxXXx, xXXXxX, HxXXXX, xXXXXX, HxXXXX, XXxXXX, XXXxXX, XXXHxX, XXXHxx и XXXXXX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения мотив из шести нуклеотидных оснований в положениях 11-16 одноцепочечного олигонуклеотида, если считать от 3'-конца, представляет собой xxHxxX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения три крайних 5'-концевых нуклеотидных основания выбраны из группы, состоящей из Hxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX и XXX, где "X" обозначает нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA, а "x" обозначает нуклеотидный остаток ДНК или РНК.

В одном из вариантов изобретения "x" обозначает остаток ДНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает, у 5'-конца, остаток нуклеотидного аналога, такой как остаток LNA.

В одном из вариантов изобретения остатки нуклеотидных аналогов, такие как X, независимо выбраны из группы, состоящей из остатка 2'-О-алкил-РНК, остатка 2'ОМе-РНК, остатка 2'-амино-ДНК, остатка 2'-фтор-ДНК, остатка LNA, остатка PNA, остатка HNA, остатка INA.

В одном из вариантов изобретения все нуклеотидные основания одноцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению представляют собой остатки нуклеотидных аналогов.

В одном из вариантов изобретения остатки нуклеотидных аналогов, такие как X, независимо выбраны из группы, состоящей из остатков 2'ОМе-РНК, остатков 2'-фтор-ДНК и остатков LNA.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает указанный по меньшей мере один остаток аналога LNA и по меньшей мере один дополнительный остаток нуклеотидного аналога, не являющийся остатком LNA.

В одном из вариантов изобретения остаток или остатки нуклеотидных аналогов, не являющихся LNA, независимо выбраны из остатков 2'-ОМЕ-РНК и остатков 2'-фтор-ДНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид состоит по меньшей мере из одной последовательности XYX или YXY, где X представляет собой LNA, а Y представляет собой остаток 2'-ОМЕ-РНК и остаток 2'-фтор-ДНК.

В одном из вариантов изобретения последовательность нуклеотидных оснований одноцепочечного олигонуклеотида состоит из чередующихся остатков X и Y.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает чередующиеся остатки LNA и ДНК (Xx) или (xx).

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает мотив из чередующихся остатков LNA, за которыми следуют 2 остатка ДНК (Xxx), xXx или xxX.

В одном из вариантов изобретения по меньшей мере один из остатков нуклеотидных аналогов ДНК или остатков нуклеотидного аналога, не являющегося LNA, заменен нуклеотидным основанием LNA в положении, выбранном из положений, идентифицированных как остатки нуклеотидных оснований LNA согласно любому из вышеуказанных вариантов.

В одном из вариантов изобретения "X" обозначает остаток LNA.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере 2 остатка нуклеотидных аналогов, например по меньшей мере 3 остатка нуклеотидных аналогов, например по меньшей мере 4 остатка нуклеотидных аналогов, например по меньшей мере 5 остатков нуклеотидных аналогов, например по меньшей мере 6 остатков нуклеотидных аналогов, например по меньшей мере 7 остатков нуклеотидных аналогов, например по меньшей мере 8 остатков нуклеотидных аналогов, например по меньшей мере 9 остатков нуклеотидных аналогов, например по меньшей мере 10 остатков нуклеотидных аналогов.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере 2 остатка LNA, например по меньшей мере 3 остатка LNA, например по меньшей мере 4 остатка LNA, например по меньшей мере 5 остатков LNA, например по меньшей мере 6 остатков LNA, например по меньшей мере 7 остатков LNA, например по меньшей мере 8 остатков LNA, например по меньшей мере 9 остатков LNA, например по меньшей мере 10 остатков LNA.

В одном из вариантов изобретения по меньшей мере один остаток нуклеотидного аналога, такой как остаток LNA, например остаток в положениях 1-10 нуклеотидного аналога, такой как остаток LNA, в частности, остаток в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 нуклеотидных аналогов, таких как остатки LNA, представляет собой цитозин или гуанин.

В одном из вариантов изобретения по меньшей мере два остатка нуклеотидных аналогов, такие как остатки LNA, представляют собой цитозин или гуанин. В одном из вариантов изобретения по меньшей мере три остатка нуклеотидных аналогов, такие как остатки LNA, представляют собой цитозин или гуанин. В одном из вариантов изобретения по меньшей мере четыре остатка нуклеотидных аналогов, такие как остатки LNA, представляют собой цитозин или гуанин. В одном из вариантов изобретения по меньшей мере пять остатков нуклеотидных аналогов, такие как остатки LNA, представляют собой цитозин или гуанин. В одном из вариантов изобретения по меньшей мере шесть остатков нуклеотидных аналогов, такие как остатки LNA, представляют собой цитозин или гуанин. В одном из вариантов изобретения по меньшей мере семь остатков нуклеотидных аналогов, такие как остатки LNA, представляют собой цитозин или гуанин. В одном из вариантов изобретения по меньшей мере восемь остатков нуклеотидных аналогов, такие как остатки LNA, представляют собой цитозин или гуанин.

В предпочтительном варианте изобретения нуклеотидные аналоги образуют дуплекс с комплементарным нуклеотидом РНК, который имеет более высокую термостабильность, чем дуплекс, в котором эквивалентный нуклеотид ДНК аффинно связан с указанным комплементарным нуклеотидом РНК.

В одном из вариантов изобретения нуклеотидные аналоги сообщают одноцепочечному олигонуклеотиду более высокую стабильность в сыворотке.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид образует А-спиральную конформацию с комплементарной одноцепочечной молекулой РНК.

Дуплекс, образованный между двумя молекулами РНК, обычно присутствует в А-конформации, а дуплекс, образованный между двумя молекулами ДНК, обычно присутствует в В-конформации. Дуплекс, образованный между молекулами ДНК и РНК, обычно присутствует в промежуточной конформации (в А/В-форме). Нуклеотидные аналоги, такие как бета-D-окси-LNA, могут быть использованы для стимуляции образования конформации, наиболее близкой к А-конформации. Для определения формы дуплексов между олигонуклеотидами согласно изобретению и комплементарными молекулами РНК применяют стандартный метод кольцевого дихроизма (KD) или ЯМР-анализ.

Поскольку считается, что рекрутинг под действием RISC-комплекса зависит от конкретной структурной конформации миРНК/мРНК-мишени, то в одном из вариантов изобретения олигонуклеотиды согласно изобретению могут образовывать дуплекс в А/В-конформации с комплементарной молекулой РНК.

Однако авторами настоящего изобретения было также определено, что использование нуклеотидных аналогов, таких как альфа-L-изомер LNA, может также оказаться эффективным для стимуляции образования А-конформационной структуры.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид образует А/В-конформацию с комплементарной одноцепочечной молекулой РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид образует А-конформацию с комплементарной одноцепочечной молекулой РНК.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению не опосредует расщепление комплементарной одноцепочечной молекулы РНК под действием РНКазы Н. Обычно для эффективного рекрутинга РНКазы Н под действием олигонуклеотида необходимо, чтобы олигонуклеотидный фрагмент состоял по меньшей мере из 5 (обычно он не является эффективным для рекрутинга РНКазы Н), более предпочтительно по меньшей мере из 6, а еще более предпочтительно по меньшей мере примерно из 7 или 8 смежных нуклеотидных оснований ДНК (или альтернативных нуклеотидных оснований, которые способны осуществлять рекрутинг РНКазы Н, таких как альфа-L-амино LNA).

В EP 1222309 описаны методы *in vitro* определения активности РНКазы Н, которые могут быть применены для определения способности олигонуклеотида к рекрутингу РНКазы Н. Считается, что соединение способно осуществлять рекрутинг РНКазы Н, если, в случае использования комплементарной РНК-мишени, исходный уровень РНКазы Н, измеряемый в пмоль/л/мин, составляет по меньшей мере 1%, например по меньшей мере 5%, например по меньшей мере 10% или менее чем 20% от исходного уровня, определяемого с использованием только эквивалентных ДНК-олигонуклеотидов, не имеющих 2'-замещений и имеющих фосфориотатные связи между всеми нуклеотидами в данном олигонуклеотиде, как было определено с применением методики, описанной в примерах 91-95 EP 1222309.

При этом считается, что соединение в основном не способно осуществлять рекрутинг РНКазы Н, если, в случае использования комплементарной РНК-мишени, исходный уровень РНКазы Н, измеряемый в пмоль/л/мин, составляет менее чем 1%, например менее чем 5%, например менее чем 10% или менее чем 20% от исходного уровня, определяемого с использованием только эквивалентных только ДНК-олигонуклеотидов, не имеющих 2'-замещений и имеющих фосфориотатные связывающие группы между всеми нуклеотидами в данном олигонуклеотиде, как было определено с применением методики, описанной в примерах 91-95 EP 1222309.

В особенно предпочтительном варианте изобретения одноцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению обладает способностью образовывать дуплекс с комплементарной одноцепочечной молекулой нуклеиновой кислоты РНК (обычно примерно такой же длины, как и указанный одноцепочечный олигонуклеотид), имеющей фосфодиэфирные межнуклеозидные связи, где указанный дуплекс имеет T_m по меньшей мере примерно 60°C, при этом предпочтительно, чтобы одноцепочечный олигонуклеотид обладал способностью образовывать дуплекс с комплементарной одноцепочечной молекулой нуклеиновой кислоты РНК, имеющей фосфодиэфирные межнуклеозидные связи, где указанный дуплекс имеет T_m примерно 70-95°C, например примерно 70-90°C, например примерно 70-85°C.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид согласно изобретению обладает способностью образовывать дуплекс с комплементарной одноцепочечной молекулой нуклеиновой кислоты ДНК, имеющей фосфодиэфирные межнуклеозидные связи, где указанный дуплекс имеет T_m примерно 50-95°C, например примерно 50-90°C, например по меньшей мере примерно 55°C, например по меньшей мере примерно 60°C или не более чем примерно 95°C.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид может иметь длину 14-16 нуклеотидных оснований, включая 15 нуклеотидных оснований.

В одном из вариантов изобретения остаток или остатки LNA независимо выбраны из группы, состоящей из окси-LNA, тио-LNA и амино-LNA, в любой из D-β- и L-α-конфигураций или их комбинаций.

В одном из конкретных вариантов изобретения остатками LNA могут быть нуклеотидные основания ENA.

В одном из вариантов изобретения остатки LNA составляют бета-D-окси-LNA.

В одном из вариантов изобретения остатки LNA составляют альфа-L-амино-LNA.

В предпочтительном варианте изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает 3-17 остатков LNA.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере одну межнуклеозидную связывающую группу, которая не является фосфатом.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере одну фосфориотатную межнуклеозидную связь.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает фосфодиэфирную и фосфортиоатную связи.

В одном из вариантов изобретения все межнуклеозидные связи представляют собой фосфортиоатные связи.

В одном из вариантов изобретения одноцепочечный олигонуклеотид включает по меньшей мере одну фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

В одном из вариантов изобретения все межнуклеозидные связи одноцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению представляют собой фосфодиэфирные связи.

В одном из вариантов изобретения фармацевтическая композиция согласно изобретению включает носитель, такой как физиологический раствор или забуференный физиологический раствор.

В одном из вариантов изобретения синтез одноцепочечного олигонуклеотида, направленного против человеческой микроРНК, осуществляют в направлении 3'-5' а-f.

Такой способ синтеза одноцепочечного олигонуклеотида согласно изобретению может быть осуществлен с применением стандартного твердофазного олигонуклеотидного синтеза.

Другие варианты изобретения, которые могут быть объединены с вышеописанными вариантами, приводятся в формуле изобретения и в разделе, озаглавленном "Другие варианты изобретения".

Определения

Термин "нуклеотидное основание" обозначает нуклеотиды, такие как нуклеотиды ДНК и РНК, и нуклеотидные аналоги.

Термин "олигонуклеотид" (или просто "олиго") в контексте настоящего описания обозначает молекулу, образованную посредством ковалентной связи двух или более нуклеотидных оснований. В одном из вариантов изобретения "олигонуклеотид", используемый в настоящем изобретении (также называемый одноцепочечным олигонуклеотидом), может иметь длину, например 8-26 нуклеотидов, например 10-26 нуклеотидов, например 12-26 нуклеотидов. В предпочтительном варианте изобретения, подробно описанном в настоящем изобретении, олигонуклеотид согласно изобретению имеет длину 8-17 нуклеотидов, например 20-27 нуклеотидов, например 8-16 нуклеотидов, например 12-15 нуклеотидов.

В таком варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению может иметь длину 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов.

Следует отметить, что в случае использования более коротких олигонуклеотидов может оказаться необходимым увеличение числа (высокоаффинных) нуклеотидных аналогов, таких как LNA. Поэтому в одном из вариантов, изобретения по меньшей мере примерно 30% нуклеотидов, например по меньшей мере примерно 33%, например по меньшей мере примерно 40% или по меньшей мере примерно 50% или по меньшей мере примерно 60%, например по меньшей мере примерно 66%, например по меньшей мере примерно 70%, например по меньшей мере примерно 80%, или по меньшей мере примерно 90% нуклеотидов представляют собой нуклеотидные аналоги. Также очевидно, что указанный олигонуклеотид может состоять из нуклеотидной последовательности, состоящей только из последовательностей нуклеотидных аналогов.

Используемый здесь термин "азотистое основание" включает пурины и пиримидины, такие как нуклеотидные основания ДНК А, С, Т и G, нуклеотидные основания РНК А, С, U и G, а также нуклеотидные основания, не являющиеся основаниями ДНК/РНК, такие как 5-метилцитозин (^{Me}C), изоцитозин, псевдоизоцитозин, 5-бромурацил, 5-пропинурацил, 5-пропинил-6-фторурацил, 5-метилтиазолурацил, 6-аминопурин, 2-аминопурин, инозин, 2,6-диаминопурин, 7-пропин-7-деазаденин, 7-пропин-7-деазагуанин и 2-хлор-6-аминопурин, в частности ^{Me}C. При этом следует отметить, что практически выбор нуклеотидного основания, не являющегося основанием ДНК/РНК, зависит от соответствующего (или спаривающегося) нуклеотида, присутствующего в цепи микроРНК, т.е. олигонуклеотида, который, предположительно, является мишенью. Так, например, в случае если соответствующим нуклеотидом является G, то обычно необходимо выбрать такое нуклеотидное основание, не являющееся основанием ДНК/РНК, которое будет обладать способностью образовывать водородные связи с G. В этом конкретном случае, если соответствующим нуклеотидом является G, то типичным примером предпочтительного не-ДНК/РНК нуклеотидного основания является ^{Me}C.

Термин "межнуклеозидная связывающая группа" означает группу, способную образовывать ковалентные связи между двумя нуклеотидами, например между остатками ДНК, между остатками ДНК и нуклеотидными аналогами, между двумя не-LNA-остатками, между не-LNA-остатком и остатком LNA и между двумя остатками LNA и т.п. Предпочтительными примерами являются фосфатные, фосфодиэфирные и фосфортиоатные группы.

Межнуклеозидная связь может быть выбрана из группы, состоящей из -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, и/или межнуклеозидная связь может быть выбрана из группы, состоящей из -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, где R^H выбран из водорода и

C_{1-4} алкила. В некоторых вариантах изобретения могут оказаться предпочтительными межнуклеозидные связи, содержащие серу (S), как описано выше.

Термины "соответствующий..." и "соответствует...", относящиеся к олигонуклеотидам, используются здесь для сравнения нуклеотидных последовательностей соединений согласно изобретению и их обратных комплементов или в одном из вариантов изобретения для сравнения нуклеотидных последовательностей и эквивалентных (идентичных) нуклеотидных последовательностей, которые могут, например, содержать другие нуклеотидные основания, но при этом сохранять ту же самую последовательность оснований или их комплементов. Нуклеотидные аналоги непосредственно сравнивают с их эквивалентными или соответствующими природными нуклеотидами. Последовательности, образующие обратный комплемент данной последовательности, называются здесь последовательностями, комплементарными данной последовательности.

Что касается длины описанной здесь нуклеотидной молекулы, то она соответствует числу мономерных остатков, т.е. нуклеотидных оснований, независимо от того, являются ли такие мономерные остатки нуклеотидами или нуклеотидными аналогами. Что касается нуклеотидных оснований, то термины "мономер" и "остаток" являются здесь взаимозаменяемыми.

Следует отметить, что если при определении конкретных величин или интервалов величин используется слово "примерно", то при этом подразумевается, что данные величины включают конкретно указанную величину или указанный интервал величин.

Предпочтительными аналогами ДНК являются аналоги ДНК, в которых группа 2'-H замещена группой, не являющейся -OH (РНК), например группами -O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH или -F.

Предпочтительными аналогами РНК являются аналоги РНК, которые были модифицированы в их 2'-ОН-группе, например, путем замещения группой, не являющейся -H (ДНК), например, группами -O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH или -F.

В одном из вариантов изобретения нуклеотидным аналогом является "ENA".

Используемые здесь термины "структурная единица LNA", "мономер LNA", "остаток LNA", "структурная единица блокированной нуклеиновой кислоты", "мономер блокированной нуклеиновой кислоты" или "остаток блокированной нуклеиновой кислоты" означают бициклический нуклеозидный аналог.

Структурные единицы LNA описаны inter alia в заявках WO 99/14226, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 03/006475 и WO 03/095467. Структурная единица LNA может быть также определена по ее химической формуле. Так, например, используемая здесь "структурная единица LNA" имеет химическую структуру, представленную на схеме 1.

Схема 1



где X выбран из группы, состоящей из O, S и NR^H, где R^H представляет собой H или C_{1-4} алкил;

Y представляет собой $(-CH_2)_r$, где r представляет собой целое число 1-4; и

B представляет собой азотистое основание.

Если в соответствии с настоящим изобретением остаток ДНК заменен соответствующим остатком LNA, то термин "соответствующий остаток LNA" означает, что остаток ДНК был заменен остатком LNA, содержащим такое же азотистое основание, как и замененный остаток ДНК, например остаток LNA, соответствующий остатку ДНК, содержащему азотистое основание А, также содержит азотистое основание А. Исключением является тот случай, когда остаток ДНК содержит основание С, и в этом случае соответствующий остаток LNA может содержать основание С или основание ^{Me}C, предпочтительно ^{Me}C.

Используемый здесь термин "не-LNA-остаток" означает нуклеозид, отличающийся от LNA-остатка, т.е. термин "не-LNA-остаток" включает остаток ДНК, а также остаток РНК. Предпочтительным не-LNA-остатком является остаток ДНК.

Используемые здесь термины "структурная единица", "остаток" и "мономер" являются синонимами.

Используемый здесь термин "конъюгат" означает гетерогенную молекулу, образованную посредством ковалентного связывания описанного здесь олигонуклеотида с одной или несколькими не-нуклеотидными или не-полинуклеотидными молекулами. Примерами не-нуклеотидных или не-полинуклеотидных молекул являются макромолекулярные агенты, такие как белки, цепи жирных кислот, сахарные остатки, гликопротеины, полимеры или их комбинации. Типичными белками могут быть антитела для белка-мишени. Типичными полимерами могут быть полиэтиленгликоли.

Термин "по меньшей мере один" охватывает целое число, равное или превышающее 1, такое как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и т.д.

При использовании терминов "нуклеотид", "агент", "остаток LNA" и т.п. подразумевается, что указанные объекты могут быть в единственном или во множественном числе. В частности, выражение "компонент (такой как нуклеотид, агент, остаток LNA или т.п.), выбранный из группы, состоящей из ...", означает, что могут быть выбраны один или несколько из указанных компонентов. Так, например, выражения, подобные выражению "компонент, выбранный из группы, состоящей из A, B и C", означают все комбинации A, B и C, т.е. A, B, C, A+B, A+C, B+C и A+B+C.

Термин "остаток тио-LNA" означает остаток LNA, в котором X на схеме 1 представляет собой S. Остаток тио-LNA может присутствовать в бета-D-форме и альфа-L-форме. Обычно предпочтительной является бета-D-форма остатка тио-LNA. Бета-D-форма и альфа-L-форма остатка тио-LNA представлены на схеме 3 как соединения 3A и 3B соответственно.

Термин "остаток аминокислоты-LNA" означает остаток LNA, в котором X на схеме 1 представляет собой NH или NR^H, где R^H представляет собой водород или C₁₋₄алкил. Остаток аминокислоты-LNA может присутствовать в бета-D-форме и альфа-L-форме. Обычно предпочтительной является бета-D-форма остатка аминокислоты-LNA. Бета-D-форма и альфа-L-форма остатка аминокислоты-LNA представлены на схеме 4 как соединения 4A и 4B соответственно.

Термин "остаток окси-LNA" означает остаток LNA, в котором X на схеме 1 представляет собой O. Остаток тио-LNA может присутствовать в бета-D-форме и альфа-L-форме. Обычно предпочтительной является бета-D-форма остатка окси-LNA. Бета-D-форма и альфа-L-форма остатка окси-LNA представлены на схеме 5 как соединения 5A и 5B соответственно.

Используемый здесь термин "C₁₋₆алкил" означает прямую или разветвленную насыщенную углеводородную цепь, где самые длинные цепи имеют от одного до шести атомов углерода, например метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, изопентил, неопентил и гексил. Разветвленная углеводородная цепь представляет собой C₁₋₆алкил, замещенный у любого атома углерода углеводородной цепью.

Используемый здесь термин "C₁₋₄алкил" означает прямую или разветвленную насыщенную углеводородную цепь, где самые длинные цепи имеют от одного до четырех атомов углерода, например метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил. Разветвленная углеводородная цепь представляет собой C₁₋₄алкил, замещенный у любого атома углерода углеводородной цепью.

Используемый здесь термин "C₁₋₆алкокси" означает C₁₋₆алкилокси, такой как метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, изобутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, пентокси, изопентокси, неопентокси и гексокси.

Используемый здесь термин "C₂₋₆алкенил" означает прямую или разветвленную углеводородную группу, имеющую от двух до шести атомов углерода и содержащую одну или несколько двойных связей. Репрезентативными примерами C₂₋₆алкенильных групп являются аллил, гомоаллил, винил, кротил, бутенил, бутаденил, пентенил, пентаденил, гексенил и гексиденил. Положением ненасыщенной связи (двойной связи) может быть любое положение в углеродной цепи.

Используемый здесь термин "C₂₋₆алкинил" означает прямую или разветвленную углеводородную группу, имеющую от двух до шести атомов углерода и содержащую одну или несколько тройных связей. Репрезентативными примерами C₂₋₆алкинильных групп являются ацетилен, пропинил, бутинил, пентинил и гексинил. Положением ненасыщенной связи (тройной связи) может быть любое положение в углеродной цепи. Более чем одна связь может быть ненасыщенной, а поэтому "C₂₋₆алкинил" представляет собой диин или ендиин, известные специалистам.

Используемый здесь термин "гибридизация" означает водородные связи, которыми могут быть водородные связи Уотсона-Крика, Хугстена, реверсивные водородные связи Хугстена и т.п. между комплементарными нуклеозидными или нуклеотидными основаниями. Четырьмя нуклеотидными основаниями, обычно присутствующими в ДНК, являются G, A, T и C, из которых G спаривается с C, а A спаривается с T. В РНК T заменен урацилом (U), который спаривается с A. Химические группы в нуклеотидных основаниях, которые участвуют в образовании стандартного дуплекса, составляют основания Уотсона-Крика. За последние два года Хугстеном было показано, что пуриновые нуклеотидные основания (G и A), помимо оснований Уотсона-Крика, включают основания Хугстена, которые могут распознаваться с внешней стороны дуплекса и используются для связывания с пиримидиновыми олигонуклеотидами посредством водородных связей, образуя, тем самым, тройную спиральную структуру.

В контексте настоящего изобретения термин "комплементарный" относится к способности двух нуклеотидных последовательностей точно спариваться друг с другом. Так, например, если нуклеотид в определенном положении олигонуклеотида способен образовывать водородную связь с нуклеотидом в соответствующем положении молекулы ДНК или РНК, то считается, что такой олигонуклеотид и ДНК или РНК являются комплементарными друг другу в этом положении. Считается, что цепи ДНК или РНК комплементарны друг другу в том случае, если достаточное число нуклеотидов в олигонуклеотиде могут образовывать водородные связи с соответствующими нуклеотидами в ДНК- или РНК-мишени и тем самым образовывать стабильный комплекс. При этом для сообщения стабильности последовательности олигонуклеотидов *in vitro* или *in vivo* эти последовательности необязательно должны быть на 100% комплементарны их микроРНК-мишеням. Так, например, термины "комплементарный" и "специфически

гибридирующий" означают, что олигонуклеотид достаточно сильно и специфически связывается с молекулой-мишенью, что обеспечивает необходимое подавление нормальной функции мишени, но при этом функция РНК, не являющаяся мишенью, остается неизменной.

В предпочтительном примере олигонуклеотид согласно изобретению на 100% комплементарен человеческой последовательности микроРНК, такой как одна из описанных здесь последовательностей микроРНК.

В предпочтительном примере олигонуклеотид согласно изобретению содержит непрерывную последовательность, которая на 100% комплементарна уникальной области человеческой последовательности микроРНК.

МикроРНК представляют собой короткие некодирующие РНК, происходящие от эндогенных генов, действующих как посттранскрипционные регуляторы экспрессии генов. Они процессируются из более длинных (примерно 70-80 нуклеотидов) шпилькоподобных предшественников, называемых пре-миРНК, под действием фермента РНКазы III Dicer. МикроРНК образуют рибонуклеопротеиновые комплексы, называемые миРНК, и распознают их сайты-мишени благодаря антисмысловой комплементарности, опосредуя, тем самым, ингибирование их генов-мишеней. Почти полная или полная комплементарность между миРНК и ее сайтом-мишенью приводит к расщеплению мРНК-мишени, тогда как ограниченная комплементарность между микроРНК и сайтом-мишенью приводит к ингибированию трансляции гена-мишени.

В контексте настоящего изобретения термин "микроРНК" или "миРНК" означает олигонуклеотид РНК, состоящий из 18-25 нуклеотидов. По своим функциям миРНК представляют собой типичные регуляторные эндогенные молекулы РНК.

Термины "целевая микроРНК", или "целевая миРНК", или "миРНК-мишень" означают микроРНК, которая играет определенную биологическую роль в развитии заболевания у человека, например миРНК может стимулировать онкогенез или подавлять развитие опухоли при раке, а поэтому она является мишенью для терапевтического воздействия на рассматриваемое заболевание.

Термины "ген-мишень" или "мРНК-мишень" означают регуляторные мРНК-мишени для микроРНК, где указанный "ген-мишень" или "мРНК-мишень" подвергаются посттранскрипционной регуляции под действием микроРНК, что обусловлено полной или почти полной комплементарностью между миРНК и ее сайтом-мишенью и приводит к расщеплению мРНК-мишени; либо ограниченной комплементарностью, часто определяемой как комплементарность между так называемой "уникальной" последовательностью (нуклеотидами 2-7 миРНК) и сайтом-мишенью, которая приводит к ингибированию трансляции мРНК-мишени.

В контексте настоящего изобретения олигонуклеотид согласно изобретению является одноцепочечным, а это означает, что олигонуклеотид не имеет комплементарного олигонуклеотида, т.е. он не может быть двухцепочечным олигонуклеотидным комплексом, таким как киРНК. В одном из вариантов изобретения композиция согласно изобретению не содержит другого олигонуклеотида, который имеет область, комплементарную одноцепочечному олигонуклеотиду из пяти или более смежных нуклеотидных оснований, например из восьми или более, или из 12 или более смежных нуклеотидных оснований. Считается, что такой другой олигонуклеотид не связан ковалентной связью с одноцепочечным олигонуклеотидом.

LNA-содержащие олигонуклеотиды согласно изобретению.

Хотя LNA-остатки и не-LNA-остатки могут быть объединены различными методами с образованием олигонуклеотидов, однако авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что присутствие определенной коровой последовательности ДНК и присутствие определенных остатков LNA в указанной последовательности ДНК приводят к особенно сильному ингибированию микроРНК. Такое присутствие остатков LNA в указанной коровой последовательности олигонуклеотидов согласно изобретению сообщает указанным олигонуклеотидам высокий уровень резистентности к нуклеазе.

Нуклеотидами, расположенными за пределами коровой последовательности, могут быть LNA-остатки и/или не-LNA-остатки. В одном из вариантов изобретения не-LNA-остатками, расположенными за пределами коровой последовательности, являются остатки ДНК.

Коровая последовательность.

Для более эффективного, по возможности, ингибирования микроРНК-мишеней антисмысловыми олигонуклеотидами согласно изобретению необходима определенная степень комплементарности между антисмысловым олигонуклеотидом согласно изобретению и соответствующей микроРНК-мишенью.

При этом особенно важно, чтобы олигонуклеотиды согласно изобретению были комплементарны соответствующей микроРНК-мишени в положениях 3-8 от 5'-конца. В некоторых микроРНК-мишенях нуклеотид 1, если считать от 5'-конца, представляет собой неспаривающееся основание, которое, по все вероятности, скрыто в связывающем кармане белка Ago 2. В соответствии с этим олигонуклеотид согласно изобретению может иметь, а может и не иметь нуклеотид в положении 1 от 3'-конца, соответствующий нуклеотиду 1 от 5'-конца соответствующей микроРНК-мишени. В некоторых случаях, первые два нуклеотида от 5'-конца соответствующей микроРНК-мишени могут оставаться неспаренными.

Поэтому коровой последовательностью олигонуклеотидов согласно изобретению является последовательность ДНК в 1-6-положениях, 2-7-положениях или 3-8-положениях, если считать от 3'-конца, соответствующая 3-8-положениям, если считать от 5'-конца, соответствующей микроРНК-мишени.

miR-19b.

Одна из конкретных микроРНК-мишеней обозначена miR-19b. Последовательность miR-19b в 3-8-положениях, если считать от 5'-конца, представляет собой ugcaaa (см. GenBank AJ421740 и AJ421739). Соответствующая ДНК-последовательность представляет собой acgttt. Кроме того, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что для максимального ингибирования микроРНК-мишеней олигонуклеотиды согласно изобретению должны содержать в своей коровой последовательности по меньшей мере один остаток LNA.

В соответствии с этим в своем первом аспекте настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду согласно изобретению, такому как олигонуклеотид длиной 12-26 нуклеотидов, в котором в положениях 1-6, 2-7 или 3-8, а предпочтительно в положениях 2-7 или 3-8, считая от 3'-конца, имеется следующая последовательность ДНК:

acgttt (SEQ ID NO 6)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

Комплементарность с другими нуклеотидами микроРНК-мишени может повышать уровень ингибирования указанной микро-РНК-мишени. Поэтому в одном из вариантов изобретения описанный выше олигонуклеотид в положениях 1-7, 2-8 или 3-9, а предпочтительно в положениях 2-8 или 3-9, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

acgttta (SEQ ID NO 70)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В другом варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению в положениях 1-8, 2-9 или 3-10, а предпочтительно в положениях 2-9 или 3-10, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

acgttttag (SEQ ID NO 71)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В еще одном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению в положениях 1-9, 2-10 или 3-11, а предпочтительно в положениях 2-10 или 3-11, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

acgttttagg (SEQ ID NO 72)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три, а еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, например четыре или пять, остатков ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

miR-122a.

Другой представляющей интерес микроРНК-мишенью является miR-122a. Последовательность miR-122a в положениях 3-8, считая от 5'-конца, представляет собой gagugu (см. miRBase, имя файла HGNC:MIRN122A). Соответствующая последовательность ДНК представляет собой ctcaca.

В соответствии с этим во втором своем аспекте настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду согласно изобретению, такому как олигонуклеотид длиной 12-26 нуклеотидов, имеющий в положениях 1-6, 2-7 или 3-8, а предпочтительно в положениях 2-7 или 3-8, считая от 3'-конца, следующую последовательность ДНК:

ctcaca (SEQ ID NO 7)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду-антагонисту miR-122a, который в положениях 1-7, 2-8 или 3-9, а предпочтительно в положениях 2-8 или 3-9, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

ctcacac (SEQ ID NO 73)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В другом варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению в положениях 1-8, 2-9 или 3-10, а предпочтительно в положениях 2-9 или 3-10, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

ctcacact (SEQ ID NO 74)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В еще одном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению в положениях 1-9, 2-10 или 3-11, а предпочтительно в положениях 2-10 или 3-11, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

ctcacactg (SEQ ID NO 75)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три, а еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, например четыре или пять, остатков ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

miR-155.

Другой представляющей интерес микроРНК-мишенью является miR-155. Последовательность miR-155 в положениях 3-8, считая от 5'-конца, представляет собой aaugcu (см. miRBase, имя файла HGNC:MIRN155). Соответствующая последовательность ДНК представляет собой ttacga.

В соответствии с этим в своем третьем аспекте настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду согласно изобретению, такому как олигонуклеотид длиной 12-26 нуклеотидов, имеющий в положениях 1-6, 2-7 или 3-8, а предпочтительно в положениях 2-7 или 3-8, считая от 3'-конца, следующую последовательность ДНК:

ttacga (SEQ ID NO 8)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид против miR-155 в положениях 1-7, 2-8 или 3-9, а предпочтительно в положениях 2-8 или 3-9, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

ttacgat (SEQ ID NO 76)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В другом варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению в положениях 1-8, 2-9 или 3-10, а предпочтительно в положениях 2-9 или 3-10, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

ttacgatt (SEQ ID NO 77)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В еще одном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению в положениях 1-9, 2-10 или 3-11, а предпочтительно в положениях 2-10 или 3-11, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

ttacgatta (SEQ ID NO 78)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три, а еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, например четыре или пять, остатков ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

miR-375.

Другой представляющей интерес микроРНК-мишенью является miR-375. Последовательность miR-375 в положениях 3-8, считая от 5'-конца, представляет собой uguucg (см. miRBase, имя файла HGNC:MIRN375). Соответствующая последовательность ДНК представляет собой acaagc.

В соответствии с этим в своем четвертом аспекте настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду согласно изобретению, такому как олигонуклеотид длиной 12-26 нуклеотидов, имеющий в положениях 1-6, 2-7 или 3-8, а предпочтительно в положениях 2-7 или 3-8, считая от 3'-конца, следующую последовательность ДНК:

acaagc (SEQ ID NO 9)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В одном из вариантов изобретения описанный выше олигонуклеотид против miR-375 в положениях 1-7, 2-8 или 3-9, а предпочтительно в положениях 2-8 или 3-9, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

acaagca (SEQ ID NO 79)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В другом варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению в положениях 1-8, 2-9 или 3-10, а предпочтительно в положениях 2-9 или 3-10, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

acaagcaa (SEQ ID NO 80)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

В еще одном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению в положениях 1-9, 2-10 или 3-11, а предпочтительно в положениях 2-10 или 3-11, считая от 3'-конца, имеет следующую последовательность ДНК:

acaagcaag (SEQ ID NO 81)

где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два, а более предпочтительно по меньшей мере три, например три, а еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, например четыре или пять, остатков ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA.

Модификация нуклеотидов в коровой последовательности.

Как упоминалось выше, в коровой последовательности олигонуклеотидов согласно изобретению по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующим остатком LNA. Авторами настоящего изобретения было также обнаружено, что ингибирование микроРНК-мишеней может быть еще более усилено, если два остатка LNA в указанной коровой последовательности будут разделены по меньшей мере одним остатком ДНК.

В соответствии с этим в одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к вышеописанному олигонуклеотиду, в котором по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в положениях 1-6, 2-7 или 3-8, а предпочтительно в положениях 2-7 или 3-8, считая от 3'-конца, были заменены соответствующим остатком LNA и в котором остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК.

Авторами настоящего изобретения было также обнаружено, что ингибирование микроРНК-мишеней может быть еще более усилено, если два остатка LNA в указанной коровой последовательности будут разделены максимум двумя остатками ДНК. В соответствии с этим в одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к вышеописанному олигонуклеотиду, в котором число смежных остатков ДНК в положениях 1-6, 2-7 или 3-8, а предпочтительно в положениях 2-7 или 3-8, считая от 3'-конца, составляет максимум два.

Указанные данные относятся к коровой последовательности per se, т.е. они относятся к положениям олигонуклеотидов согласно изобретению, соответствующих коровой последовательности. Следовательно, в другом своем варианте настоящее изобретение относится к описанному выше олигонуклеотиду, где по меньшей мере два, например два, три или четыре, остатка ДНК в положениях 1-7, 2-8 или 3-9, а предпочтительно в положениях 2-8 или 3-9 от 3'-конца были заменены соответствующим остатком LNA и где остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному выше олигонуклеотиду, где число смежных остатков ДНК в положениях 1-7, 2-8 или 3-9, а предпочтительно в положениях 2-8 или 3-9 от 3'-конца составляет максимум два.

В еще одном своем варианте настоящее изобретение относится к вышеописанному олигонуклеотиду, где по меньшей мере два, например два, три или четыре, остатка ДНК в положениях 1-8, 2-9 или 3-10, предпочтительно в положениях 2-9 или 3-10 от 3'-конца были заменены соответствующим остатком LNA и где остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК. В другом своем варианте настоящее изобретение относится к описанному выше олигонуклеотиду, где число смежных остатков ДНК в положениях 1-8, 2-9 или 3-10, а предпочтительно в положениях 2-9 или 3-10, считая от 3'-конца, составляет максимум два.

xxxXXX, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, XxXXxx, XxxXXx, XxxxXX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX, xXxXxX и XxXxXx, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В предпочтительном варианте изобретения тип замены нуклеотидов в положениях 3-8 от 3'-конца может быть выбран из группы, состоящей из XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, XxXXxx, XxxXXx, XxxxXX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX, xXxXxX и XxXxXx, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В более предпочтительном варианте изобретения тип замены нуклеотидов в положениях 3-8 от 3'-конца выбран из группы, состоящей из xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX и xXxXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В еще более предпочтительном варианте изобретения тип замены нуклеотидов в положениях 3-8 от 3'-конца представляет собой xXxXxX или XxXxXx, где "X" обозначает остаток LNA, а "x" обозначает не-LNA-остаток. В наиболее предпочтительном варианте изобретения, тип замены нуклеотидов в положениях 3-8 от 3'-конца представляет собой xXxXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток.

В другом варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит по меньшей мере четыре остатка LNA в положениях 3-8 от 3'-конца. В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит четыре остатка LNA в положениях 3-8 от 3'-конца. Тип замены нуклеотидов в положениях 3-8 от 3'-конца может быть выбран из группы, состоящей из xxXXXX, xXxXXX, xXXxXX, xXXXxX, xXXXXx, XxxXXX, XxXxXX, XxXXxX, XxXXXx, XXxxXX, XXxXxX, XXxXXx, XXXxxX, XXXxXx и XXXXxx, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток.

В другом варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит по меньшей мере пять остатков LNA в положениях 3-8 от 3'-конца. В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит пять остатков LNA в положениях 3-8 от 3'-конца. Тип замены нуклеотидов в положениях 3-8 от 3'-конца может быть выбран из группы, состоящей из xXXXXX, XxXXXX, XXxXXX, XXXxXX, XXXXxX и XXXXXx, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток.

При этом предпочтительно, чтобы олигонуклеотид согласно изобретению содержал один или два остатка LNA в положениях 3-8 от 3'-конца. Такая конструкция рассматривается как предпочтительная с точки зрения стабильности А-спирали, образованной дуплексом олигонуклеотид:микроРНК, т.е. дуплексом, который по своей структуре напоминает дуплекс РНК:РНК.

В предпочтительном варианте изобретения указанным не-LNA-остатком является остаток ДНК.

Изменение длин олигонуклеотидов.

Длина олигонуклеотидов согласно изобретению необязательно должна точно соответствовать длине микроРНК-мишеней. Фактически, предпочтительнее использовать короткие олигонуклеотиды, такие как олигонуклеотиды длиной 10-17 или 10-16 нуклеотидов.

В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид согласно изобретению имеет длину 8-24 нуклеотида, например 10-24 нуклеотида, 12-24 нуклеотида, а именно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, предпочтительно 10-22, например 12-22 нуклеотида, а именно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида, более предпочтительно 10-20, например 12-20 нуклеотидов, а именно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов, еще более предпочтительно 10-19, например 12-19 нуклеотидов, а именно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 нуклеотидов, например 10-18, а именно 12-18 нуклеотидов, например 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 нуклеотидов, более предпочтительно 10-17, например 12-17 нуклеотидов, а именно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов, а наиболее предпочтительно 10-16, например 12-16 нуклеотидов, а именно 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 нуклеотидов.

Модификация нуклеотидов от положения 11 в направлении от 3'-конца до 5'-конца.

Тип замены нуклеотидов от положения 11 в направлении от 3'-конца до 5'-конца может включать, а может и не включать остатки нуклеотидных аналогов (такие как LNA). В предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит по меньшей мере один остаток нуклеотидного аналога (такого как LNA), например один остаток нуклеотидного аналога от положения 11 в направлении от 3'-конца до 5'-конца. В другом предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит по меньшей мере два остатка нуклеотидного аналога, такого как LNA, например два остатка нуклеотидного аналога от положения 11 до 5'-конца в направлении от 3'-5'.

В нижеследующих вариантах, которые относятся к модификации нуклеотидов от положения 11 до 5'-конца данного олигонуклеотида, остатки LNA могут быть заменены другими нуклеотидными аналогами, такими как аналоги, описанные в настоящем изобретении. Поэтому "X" может быть выбран из группы, состоящей из 2'-О-алкил-РНК-остатка, 2'-ОМе-РНК-остатка, 2'-амино-ДНК-остатка, 2'-фтор-ДНК-остатка, LNA-остатка, PNA-остатка, HNA-остатка, INA-остатка, "x" предпочтительно, обозначает ДНК или РНК, а наиболее предпочтительно ДНК.

В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид согласно изобретению имеет нижеследующий тип замены, который повторяется от нуклеотида 11 до 5'-конца в направлении от 3'-5': xXxX или XxXx, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В другом варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению имеет нижеследующий тип замены, который повторяется от нуклеотида 11 до 5'-конца в направлении от 3'-5': XxxXxx, xXxxXx или xXxxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В еще одном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению имеет нижеследующий тип замены, который повторяется от нуклеотида 11 до 5'-конца в направлении от 3'-5': XxxxXxxx, xXxxxXxx, xxXxxxXx или xxxXxxxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток.

Характер специфической замены для нуклеотидов от положения 11 до 5'-конца в направлении от 3'-5' зависит от числа нуклеотидов в олигонуклеотидах согласно изобретению. В предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит 12 нуклеотидов, и такую замену для положений 11-12 от 3'-конца выбирают из группы, состоящей из xX и Xx, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-12 от 3'-конца имеет характер xX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. Альтернативно, остатки LNA отсутствуют в положениях 11-12 от 3'-конца, т.е. замена имеет характер xx.

В другом предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит 13 нуклеотидов, и замену для положений 11-13 от 3'-конца выбирают из группы, состоящей из Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX и XXX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-13 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из xXx, xxX и xXX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-13 от 3'-конца имеет характер xxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. Альтернативно, остатки LNA отсутствуют в положениях 11-12 от 3'-конца, т.е. замена имеет характер xxx.

В другом предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит 14 нуклеотидов, и замену для положений 11-14 от 3'-конца выбирают из группы, состоящей из Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX и xxXX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-14 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из xXxx, xxXx, xxxX, xXxX и xxXX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-14 от 3'-конца имеет характер xXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. Альтернативно, остатки LNA отсутствуют в положениях 11-14 от 3'-конца, т.е. замена имеет характер xxxx.

В другом предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит 15 нуклеотидов, и такую замену для положений 11-15 от 3'-конца выбирают из группы, состоящей из Xxxxx, xXxxx, xxXxx, xxxXx, xxxXx, XXxxx, XxXxx, XxxXx, XxxxX, xXXxx, xXxXx, xXxxX, xxXXx, xxXxX, xxxXX и XxXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-15 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из xxXxx, XxXxx, XxxXx, xXxxX, xXxxX и xxXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-15 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из xxXxx, xXxxX, xXxxX и xxXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В еще более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-15 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из xXxxX и xxXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В еще более предпочтительном варианте изобретения, замена в положениях 11-15 от 3'-конца имеет характер xxXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. Альтернативно, остатки LNA отсутствуют в положениях 11-15 от 3'-конца, т.е. замена имеет характер xxxxx.

В другом предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит 16 нуклеотидов, и такую замену для положений 11-16 от 3'-конца выбирают из группы, состоящей из Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxXxx, XXXxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXXxxx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXXx, xxxXxX, xxxXX, XXXxxx, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, XxXXxx, XxXxX, XxXxxX, XxxXXx, XxxXxX, XxxxXX, xXXxxx, xXXxXx, xXXxxX, xXxXxx, xXxxXX, xxXXxx, xxXXxX, xxXxXX и xxxXXX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-16 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из XxxXxx, xXxXxx, xXxxXx, xxXxXx, xxXxxX, XxXxXx, XxXxxX, xxxXxx, xXxxXx, xXxxXX и xxXxXX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-16 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из xXxXxx, xXxxXx, xxXxXx, xxXxxX, xXxXxx, xXxxXX и xxXxXX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В еще более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-16 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из xxXxxX, xXxxXX и xxXxXX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В еще более предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-16 от 3'-конца выбрана из группы, состоящей из xxXxxX и xXxxXx, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. В наиболее предпочтительном варианте изобретения замена в положениях 11-16 от 3'-конца имеет характер

xxXxxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. Альтернативно, остатки LNA отсутствуют в положениях 11-16 от 3'-конца, т.е. замена имеет характер xxxxxx.

В предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит остаток LNA у 5'-конца. В другом предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит остаток LNA в первых двух положениях от 5'-конца.

В особенно предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит 13 нуклеотидов, и замена от 3'-конца имеет характер XXxXxXxxXXxxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. Предпочтительной последовательностью этого варианта от 3'-конца является последовательность CCtCaCaTGttA, где прописные буквы означают азотистые основания в LNA-остатке, а строчные буквы означают азотистые основания в не-LNA-остатке.

В другом особенно предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит 15 нуклеотидов, и замена от 3'-конца имеет характер XXxXxXxxXXxxXxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает не-LNA-остаток. Предпочтительной последовательностью этого варианта от 3'-конца является последовательность CCtCaCaTGttAcC, где прописные буквы означают азотистые основания в LNA-остатке, а строчные буквы означают азотистые основания в не-LNA-остатке.

Модификация межнуклеозидной связывающей группы.

Типичными межнуклеозидными связывающими группами в олигонуклеотидах являются фосфатные группы, но эти группы могут быть заменены межнуклеозидными связывающими группами, не являющимися фосфатом. В другом представляющем интерес варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению имеет модифицированную структуру межнуклеозидных связывающих групп, т.е. модифицированный олигонуклеотид содержит межнуклеозидную связывающую группу, не являющуюся фосфатом. В соответствии с этим в предпочтительном варианте изобретения олигонуклеотид согласно изобретению содержит по меньшей мере одну группу.

Конкретные примеры межнуклеозидных связывающих групп, за исключением фосфата ($-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$), включают $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}^{\text{H}})-\text{O}-$, $\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_3)-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{NR}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{R})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{BH}_3)-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-$, $-\text{CH}_2-\text{NCH}_3-\text{O}-\text{CH}_2-$, где R^{H} представляет собой водород или C_{1-4} алкил.

Если межнуклеозидная связывающая группа является модифицированной, то указанная межнуклеозидная связывающая группа предпочтительно представляет собой фосфортиоатную группу ($-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$). В предпочтительном варианте изобретения все межнуклеозидные связывающие группы олигонуклеотидов согласно изобретению представляют собой фосфортиоат.

Конструкции специфических микроРНК.

В нижеследующей таблице приводятся примеры олигонуклеотидов согласно изобретению, а именно олигонуклеотидов, используемых в фармацевтических композициях, и для сравнения известных молекул.

мишень: hsa-miR-122a MIMAT0000421		SEQ ID
uggaugugugacaauugguuugu		SEQ ID NO 1
скринирован в клеточной линии HUH-7, экспрессирующей miR-122		
Олиго #, микроРНК-мишень, олигонуклеотидная последовательность	Конструкция	
3962:miR-122 5'- ACAACacaccattgtcacactCCA-3'	Полный комплемент, гэп	SEQ ID NO 11
3965:miR-122 5'- acaaacACCATTGTcacactcca-3'	Полный комплемент, блок	SEQ ID NO 12
3972:miR-122 5'- acAaaCacCatTgtCacActCca-3'	Полный комплемент, LNA_3	SEQ ID NO 13
3549 (3649):miR-122 5'- CcAttGTcaCaCtCC-3'	Новая конструкция	SEQ ID NO 14
3975:miR-122 5'-CcAttGTcaCACTCC-3'	Улучшенная новая конструкция	SEQ ID NO 15
3975':miR-122 5'-ATTGTcACACTCC-3'	ED - 13-мер	SEQ ID NO 16
3975'':miR-122 5'-TGTcACACTCC-3'	ED - 11-мер	SEQ ID NO 17
3549' (3649):miR-122 5' CC ^M AT ^M T ^M GTC ^M CA ^M CT ^M CC-3'	Новая конструкция - 2' МОЕ	SEQ ID NO 18
3549'' (3649):miR-122 5' CC ^F AT ^F T ^F GTC ^F CA ^F CT ^F CC-3'	Новая конструкция - 2' -фтор	SEQ ID NO 19
мишень: hsa-miR-19b MIMAT0000074		
ugugcaaaauccaugcaaaacuga		SEQ ID NO 2
скринирован в клеточной линии HeLa, экспрессирующей miR-19b		
Олиго #, микроРНК-мишень, олигонуклеотидная последовательность	Конструкция	
3963:miR-19b 5'- TCAGttttgcatggatttgCACA-3'	Полный комплемент, гэп	SEQ ID NO 20
3967:miR-19b 5'- tcagttTTGCATGGatttgcaca-3'	Полный комплемент, блок	SEQ ID NO 21
3973:miR-19b 5'- tcAgtTttGcaTggAttTgcAca-3'	Полный комплемент, LNA_3	SEQ ID NO 22
3560:miR-19b 5'-TgCatGGatTtGcAC-3'	Новая конструкция	SEQ ID NO 23
3976:miR-19b 5'-TgCaTGGatTTGcAC-3'	Улучшенная	SEQ ID NO 24

	новая конструкция	
3976':miR-19b 5'-CatGGaTTTGcAC-3'	ED - 13-мер	SEQ ID NO 25
3976'':miR-19b 5'-TGGaTTTGcAC-3'	ED - 11-мер	SEQ ID NO 26
3560':miR-19b 5'- TG ^M CA ^M T ^M GGA ^M T ^M TT ^M GC ^M AC-3'	Новая конструкция - 2'МОЕ	SEQ ID NO 27
3560'':miR-19b 5'- TG ^F CA ^F T ^F GGA ^F T ^F TT ^F GC ^F AC-3'	Новая конструкция - 2'МОЕ	SEQ ID NO 28
Мишень: hsa-miR-155 MIMAT0000646		
uuaaugcuaaucgugauagggg		SEQ ID NO 3
скринирован в клеточной линии 518A2, экспрессирующей miR-155		
Олиго #, микроРНК-мишень, олигонуклеотидная последовательность	Конструкция	
3964:miR-155 5'- CCCCtatcacgattagcatTAA-3'	Полный комплемент, гэпр	SEQ ID NO 29
3968:miR-155 5'- cccctaTCACGATTagcattaa-3'	Полный комплемент, блок	SEQ ID NO 30
3974:miR-155 5'- cCccTatCacGatTagCatTaa-3'	Полный комплемент, LNA_3	SEQ ID NO 31
3758: miR-155 5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'	Новая конструкция	SEQ ID NO 32
3818: miR-155 5'-TcAcGATtaGCAtTA-3'	Улучшенная новая конструкция	SEQ ID NO 33
3818': miR-155 5'-ACGATtAGCatTA-3'	ED - 13-мер	SEQ ID NO 34
3818'': miR-155 5'-GATtAGCaTTA-3'	ED - 11-мер	SEQ ID NO 35
3758': miR-155 5'- TC ^M AC ^M G ^M ATTA ^M GC ^M AT ^M TA-3'	Новая конструкция - 2'МОЕ	SEQ ID NO 36
3758'': miR-155 5'- TC ^F AC ^F G ^F ATT ^F A ^F GC ^F AT ^F TA-3'	Новая конструкция -	SEQ ID NO 37

	2'-фтор	
мишень: hsa-miR-21 MIMAT0000076		
uagcuuauacagacugauguuga		SEQ ID NO 4
miR-21 5'- TCAAcacagctctgataaGCTA - 3'	Полный комплемент, гэп	SEQ ID NO 38
miR-21 5'- tcaacaTCAGTCTGataagcta - 3'	Полный комплемент, блок	SEQ ID NO 39
miR-21 5'- tcAtcAtcAgtCtgAtaAGcTt - 3'	Полный комплемент, LNA_3	SEQ ID NO 40
miR-21 5'-TcAgtCTgaTaAgCT -3'	Новая конструкция	SEQ ID NO 41
miR-21 5'-TcAgtCTgaTAAgCT -3'-	Улучшенная новая конструкция	SEQ ID NO 42
miR-21 5'-AGTCTgATAAgCT -3'-	ED - 13-мер	SEQ ID NO 43
miR-21 5'-TCTgAtAAGCT -3'-	ED - 11-мер	SEQ ID NO 44
miR-21 5'-TC ^M AG ^M T ^M CTG ^M A ^M TA ^M AG ^M CT-3'	Новая конструкция - 2' МОЕ	SEQ ID NO 45
miR-21 5'-TC ^F AG ^F T ^F CTG ^F A ^F TA ^F AG ^F CT-3'	Новая конструкция - 2'-фтор	SEQ ID NO 46
мишень: hsa-miR-375 MIMAT0000728		
uuuguuucguucggcucgcguga		SEQ ID NO 5
miR-375 5'-TCTCgcgtgccgttcgttCTTT - 3'	Полный комплемент, гэп	SEQ ID NO 47
miR-375 5'- tctcgcGTGCCGTtcgttcttt - 3'	Полный комплемент, блок	SEQ ID NO 48
miR-375 5'-tcTcgCgtGccGttCgtTctTt - 3'	Полный комплемент, LNA_3	SEQ ID NO 49
miR-375 5'-GtGccGTtcGtTcTT 3'	Новая конструкция	SEQ ID NO 50
miR-375 5'-GtGcCGTtcGTTcTT 3'	Улучшенная новая конструкция	SEQ ID NO 51
miR-375 5'-GCCGTtCgTTCTT 3'	ED - 13-мер	SEQ ID NO 52
miR-375 5'-CGTTcGTTCTT 3'	ED - 11-мер	SEQ ID NO 53
miR-375 5'-GT ^M GC ^M C ^M GTT ^M C ^M GT ^M TC ^M TT 3'	Новая конструкция - 2' МОЕ	SEQ ID NO 54
miR-375 5'-GT ^F GC ^F C ^F GTT ^F C ^F GT ^F TC ^F TT 3'	Новая конструкция - 2'-фтор	SEQ ID NO 55

Прописные буквы без надстрочного индекса М или F обозначают остатки LNA. Строчные буквы обозначают ДНК, за исключением строчных букв, выделенных жирным шрифтом, которые означают РНК. Цитозины LNA могут быть, но необязательно, метилированными. Прописные буквы с надстрочным индексом М означают остатки 2'ОМЕ РНК, прописные буквы с надстрочным индексом F обозначают остатки 2'-фтор-ДНК, а строчные буквы обозначают ДНК. В одном из вариантов изобретения вышеописанные олигонуклеотиды могут иметь только фосфориотатные связи, но могут быть использованы олигонуклеотиды с другими нуклеотидными связями. В одном из вариантов изобретения все нуклеотиды имеют фосфодиэфирные связи. Считается, что для введения в головной/спинной мозг, предпочтительно, например, использовать олигонуклеотиды против miR-21, имеющие фосфодиэфирные связи.

В одном из вариантов изобретения олигонуклеотиды согласно изобретению могут иметь последовательность нуклеотидов в направлении 5'-3', выбранную из группы, состоящей из:

LdLddLLddLdLdLL (Новая конструкция)
 LdLdLLddLLdLdLL (Улучшенная новая конструкция)
 LMLMMLMMLMMLL (Новая конструкция - 2'ОМЕ)
 LMLMLLLMMLLLMMLL (Улучшенная новая конструкция- 2'ОМЕ)
 LFLFFLLFFLFLFL (Новая конструкция - 2'-фтор)
 LFLFLLLFFLLFLFL (Улучшенная новая конструкция- 2'-фтор)
 LddLddLddL(d)(d)(L)(d)(d)(L)(d) 'Каждый третий'
 dLddLddLdd(L)(d)(d)(L)(d)(d)(L) 'Каждый третий'
 ddLddLddLd(d)(L)(d)(d)(L)(d)(d) 'Каждый третий'
 LMMMLMML(M)(M)(L)(M)(M)(L)(M) 'Каждый третий'
 MLMMLMML(M)(M)(L)(M)(M)(L) 'Каждый третий'
 MMLMMLM(M)(L)(M)(M)(L)(M)(M) 'Каждый третий'
 LFFFLFFFL(F)(F)(L)(F)(F)(L)(F) 'Каждый третий'
 FLFFFLFF(L)(F)(F)(L)(F)(F)(L) 'Каждый третий'
 FFLFFFLF(F)(L)(F)(F)(L)(F)(F) 'Каждый третий'
 dLdLdLdL(d)(L)(d)(L)(d)(L)(d) 'Каждый второй'
 LdLdLdLd(d)(L)(d)(L)(d)(L)(d)(L) 'Каждый второй'
 MLMMLMML(M)(L)(M)(L)(M)(L)(M) 'Каждый второй'
 LMLMMLM(M)(L)(M)(L)(M)(L)(M)(L) 'Каждый второй'
 FLFLFLFL(F)(L)(F)(L)(F)(L)(F) 'Каждый второй'
 LFLFLFL(F)(L)(F)(L)(F)(L)(F)(L) 'Каждый второй'

где L = остаток LNA, d = остатки ДНК, M = 2'ОМЕ-РНК, F=2'-фтор, а остатки в скобках являются необязательными.

Конкретные примеры олигонуклеотидов согласно изобретению могут быть выбраны из группы, состоящей из

tgCatGgaTttGcaCa (SEQ ID NO 82), tgCatGgaTttGcaC (SEQ ID NO 83),
 CatGgaTttGcaC (SEQ ID NO 84), tGcAtGgAtTtGcAc (SEQ ID NO 85),
 cAtGgAtTtGcAc (SEQ ID NO 86), CatGGatTtGcAC (SEQ ID NO 87),
 TgCatGGatTtGcAC (SEQ ID NO 88), TgCaTgGaTtTgCaCa (SEQ ID NO 89),
 cCatTgtCacActCca (SEQ ID NO 90), cCatTgtAacTctCca (SEQ ID NO 91),
 ccAttGtcAcaCtcCa (SEQ ID NO 92), cCatTgtCacActCc (SEQ ID NO 93),
 atTgtCacActCc (SEQ ID NO 94), ccAttGtcAcaCtcC (SEQ ID NO 95),
 AttGtcAcaCtcC (SEQ ID NO 96), aTtGtCaCaCtCc (SEQ ID NO 97),
 AttGTcaCaCtCC (SEQ ID NO 98), CcAttGTcaCaCtCC (SEQ ID NO 99),
 CcaTtgTcacActcCa (SEQ ID NO 100), CCAttgtcacacTCCa (SEQ ID NO 101),
 tCacGatTagCatTaa (SEQ ID NO 102), aTcaCgaTtaGcaTta (SEQ ID NO 103),
 TcAcGaTtAgCaTta (SEQ ID NO 104), AtcAcGaTtAgCaTta (SEQ ID NO 105),
 gAgcCgaAcgAacAa (SEQ ID NO 106), gcCgaAcgAacAa (SEQ ID NO 107),
 GaGcCgAaCgAaCaA (SEQ ID NO 108) и GcCgAaCgAaCaA (SEQ ID NO 109);

где строчные буквы обозначают азотистое основание остатка ДНК, прописные буквы обозначают азотистое основание остатка LNA, а прописные буквы C обозначают ^{Me}C.

Следует отметить, что нуклеотидная конструкция LNA/ДНК в вышеописанных конкретных примерах может быть использована и в других олигонуклеотидах согласно изобретению.

Конъюгаты.

Настоящее изобретение также относится к конъюгатам, содержащим олигонуклеотид согласно изобретению.

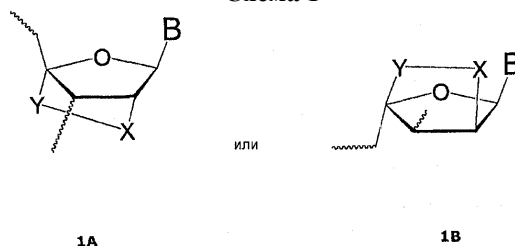
В одном из вариантов изобретения олигомерное соединение связано с лигандами/конъюгатами, которые могут быть использованы, например, для улучшения поглощения клетками антисмысловых олигонуклеотидов. Такое конъюгирование может быть осуществлено в концевых 5'/3'-ОН-положениях, однако лиганды могут также присутствовать у сахаров и/или оснований. В частности, фактором роста, с которым может быть конъюгирован антисмысловый олигонуклеотид, может быть трансферрин или фолат. Комплексы "трансферрин-полилизин-олигонуклеотид" или комплексы "фолат-полилизин-олигонуклеотид" могут быть получены так, чтобы они поглощались клетками, экспрессирующими высокие уровни рецептора трансферрина или фолата. Другими примерами конъюгатов/лигандов являются молекулы холестерина, дуплексные интеркалирующие агенты, такие как акридин, поли-L-лизин, "конце-эпирующие молекулы" с одной или несколькими резистентными к нуклеазе связывающими группами, такими как фосформонотиоат и т.п. Настоящее изобретение также относится к конъюгату, включающему описанное здесь соединение согласно изобретению и по меньшей мере одну не-нуклеотидную или не-полинуклеотидную молекулу, ковалентно связанную с указанным соединением. Следовательно, в одном из вариантов изобретения, относящемся к соединению согласно изобретению, которое состоит из описанной здесь конкретной нуклеиновой кислоты, указанное соединение может также включать по меньшей мере одну не-нуклеотидную или не-полинуклеотидную молекулу (например, не содержащую один или несколько нуклеотидов или нуклеотидных аналогов), ковалентно связанную с указанным соединением. Такая не-нуклеотидная молекула может, например, представлять собой или включать стерол, такой как холестерин.

Поэтому следует отметить, что олигонуклеотид согласно изобретению, такой как олигонуклеотид, используемый в фармацевтических (терапевтических) препаратах, может также содержать не-нуклеотидные компоненты, такие как конъюгаты, описанные в настоящем изобретении.

Остаток LNA.

В предпочтительном варианте изобретения остаток LNA имеет общую химическую структуру, представленную на схеме 1.

Схема 1



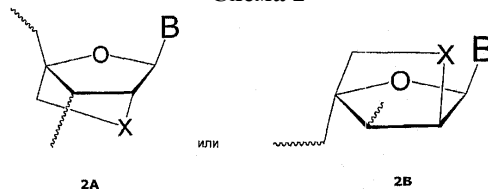
где X выбран из группы, состоящей из O, S и NR^{H} , где R^{H} представляет собой H или C_{1-4} алкил;

Y представляет собой $(-\text{CH}_2)_r$, где r равно целому числу 1-4; и

B представляет собой азотистое основание.

В предпочтительном варианте изобретения r равно 1 или 2, в частности 1, т.е. предпочтительный остаток LNA имеет химическую структуру, представленную на схеме 2.

Схема 2

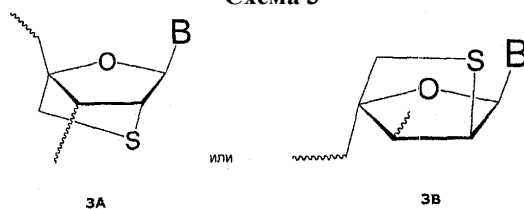


где X и B являются такими, как они определены выше.

В представляющем интерес варианте изобретения остатки LNA, включенные в олигонуклеотиды согласно изобретению, независимо выбраны из группы, состоящей из тимо-LNA-остатков, амино-LNA-остатков и окси-LNA-остатков.

Таким образом, тио-LNA-остаток может иметь химическую структуру, представленную на схеме 3.

Схема 3

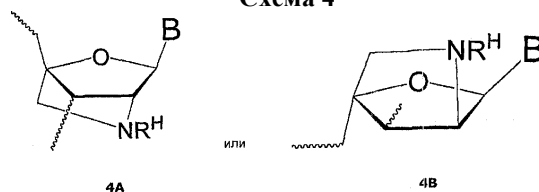


где В является таким, как он определен выше.

При этом предпочтительно, чтобы тио-LNA-остаток имел бета-D-форму, т.е. структуру, представленную на схеме 3А.

Аналогичным образом, аминок-LNA-остаток может иметь химическую структуру, представленную на схеме 4.

Схема 4

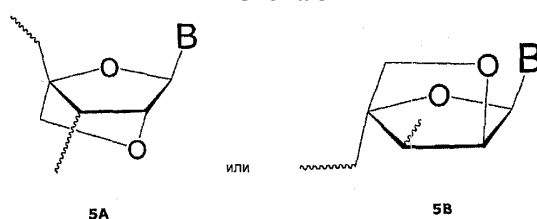


где В и R^H являются такими, как они определены выше.

При этом предпочтительно, чтобы аминок-LNA-остаток имел бета-D-форму, т.е. структуру, представленную на схеме 4А.

Окси-LNA-остаток может иметь химическую структуру, представленную на схеме 5.

Схема 5



где В является таким, как он определен выше.

При этом предпочтительно, чтобы окси-LNA-остаток имел бета-D-форму, т.е. структуру, представленную выше на схеме 5А.

Как указывалось выше, В представляет собой азотистое основание, которое может быть природным или неприродным. Конкретными примерами азотистых оснований являются аденин (А), цитозин (С), 5-метилцитозин (М^сС), изоцитозин, псевдоизоцитозин, гуанин (G), тимин (Т), урацил (U), 5-бром урацил, 5-пропинилурацил, 5-пропини-6,5-метилтиазолурацил, 6-аминопурин, 2-аминопурин, инозин, 2,6-диаминопурин, 7-пропин-7-деазааденин, 7-пропин-7-деазагуанин и 2-хлор-6-аминопурин.

Концевые группы.

Конкретными примерами концевых групп являются концевые группы, выбранные из группы, состоящей из водорода, азидо, галогена, циано, нитро, гидрокси, Prot-O-, Act-O-, меркапто, Prot-S-, Act-S-, C₁₋₆алкилтио, amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, моно- или ди(C₁₋₆алкил)амино, необязательно замещенного C₁₋₆алкокси, необязательно замещенного C₁₋₆алкила, необязательно замещенного C₂₋₆алкенила, необязательно замещенного C₂₋₆алкенилокси, необязательно замещенного C₂₋₆алкинила, необязательно замещенного C₂₋₆алкинилокси, монофосфата, включая защищенный монофосфат; монотиофосфата, включая защищенный монотиофосфат; дифосфата, включая защищенный дифосфат; дитиофосфата, включая защищенный дитиофосфат; трифосфата, включая защищенный трифосфат; тритиофосфата, включая защищенный тритиофосфат, где Prot представляет собой защитную группу для -OH, -SH и -NH(R^H), Act представляет собой активирующую группу для -OH, -SH и -NH(R^H), а R^H представляет собой водород или C₁₋₆алкил.

Примерами фосфатзащитных групп являются S-ацетилтиоэтил (SATE) и S-пивалоилтиоэтил (трет-бутил-SATE).

Другими примерами концевых групп являются ДНК-интеркалирующие агенты, фотохимически активные группы, термохимически активные группы, хелатообразующие группы, репортерные группы, лиганды, карбокси, сульфоно, гидроксиметил, Prot-O-CH₂-, Act-O-CH₂-, аминометил, Prot-N(R^H)-CH₂-, Act-N(R^H)-CH₂-, карбоксиметил, сульфометил, где Prot представляет собой защитную группу для -OH, -SH и -NH(R^H), Act представляет собой активирующую группу для -OH, -SH и -NH(R^H), а R^H представляет собой водород или C₁₋₆алкил.

Примерами защитных групп для групп -ОН и -SH являются замещенный тритил, такой как 4,4'-диметокситритилокси (DMT), 4-монометокситритилокси (MMT); тритилокси, необязательно замещенный 9-(9-фенил)ксантенилокси (пиксил), необязательно замещенный метокситетрагидропиранилокси (mthp); силилокси, такой как триметилсилилокси (TMS), триизопропилсилилокси (TIPS), трет-бутилдиметилсилилокси (TBDMS), триэтилсилилокси, фенилдиметилсилилокси; трет-бутиловые эфиры; ацетали (включающие две гидроксигруппы); ацилокси, такие как ацетил или замещенные галогеном ацетилы, например хлорацетилокси или фторацетилокси, изобутирилокси, пивалоилокси, бензоилокси и замещенные бензоилы, метоксиметилокси (MOM), бензиловые эфиры или замещенные бензиловые эфиры, такие как 2,6-дихлорбензилокси (2,6-Cl₂Bzl). Кроме того, если Z или Z* представляют собой гидроксил, то они могут быть защищены путем присоединения к твердому носителю, необязательно, посредством линкера.

Примерами аминовых защитных групп являются флуоренилметоксикарбониламино (Fmoc), трет-бутилоксикарбониламино (BOC), трифторацетиламино, аллилоксикарбониламино (alloc, AOC), Z-бензилоксикарбониламино (Cbz), замещенный бензилоксикарбониламино, такой как 2-хлорбензилоксикарбониламино (2-ClZ), монометокситритиламино (MMT), диметокситритиламино (DMT), фталоиламино и 9-(9-фенил)ксантениламино (пиксил).

Активирующая группа предпочтительно опосредует связывание с другими остатками и/или с нуклеотидными мономерами, и после завершения связывания активирующая группа обычно превращается в межнуклеозидную связь. Примерами таких активирующих групп являются необязательно замещенный О-фосфорамидит, необязательно замещенный О-фосфотриэфир, необязательно замещенный О-фосфодиэфир, необязательно замещенный Н-фосфонат и необязательно замещенный О-фосфонат. В контексте настоящего изобретения термин "фосфорамидит" означает группу формулы -P(OR^x)-N(R^y)₂, где R^x означает необязательно замещенную алкильную группу, например метил, 2-цианоэтил или бензил, а каждый из R^y означает необязательно замещенные алкильные группы, например этил или изопропил, или группа -N(R^y)₂ образует морфолиногруппу (-N(CH₂CH₂)₂O). R^x предпочтительно, означает 2-цианоэтил, а два R^y являются предпочтительно идентичными и означают изопропил. В соответствии с этим особенно предпочтительным фосфорамидитом является N,N-диизопропил-О-(2-цианоэтил)-фосфорамидит.

Наиболее предпочтительными концевыми группами являются гидроксиды, меркапто и амино, в частности гидроксиды.

Терапия и фармацевтические композиции

Как указывалось выше, олигонуклеотиды согласно изобретению входят в состав соответствующих лекарственных средств с улучшенными свойствами. Для получения эффективных и безопасных лекарственных средств необходима тонкая регуляция различных параметров, таких как аффинность/специфичность, стабильность в биологических жидкостях, поглощение клетками, механизм действия, фармакокинетические свойства и токсичность.

В соответствии с этим в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей олигонуклеотид согласно изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или адъювант. Указанным носителем предпочтительно является физиологический раствор или забуференный физиологический раствор.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду согласно изобретению, используемому в качестве лекарственного препарата.

Следует отметить, что доза зависит от тяжести патологического состояния, подвергаемого лечению, и его отзывчивости на такое лечение, а также от конкретного курса лечения, которое проводят от нескольких дней до нескольких месяцев или до тех пор, пока такое лечение не даст нужный эффект или не будет достигнуто ослабление симптомов указанного патологического состояния. Оптимальная схема введения доз может быть определена исходя из измерения уровня аккумуляции лекарственного средства в организме пациента. Оптимальные дозы могут варьироваться в зависимости от относительной эффективности отдельных олигонуклеотидов. В основном такая доза может быть определена исходя из EC₅₀, которая, по оценкам, проведенным на животных-моделях *in vitro* и *in vivo*, является эффективной. В общих чертах, доза составляет от 0,01 мкг до 1 г/кг массы тела и может быть введена один или несколько раз в день, в неделю, в месяц или год или даже один раз в каждые 2-10 лет либо путем непрерывного вливания в течение периода времени от нескольких часов до нескольких месяцев. Частота введения дозы может быть оценена исходя из установленного времени присутствия лекарственного средства в организме и от концентраций лекарственного средства в физиологических жидкостях или в тканях. После успешного лечения пациенту может быть назначена поддерживающая терапия в целях предупреждения рецидивов указанного патологического состояния.

Фармацевтические композиции.

Как указывалось выше, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один олигонуклеотид согласно изобретению в качестве активного ингредиента. Следует отметить, что фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать, но необязательно, фармацевтический носитель и что указанная фармацевтическая композиция может содержать, но необязательно, другие соединения, такие как химиотерапевтические соединения, противовоспалительные соединения, противовирусные соединения и/или иммуномодулирующие соединения.

Олигонуклеотиды согласно изобретению могут быть использованы в чистом виде или в форме различных фармацевтически приемлемых солей. Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемые соли" означает соли, сохраняющие нужную биологическую активность идентифицированных здесь олигонуклеотидов и обладающие минимальной нежелательной токсичностью. Неограничивающими примерами таких солей могут быть соли, образованные органическими аминокислотами, и основно-аддитивные соли, образованные катионами металлов, таких как цинк, кальций, висмут, барий, магний, алюминий, медь, кобальт, никель, кадмий, натрий, калий и т.п., или соли, образованные катионами аммиака, N,N-дибензилэтилен-диамина, D-глюкозамина, тетраэтиламмония или этилендиамина.

В одном из вариантов изобретения олигонуклеотид может иметь форму пролекарства. Олигонуклеотиды образуются отрицательно заряженными ионами. Вследствие липофильной природы клеточных мембран поглощение олигонуклеотидов клетками, по сравнению с нейтральными или липофильными эквивалентами, снижается. Такую проблему полярности можно решить методом, предусматривающим использование пролекарств (см., например, Crooke, R.M. (1998) in Crooke, S.T. *Antisense research and Application*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, vol. 131, p. 103-140).

Частью приготовленного лекарственного средства могут быть фармацевтически приемлемые связывающие агенты и адъюванты.

Примеры методов доставки описанных здесь терапевтических средств, а также подробное описание фармацевтических препаратов и солей можно найти, например, в предварительных заявках на патенты США 60/838710 и 60/788995, которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки, и в заявке на патент Дании РА 200600615, которая также вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Фармацевтическими композициями согласно изобретению являются, но не ограничиваются ими, растворы, эмульсии и препараты, содержащие липосомы. Такие композиции могут быть приготовлены из различных компонентов, которые представляют собой, но не ограничиваются ими, предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Доставка лекарственного средства в опухолевую ткань может быть улучшена путем применения опосредующих такую доставку носителей, включая, но не ограничиваясь ими, катионные липосомы, циклодекстрины, производные порфирина, дендримеры с разветвленной цепью, полиэтилениминовые полимеры, наночастицы и микросферы (Dass C.R. J. Pharm. Pharmacol. 2002; 54(1):3-27). Фармацевтические композиции согласно изобретению, которые могут присутствовать в основном в виде унифицированной лекарственной формы, могут быть приготовлены стандартными методами, хорошо известными специалистам-фармацевтам. Такие методы включают стадию взаимодействия активных ингредиентов с фармацевтическим(ими) носителем(ями) или наполнителем(ями). В общих чертах, такие композиции приготавливают путем равномерного и тщательного смешивания активных ингредиентов с жидкими носителями, или тонкоизмельченными твердыми носителями, или с теми и другими с последующим формованием, если это необходимо, нужного продукта. Композиции согласно изобретению могут быть приготовлены в виде любой из многих возможных лекарственных форм, таких как, но не ограничивающихся ими, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели и суппозитории. Композиции согласно изобретению могут быть также приготовлены в виде суспензий в водных, безводных или в смешанных средах. Водные суспензии могут также содержать вещества, повышающие вязкость такой суспензии, и такими веществами являются, например, натрийсодержащая карбоксиметилцеллюлоза, сорбит и/или декстран. Такая суспензия может также содержать стабилизаторы. Соединения согласно изобретению могут быть также конъюгированы с активными лекарственными веществами, например с аспирином, ибупрофеном, серосодержащими лекарственными средствами, антидиабетическими лекарственными средствами, антибактериальными лекарственными средствами или антибиотиками.

В другом варианте изобретения композиции согласно изобретению могут содержать одно или несколько олигонуклеотидных соединений, нацеленных на первую микроРНК, и одно или несколько дополнительных олигонуклеотидных соединений, нацеленных на вторую микроРНК-мишень. Указанные два или более объединенных соединений могут быть использованы вместе или отдельно.

Описанные здесь соединения могут быть использованы в различных терапевтических целях, указанных выше. В общих чертах, терапевтические методы согласно изобретению включают введение терапевтически эффективного количества олигонуклеотида млекопитающему, в частности человеку. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим (a) одно или несколько соединений согласно изобретению и (b) одно или несколько химиотерапевтических средств. Такие химиотерапевтические средства, при их использовании с соединениями согласно изобретению, могут быть введены отдельно, последовательно или в комбинации с одним или не-

сколькими другими указанными химиотерапевтическими средствами, или в комбинации с лучевой терапией. Все химиотерапевтические средства, известные специалистам, вводят в качестве комбинированной терапии вместе с соединением согласно изобретению. Другими активными средствами, такими как противовоспалительные лекарственные средства, являются, но не ограничиваются ими, нестероидные противовоспалительные средства и кортикостероиды, противовирусные лекарственные средства и иммуномодулирующие лекарственные средства, которые могут быть также объединены в композиции согласно изобретению. Два или более объединенных соединений могут быть использованы вместе или отдельно.

Примерами показаний к лечению фармацевтическими композициями согласно изобретению могут служить следующие заболевания.

микроРНК	Возможные медицинские показания
miR-21	Глиобластома, рак молочной железы
miR-122	Гиперхолестеринемия, гепатит С, гемохроматоз
miR-19b	Лимфома и опухоли других типов
miR-155	Лимфома, рак молочной железы и рак легких
miR-375	Диабет, метаболические расстройства
miR-181	Миобластная дифференциация, аутоиммунные расстройства

Было показано, что мРНК гена-супрессора опухоли, тропомизина 1 (TPM1), является мишенью miR-21. Кроме того, было показано, что мРНК миотропина (mtrn) является мишенью miR-375.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида согласно изобретению в целях приготовления лекарственного препарата для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии и гиперлипидемии; рака, глиобластомы, рака молочной железы, лимфомы, рака легких; диабета, метаболических расстройств; миобластной дифференциации и иммунных расстройств.

Настоящее изобретение также относится к олигонуклеотидам согласно изобретению, которые могут быть использованы для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии и гиперлипидемии; рака, глиобластомы, рака молочной железы, лимфомы, рака легких; диабета, метаболических расстройств; миобластной дифференциации и иммунных расстройств.

Настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием или состоянием, выбранным из группы, состоящей из атеросклероза, гиперхолестеринемии и гиперлипидемии; рака, глиобластомы, рака молочной железы, лимфомы, рака легких; диабета, метаболических расстройств; миобластной дифференциации и иммунных расстройств, где указанный способ включает стадию введения олигонуклеотида или фармацевтической композиции согласно изобретению индивидууму, нуждающемуся в таком лечении.

Рак.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата в целях приготовления лекарственного препарата для лечения рака. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики рака, где указанный способ включает введение олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата или фармацевтической композиции согласно изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

Таковыми раковыми заболеваниями могут быть лимфорегикулярная неоплазия, лимфобластный лейкоз, опухоли головного мозга, опухоли желудка, плазмацитомы, множественная миелома, лейкоз, опухоли соединительных тканей, лимфомы и солидные опухоли.

Соединение настоящего изобретения или его конъюгат могут быть использованы в целях приготовления лекарственного препарата для лечения рака и являются подходящими для лечения рака в форме солидной опухоли. Аналогичным образом, описанный здесь способ может быть подходящим для лечения рака в форме солидной опухоли.

Кроме того, указанной раковой опухолью, подходящей для такого лечения, является карцинома. Карциному обычно выбирают из группы, состоящей из злокачественной меланомы, базально-клеточной карциномы, карциномы яичника, карциномы молочной железы, немелкоклеточного рака легких, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рецидивирующего поверхностного рака мочевого пузыря, карциномы желудка, карциномы предстательной железы, карциномы поджелудочной железы, карциномы легких, карциномы шейки матки, дисплазии шейки матки, папилломатоза носоглотки, карциномы толстой кишки, карциномы прямой и ободочной кишки и карциноидных опухолей. Чаше, указанную карциному выбирают из группы, состоящей из злокачественной меланомы, немелкоклеточного рака легких, карциномы молочной железы, карциномы толстой кишки и почечно-клеточной карциномы. Злокачественную меланому обычно выбирают из группы, состоящей из поверхностно распространяющейся меланомы, нодулярной меланомы, злокачественного лентиго, акральной меланомы, амеланотиче-

ской меланомы и десмопластической меланомы.

Альтернативно, подходящим раковым заболеванием может быть саркома. Саркома обычно имеет форму, выбранную из группы, состоящей из остеосаркомы, саркомы Юинга, хондросаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, фибросаркомы и саркомы Капоши.

Альтернативно, подходящим раковым заболеванием является глиома.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к использованию олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата в целях приготовления лекарственного препарата для лечения рака, где указанный лекарственный препарат также содержит химиотерапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из аденокортикостероидов, таких как преднизон, дексаметазон или декадрон; альтретамина (гексалена, гексаметилмеламина (HMM)); амифостина (этиола); аминоклотиетимида (цитадрена); амсакрина (M-AMSA); анастрозола (аримидекса); андрогенов, таких как тестостерон; аспарагиназы (элспара); бациллы Кальметта-Герена; бикалутамида (казодекса); блеомицина (бленоксана); бусульфана (милерана); карбоплатина (параплатина); кармустина (BCNU, BiCNU); хлорамбуцила (лейкерана); хлордезоксиаденозина (2-CDA, кладрибина, лейстатина); цисплатина (платинола); арабинозида цитозина (цитарабина); дакарбазина (DTIC); дактиномицина (актиномицина-D, космогена); даунорубицина (церубидина); доцетаксела (таксотера); доксорубицина (адриномицина); эпирубицина; эстрамустина (эмцита); эстрогенов, таких как диэтилстильбестрол (DES); этопсиды (VP-16, вепезид, этопозоса); флударабина (флудары); флутамида (эйлексина); 5-FUDR (флосуридина); 5-фторурацила (5-FU); гемцитабина (гемзара); гозерелина (зодалекса); герцептина (трастузумаба); гидроксимочевина (гидреи); идарубицина (идамицина); ифосфамида; IL-2 (пролейкина, альдеслейкина); интерферона-альфа (интрона А, роферона А); иринотекана (камптозара); лейпролида (лупрона); левамизола (эргамизола); ломустина (CCNU); мехлоретамин (мустаргена, азотного аналога горчичного газа); мелфалана (алкерана); меркаптопурина (пуринетол, 6-MP); метотрексат (мексат); митомицина-С (мутамицина); митоксантрона (новантрона); октреотида (сандостатина); пентостатина (2-дезоксикоформина, нипента); пликамицина (митрамицина, митрацина); прокарбазина (матулана); стрептозоцина; тамоксифина (нолвадекса); таксола (паклитаксела); тенипозид (вумона, VM-26); тиотепы; топотекана (гикамтина); третиноина (везаноина, полностью трансретиноевой кислоты); винбластин (валбана); винкристин (онковина) и винорелбидин (навелбидин). В соответствии с этим другое химиотерапевтическое средство выбирают из таксанов, таких как таксол, паклитаксел или доцетаксел.

Аналогичным образом, настоящее изобретение также относится к использованию олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата в целях приготовления лекарственного препарата для лечения рака, где указанное лечение также включает введение другого химиотерапевтического средства, выбранного из группы, состоящей из аденокортикостероидов, таких как преднизон, дексаметазон или декадрон; альтретамина (гексалена, гексаметилмеламина (HMM)); амифостина (этиола); аминоклотиетимида (цитадрена); амсакрина (M-AMSA); анастрозола (аримидекса); андрогенов, таких как тестостерон; аспарагиназы (элспара); бациллы Кальметта-Герена; бикалутамида (казодекса); блеомицина (бленоксана); бусульфана (милерана); карбоплатина (параплатина); кармустина (BCNU, BiCNU); хлорамбуцила (лейкерана); хлордезоксиаденозина (2-CDA, кладрибина, лейстатина); цисплатина (платинола); арабинозида цитозина (цитарабина); дакарбазина (DTIC); дактиномицина (актиномицина-D, космогена); даунорубицина (церубидина); доцетаксела (таксотера); доксорубицина (адриномицина); эпирубицина; эстрамустина (эмцита); эстрогенов, таких как диэтилстильбестрол (DES); этопсиды (VP-16, вепезид, этопозоса); флударабина (флудары); флутамида (эйлексина); 5-FUDR (флосуридина); 5-фторурацила (5-FU); гемцитабина (гемзара); гозерелина (зодалекса); герцептина (трастузумаба); гидроксимочевина (гидреи); идарубицина (идамицина); ифосфамида; IL-2 (пролейкина, альдеслейкина); интерферона-альфа (интрона А, роферона А); иринотекана (камптозара); лейпролида (лупрона); левамизола (эргамизола); ломустина (CCNU); мехлоретамин (мустаргена, азотного аналога горчичного газа); мелфалана (алкерана); меркаптопурина (пуринетол, 6-MP); метотрексат (мексат); митомицина-С (мутамицина); митоксантрона (новантрона); октреотида (сандостатина); пентостатина (2-дезоксикоформина, нипента); пликамицина (митрамицина, митрацина); прокарбазина (матулана); стрептозоцина; тамоксифина (нолвадекса); таксола (паклитаксела); тенипозид (вумона, VM-26); тиотепы; топотекана (гикамтина); третиноина (везаноина, полностью трансретиноевой кислоты); винбластин (валбана); винкристин (онковина) и винорелбидин (навелбидин). В соответствии с этим указанное лечение также включает введение другого химиотерапевтического средства, выбранного из таксанов, таких как таксол, паклитаксел или доцетаксел.

Альтернативно, настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, где указанный способ включает введение олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата или фармацевтической композиции согласно изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении, а также введение другого химиотерапевтического средства. Такой способ может включать введение дополнительного химиотерапевтического средства, конъюгированного с соединением согласно изобретению и присутствующего в фармацевтической композиции или вводимого в виде отдельного препарата.

Инфекционные заболевания.

Считается, что соединения согласно изобретению могут быть использованы для лечения инфекционных заболеваний широкого ряда, таких как дифтерия, столбняк, коклюш, полиомиелит, гепатит В, гепатит С, инфекция, вызываемая *Nemophilus influenza*, корь, паротит и коревая краснуха.

Олигонуклеотид Hsa-miR-122 показан для лечения инфекций, вызываемых вирусом гепатита С, а, по существу, все олигонуклеотиды согласно изобретению, направленные против miR-122, могут быть использованы для лечения инфекций, вызываемых вирусом гепатита С.

В соответствии с этим в еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата в целях приготовления лекарственного средства для лечения инфекционного заболевания, а также к способу лечения инфекционного заболевания, включающему введение олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата или фармацевтической композиции согласно изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

Воспалительные заболевания.

Воспалительный ответ является главным механизмом защиты организма от поражения инфекционными агентами, такой механизм также играет определенную роль в патогенезе многих острых и хронических заболеваний, включая аутоиммунные расстройства. Несмотря на усилия, предпринимаемые в последнее время для борьбы с патогенами, все еще существует возможность возникновения "высышек" воспалительных заболеваний, которые могут иметь тяжелые последствия. А поэтому часто возникает необходимость подавлять симптомы воспалений путем введения противовоспалительных лекарственных средств. Воспаление представляет собой сложный процесс, обычно инициируемый поражением ткани, в основе которого лежит активация большого числа ферментов, увеличение проницаемости сосудов и экстравазация жидкостей крови, миграция клеток и высвобождение химических медиаторов, и все эти факторы вызывают как разрушение, так и репарацию пораженной ткани.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата в целях приготовления лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания, а также к способу лечения воспалительного заболевания, где указанный способ включает введение олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата или фармацевтической композиции согласно изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

В одном из предпочтительных вариантов изобретения указанным воспалительным заболеванием является ревматическое заболевание и/или заболевания соединительной ткани, такие как ревматоидный артрит, системная красная волчанка (СКВ) или волчанка, склеродермия, полимиозит, воспалительное заболевание кишечника, дерматомиозит, язвенный колит, болезнь Крона, васкулит, псориатический артрит, эксфолиативный псориатический дерматит, вульгарная пузырчатка и синдром Сьегрена, в частности воспалительное заболевание кишечника и болезнь Крона.

Альтернативно, воспалительным заболеванием может быть неревматическое воспаление, такое как бурсит, синовит, капсулит, тендинит и/или другие воспалительные поражения при бытовых и/или спортивных травмах.

Нарушения метаболизма.

Нарушение метаболизма представляет собой расстройство, вызываемое аккумуляцией химических веществ, продуцируемых в организме. Такие расстройства обычно представляют серьезную опасность, а в некоторых случаях могут приводить к летальному исходу. В других случаях такие расстройства могут замедлять физическое развитие или вызывать умственную отсталость. У большинства детей, страдающих такими расстройствами, сначала не наблюдается явных признаков заболевания. Часто такие расстройства выявляются при соответствующем обследовании новорожденных. При ранней диагностике и соответствующей терапии такие метаболические расстройства часто поддаются эффективному лечению.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата в целях приготовления лекарственного препарата для лечения метаболического расстройства, а также к способу лечения такого расстройства, где указанный способ включает введение олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата или фармацевтической композиции согласно изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

В одном из предпочтительных вариантов изобретения указанное метаболическое расстройство выбирают из группы, состоящей из амилоидоза, биотинидоза, наследственного заболевания у мужчин, передающегося по менделевскому механизму (он-лайн база данных о наследовании заболевания по закону Менделя, OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man), синдрома Криглера-Найяра, диабета, болезни Фабри (Fabry Support & Information Group), расстройств, вызываемых нарушением окисления жирных кислот, галактоземии, дефицита глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (G6PD), ацидурии, вызываемой чрезмерной экскрецией глутаровой кислоты (Международная организация по исследованию ацидемии, вызываемой увеличением содержания глутаровой кислоты), глутаровой ацидемии типа I, глутаровой ацидемии типа II, F-HYPDRR - наследственной гипофосфатемии, витамин D-резистентного рахита, болезни Краббе, дефицита длинных цепей гидроксиацил-CoA-дегидрогеназы 3 (LCHAD), заболевания группы маннозидозов, болезни кленового сиропа, митохондриальных расстройств, синдромов мукополисахаридоза: болезни Нимана-Пика, органической ацидемии, фенилкетонурии (PKU), болезни Помпе,

порфиринурии, метаболического синдрома, гиперлипидемии и наследственных нарушений липидного обмена, триметиламинурии: синдрома, характеризующегося неприятным запахом тела, отдающим рыбой, и нарушения цикла мочевины (орнитинового цикла).

Заболевания печени.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата в целях приготовления лекарственного препарата для лечения заболевания печени, а также к способу лечения заболевания печени, где указанный способ включает введение олигонуклеотида согласно изобретению или его конъюгата или фармацевтической композиции согласно изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

В одном из предпочтительных вариантов изобретения заболевание печени выбрано из группы, состоящей из билиарной атрезии, синдрома Алажиля, заболевания, ассоциированного с присутствием альфа-1-антитрипсина, тирозинемии, гепатита новорожденных и болезни Вильсона.

Другие применения.

Олигонуклеотиды согласно изобретению могут быть использованы в исследованиях в качестве тест-реагентов для диагностики, терапии и профилактики заболеваний. В исследовании указанный олигонуклеотид может быть использован для специфического ингибирования синтеза генов-мишеней в клетках и у экспериментальных животных, и такое его применение облегчает проведение функционального анализа данной мишени или оценку ее эффективности в качестве мишени для терапевтического лечения. В диагностике указанные олигонуклеотиды могут быть использованы для детектирования и количественной оценки экспрессии данной мишени в клетках и в тканях с помощью нозерн-блот-анализа, гибридизации *in situ* или аналогичными методами. В терапии животному или человеку с подозрением на заболевание или расстройство, которое может быть подвергнуто лечению путем модуляции экспрессии мишени, может быть назначено лечение, включающее введение олигонуклеотидных соединений согласно изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения животного, в частности мыши и крысы, и человека с подозрением на заболевание или состояние или человека с предрасположенностью к заболеванию или состоянию, ассоциированному с экспрессией данной мишени, где указанный способ включает введение терапевтически или профилактически эффективного количества одного или нескольких олигонуклеотидных соединений или композиций согласно изобретению.

Терапевтическое применение олигонуклеотидов, нацеленных против miR-122a.

В разделе "Примеры" продемонстрировано, что олигонуклеотид LNA-antimiR™, такой как SPC3372, нацеленный на miR-122a, способствует снижению уровней холестерина в плазме. Поэтому в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению вышеописанных олигонуклеотидов, нацеленных на miR-122a-мишень, в качестве лекарственного средства.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к применению вышеописанных олигонуклеотидов, нацеленных на miR-122a-мишень, в целях приготовления лекарственного препарата для снижения повышенных уровней холестерина в плазме. Для специалиста-медика очевидно, что повышенный уровень холестерина в плазме является нежелательным фактором, поскольку он приводит к увеличению риска возникновения различных патологий, например атеросклероза.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению вышеописанных олигонуклеотидов, нацеленных на miR-122a-мишень, в целях позитивной регуляции уровней мРНК Nrdg3, Aldo A, Bckdk или CD320.

Другие варианты осуществления

Нижеследующие варианты настоящего изобретения могут быть объединены с другими его вариантами, описанными в настоящем изобретении.

1. Олигонуклеотид, имеющий длину 12-26 нуклеотидов и содержащий коровую ДНК-последовательность, в положениях 2-7 или в положениях 3-8 от 3'-конца, acgttt, где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA, или его конъюгат.

2. Олигонуклеотид, имеющий длину 12-26 нуклеотидов и содержащий коровую ДНК-последовательность, в положениях 2-7 или в положениях 3-8 от 3'-конца, tcсаса, где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA, или его конъюгат.

3. Олигонуклеотид, имеющий длину 12-26 нуклеотидов и содержащий коровую ДНК-последовательность, в положениях 2-7 или в положениях 3-8 от 3'-конца, ttacga, где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA, или его конъюгат.

4. Олигонуклеотид, имеющий длину 12-26 нуклеотидов и содержащий коровую ДНК-последовательность в положениях 2-7 или в положениях 3-8 от 3'-конца, асааgс, где по меньшей мере один, например один, а предпочтительно по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA, или его конъюгат.

5. Олигонуклеотид по любому из вариантов 1-4 или его конъюгат, где по меньшей мере два, например два или три, остатка ДНК в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 от 3'-конца были заменены соответствующими остатками LNA и где указанные остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК.

6. Олигонуклеотид согласно варианту 5 или его конъюгат, в котором число смежных остатков ДНК в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 от 3'-конца составляет максимум два.

7. Олигонуклеотид согласно варианту 6 или его конъюгат, в котором каждый второй нуклеотид в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 от 3'-конца представляет собой остаток LNA.

8. Олигонуклеотид согласно варианту 6 или его конъюгат, в котором каждый третий нуклеотид в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 от 3'-конца представляет собой остаток LNA.

9. Олигонуклеотид согласно варианту 6 или его конъюгат, в котором тип замены нуклеотидов в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 от 3'-конца выбран из группы, состоящей из xxXxxX, xXxxXx, xXxxXxx, xXxXxx, XxxXxx, xXxXxxX, XxXxxX, XxxXxxX и XxXxxX, где "X" означает остаток LNA, а "x" означает остаток ДНК.

10. Олигонуклеотид согласно варианту 9 или его конъюгат, в котором тип замены нуклеотидов в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 от 3'-конца выбран из группы, состоящей из xxXxxX, xXxxXx, XxxXxx, xXxxXxx и XxXxxX, где "X" обозначает остаток LNA, а "x" обозначает остаток ДНК.

11. Олигонуклеотид согласно варианту 1 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца, acgttta, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

12. Олигонуклеотид согласно варианту 2 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца, stcasac, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

13. Олигонуклеотид согласно варианту 3 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца, ttacgat, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

14. Олигонуклеотид согласно варианту 4 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца, asaagca, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

15. Олигонуклеотид согласно любому из вариантов 11-14 или его конъюгат, где по меньшей мере два, например два, три или четыре, остатка ДНК в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца были заменены соответствующими остатками LNA и где указанные остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК.

16. Олигонуклеотид согласно варианту 15 или его конъюгат, в котором число смежных остатков ДНК в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца составляет максимум два.

17. Олигонуклеотид согласно варианту 16 или его конъюгат, в котором каждый второй нуклеотид в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца представляет собой остаток LNA.

18. Олигонуклеотид согласно варианту 16 или его конъюгат, в котором каждый третий нуклеотид в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца представляет собой остаток LNA.

19. Олигонуклеотид согласно варианту 16 или его конъюгат, в котором тип замены нуклеотидов в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца выбран из группы, состоящей из xxXxxX, xXxxXxx, xXxxXxx, xXxxXxxX, xXxxXxxX, xXxxXxxX, xXxxXxxX, XxxXxxX, XxxXxxX, XxXxxX, XxXxxX и XxXxxX, где "X" обозначает остаток LNA, а "x" обозначает остаток ДНК.

20. Олигонуклеотид согласно варианту 16 или его конъюгат, в котором тип замены нуклеотидов в положениях 1-7, 2-8 или 3-9 от 3'-конца выбран из группы, состоящей из xxXxxX, xXxxXxx, XxxXxxX, xXxxXxxX, XxXxxX и XxXxxX, где "X" обозначает остаток LNA, а "x" обозначает остаток ДНК.

21. Олигонуклеотид согласно варианту 11 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца, acgttttag, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

22. Олигонуклеотид согласно варианту 12 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца, *ctcacact*, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

23. Олигонуклеотид согласно варианту 13 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца, *ttacgatt*, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

24. Олигонуклеотид согласно варианту 14 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца, *asaagcaa*, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три или четыре, остатка ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

25. Олигонуклеотид согласно любому из вариантов 21-24 или его конъюгат, где по меньшей мере два, например два, три или четыре, остатка ДНК в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца были заменены соответствующими остатками LNA и где указанные остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК.

26. Олигонуклеотид согласно варианту 25 или его конъюгат, в котором число смежных остатков ДНК в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца составляет максимум два.

27. Олигонуклеотид согласно варианту 26 или его конъюгат, в котором каждый второй нуклеотид в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца представляет собой остаток LNA.

28. Олигонуклеотид согласно варианту 26 или его конъюгат, в котором каждый третий нуклеотид в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца представляет собой остаток LNA.

29. Олигонуклеотид согласно варианту 26 или его конъюгат, в котором тип замены нуклеотидов в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца выбран из группы, состоящей из *xxXxxXxx*, *xxXxxXxX*, *xxXxXxxX*, *xxXxXxXx*, *xXxxXxxX*, *xXxxXxXx*, *xXxXxxXx*, *xXxXxXxx*, *XxxXxxXx*, *XxxXxXxx*, *XxXxxXxx*, *XxXxXxxX*, *XxXxxXxX*, *XxxXxXxX* и *XxXxXxXx*, где "X" обозначает остаток LNA, а "x" обозначает остаток ДНК.

30. Олигонуклеотид согласно варианту 29 или его конъюгат, в котором тип замены нуклеотидов в положениях 1-8, 2-9 или 3-10 от 3'-конца выбран из группы, состоящей из *xxXxxXxx*, *xXxxXxxX*, *XxxXxxXx*, *xXxXxXxx*, *XxXxXxxX* и *XxXxXxxX*, где "X" обозначает остаток LNA, а "x" обозначает остаток ДНК.

31. Олигонуклеотид согласно варианту 21 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца, *acgtttagg*, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три, еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, например четыре или пять, остатков ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

32. Олигонуклеотид согласно варианту 22 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца, *ctcacactg*, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три, еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, например четыре или пять, остатков ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

33. Олигонуклеотид согласно варианту 23 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца, *ttacgatta*, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три, еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, например четыре или пять, остатков ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

34. Олигонуклеотид согласно варианту 24 или его конъюгат, имеющий последовательность ДНК в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца, *asaagcaag*, где по меньшей мере один, например один, предпочтительно по меньшей мере два, например два, более предпочтительно по меньшей мере три, например три, еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, например четыре или пять, остатков ДНК в указанной последовательности были заменены соответствующими остатками LNA.

35. Олигонуклеотид согласно любому из вариантов 21-24 или его конъюгат, где по меньшей мере два, например два, три, четыре или пять, остатка ДНК в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца были заменены соответствующими остатками LNA и где указанные остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК.

36. Олигонуклеотид согласно варианту 35 или его конъюгат, в котором число смежных остатков ДНК в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца составляет максимум два.

37. Олигонуклеотид согласно варианту 36 или его конъюгат, в котором каждый второй нуклеотид в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца представляет собой остаток LNA.

38. Олигонуклеотид согласно варианту 36 или его конъюгат, в котором каждый третий нуклеотид в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца представляет собой остаток LNA.

39. Олигонуклеотид согласно варианту 36 или его конъюгат, в котором тип замены нуклеотидов в положениях 1-9, 2-10 или 3-11 от 3'-конца выбран из группы, состоящей из xxXxxXxxX, xxXxxXxXx, xxXxXxxXx, xxXxXxXxx, xXxxXxxXx, xXxxXxXxx, xXxXxxXxx, XxxXxxXxx, xxXxXxXxX, xXxxXxXxX, xXxXxxXxX, xXxXxxXxxX, XxxXxxXxxX, XxxXxxXxxX, XxxXxxXxxX, XxxXxxXxxX, XxXxxXxxX, XxXxxXxxX, XxXxxXxxX и XxXxxXxxX, где "X" обозначает остаток LNA, а "x" обозначает остаток ДНК.

40. Олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов или его конъюгат, где указанный олигонуклеотид имеет длину от 12 до 24 нуклеотидов, например от 12 до 22 нуклеотидов, предпочтительно от 12 до 20 нуклеотидов, например от 12 до 19 нуклеотидов, более предпочтительно от 12 до 18 нуклеотидов, например от 12 до 17 нуклеотидов, а еще более предпочтительно от 12 до 16 нуклеотидов.

41. Олигонуклеотид согласно варианту 1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из

$tg^{Me}CatGgaTttGca^{Me}Ca$, $tg^{Me}CatGgaTttGca^{Me}C$, $^{Me}CatGgaTttGca^{Me}C$,
 $tGcAtGgAtTtGcAc$, $cAtGgAtTtGcAc$, $^{Me}CatGGatTtGcA^{Me}C$,
 $Tg^{Me}CatGGatTtGcA^{Me}C$ и $Tg^{Me}CaTgGaTttGcAcA$,

где строчные буквы обозначают азотистое основание остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистое основание остатка LNA;

или его конъюгат (SEQ ID NO: 82-89).

42. Олигонуклеотид согласно варианту 2, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из

$c^{Me}CatTgtCacAct^{Me}Cca$, $c^{Me}CatTgtAacTct^{Me}Cca$, $ccAttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}Ca$,
 $c^{Me}CatTgt^{Me}CacAct^{Me}Cc$, $atTgt^{Me}CacAct^{Me}Cc$, $ccAttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}C$,
 $AttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}C$, $aTtGt^{Me}CaCa^{Me}Ct^{Me}Cc$, $AttGTca^{Me}Ca^{Me}Ct^{Me}C^{Me}C$,
 $^{Me}CcAttGTca^{Me}Ca^{Me}Ct^{Me}C^{Me}C$, $^{Me}CcaTgtTcacActc^{Me}Ca$, и
 $^{Me}C^{Me}CAttgtcacact^{Me}C^{Me}Ca$;

где строчные буквы обозначают азотистое основание остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистое основание остатка LNA;

или его конъюгат (SEQ ID NO: 90-101).

43. Олигонуклеотид согласно варианту 3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из

$t^{Me}CacGatTag^{Me}CatTaa$, $aTca^{Me}CgaTtaGcaTta$, $TcAcGaTtAg^{Me}CaTtAa$,
 $AtcAcGaTtAg^{Me}CaTta$,

где строчные буквы обозначают азотистое основание остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистое основание остатка LNA;

или его конъюгат (SEQ ID NO: 102-105).

44. Олигонуклеотид согласно варианту 4, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из

$gAgc^{Me}CgaAcgAacAa$, $gc^{Me}CgaAcgAacAa$, $GaGc^{Me}CgAa^{Me}CgAa^{Me}CaA$,
 $Gc^{Me}CgAa^{Me}CgAa^{Me}CaA$,

где строчные буквы обозначают азотистое основание остатка ДНК, а прописные буквы обозначают азотистое основание остатка LNA;

или его конъюгат (SEQ ID NO: 106-109).

45. Олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов или его конъюгат, где указанный олигонуклеотид включает по меньшей мере одну межнуклеозидную связывающую группу, которая не является фосфодиэфиром.

46. Олигонуклеотид согласно варианту 45 или его конъюгат, где указанная межнуклеозидная связывающая группа, не являющаяся фосфодиэфиром, представляет собой фосфортиоат.

47. Олигонуклеотид согласно варианту 46 или его конъюгат, где все межнуклеозидные связывающие группы представляют собой фосфортиоат.

48. Олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов или его конъюгат, где указанные остатки LNA независимо выбраны из группы, состоящей из тимо-LNA-остатков, аминоксо-LNA-остатков и оксо-LNA-остатков.

49. Олигонуклеотид согласно варианту 48 или его конъюгат, где указанные остатки LNA присутствуют в бета-D-форме.

50. Олигонуклеотид согласно варианту 48 или его конъюгат, где указанные остатки LNA представляют собой окси-LNA-остатки, присутствующие в бета-D-форме.

51. Олигонуклеотид согласно любому из предыдущих вариантов или его конъюгат, которые могут быть использованы в качестве лекарственного препарата.

52. Фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид согласно любому из вариантов 1-50 или его конъюгат и фармацевтически приемлемый носитель.

53. Композиция согласно варианту 52, где указанным носителем является физиологический раствор или забуференный физиологический раствор.

54. Применение олигонуклеотида согласно любому из вариантов 1-50 или его конъюгата или композиции согласно варианту 52 в целях приготовления лекарственного препарата для лечения рака.

55. Способ лечения рака, включающий стадию введения олигонуклеотида по любому из вариантов 1-50 или его конъюгата или композиции согласно варианту 52.

56. Применение олигонуклеотида согласно любому из вариантов 1-50 или его конъюгата или композиции согласно варианту 52 в целях приготовления лекарственного препарата для лечения заболевания, ассоциированного с повышенными уровнями холестерина в плазме.

57. Применение олигонуклеотида согласно любому из вариантов 1-50 или его конъюгата, или композиции согласно варианту 52 для позитивной регуляции уровней мРНК Nrdg3, Aldo A, Bckdk или CD320.

Экспериментальная часть

Пример 1. Синтез мономеров.

Структурные блоки LNA-мономера и их производные получали в соответствии с процедурами, описанными и указанными в литературе, см., например, WO 03/095467 A1 и D.S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002), Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis, 6, 802-808.

Пример 2. Синтез олигонуклеотидов.

Олигонуклеотиды синтезировали фосфорамидитным методом на синтезаторе Expedite 8900/MOSS (Multiple Oligonucleotide Synthesis System) в масштабе 1 мкмоль или 15 мкмоль. Для более крупномасштабного синтеза использовали синтезатор Äkta Oligo Pilot (GE Healthcare). По окончании синтеза (DMT-on) олигонуклеотиды отщепляли от твердого носителя с использованием водного аммиака в течение 1-2 ч при комнатной температуре, а затем подвергали реакции снятия защиты в течение 4 ч при 65°C. Олигонуклеотиды очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ). После удаления группы DMT олигонуклеотиды охарактеризовывали с помощью анионообменной ВЭЖХ, ОФ-ВЭЖХ и электрофореза в полиакриламидном геле (CGE), а молекулярную массу дополнительно подтверждали с помощью ESI-MS. Более подробно см. ниже.

Получение LNA на твердом носителе.

Получение неполного сукцинилового эфира LNA.

Мономер 5'-O-Dmt-3'-гидрокси-LNA (500 мг), ангидрид янтарной кислоты (1,2 экв.) и DMAP (1,2 экв.) растворяли в ДХМ (35 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После экстрагирования 0,1 М NaH_2PO_4 , pH 5,5 (2×) и раствором соли (1×) органический слой сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали. Производное неполного эфира получали с выходом 95% и использовали без дополнительной очистки.

Получение LNA на носителе.

Производное неполного эфира, полученное, как описано выше (90 мкмоль), растворяли в минимальном количестве ДМФ, добавляли DIEA и pyBOP (90 мкмоль) и смешивали в течение 1 мин. Эту предварительно активированную смесь объединяли с LCAA-CPG (500 Å, размер пор 80-120 меш, 300 мг) в лабораторном синтезаторе и перемешивали. После выдерживания в течение 1,5 ч при комнатной температуре носитель отфильтровывали и промывали ДМФ, ДХМ и MeOH. После сушки загрузка составляла 57 мкмоль/г (см. Tom Brown, Dorcas J.S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. In: F. Eckstein, editor. Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14).

Удлинение олигонуклеотида.

Взаимодействие фосфорамидитов (A(bz), G(ibu), 5-метил-C(bz)) или T-β-цианоэтилфосфорамидита) осуществляли с использованием раствора 0,1 М 5'-O-DMT-защищенного амидита в ацетонитриле и DCI (4,5-дицианоимидазола) в ацетонитриле (0,25 М) в качестве активатора. Реакцию тиолирования проводили с использованием хлорида ксантана (0,01 М в ацетонитриле:пиридине, 10%). Оставшиеся реагенты обычно использовали для синтеза олигонуклеотидов.

Очистка с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Колонка:	Xterra RP ₁₈
Скорость потока:	3 мл/мин
Буферы:	0,1 М ацетат аммония, pH 8, и ацетонитрил
Сокращения:	
DMT:	Диметокситритил
DCI:	4,5-дицианоимидазол
DMAP:	4-диметиламинопиридин
ДХМ (DCM):	Дихлорметан
ДМФ (DMF):	Диметилформамид
ТГФ (THF):	Тетрагидрофуран
DIEA:	N,N-диизопропилэтиламин
PyBOP:	Гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окси- трис-пирролидинофосфония
Bz:	Бензоил
Ibu:	Изобутирил

Пример 3. Конструирование LNA-олигонуклеотидов против miR и температуры плавления микроРНК-мишень:

miR-122a:	5'-uggagugugacsauggguguuugu-3'	SEQ ID NO: 1
miR-122a, в ориентации 3'-5':	3'-uguuugugguaacagugugaggu-5'	(SEQ ID NO: 1 в обратной ориентации)

Таблица 1

Олигонуклеотидные последовательности LNA-antimiR и T_m

SEQ ID NO:	Oligo ID		SEQ ID	Последовательность:		T _m (°C)
2	SPC3370	конструкция XxxX	SEQ ID 56	5'- cCatTgtCacActCca-3'	PS- остов	75
3	SPC3372	конструкция XxxX	SEQ ID 57	5'- ccAttGtcAcaCtcCa-3'	PS- остов	69
4	SPC3375	Гэп-мер	SEQ ID 58	5'- CCAttgtcacacTCCa-3'	PS- остов	69
5	SPC3549	15-мер	SEQ ID 59	5'-CcAttGTcaCaCtCC- 3'	PS- остов	78
6	SPC3550	контроль с несоответ ствиями	SEQ ID 60	5'-CcAttCTgaCcCtAC- 3'	PS- остов	32
7	SPC3373	контроль с несоответ ствиями	SEQ ID 61	5'- ccAttGtcTcaAtcCa-3'	PS- остов	46
8	SPC3548	13-мер	SEQ ID 62	5'-AttGTcaCaCtCC-3'	PS- остов	

Строчные буквы: ДНК; прописные буквы: LNA (все цитозины (C) LNA были метилированными), подчеркнуто: несоответствия.

Температуры плавления зрелой последовательности miR-122a определяли с использованием синтетического РНК-олигонуклеотида против miR-122a с фосфориотатными связями.

Дуплекс LNA-олигонуклеотидов против miR/miR-122a разводили до 3 мкМ в 500 мкл РНКазы, не содержащей H₂O, а затем смешивали с 500 мкл 2× буфера для димеризации (конечная концентрация олигонуклеотидного дуплекса = 1,5 мкМ, 2× T_m-буфер: 200 мМ NaCl, 0,2 мМ EDTA, 20 мМ NaP, pH 7,0, DEPC-обработка для удаления РНКаз). Полученную смесь сначала нагревали до 95°C в течение 3 мин, а затем охлаждали при комнатной температуре (к.т.) в течение 30 мин.

После инкубирования при комнатной температуре T_m измеряли на спектрофотометре Lambda 40 UV/VIS, снабженном устройством для программирования температур PTP6 Peltier, осуществляемого с помощью компьютерной программы PE Templab (Perkin Elmer). Температуру повышали с 20 до 95°C, а затем снова снижали до 20°C и при этом непрерывно регистрировали абсорбцию при 260 нм. Для определения температуры плавления/отжига (T_m) использовали производную первого порядка и локальные максимумы функции температур плавления и отжига, которые должны давать аналогичные/одинаковые значения T_m. Кривую для производной первого порядка строили по 91 точке.

Для определения T_m для других олигонуклеотидов, таких как олигонуклеотиды согласно изобретению, может быть применен вышеуказанный анализ с заменой олигонуклеотида против miR и комплементарной молекулы РНК.

Однако в одном из вариантов изобретения T_m может быть определена с использованием комплементарной молекулы ДНК (с фосфориотатными связями). Обычно T_m комплементарной молекулы ДНК примерно на 10°C меньше, чем T_m эквивалентного РНК-комплемента. Следовательно, T_m, измеренная с использованием ДНК-комплемента, может быть использована в тех случаях, когда дуплекс имеет очень высокую T_m (табл. 2)

Определение температур плавления (T_m)

Олигонуклеотид против РНК-комплемента miR-122	T _m
SPC3372 + miR-122a, РНК	69°C
SPC3648 + miR-122a, РНК	74°C
SPC3649 + miR-122a, РНК	79°C
Олигонуклеотид против ДНК-комплемента	T _m
SPC3372 + 122R, ДНК	57°C
SPC3649 + 122R, ДНК	66°C

Известно, что если использовать олигонуклеотиды с очень высокими T_m, то для определения T_m недостаточно проведения лишь вышеуказанных анализов. В этом случае использование комплементарной ДНК-молекулы с фосфориотатными связями может приводить к снижению значений T_m.

В анализе на гибридизацию олигонуклеотидов обычно используется формамид (см. Hutton, 1977, NAR, 4 (10), 3537-3555). В вышеуказанном анализе включение 15% формамида обычно приводит к снижению T_m примерно на 9°C, а включение 50% формамида обычно приводит к снижению T_m примерно на 30°C. Поэтому, используя такие соотношения, можно определить сравнительную T_m олигонуклеотида по отношению к его комплементарной молекуле РНК (с фосфодиэфирной связью), даже если T_m дуплекса, например, выше 95°C (в отсутствие формамида).

Для олигонуклеотидов с очень высокой T_m используют альтернативный метод определения T_m, который включает титрование и электрофорез в геле, проводимый для идентификации одной цепи от дуплекса, и по их концентрациям и отношениям определяют K_d (константу диссоциации), которая соответствует deltaG, а также T_m.

Пример 4. Стабильность LNA-олигонуклеотидов в плазме человека или крыс.

Олигонуклеотид LNA тестировали на стабильность в плазме человека или крыс (можно также использовать плазму мышей, обезьян или собак). В 45 мкл плазмы добавляли 5 мкл LNA-олигонуклеотида (при конечной концентрации 20 мкМ). LNA-олигонуклеотиды инкубировали в плазме в течение 0-96 ч при 37°C (плазму тестировали на нуклеазную активность в течение периода времени до 96 ч, и этот тест не выявил каких-либо различий в характере расщепления нуклеазой).

В указанное время образец быстро замораживали в жидком азоте. 2 мкл (=40 пмоль) LNA-олигонуклеотида в плазме разводили путем добавления 15 мкл воды и 3 мкл 6× загрузочного красителя (Invitrogen). В качестве маркера использовали 10 п.н.-лэддер (Invitrogen, USA, 10821-015). К 1 мкл лэддера добавляли 1 мкл 6× загрузочного красителя и 4 мкл воды. Образцы смешивали, нагревали до 65°C в течение 10 мин и загружали на предварительно полученный гель для электрофореза (16% акриламид, 7 М мочевины, 1× TBE, предварительный электрофорез при 50 Вт в течение 1 ч) и проводили электрофорез при 50-60 Вт в течение 2,5 ч. Затем гель окрашивали 1× SyBR-золотом (Molecular Probes) в 1× TBE в течение 15 мин. Полосы визуализировали с использованием люминесцентного визуализатора от BioRad.

Пример 5. In vitro модель: клеточная культура.

Влияние LNA-олигонуклеотидов на экспрессию нуклеиновой кислоты-мишени (количественную экспрессию) может быть проанализировано в клетках любых типов при условии, что такая нуклеиновая кислота-мишень присутствует на измеримых уровнях. Мишень может экспрессироваться эндогенно или посредством временной или стабильной трансфекции нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную нуклеиновую кислоту.

Уровень экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени может быть рутинно определен с помощью, например, нозерн-блот-анализа (включая нозерн-анализ микроРНК), количественной ПЦР (включая количественную ПЦР микроРНК) и анализов на защиту от рибонуклеазы. Клетки нижеследующих типов используются в иллюстративных целях, однако могут быть использованы клетки и других типов при условии, что в клетке выбранного типа будет экспрессироваться данная мишень.

Клетки культивировали в подходящей среде, описанной ниже, и выдерживали при 37°C, при влажности 95-98% и при 5% CO₂. Пассажи клеток проводили рутинным способом 2-3 раза в неделю.

15PC3: Клеточная линия рака человеческой предстательной железы 15PC3 была любезно предоставлена Dr. F. Baas, Лаборатория Neurozintuigen Laboratory, AMC, Нидерланды и была культивирована в среде DMEM (Sigma), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS) + глутамак I + гентамицин.

PC3: Клеточная линия рака человеческой предстательной железы PC3 была закуплена у ATCC и была культивирована в среде Куна F12, содержащей глутамин (Gibco) + 10% FBS + гентамицин.

518A2: Клеточная линия человеческой злокачественной меланомы 518A2 была любезно предоставлена Dr. B. Jansen (Отдел экспериментальной онкологии, кафедра молекулярной фармакологии, Отделение клинической фармакологии Венского университета) и была культивирована в среде DMEM (Sigma), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS) + глутамак I + гентамицин.

HeLa: Клеточную линию карциномы шейки матки HeLa культивировали в среде MEM (Sigma), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку и гентамицин, при 37°C, влажности 95% и 5% CO₂.

MPC-11: Клеточную линию мышинной множественной миеломы MPC-11 закупали у ATCC и выдерживали в среде DMEM, содержащей 4 mM глутамакса + 10% лошадиной сыворотки.

DU-145: Клеточную линию рака человеческой предстательной железы DU-145 закупали у ATCC и выдерживали в среде RPMI, содержащей глутамакс + 10% FBS.

RCC-4+/-VHL: Клеточную линию рака почек человека RCC4, стабильно трансфицированную плазмидой, экспрессирующей VHL, или пустой плазмидой, закупали у ECACC и поддерживали в соответствии с инструкциями производителей.

786-0: Клеточную линию почечно-клеточной карциномы человека 786-0 закупали у ATCC и поддерживали в соответствии с инструкциями производителей.

HUVEC: Клеточную линию эндотелия пупочной вены человека HUVEC закупали у Cambiocore и поддерживали в среде EGM-2.

K562: Клеточную линию хронического миелогенного лейкоза человека K562 закупали у ATCC и поддерживали в среде RPMI, содержащей глутамакс + 10% FBS.

U87MG: Клеточную линию человеческой глиобластомы U87MG закупали у ATCC и поддерживали в соответствии с инструкциями производителей.

B16: Клеточную линию мышинной меланомы B16 закупали у ATCC и поддерживали в соответствии с инструкциями производителей.

LNCap: Клеточную линию рака человеческой предстательной железы LNCap закупали у ATCC и поддерживали в среде RPMI, содержащей глутамакс + 10% FBS.

HuH-7: Эпителиальные клетки печени человека культивировали в минимальной поддерживающей среде (MEM) Игла, содержащей 10% FBS, 2 mM глутамакс I, 1x заменимых аминокислот, 25 мкг/мл гентамицина.

L428: (Немецкая коллекция микроорганизмов (HKM, Брауншвейг, Германия)): В-клетки человеческой лимфомы поддерживали в среде RPMI 1640, в которую были добавлены 10% FCS, L-глутамин и антибиотики.

L1236: (Немецкая коллекция микроорганизмов (HKM, Брауншвейг, Германия)): В-клетки человеческой лимфомы поддерживали в среде RPMI 1640, в которую были добавлены 10% FCS, L-глутамин и антибиотики.

Пример 6. In vitro модель: обработка антисмысловым олигонуклеотидом LNA, направленным против miR.

Клеточную линию HuH-7, экспрессирующую miR-122a, трансфицировали олигонуклеотидом LNA против miR при концентрациях 1 и 100 нМ в соответствии с оптимизированным протоколом, осуществляемым с использованием липофектамина 2000 (LF2000, Invitrogen) (как описано ниже).

Клетки HuH-7 культивировали в среде MEM Игла, содержащей 10% FBS, 2 mM глутамакс I, 1x заменимых аминокислот, 25 мкг/мл гентамицина. За 1 день до трансфекции клетки высевали в 6-луночные планшеты (300000 клеток на лунку) в общем объеме 2,5 мл. В день трансфекции приготавливали раствор, содержащий LF2000, разведенный в среде Optimem (Invitrogen) (1,2 мл Optimem + 3,75 мкл LF2000

на лунку, LF2000 в конечной концентрации 2,5 мкг/мл, конечный общий объем 1,5 мл).

Олигонуклеотиды LNA (LNA против miR) также разводили в среде Optimem, содержащей 285 мкл Optimem + 15 мкл олигонуклеотида LNA (10 мкМ маточного раствора олигонуклеотида на конечную концентрацию 100 нМ и 0,1 мкМ на конечную концентрацию 1 нМ). Клетки один раз промывали в среде Optimem, а затем в каждую лунку добавляли 1,2 мл смеси Optimem/LF2000. Клетки инкубировали в течение 7 мин при комнатной температуре в смеси LF2000, а затем добавляли раствор 300 мкл олигонуклеотида в Optimem.

Затем клетки инкубировали в течение 4 ч с олигонуклеотидом и липофектамино 2000 (в стандартном клеточном инкубаторе, при 37°C и 5% CO₂). Через 4 ч среду/смесь удаляли и добавляли стандартную полную среду. Клетки оставляли еще на 20 ч для роста. Через 24 ч после трансфекции клетки собирали в тризоль (Invitrogen). РНК экстрагировали с использованием тризола в соответствии со стандартным протоколом, представленным в инструкциях производителей (Invitrogen), в частности, для сохранения микроРНК при экстракции всей РНК.

Пример 7. In vitro и in vivo модель: анализ на ингибирование экспрессии miR олигонуклеотидами, проводимый с помощью микроРНК-специфической количественной ПЦР.

Уровни miR-122a в образцах РНК оценивали на аппарате для быстрой ПЦР в реальном времени ABI 7500 (Applied Biosystems, USA) с использованием набора для miR-122a-специфической количественной ОТ-ПЦР, mirVana (Ambion, USA) и праймеров для miR-122a (Ambion, USA). Эту процедуру проводили в соответствии с инструкциями производителей.

Результаты.

miR-122a-специфическая новая конструкция олигонуклеотида LNA-antimiR (т.е. SPC3349 (также обозначаемая SPC3549)) была более эффективной для ингибирования miR-122a при 1 нМ по сравнению с описанными ранее моделями конструкций, включающих мотивы "каждый третий" и "гэп-мер" (SPC3370, SPC3372, SPC3375), при концентрации 100 нМ. Контроль с несоответствиями не обнаруживал ингибирования miR-122a (SPC3350). Результаты представлены на фиг. 1.

Пример 8. Оценка специфичности LNA-антагониста miR в отношении ингибирования miR, проводимая по профилю экспрессии микроРНК на микромассивах.

А) Мечение РНК для анализа на профиль экспрессии микроРНК на микромассивах.

Полноразмерную РНК экстрагировали с использованием реагента тризоль (Invitrogen) и метили у 3'-конца с использованием РНК-лигазы T4 и Cy3- или Cy5-меченого РНК-линкера (5'-PO4-rUrU-Cy3/dT-3' или 5'-PO4-rUrU-Cy5/dT-3'). Реакционная смесь для мечения содержала 2-5 мкг полноразмерной РНК, 15 мкМ РНК-линкера, 50 мМ трис-НСl (рН 7,8), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 16% полиэтиленгликоля и 5 единиц РНК-лигазы T4 (Ambion, USA) и эту смесь инкубировали при 30°C в течение 2 ч, а затем РНК-лигазу T4 подвергали термоинактивации при 80°C в течение 5 мин.

В) Гибридизация микромассива и промывки после гибридизации.

LNA-модифицированные зонды для захвата олигонуклеотидов, включая зонды для всех описанных микроРНК, имеющихся в базе данных miRBase для микроРНК мыши (*Mus musculus*) и человека (*Homo sapiens*), версия 7.1, а также серию зондов позитивного и негативного контроля, закупали у Exiqon (Exiqon, Denmark) и использовали для получения отпечатков микромассивов в целях определения профилей микроРНК. Зонды для захвата содержали 5'-концевой C6-аминомодифицированный линкер и были сконструированы так, чтобы зонды, комплементарные микроРНК-мишеням, имели T_m 12°C, что было осуществлено путем коррекции содержания LNA и длины зондов для захвата. Зонды для захвата разводили до конечной концентрации 10 мкМ в 150 мМ натрийфосфатного буфера (рН 8,5) и наносили пятнами на предметные стекла Codelink (Amersham Biosciences) при влажности 45% и при комнатной температуре (с четырьмя повторностями) с использованием устройства для создания массивов MicroGrid II, поставляемого компанией BioRobotics. Затем предметные стекла с нанесенными на них пятнами обрабатывали в соответствии с рекомендациями производителя.

Меченую РНК гибридизовали с LNA-микромассивами в течение ночи при 65°C в смеси для гибридизации, содержащей 4× SSC, 0,1% ДСН, 1 мкг/мл ДНК спермы сельди и 38% формамида. Гибридизованные предметные стекла три раза промывали в 2× SSC, 0,025% ДСН при 65°C, затем три раза промывали в 0,08× SSC и, наконец, три раза промывали в 0,4× SSC при комнатной температуре.

С) Сканирование массивов, анализ изображений и обработка данных.

Микромассивы сканировали на сканере ArrayWorx (Applied Precision, USA) в соответствии с рекомендациями производителей. Сканированные изображения вводили в устройство TIGR Spotfinder version 3.1 (Saeed et al., 2003) для определения средней интенсивности пятна и средней интенсивности локального фона, исключая пятна, интенсивность которых ниже интенсивности среднего локального фона + 4× стандартные отклонения. Интенсивности с поправками на фон нормализовали с помощью пакета программ по нормализации стабилизации дисперсии, версия 1.8.0 (Huber et al., 2002), для R (www.r-project.org).

Интенсивности пятен-дубликатов усредняли с помощью программы Microsoft Excel. Зонды с коэффициентом дисперсии >100% были исключены из последующего анализа данных.

Пример 9. Детектирование микроРНК посредством гибридизации *in situ*: Детектирование микроРНК в фиксированных формалином и залитых в парафин тканевых срезах посредством гибридизации *in situ*.

А) Приготовление фиксированных формалином и залитых в парафин срезов для гибридизации *in situ*.

Залитые в парафин образцы брали из соответствующих архивов образцов и разрезали на 5-10-мм срезы, а затем помещали на положительно заряженные предметные стекла с применением метода флотации. Предметные стекла хранили при 4°C до проведения экспериментов *in situ*.

В) Гибридизация *in situ*.

Срезы на предметных стеклах депарафинизировали в ксилоле, а затем подвергали регидратации серийными разведениями этанола (от 100 до 25%). Предметные стекла помещали в DEPC-обработанную воду и обрабатывали HCl и 0,2% глицином, а затем снова фиксировали в 4% параформальдегиде и обрабатывали ангидридом уксусной кислоты/триэтаноламином, после чего в промежутках между обработками их несколько раз промывали 1× PBS. Предметные стекла предварительно гибридизовали в растворе для гибридизации (50% формамид, 5× SSC, 500 мг/мл дрожжевой tPHK, 1× раствор Денхардта) при 50°C в течение 30 мин. Затем в раствор для гибридизации добавляли 3 пмоль ФИТЦ-меченого LNA-зонда (Exiqon, Denmark), комплементарного каждой отобранной миРНК, и гибридизовали в течение 1 ч при температуре, которая на 20-25°C ниже предсказанной T_m зонда (обычно в пределах 45-55°C в зависимости от последовательности миРНК). После промывывания в 0,1× и 0,5× SSC при 65°C осуществляли реакцию амплификации тирамидного сигнала с использованием набора, содержащего флуоресцентин Genpoint (ФИТЦ) (DakoCytomation, Denmark), в соответствии с рекомендациями поставщиков. И, наконец, предметные стекла помещали в раствор золота Prolong. После этого проводили флуоресцентную реакцию для проявления в течение 16-24 ч, которая позволяла подтвердить экспрессию выбранной миРНК с помощью эпифлуоресцентного микроскопа.

Детектирование микроРНК методом гибридизации *in situ* на цельных эмбрионах рыбы зебры, лягушек (Xenopus) и мышей.

Все стадии промывки и инкубирования проводили в 2-миллилитровых пробирках Эппендорфа. Эмбрионы фиксировали в течение ночи при 4°C в 4% параформальдегиде в PBS, а затем пропускали через градиент метанола (25% MeOH в PBST (PBS, содержащий 0,1% твин-20), 50% MeOH в PBST, 75% MeOH в PBST - 100% метанола) и хранили при -20°C в течение нескольких месяцев. В первый день гибридизации *in situ* эмбрионы подвергали регидратации путем последовательного инкубирования в течение 5 мин в 75% MeOH в PBST, 50% MeOH в PBST, 25% MeOH в PBST и 100% PBST (4×5 мин).

Эмбрионы рыб, мышей и лягушек обрабатывали протеиназой К (10 мкг/мл в PBST) в течение 45 мин при 37°C, а затем снова фиксировали в течение 20 мин в 4% параформальдегиде в PBS и 3×5 мин промывали PBST. После короткой промывки в воде активность эндогенной щелочной фосфатазы блокировали путем инкубирования эмбрионов в 0,1 М триэтаноламина и 2,5% уксусного ангидрида в течение 10 мин, с последующей короткой промывкой в воде и 5×5-минутной промывкой в PBST. После этого эмбрионы переносили на 2-3 ч в буфер для гибридизации (50% формамид, 5× SSC, 0,1% твин, 9,2 мМ лимонная кислота, 50 мкг/мл гепарина, 500 мкг/мл дрожжевой РНК) при температуре гибридизации. Гибридизацию осуществляли в свежем предварительно нагретом буфере для гибридизации, содержащем 10 нМ 3'-DIG-меченый LNA-зонд (Roche Diagnostics), комплементарный каждой выбранной миРНК. Промывки после гибридизации осуществляли при температуре гибридизации путем последовательного инкубирования в течение 15 мин в НМ (буфере для гибридизации, не содержащем гепарина и дрожжевой РНК), 75% НМ-/25% 2× SSCT (SSC, содержащем 0,1% твин-20), 50% НМ-/50% 2× SSCT, 25% НМ-/75% 2× SSCT, 100% 2× SSCT и в течение 2×30 мин в 0,2× SSCT.

Затем эмбрионы переносили в PBST путем последовательного инкубирования в течение 10 мин в 75% 0,2× SSCT/25% PBST, 50% 0,2× SSCT/50% PBST, 25% 0,2× SSCT/75% PBST и 100% PBST. После блокирования в течение 1 ч в блокирующем буфере (2% овечья сыворотка/2 мг/мл BSA в PBST) эмбрионы инкубировали в течение ночи при 4°C в блокирующем буфере, содержащем конъюгированные с щелочной фосфатазой Fab-фрагменты против DIG (Roche, 1/2000). На следующий день эмбрионы рыбы зебры промывали в течение 6×15 мин в PBST, а эмбрионы мыши и *X.tropicalis* промывали 6×1 ч в TBST, содержащем 2 мМ левамизол, а затем в течение 2 дней при 4°C с постоянной заменой свежим промывочным буфером.

После промывки, осуществляемой после обработки антителом, эмбрионы промывали 3×5 мин в буфере для окрашивания (100 мМ трис-HCl, pH 9,5, 50 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 0,1% твин-20). Окрашивание проводили в буфере, в который было добавлено 4,5 мкл/мл NBT (Roche, 50 мг/мл маточного раствора) и 3,5 мкл/мл BCIP (Roche, 50 мг/мл маточного раствора). Реакцию прекращали добавлением 1 мМ EDTA в PBST и эмбрионы хранили при 4°C. После этого эмбрионы помещали в раствор Мюррея (бензилбензоат:бензиловый спирт, 2:1) в градиенте увеличения концентраций метанола (25% MeOH в PBST, 50% MeOH в PBST, 75% MeOH в PBST, 100% MeOH), а затем визуализировали.

Пример 10. In vitro модель: Выделение мРНК и анализ на экспрессию мРНК (выделение полноразмерной РНК и синтез кДНК для проведения анализа мРНК).

Полноразмерную РНК выделяли с использованием набора RNeasy mini kit (Qiagen) или с использованием реагента тризола (Invitrogen). Для выделения полноразмерной РНК с использованием набора RNeasy mini kit (Qiagen) клетки промывали PBS и в лунки непосредственно добавляли буфер для лизиса клеток (RTL, Qiagen), в который был добавлен 1%-ный меркаптоэтанол. Через несколько минут образцы обрабатывали в соответствии с инструкциями производителей.

Для проведения in vivo анализа на экспрессию мРНК образцы тканей сначала гомогенизировали на гомогенизаторе Retsch 300MM, а затем выделяли полноразмерную РНК с использованием реагента тризола или набора "RNeasy mini kit" в соответствии с инструкциями производителя.

Синтез первой цепи (кДНК из мРНК) осуществляли с использованием набора, содержащего обратную транскриптазу OmniScript, или обратной транскриптазы M-MLV (в общих чертах описанных производителем (Ambion)) в соответствии с инструкциями производителей (Qiagen). При использовании обратной транскриптазы OmniScript 0,5 мкг полноразмерной РНК каждого образца доводили до 12 мкл и смешивали с 0,2 мкл poly-(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 мкг/мл) (Life Technologies), 2 мкл dNTP-смеси (5 mM каждой), 2 мкл 10× RT-буфера, 0,5 мкл ингибитора РНКазы RNAGuard™ (33 единицы/мл, Amersham) и 1 мкл обратной транскриптазы OmniScript, а затем инкубировали при 37°C в течение 60 мин и подвергали термоинактивации при 93°C в течение 5 мин.

При осуществлении синтеза первой цепи с использованием рандомизированных декамеров и обратной транскриптазы M-MLV (по существу, в соответствии с рекомендациями производителя (Ambion)) 0,25 мкг полноразмерной РНК для каждого образца доводили до 10,8 мкл в H₂O. После этого добавляли 2 мкл декамеров и 2 мкл dNTP-смеси (2,5 mM каждой). Образцы нагревали до 70°C в течение 3 мин и сразу охлаждали в ледяной воде, после чего добавляли 3,25 мкл смеси (содержащей 2 мкл 10× RT-буфера; 1 мкл обратной транскриптазы M-MLV; 0,25 мкл ингибитора РНКазы). кДНК синтезировали при 42°C в течение 60 мин, а затем проводили стадию термоинактивации при 95°C в течение 10 мин и, наконец, охлаждали до 4°C. кДНК может быть также использована для количественной оценки мРНК, например путем проведения количественной ПЦР в реальном времени.

Экспрессия мРНК может быть проанализирована различными методами, известными специалистам. Так, например, уровни мРНК могут быть количественно оценены с помощью, например, нозерн-блот-анализа, конкурентной полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа на защиту от рибонуклеазы (RPA) или ПЦР в реальном времени. В настоящем изобретении предпочтительной является количественная ПЦР в реальном времени. Анализ РНК может быть проведен на полноразмерной клеточной РНК или мРНК.

Методы выделения РНК и анализ РНК, такой как нозерн-блот-анализ, известны специалистам и описаны, например, в руководстве Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons.

Количественная ПЦР в реальном времени может быть легко проведена с использованием коммерчески доступной системы ПЦР-детекции в реальном времени (iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System), поставляемой компанией BioRAD.

Количественная ПЦР в реальном времени представляет собой метод, хорошо известный специалистам и описанный, например, в публикации Heid et al. Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994.

Пример 11. Поглощение LNA-олигонуклеотида и эффективность in vivo.

Исследование in vivo: Шесть групп животных (5 мышей на группу) обрабатывали следующим образом. Животным группы 1 непрерывно в течение 3 дней вводили i.v. 0,2 мл физиологического раствора, животным группы 2 вводили 2,5 мг/кг SPC3372, животным группы 3 вводили 6,25 мг/кг SPC3372, животным группы 4 вводили 12,5 мг/кг SPC3372, животным группы 5 вводили 25 мг/кг SPC3372, а животным группы 6 вводили 25 мг/кг SPC3373 (олигонуклеотида LNA-antimiR™) с несоответствиями, все эти процедуры проводили одним и тем же способом. Все дозы вычисляли из расчета массы тела каждого животного на день 0.

Перед введением дозы (в день 0) и через 24 ч после введения последней дозы (день 3) в пробирки, содержащие EDTA, собирали кровь, взятую из ретроорбитальной области, а затем собирали фракцию плазмы и хранили в замороженном виде при -80°C для проведения анализа на уровень холестерина. После умерщвления животных печень удаляли и одну часть разрезали на 5-мм кубики, а затем погружали в 5 объемов охлажденного льдом реагента RNeasy lysis buffer. Другую часть быстро замораживали в жидком азоте и хранили в криогенных условиях для последующего приготовления срезов.

Полноразмерную РНК экстрагировали из образцов печени, как описано выше, и анализировали на уровни miR-122a с помощью микроРНК-специфической количественной ПЦР. На фиг. 5 продемонстрирована четкая зависимость "доза-ответ", полученная с использованием SPC3372 с IC₅₀ при 3-5 мг/кг, тогда как с использованием олигонуклеотида LNA SPC3373, который является антагонистом miR-122a и имеет несоответствия, ингибирование miR-122a не наблюдалось.

Пример 12. Зависимость "доза-ответ" для LNA против miR-122a in vivo у самок мышей C57/BL/J.

Исследование in vivo: Десять групп животных (самок C57/BL6; 3 мыши на группу) обрабатывали следующим образом. Животным группы 1 на день 0, на день 2 и на день 4 вводили i.p. 0,2 мл физиологического раствора. Животным групп 2-10 внутривенно вводили три различные концентрации (25, 5 и 1 мг/кг) LNA против miR-122a/SPC3372 (группы 2-4), LNA-antimiR-122a/SPC3548 (группы 5-7) или LNA-antimiR-122a/SPC3549 (группы 8-10), где последовательности LNA-antimiR-122 представлены в табл. 1. Все три олигонуклеотида LNA против miR-122a были нацелены на печеночную специфическую miR-122a. Дозы вычисляли из расчета массы тела каждого животного на день 0.

Животных умерщвляли через 48 ч после введения последней дозы (день 6) и кровь, взятую из ретроорбитальной области, собирали в пробирки, содержащие EDTA, а затем собирали фракцию плазмы и хранили в замороженном виде при -80°C для проведения анализа на уровень холестерина. После умерщвления животных печень удаляли и одну часть разрезали на 5-мм кубики, а затем погружали в 5 объемов охлажденного льдом реагента RNeasy. Другую часть быстро замораживали в жидком азоте и хранили для последующего приготовления срезов в криогенных условиях.

Полноразмерную РНК экстрагировали из образцов печени с использованием реагента тризола в соответствии с рекомендациями производителей (Invitrogen, USA) и анализировали на уровне miR-122a путем проведения микроРНК-специфической количественной ПЦР в соответствии с рекомендациями производителей (Ambion, USA). На фиг. 2 продемонстрирована четкая зависимость "доза-ответ" для всех трех молекул LNA-antimiR-122a (SPC3372, SPC3548, SPC3549). Молекулы SPC3548 и SPC3549 обеспечивали значительно более эффективный сайленсинг in vivo в отношении miR-122a (на что указывало снижение уровней miR-122a) по сравнению с молекулой SPC3372, при этом наиболее эффективной оказалась молекула SPC3549 (IC₅₀ приблизительно при 1 мг/кг).

Вышеописанную процедуру повторяли в присутствии SPC3372 и SPC3649 с использованием 5 мышей на группу и объединенные данные (для всех восьми мышей на группу) представлены на фиг. 2b.

Пример 12a. Нозерн-блот-анализ.

МикроРНК-специфический нозерн-блот-анализ, проводимый в мышечной печени, обработанной LNA против miR, указывал на усиление блокирования miR-122 под действием SPC3649 по сравнению с SPC3372.

Олигонуклеотиды, используемые в этом примере:

SPC3649: 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3' (SEQ ID 59)	Новая конструкция
SPC3372: 5'-CcAttGtcAcaCtcCa-3' (SEQ ID 57)	Старая конструкция

Авторами настоящего изобретения было принято решение проанализировать влияние SPC3649 на уровне микроРНК miR-122 в печени SPC3649-обработанных мышей. Мышам через день в течение шести дней вводили три i.p.-инъекции LNA-antimiR SPC3649 и SPC3372 в указанных дозах и через 48 ч после введения последней дозы животных умерщвляли. Полноразмерную РНК экстрагировали из печени. Уровни miR-122 оценивали с помощью микроРНК-специфического нозерн-блот-анализа (фиг. 6).

Обработка здоровых мышей молекулой SPC3649 приводила к резкому усилению дозозависимого снижения уровня miR-122. Был проведен микроРНК-специфический нозерн-блот-анализ, в котором сравнивали SPC3649 и SPC3372 (фиг. 6). SPC3649 полностью блокировал miR-122 при 5 и 25 мг/кг, на что указывало отсутствие зрелой одноцепочечной miR-122 и присутствие лишь полосы дуплекса LNA против miR и miR-122. Сравнение полосы дуплекса со зрелой полосой, проводимое с помощью нозерн-блот-анализа, показало, что эффективность SPC3649 при 1 мг/кг равна эффективности SPC3372 при 25 мг/кг.

Пример 13. Оценка уровней холестерина в плазме у мышей, обработанных LNA-antimiR-122.

Общий уровень холестерина в плазме определяли с помощью колориметрического анализа Cholesterol CP, разработанного компанией ABX Pentra. Уровень холестерина определяли после ферментативного гидролиза и окисления (2, 3). К 1,5 мкл плазмы добавляли 21,5 мкл воды. Затем добавляли 250 мкл реагента и содержание холестерина измеряли в течение 5 мин на длине волны 540 нм. Для каждого животного измерения проводили с двумя повторностями. Чувствительность и линейность цепи оценивали с использованием контрольного соединения с 2-кратным разведением (контроль ABX Pentra N). Уровень холестерина определяли путем вычитания фона и сравнивали с уровнями холестерина в плазме мышей, обработанных физиологическим раствором.

На фиг. 3 продемонстрировано заметное снижение уровня холестерина в плазме у мышей, которым вводили SPC3548 и SPC3549, по сравнению с уровнем холестерина у контрольных мышей, которым вводили физиологический раствор на день 6.

Пример 14. Оценка уровней мРНК-мишени для miR-122a у мышей, обработанных LNA против miR-122a.

Контрольных животных, обработанных физиологическим раствором, и животных, обработанных различными LNA против miR-122a, умерщвляли через 48 ч после введения последней дозы (день 6) и полноразмерную РНК экстрагировали из образцов печени с использованием реагента тризола в соответствии с рекомендациями производителей (Invitrogen, USA). Уровни мРНК оценивали путем проведения

количественной ОТ-ПЦР в реальном времени для двух генов-мишеней для miR-122a, Bckdk (гена киназы дегидрогеназ кетокислоты с разветвленной цепью, ENSMUSG00000030802) и альдолазы A (aldoA, ENSMUSG00000030695) соответственно, а также GAPDH в качестве контроля с помощью анализов Taqman в соответствии с инструкциями производителя (Applied biosystems, USA). На фиг. 4а и 4b продемонстрирована четкая дозозависимая активация двух генов-мишеней для miR-122a, Bckdk и AldoA соответственно в ответ на обработку всеми тремя молекулами LNA-antimiR-122a (SPC3372, SPC3548, SPC3549). В противоположность этому, количественные ПЦР-анализы на GAPDH в качестве контроля не выявили каких-либо различий в уровнях мРНК GAPD у мышей, обработанных LNA-antimiR-122a, по сравнению с уровнями мРНК GAPD у контрольных животных, обработанных физиологическим раствором (фиг. 4с). Уровни мРНК Bckdk и AldoA у SPC3548- и SPC3549-обработанных мышей были значительно выше, по сравнению с уровнями, наблюдаемыми у SPC3372-обработанных мышей (фиг. 4а и 4b), что указывает на более высокую *in vivo* эффективность данных молекул.

Пример 15. Длительность действия LNA-олигонуклеотида *in vivo*.

Исследование *in vivo*: Две группы животных (21 мышь на группу) обрабатывали следующим образом. Животным группы 1 ежедневно в течение 3 дней внутривенно вводили 0,2 мл физиологического раствора, а животным группы 2 аналогичным образом вводили 25 мг/кг SPC3372. Все дозы вычисляли из расчета массы тела каждого животного на день 0.

После введения последней дозы (день 3) 7 животных от каждой группы умерщвляли на дни 9, 16 и 23 соответственно. Перед этим каждый день в пробирки, содержащие EDTA, собирали кровь, взятую из ретроорбитальной области, а затем собирали фракцию плазмы и хранили в замороженном виде при -80°C для ежедневного проведения анализа на уровень холестерина. После умерщвления животных печень удаляли и одну часть разрезали на 5-мм кубики, а затем погружали в 5 объемов охлажденного льдом реагента RNeasy. Другую часть быстро замораживали в жидком азоте и хранили в криогенных условиях для последующего приготовления срезов.

Полноразмерную РНК экстрагировали из образцов печени, как описано выше, и анализировали на уровни miR-122a путем проведения микроРНК-специфической количественной ПЦР. На фиг. 7 (умерщвление на дни 9, 16 или 23 соответствует умерщвлению через 1, 2 или 3 недели после введения последней дозы) продемонстрировано двукратное ингибирование у мышей, которым вводили SPC3372, по сравнению с ингибированием у контрольных мышей, которым вводили физиологический раствор, и такое ингибирование еще могло быть детектировано на день 16, а на день 23 уровни miR-122a приближались к уровням, наблюдаемым у группы, которой вводили физиологический раствор.

Пример 16. Длительность действия LNA-олигонуклеотида *in vivo*.

Исследование *in vivo*: Две группы животных (21 мышь на группу) обрабатывали следующим образом. Животным группы 1 ежедневно в течение 3 дней внутривенно вводили 0,2 мл физиологического раствора, а животным группы 2 аналогичным образом вводили 25 мг/кг SPC3372. Все дозы вычисляли из расчета массы тела каждого животного на день 0.

После введения последней дозы (день 3) 7 животных от каждой группы умерщвляли на дни 9, 16 и 23 соответственно. Перед этим каждый день в пробирки, содержащие EDTA, собирали кровь, взятую из ретроорбитальной области, а затем собирали фракцию плазмы и хранили в замороженном виде при -80°C для ежедневного проведения анализа на уровень холестерина. После умерщвления животных печень удаляли и одну часть разрезали на 5-мм кубики, а затем погружали в 5 объемов охлажденного льдом реагента RNeasy. Другую часть быстро замораживали в жидком азоте и хранили в криогенных условиях для последующего приготовления срезов.

Полноразмерную РНК экстрагировали из образцов печени, как описано выше, и анализировали на уровни miR-122a путем проведения микроРНК-специфической количественной ПЦР. На фиг. 8 продемонстрировано, что у мышей, которым вводили SPC3372, по сравнению с контрольными мышами, которым вводили физиологический раствор, наблюдалось в два раза большее ингибирование, и такое ингибирование еще могло быть детектировано на 16-й день, а на 23-й день уровни miR-122a приближались к уровням, наблюдаемым у группы, которой вводили физиологический раствор.

Нижеследующие процедуры проводили, как описано в примерах 17-22.

Мышам NMRI ежедневно в течение трех дней внутривенно вводили SPC3372 в дозе 2,5-25 мг/кг. Через 24 ч, 1, 2 или 3 недели после введения последней дозы животных умерщвляли. Собранную печень разрезали на куски и погружали в реагент RNeasy (Ambion) или быстро замораживали. РНК экстрагировали реагентом тризолом в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) из ткани, обработанной реагентом RNeasy, за исключением осажденной РНК, которую промывали в 80% этаноле и не подвергали перемешиванию. РНК использовали для количественной ПЦР TaqMan на мРНК, проводимой в соответствии с инструкциями производителя (Applied biosystems), или для нозерн-блот-анализа (см. ниже). Из быстрозамороженных кусков ткани приготавливали срезы в криогенных условиях для гибридизации *in situ*.

Кроме того, как показано на фиг. 9-14, SPC3372 представляет собой LNA-antimiR, а SPC3373 (контроль с несоответствиями) был обозначен не SPC, а "mm".

Пример 17. Дозозависимое индуцирование мРНК-мишени для miR-122a путем SPC3372-ингибирования miR-122a.

Мышей обрабатывали различными дозами SPC3372 каждый день в течение трех дней, как описано выше, а затем через 24 ч после введения последней дозы мышей умерщвляли. Полноразмерную РНК, экстрагированную из печени, подвергали количественной ПЦР. Гены, имеющие предсказанный сайт-мишень для miR-122 и активируемые, как наблюдалось в анализе на микромассивах, оценивали на дозозависимое индуцирование с помощью количественной ПЦР путем увеличения доз SPC3372. Полноразмерную РНК печени, взятую у 2-3 мышей на группу, умерщвленных через 24 ч после введения последней дозы, подвергали количественной ПЦР для анализа указанных генов. На фиг. 9 показаны уровни мРНК по сравнению с уровнями мРНК у группы, которой вводили физиологический раствор, $n=2-3$ (2,5-12,5 мг/кг/день: $n=2$, без ср. кв. от.). Показан также контроль с несоответствиями (mm, SPC3373).

Анализируемые гены: *Nrdg3* Aldo A, *Bckdk*, *CD320* с предсказанным сайтом-мишенью для miR-122. *Aldo B* и *Gapdh* не имели предсказанного сайта-мишени для miR-122a.

Явное дозозависимое индуцирование наблюдалось в случае генов-мишеней для miR-122a после обработки различными дозами SPC3372.

Пример 18. Временное индуцирование мРНК-мишеней для miR-122a после обработки SPC3372.

Самок мышей NMRI обрабатывали 25 мг/кг/день SPC3372, а контроль обрабатывали физиологическим раствором ежедневно в течение трех дней, а затем через 1, 2 или 3 недели после введения последней дозы соответственно умерщвляли. РНК экстрагировали из печени и уровни предсказанных мРНК-мишеней для miR-122a, отобранных в соответствии с данными анализа на микромассивах, оценивали с помощью количественной ПЦР. Было исследовано три животных от каждой группы.

Анализируемые гены: *Nrdg3* Aldo A, *Bckdk*, *CD320* с предсказанным сайтом-мишенью для miR-122. *Gapdh* не имел предсказанного сайта-мишени для miR-122a.

Наблюдалось временное индуцирование с последующим восстановлением нормальных уровней экспрессии аналогично восстановлению нормальных уровней miR-122a (фиг. 10).

Уровни мРНК нормализовали на отдельные уровни GAPDH и на средние значения, полученные для группы, обработанной физиологическим раствором, в каждый отдельный момент времени. Были также включены величины, полученные для животных, умерщвленных через 24 ч после введения последней дозы. Указано среднее и стандартное отклонение, $n=3$ (24 ч, $n=3$).

Пример 19. Индуцирование *Vldlr* в печени путем SPC3372-обработки.

Те же самые образцы РНК печени, которые были получены в предыдущем примере, оценивали на индуцирование *Vldlr*.

Временная активация наблюдалась после обработки SPC3372, как и в случае других предсказанных мРНК-мишеней для miR-122a (фиг. 11).

Пример 20. Стабильность дуплекса miR-122a/SPC3372 в мышинной плазме.

Стабильность SPC3372 и дуплекса SPC3372/miR-122a тестировали в мышинной плазме при 37°C в течение 96 ч. На фиг. 12 проиллюстрирован электрофорез в ПААГ, окрашенном SYBR-золотом.

SPC3372 оставался полностью стабильным в течение 96 ч. Дуплекс SPC3372/miR-122a сразу подвергался усечению (однопочечная область miR-122a не поддавалась разложению под действием SPC3372) и оставался почти полностью стабильным в течение 96 ч.

Тот факт, что стабильность предварительно полученного дуплекса SPC3372/miR-122 и термостабильность дуплекса молекулы SPC3372 в сыворотке сохранялась в течение 96 ч, подтвердил мнение авторов настоящего изобретения о том, что ингибирование miR-122a под действием SPC3372 обусловлено образованием стабильного дуплекса между двумя молекулами, что было также обнаружено из наблюдений в клеточной культуре (Naguibneva et al. 2006).

Пример 21. Секвестрация зрелой miR-122a под действием SPC3372 приводит к образованию дуплекса.

РНК печени также подвергали микроРНК-специфическому нозерн-блоттингу. На фиг. 13 показана мембрана, зондированная miR-122a-специфическим зондом (верхняя панель) и повторно зондированная Let-7-специфическим зондом (нижняя панель). С использованием miR-122-зонда можно было детектировать две полосы, где одна полоса соответствовала зрелой miR-122, а другая соответствовала дуплексу между SPC3372 и miR-122.

Для подтверждения сайленсинга miR-122 образцы РНК печени подвергали нозерн-блот-анализу на короткую РНК, этот анализ указывал на значимое снижение уровней детектируемой зрелой miR-122 в соответствии с результатами ОТ-ПЦР в реальном времени, полученными авторами настоящего изобретения. Для сравнения можно отметить, что уровни для Let-7a-контроля не изменялись.

Интересно отметить, что авторами настоящего изобретения была обнаружена дозозависимая аккумуляция смещенной полосы гетеродуплекса miR-122/SPC3372, что позволяет предположить, что miR-122 не является мишенью, которая подвергается деградации под действием молекулы SPC3372, но, при этом эта молекула связывается с микроРНК и тем самым препятствует осуществлению ее функций вследствие стерического затруднения.

Нозерн-блот-анализ осуществляли следующим образом.

Нозерн-мембраны получали, как описано в публикации Sempere et al. 2002, за исключением следующих изменений: полноразмерную РНК, 10 мкг на дорожку, в формамидном загрузочном буфере (47,5% формамид, 9 мМ EDTA, 0,0125% бромфеноловый синий, 0,0125% ксилон-цианол, 0,0125% ДСН) загружали на 15% денатурирующий полиакриламидный гель с TBE-мочевинной Novex (Invitrogen) без предварительного нагревания РНК. РНК подвергали электрофоретическому переносу на гибридизационную блоттинг-мембрану GeneScreen plus (PerkinElmer) при 200 мА в течение 35 мин. Эти мембраны зондировали ³²P-мечеными LNA-модифицированными олигонуклеотидами, комплементарными зрелым микроРНК*. LNA-олигонуклеотиды метили и гибридизовали с мембраной, как описано в литературе (Válóczi et al. 2004), за исключением следующих изменений: растворы для предварительной гибридизации и растворы для гибридизации содержали 50% формамид, 0,5% ДСН, 5× SSC, 5× раствор Денхардта и 20 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы сельди. Гибридизацию осуществляли при 45°C. Блоты визуализировали путем сканирования на сканере Storm 860. Фоновый сигнал мембраны вычитали из радиоактивных сигналов, поступающих от полос микроРНК. Величины сигналов miR-122 корректировали на различия в загрузке по отношению к сигналу let-7a. Для определения размера радиоактивных сигналов использовали систему Decade Marker System (Ambion) в соответствии с рекомендациями поставщиков.

Пример 22. Секвестрация miR-122a под действием SPC3372 и распределение SPC3372, проанализированные посредством гибридизации *in situ* в срезах печени.

Криосрезы печени, полученные от обработанных животных, подвергали гибридизации *in situ* для детектирования и для определения локализации miR-122 и SPC3372 (фиг. 14). Зонд, комплементарный miR-122, позволяет детектировать miR-122a. Второй зонд был комплементарен SPC3372. На фиг. 14 проиллюстрировано перекрытие, зеленым цветом показано распределение и кажущиеся количества miR-122a и SPC3372, а синим цветом показано окрашивание ядер красителем DAPI, при 10× увеличении. При 100× увеличении было выявлено внутриклеточное распределение miR-122a и SPC3372 в клетках мышечной печени.

Все срезы печени, взятые у контрольных животных, обработанных физиологическим раствором, обнаруживали интенсивное окрашивание miR-122, тогда как срезы, взятые у SPC3372-обработанных мышей, обнаруживали значимое снижение интенсивности окрашивания пятен. В противоположность этому, молекула SPC3372 легко детектировалась в SPC3372-обработанной печени, но не детектировалась в печени контрольного животного, обработанного физиологическим раствором. Еще большее увеличение позволило определить локализацию miR-122a в цитоплазме гепатоцитов, где наблюдалась явная компартментализация miR-122 *in situ*, и было обнаружено однородное распределение молекулы SPC3372 по всей цитоплазме.

Пример 23. Анализ на микромассах.

Авторами настоящего изобретения были оценены профили экспрессии по всему геному в образцах полноразмерных РНК, взятых из печени мышей, обработанных физиологическим раствором, LNA-олигонуклеотидом против miR-122 и контрольным LNA с несоответствиями, через 24 ч после введения последней дозы, где указанную оценку проводили с использованием программы массивов Affymetrix Mouse Genome 430 2.0. Анализ данных, полученных с помощью массивов, выявил 455 транскриптов, которые были активированы в печени мышей, обработанных LNA против miR, по сравнению с контрольными мышами, обработанными физиологическим раствором и LNA с несоответствиями, тогда как 54 транскрипта были ингибированы (фиг. 15a). В базе данных Ensembl были идентифицированы всего 415 активированных и 53 ингибированных транскрипта. Затем авторами настоящего изобретения были оценены 3'-нетранслируемые области (UTR) дифференциально экспрессированных мРНК на присутствие последовательности из 6 нуклеотидов CACTCC, соответствующих обратному комплементу уникальной области из 2-7 нуклеотидов в зрелой miR-122. Из всех активированных транскриптов число транскриптов, имеющих по меньшей мере одну miR-122-распознающую последовательность, составляло 213 (51%), а из всех ингибированных транскриптов такое число составляло 10 (19%), при этом встречаемость популяции неспецифических последовательностей составляла 25%, что указывает на то, что значительный пул активированных мРНК представляет собой непосредственные мишени для miR-122 в печени (фиг. 15b).

Обработка LNA-antimiR приводила к максимальному снижению уровней miR-122 через 24 ч после введения последней дозы LNA и к 50% снижению через одну неделю после введения последней дозы LNA, а в соответствующем контроле, обработанном физиологическим раствором, к 50% снижению через три недели после введения последней дозы LNA (пример 12, "старая конструкция"). Это соответствует данным по значительному снижению числа дифференциально экспрессированных генов для двух групп мышей, полученным в более поздние моменты времени. По сравнению с 509 мРНК, которые были идентифицированы через 24 ч после введения последней дозы LNA, авторами настоящего изобретения был идентифицирован 251 дифференциально экспрессированный ген через одну неделю, а через три недели после обработки было идентифицировано лишь 18 генов (фиг. 15c и 15d). В общих чертах, гены активировались через 24 ч после обработки LNA-antimiR, а затем в течение следующих двух недель уровни их

активации возвращались к контрольным уровням (фиг. 15d).

В заключение следует отметить, что большая часть активированных/дерепрессированных генов после обработки молекулой LNA-antimiR представляют собой мишени для miR-122, что указывает на высокую специфичность блокирования miR-122. Кроме того, тот факт, что через 3 недели после конечной обработки уровни активированных/дерепрессированных генов приближались к нормальным уровням, дает основание предположить об относительно длительном терапевтическом действии, которое при этом не вносит каких-либо стабильных изменений, т.е. такой эффект является обратимым.

Методы

Определение профиля экспрессии генов у мышей, обработанных молекулой LNA-antimiR.

Было проведено сравнение профилей экспрессии генов в печени мышей, обработанных физиологическим раствором и молекулой LNA-antimiR. Самок мышей NMRI обрабатывали 25 мг/кг/день LNA-antimiR, а также физиологическим раствором в качестве контроля ежедневно в течение трех дней, а через 24 ч, одну, две или три недели после введения последней дозы животных умерщвляли. Кроме того, через 24 ч после введения последней дозы были получены профили экспрессии генов в печени мышей, обработанных контрольным LNA-олигонуклеотидом с несоответствиями. Были исследованы три мыши от каждой группы и был получен всего 21 профиль экспрессии. Качественную оценку и определение концентрации РНК проводили на биоанализаторе Agilent 2100 и Nanodrop ND-1000 соответственно. Полноразмерная РНК была процессирована после экспрессии на генных чипах GeneChip в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору для одноциклового синтеза кДНК, проводимого с использованием реагентов для 3'-амплификации (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, USA), в результате чего была получена двухцепочечная кДНК. Эту кДНК использовали в качестве матрицы для продуцирования меченной биотином кРНК в соответствии с инструкциями производителей. 15 мкг меченной биотином кРНК фрагментировали с получением цепей, имеющих длину 35-200 оснований, и 10 мкг из них были гибридизованы на массивах Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 в течение ночи в печи 6400 для гибридизации на генных чипах GeneChip в соответствии со стандартными процедурами. Затем массивы промывали и окрашивали на станции GeneChip Fluidics Station 450. Сканирование осуществляли на сканере GeneChip Scanner 3000, а анализ изображений проводили с помощью операционной компьютерной программы GeneChip. Нормализацию и статистический анализ проводили с помощью пакета программ LIMMA для системного программирования R (programming environment²⁷). Зонды, о которых программа GCOS сообщала как об отсутствующих при всех гибридизациях, удаляли из набора данных. Кроме того, к набору данных прилагался фильтр интенсивности для удаления зондов, обнаруживающих скорректированную по фону интенсивность ниже 16. Данные нормализовали с использованием программы нормализации по квантилям (quantile normalization²⁸).

Дифференциальную экспрессию оценивали методом линейной модели. Величины Р корректировали по множеству параметров с использованием критериев Бенджамини и Хохберга (Benjamini & Hochberg). Эти критерии рассматривались как критерии значимости, если скорректированные величины $p < 0,05$. Кластеризация и визуализация данных, полученных с использованием массивов Affymetrix, были проведены с помощью компьютерной программы визуализации (MultiExperiment Viewer software²⁹).

Предсказание сайта-мишени

Транскрипты с описанными 3'UTR брали из базы данных Ensembl (версия 41) с использованием программы для анализа данных (EnsMart data mining tool³⁰) и анализировали на присутствие последовательности САСТСС, которая представляет собой обратный комплемент из 2-7 уникальных нуклеотидов в зрелой последовательности miR-122. В качестве фонового контроля серию из 1000 последовательностей длиной в 1200 нуклеотидов, соответствующих средней длине 3'UTR активированных и ингибированных транскриптов, скринировали через 24 ч после введения последней дозы LNA-antimiR на соответствие уникальной области miR-122 из 6 нуклеотидов. Такой скрининг был проведен 500 раз и среднее количество было использовано для сравнения.

Пример 24. Дозозависимое ингибирование miR-122 в мышинной печени под действием LNA-antimiR было более сильным по сравнению с ингибированием miR-122 под действием антагониста miR.

Самок мышей NMRI обрабатывали указанными дозами LNA-antimiR (SPC3372), контролем с несоответствиями (gam, SPC3373), физиологического раствора и антагониста miR (antagomir) (SPC3595) ежедневно в течение трех дней и через 24 ч после введения последней дозы мышей умерщвляли (как описано в примере 11, "старая конструкция", $n=5$). Уровни miR-122 анализировали с помощью количественной ПЦР и нормализовали по данным, полученным для группы, обработанной физиологическим раствором. Гены с предсказанным сайтом-мишенью для miR-122 и с профилем активированной экспрессии (AldoA, Nrdg3, Bckdk и CD320) обнаруживали дозозависимую дерепрессию при возрастающих дозах LNA-antimiR, как было определено с помощью количественной ПЦР.

У мышей, обработанных LNA-antimiR, такая дерепрессия была стабильно выше для всех протестированных мРНК, являющихся мишенями для miR-122 (AldoA, Bckdk, CD320 и Nrdg3, фиг. 17-20), чем у мышей, обработанных антагонистом miR (antagomir). Это было также продемонстрировано в анализе на ингибирование miR-122, проводимом с помощью miR-122-специфической количественной ПЦР

(фиг. 16). Следовательно, LNA против miR являются более эффективными функциональными ингибиторами miR-122, чем antagomir при соответствующих дозах.

Пример 25. Ингибирование miR-122 под действием LNA-antimiR у мышей с гиперхолестеринемией, снижение уровней холестеринемии и дерепрессия мРНК-мишени для miR-122.

Самки мышей C57BL/6J получали корм с высоким содержанием жира в течение 13 недель перед их обработкой SPC3649. В результате этого их масса возрастала до 30-35 г по сравнению с массой нормальных мышей, которая составляла лишь 20 г, как было определено путем взвешивания в начале обработки молекулой LNA-antimiR. Кормление мышей пищей с высоким содержанием жира приводило к значительному увеличению общего уровня холестерина в плазме, составляющего примерно 130 мг/дл, в результате чего у таких мышей развивалась гиперхолестеринемия, в отличие от нормальных мышей, у которых уровень холестерина составлял примерно 70 мг/дл. Мышей с гиперхолестеринемией и нормальных мышей два раза в неделю обрабатывали i.p. 5 мг/кг SPC3649 и соответствующим контрольным SPC3744 с несоответствиями во время исследования в течение 5,5 недель. Пробы крови брали ежедневно и во время всего исследования измеряли общий уровень холестерина в плазме. После умерщвления мышей брали образцы печени и пробы крови для проведения общей экстракции полимеразной РНК, количественной оценки мРНК и мРНК, оценки уровней трансаминазы в сыворотке и гистологического анализа печени.

Обработка мышей с гиперхолестеринемией молекулой SPC3649 приводила к снижению общего уровня холестерина в плазме примерно на 30% уже через 10 дней, и такой уровень, в отличие от уровня холестерина у контрольных мышей, обработанных физиологическим раствором, сохранялся в течение всего исследования (фиг. 21). Такой эффект не наблюдался у мышей, получавших нормальный корм. В отличие от этого, введение контрольного SPC3744 с несоответствиями не оказывало какого-либо влияния на уровни холестерина в плазме ни у мышей с гиперхолестеринемией, ни у нормальных мышей.

Количественная оценка ингибирования miR-122 и дерепрессии мРНК гена-мишени для miR-122 (AldoA и Bckdk), проводимая после длительной обработки молекулой SPC3649, выявила, что мыши с гиперхолестеринемией и нормальные мыши имели сравнимые профили (фиг. 22-24), в результате чего было продемонстрировано, что SPC3649 является сильным антагонистом miR-122 у животных обеих групп. Анализ, проводимый с помощью количественной ПЦР miR-122, показал, что контрольный SPC3744 с несоответствиями оказывал, хотя и в меньшей степени, влияния на уровни miR-122 в печени обработанных мышей, по сравнению с SPC3649. Такое снижение может быть ассоциировано с количественной ПЦР, проводимой с использованием структуры "стебель-петля" в качестве праймеров. В соответствии с этим обработка мышей контрольным SPC3744 с несоответствиями не приводила к какой-либо функциональной дерепрессии генов-мишеней для miR-122 (фиг. 23 и 24) или к снижению уровня холестерина в плазме (фиг. 21), а это означает, что SPC3649-опосредованный антагонизм miR-122 является в высокой степени специфическим *in vivo*.

После длительной обработки молекулой SPC3649 проводили анализ ферментов в печени у мышей с гиперхолестеринемией и у нормальных мышей. У SPC3649-обработанных мышей с гиперхолестеринемией, по сравнению с контрольными мышами, обработанными физиологическим раствором, каких-либо изменений уровней аланин- и аспартат-аминотрансферазы (ALT и AST) не обнаруживалось (фиг. 25 и 26). Увеличение уровня ALT может наблюдаться у нормальных мышей после длительной обработки SPC3649 (фиг. 26).

Пример 26. Методы проведения эксперимента и анализа на LNA-antimiR/гиперхолестеринемию.

Мыши и введение доз.

В этом эксперименте использовали самок мышей C57BL/6J (Taconic M&B Laboratory Animals, Ejby, Denmark). Все вещества приготавливали в физиологическом растворе (0,9% NaCl) до конечной концентрации, пригодной для введения внутрибрюшинной инъекции мышам в объеме 10 мл/кг.

В исследовании, проводимом на мышах с индуцированным ожирением, этим мышам в течение 13 недель перед введением доз давали корм (D12492, Research Diets) с высоким содержанием жира (60%, в соответствии с Европейским стандартом (EN)) в целях увеличения у них уровня холестерина в крови. LNA-antimiR™ в дозе 5 мг/кг вводили два раза в неделю в течение 5,5 недель. Плазму крови брали один раз в неделю в течение всего периода введения доз. После завершения эксперимента мышей умерщвляли и РНК экстрагировали из печени для последующего проведения анализа. Для анализа на ферменты печени также брали сыворотку.

Экстракция полноразмерной РНК.

Срезы печени умерщвленных мышей сразу помещали на хранение в реагенте RNeasy (Ambion). Полноразмерную РНК экстрагировали реагентом тризолом в соответствии с инструкциями производителей (Invitrogen), за исключением того, что осажденную РНК промывали в 80% этаноле и не перемешивали.

МикроРНК-специфическая количественная ОТ-ПЦР.

Уровни микроРНК miR-122 и let-7a количественно оценивали с помощью анализа микроРНК TaqMan (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Реакционную смесь для ОТ-ПЦР подвергали 10-кратному разведению в воде, а затем использовали для ПЦР-амплификации в реальном времени в соответствии с инструкциями производителя. Двукратные серийные разведения кДНК,

полученной из полноразмерной РНК печени животных, обработанных физиологическим раствором, или реакционная смесь кДНК ложнотрансфицированных клеток (где количество используемой полноразмерной РНК было в 2,5 раза больше, чем в образцах) служили в качестве стандарта для гарантии прохождения амплификации в линейном режиме (количество или относительное число копий). ПЦР-амплификацию проводили в режиме реального времени на аппарате Applied Biosystems 7500 или 7900.

Количественная ОТ-ПЦР.

Количественную оценку мРНК выбранных генов проводили с использованием стандартных анализов TaqMan assays (Applied Biosystems). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием рандомизированных декамеров, 0,5 мкг полноразмерной РНК и фермента ОТ вируса М-MLV от Ambion в соответствии со стандартным протоколом. Затем кДНК первой цепи 10-кратно разводили в воде, не содержащей нуклеазы, после чего ее добавляли в реакционную смесь для ОТ-ПЦР. Двукратные серийные разведения кДНК, полученной из полноразмерной РНК печени животных, обработанных физиологическим раствором, или реакционная смесь кДНК ложнотрансфицированных клеток (где использовали в 2,5 раз большее количество полноразмерной РНК, чем в образцах) служили в качестве стандарта для гарантии прохождения амплификации в линейном режиме (количество или относительное число копий). ПЦР-амплификацию проводили в режиме реального времени на аппарате Applied Biosystems 7500 или 7900.

Оценка метаболизма.

У животных, непосредственно перед их умерщвлением, из области ретроорбитального синуса брали кровь и эту кровь собирали в EDTA-содержащие пробирки с последующим выделением фракции плазмы. Общий уровень холестерина в плазме анализировали с использованием устройства ABX Pentra Cholesterol CP (Horiba Group, Horiba ABX Diagnostics) в соответствии с инструкциями производителей.

Измерение уровней ферментов печени (ALT и AST).

Сыворотку, взятую от каждой отдельной мыши, приготавливали следующим образом. Пробы крови хранили при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем центрифугировали (10 мин, 3000 об/мин при комнатной температуре). После центрифугирования сыворотку собирали и замораживали при -20°C.

Измерение уровней ферментов ALT и AST проводили в 96-луночных планшетах с использованием реагентов для ALT и AST, поставляемых от ABX Pentra, в соответствии с инструкциями производителей. Вкратце, пробы сыворотки 2,5-кратно разводили H₂O и каждую пробу анализировали в дубликate. После добавления в каждую лунку 50 мкл разведенной пробы или стандарта (многие из них поставлялись компанией ABX Pentra) в эти лунки добавляли 200 мкл смеси реагентов для AST или ALT при 37°C. Определение кинетических параметров проводили при 37°C на спектрофотометре в течение 5 мин с интервалом в 30 с на длине волны 340 нм.

Пример 27. Модуляция репликации вируса гепатита С под действием LNA-antimiR (SPC3649).

Олигонуклеотиды, используемые в данном примере (прописные буквы: LNA, строчные буквы: ДНК, цитозины LNA являются метилированными, а LNA предпочтительно представляют собой В-D-окси-LNA (надстрочный индекс "о" после остатка LNA).

SPC3649 (LNA-antimiR, нацеленный на miR-122, был использован в начальном лабораторном синтезе, и обозначен SPC3549)
5'- ^m C _s ^o C _s A _s ^o t _s t _s G _s ^o T _s ^o C _s a _s ^m C _s ^o a _s ^m C _s ^o t _s ^m C _s ^{om} C _s ^o -3'
SPC3648 (LNA-antimiR, нацеленный на miR-122, был использован в начальном лабораторном синтезе, и обозначен SPC3548)
5'-...A _s ^o ...t _s ...t _s ...G _s ^o ...T _s ^o ...c _s ...a _s ... ^m C _s ^o ...a _s ... ^m C _s ^o ...t _s ... ^m C _s ^o ... ^m C _s ^o ...-3'...
SPC3550 (контроль с несоответствиями в 4 нуклеотида по сравнению с SPC3649) SEQ ID 63
5'- ... ^m C _s ^o ...c _s ...A _s ^o ...t _s ...t _s ... ^m C _s ^o ...T _s ^o ...g _s ...a _s ... ^m C _s ^o ...c _s ... ^m C _s ^o ...t _s ...A _s ^o ... ^m C _s ^o ... -3'
анти-122, 2'OMe: полноразмерный (в 23 нуклеотида) 2'OMe-модифицированный олигонуклеотид, комплементарный miR-122
2'OMe-Ctrl: смешанный 2'OMe-модифицированный контроль

Было показано, что репликация вируса гепатита С (HCV) стимулируется miR-122 и в соответствии с этим было продемонстрировано, что ингибирование miR-122 оказывает влияние на репликацию HCV в клеточной модели гепатомы in vitro. Авторами настоящего изобретения была проанализирована эффек-

тивность SPC3649 в отношении снижения уровня репликации HCV в клеточной модели HuH-7. Различные молекулы LNA-antimiR, а также антисмысловой и смешанный 2'ОМе-олигонуклеотид переносили в клетки HuH-7 и оставляли на 48 ч для репликации HCV. Образцы полноразмерной РНК, экстрагированной из клеток HuH-7, подвергали нозерн-блот-анализу.

Пример 28. Улучшенный антисмысловой олигонуклеотид LNA-antimiR™, нацеленный на miR-21.

Зрелая последовательность miR-21, взятая из базы данных miRBase Института Сэнгера:

```
>hsa-miR-21 MIMAT0000076
UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO 4)
>mmu-miR-21 MIMAT0000530
UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO 64)
```

Последовательность соединений:

```
SPC3521 miR-21 5'-FAM TCAGtctgataaGCTa-3' (геп-мерная
конструкция) - (SEQ ID NO 65)
SPC3870 miR-21 (мМ) 5'-FAM TCCGtcttagaaGATa-3' - (SEQ ID NO 66)
SPC3825 miR-21 5'-FAM TcTgtCAGaTaCgAT-3' (новая
конструкция) (SEQ ID NO 67)
SPC3826 miR-21 (мМ) 5'-FAM TcAGtCTGaTaAgCT-3' - (SEQ ID NO 68)
SPC3827 miR-21 5'-FAM TcAGtCTGaTaAgCT-3' (новая улучшенная
конструкция) - (SEQ ID NO 69)
```

Все соединения имели полностью или почти полностью тиолированный остов, а также содержали метку FAM у 5'-конца.

Было обнаружено, что miR-21 активируется в глиобластоме (Chan et al. Cancer Research, 2005, 65 (14), p. 6029) и в раковых клетках молочной железы (Iorio et al. Cancer Research, 2005, 65 (16), p. 7065), а поэтому считается, что miR-21 является потенциальной "онкогенной" микроРНК. Chan et al. также указывали на индуцирование апоптоза клеток глиобластомы в результате ингибирования miR-21 под действием 2'ОМе- или LNA-модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов. Следовательно, агенты, ингибирующие miR-21, являются потенциальными терапевтическими средствами для лечения глиобластомы и других солидных опухолей, таких как рак молочной железы. Авторами настоящего изобретения был представлен улучшенный LNA-модифицированный олигонуклеотид, направленный против miR-21, LNA-antimiR™, который, как было неожиданно обнаружено, обладает хорошей способностью ингибировать молекулу miR-21, которая является подходящей мишенью для вышеупомянутых терапевтических целей.

Подходящими терапевтическими способами введения являются, например, внутривенные инъекции в область локализации глиобластомы, внутритуморовые инъекции в глиобластому и раковую опухоль молочной железы, а также системная доставка при раке молочной железы.

Ингибирование miR-21 в клеточной линии глиобластомы U373 и в клеточной линии рака молочной железы MCF-7.

Эффективность современных препаратов LNA-antimiR™ и контрольных олигонуклеотидов оценивали путем их трансфекции при различных концентрациях в клеточные линии U373 и MCF-7, которые, как известно, экспрессируют miR-21 (или в других miR-21-экспрессирующих клеточных линиях). Трансфекцию осуществляли в соответствии со стандартным протоколом, проводимым с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen). Через 24 ч после трансфекции клетки собирали и полноразмерную РНК экстрагировали в соответствии с протоколом с использованием тризола (Invitrogen). Оценку уровней miR-21, в зависимости от применяемого лечения и используемой концентрации, проводили с помощью miR-21-специфической ОТ-ПЦР в режиме реального времени, где в качестве праймеров использовали структуру "стебель-петля" (Applied Biosystems), или альтернативно, с помощью miR-21-специфических нозерн-блот-анализов без использования радиоактивных меток. В клетках, трансфицированных LNA-antimiR, детектируемые уровни miR-21, в отличие от клеток, трансфицированных носителем, используемым в качестве контроля, указывали на ингибирующую способность LNA-antimiR™.

Функциональное ингибирование miR-21, оцениваемое по активации гена-мишени для miR-21.

Эффект антагонистического воздействия на miR-21 исследовали путем клонирования последовательности-мишени для miR-21 с полным соответствием, где указанные исследования проводили с применением стандартной репортерной системы на основе люциферазы Renilla (между кодирующей последовательностью и 3'UTR, psiCHECK-2, Promega) (см. пример 29). Репортерную конструкцию и LNA-antimiR™ котрансфицировали в miR-21-экспрессирующие клеточные линии (например, U373, MCF-7). Через 24 ч после трансфекции в буфере для пассивного лизиса клетки собирали и измеряли активность люциферазы в соответствии со стандартным протоколом (Promega, Dual Luciferase Reporter Assay System). Индуцирование активности люциферазы проводили в целях демонстрации функционального ингибирующего воздействия LNA-antimiR™ на miR-21.

Пример 29. Анализ с использованием люциферазного репортера для оценки функционального ингибирования микроРНК под действием LNA-antimiR и других олигонуклеотидов, нацеленных на микроРНК: общий анализ новой и улучшенной новой конструкции как предпочтительных конструкций для блокирования функции микроРНК.

Олигонуклеотиды, используемые в данном примере (прописные буквы: LNA, строчные буквы: ДНК) для оценки дерепрессирующего действия олигонуклеотида LNA-antimiR на люциферазный репортер, проводимой с использованием клонированной последовательности-мишени для микроРНК, путем блокирования соответствующей микроРНК.

мишень: hsa-miR-122a MIMAT0000421	
uggagugugacaauggguguugu	
скринирован в клеточной линии HUH-7, экспрессирующей miR-122	
Олиго #, микроРНК-мишень, олигонуклеотидная последовательность	Конструкция
3962: miR-122 5'-ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'	Полный комплемент, гэп
3965: miR-122 5'-acaacACCATTGTcactcca-3'	Полный комплемент, блок
3972: miR-122 5'-acAaaCacCatTgtCacActCca-3'	Полный комплемент, LNA_3
3549 (3649): miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Новая конструкция
3975: miR-122 5'-CcAtTGTcaCACtCC-3'	Улучшенная новая конструкция
мишень: hsa-miR-19b MIMAT0000074	
ugugcaaaуссаугсаааасуга	
скринирован в клеточной линии HeLa, экспрессирующей miR-19b	
Олиго #, микроРНК-мишень, олигонуклеотидная последовательность	конструкция
3963: miR-19b 5'-TCAGttttgcatggatttgCACA-3'	Полный комплемент, гэп
3967: miR-19b 5'-tcagtttTGCATGGatttgcaca-3'	Полный комплемент, блок
3973: miR-19b 5'-tcAgtTttGcaTggAttTgcAca-3'	Полный комплемент, LNA_3
3560: miR-19b 5'-TgCatGGatTtGcAC-3'	Новая конструкция
3976: miR-19b 5'-TgCaTGGatTTGcAC-3'	Улучшенная новая конструкция
мишень: hsa-miR-155 MIMAT0000646	
uuaaugcuaaусгугауаgggg	
скринирован в клеточной линии 518A2, экспрессирующей miR-155	
Олиго #, микроРНК-мишень, олигонуклеотидная последовательность	Конструкция
3964: miR-155 5'-CCCCtatcacgattagcatTAA-3'	Полный комплемент, гэп
3968: miR-155 5'-cccctaTACGATTtagcattaa-3'	Полный комплемент, блок
3974: miR-155 5'-cCccTatCacGatTagCatTaa-3'	Полный комплемент, LNA_3
3758: miR-155 5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'	Новая конструкция
3818: miR-155 5'-TcAcGATtaGCAtTA-3'	Улучшенная новая конструкция

SEQ ID NO являются такими, как они были указаны выше.

Репортерную плазмиду (psiCheck-2 Promega), кодирующую варианты люцифераз, а именно люциферазу коралла Renilla и люциферазу светляка, конструировали так, чтобы 3'UTR люциферазы Renilla включала одну копию последовательности, полностью комплементарной исследуемой миРНК.

Клетки, эндогенно экспрессирующие исследуемые миРНК (HuH-7 для miR-122a, HeLa для miR-19b, 518A2 для miR-155), котрансфицировали олигонуклеотидами LNA-antimiRs или другими miR-связывающими олигонуклеотидами (полностью комплементарными, т.е. полноразмерными) и соответствующей репортерной плазмидой, комплементарной микроРНК-мишени, с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen). Трансфекцию и измерение люциферазной активности осуществляли в соответствии с инструкциями производителей (с помощью набора, содержащего липофектамин 2000, Invitrogen/две люциферазы Promega) с использованием 150000-300000 клеток на лунку в 6-луночных планшетах. Для компенсации различий в плотности клеток и эффективностей трансфекции сигнал люциферазы коралла Renilla нормализовали по отношению к сигналу люциферазы светляка. Все эксперименты проводили с тремя повторностями.

Неожиданно было обнаружено, что новая конструкция и улучшенная новая конструкция являются наилучшими функциональными ингибиторами всех трех микроРНК-мишеней, miR-155, miR-19b и miR-122 (фиг. 27, 28, 29). Полученные результаты систематизированы в табл. 3.

Систематизированные результаты.

Таблица 3

Степень дерепрессии функции эндогенных miR-155, miR-19b и miR-122a под действием различных конструкций LNA-antimiR

Конструкция	miR-155	miR-19b	miR-122a
Улучшенная новая конструкция	***	***	данные отсутствуют
Новая конструкция	***	***	***
Полный комплемент, LNA_3	**	***	**
Полный комплемент, блок	**	**	**
Полный комплемент, гзп	*	не значимый	не значимый

Библиография

- Abelson, J.F. et al., 2005. Science, 310: 317-20.
 Bartel, D.P. 2004. Cell, 116: 281-297.
 Boehm, M., Slack, F. 2005. Science. 310: 1954-7.
 Brennecke, J. et al., 2003. Cell, 113: 25-36.
 Calin, G.A. et al., 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 15524-15529.
 Calin, G.A. et al., 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 2999-3004.
 Calin, G.A. et al., 2005. N. Engl. J. Med. 353: 1793-801.
 Chan, J.A. et al., 2005. Cancer Res. 65: 6029-33.
 Chen, C.Z., et al., 2004. Science. 303: 83-86.
 Chen, J.F., et al., 2005. Nat. Genet. Dec. 25, advance online publication.
 Eis, P.S. et al., 2005. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 3627-32.
 Giraldez, A.J. et al., 2005. Science, 308: 833-838.
 Griffiths-Jones, S. et al., 2004. Nucleic Acids Res. 32: D109-D111.
 Griffiths-Jones, S., et al., 2006. Nucleic Acids Res. 34: D140-4
 He, L. et al., 2005. Nature, 435: 828-833.
 Hornstein, E. et al., 2005. Nature, 438: 671-4.
 Hutvagner, G. et al., 2001. Science, 293: 834-838.
 Hutvagner, G. et al., 2004. PLoS Biology, 2: 1-11.
 Iorio, M.V. et al., 2005. Cancer Res. 65: 7065-70.
 Jin, P. et al., 2004, Nat Cell Biol. 6: 1048-53.
 Johnson, S.M. et al., 2005. Cell, 120: 635-647.
 Jopling, C.L. et al., 2005. Science, 309: 1577-81.
 Ketting, R.F. et al., 2001. Genes Dev. 15: 2654-2659.
 Kwon, C. et al., 2005. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 18986-91.
 Landthaler, M. et al., 2004. Curr. Biol. 14: 2162-2167.
 Leaman, D. et al., 2005. Cell, 121: 1097-108.
 Lee, Y., et al., 2003. Nature, 425: 415-419.
 Li, X. и Carthew, R.W. 2005. Cell, 123: 1267-77.
 Lu, J. et al., 2005. Nature, 435: 834-838.
 Michael, M.Z. et al., 2003. Mol. Cancer Res. 1: 882-891.

- Nelson, P. et al., 2003. TIBS, 28: 534-540.
Paushkin, S., et al., 2002. Curr. Opin. Cell Biol. 14: 305-312.
Poy, M.N. et al., 2004. Nature, 432: 226-230.
Wienholds, E. et al., 2005. Science, 309: 310-311.
Yekta, S. et al., 2004. Science, 304: 594-596.
Zhao, Y. et al., 2005. Nature, 436: 214-220.

Список последовательностей

<110> Santaris A/S
 <120> ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ
 <130> 16870PCT00
 <160> 109
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 uggaguguga caaugguguu ugu 23
 <210> 2
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 ugugcaaauc caugcaaaac uga 23
 <210> 3
 <211> 22
 <212> РНК
 <213> Homos sapiens
 <400> 3
 uuaaugcuaa ucgugauagg gg 22
 <210> 4
 <211> 22
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 uagcuuauca gacugauguu ga 22
 <210> 5
 <211> 22
 <212> РНК
 <213> homo sapiens
 <400> 5
 uuuguucguu cggcucgcu ga 22
 <210> 6
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

<400> 6		
tttgca		6
<210> 7		
<211> 6		
<212> ДНК		
<213> homo sapiens		
<400> 7		
acactc		6
<210> 8		
<211> 6		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
<400> 8		
agcatt		6
<210> 9		
<211> 6		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
<400> 9		
cgaaca		6
<210> 10		
<211> 6		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
<400> 10		
ataagc		6
<210> 11		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Полный комплемент гэл-мер, LNA в положениях 1-4 и 20-23		
<400> 11		
асааасасса ttgtcacact cca		23
<210> 12		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Полный комплемент, блок-мер, LNA в положениях 7-14		
<400> 12		
асааасасса ttgtcacact cca		23

<210>	13	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Полный комплемент, LNA смешанный мономер-LNA, в 3-положении, а затем в каждом третьем положении	
<400>	13	
	асаааасасса ttgtcacact cca	23
<210>	14	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Остатки LNA в положениях 1,3,6,7,10,12,14 и 15	
<400>	14	
	сcattgtcac actcc	15
<210>	15	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Остатки LNA в положениях 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15	
<400>	15	
	сcattgtcac actcc	15
<210>	16	
<211>	13	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Остатки LNA в положениях 1-5, 7-10, 12 и 13.	
<400>	16	
	attgtcacac tcc	13
<210>	17	
<211>	11	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Остатки LNA в положениях 1-3, 5-8, 10 и 11.	
<400>	17	
	tggtcacactc c	11

<210> 18
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-ОМе

 <400> 18
 ccattgtcac actcc 15

 <210> 19
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-фтор

 <400> 19
 ccattgtcac actcc 15

 <210> 20
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полный комплемент гзп-мер, LNA в положениях 1-4 и 20-23

 <400> 20
 tcagttttgc atggatttgc asa 23

 <210> 21
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полный комплемент, блок-мер, LNA в положениях 7-14

 <400> 21
 tcagttttgc atggatttgc asa 23

 <210> 22
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полный комплемент, LNA смешанный мономер-LNA, в 3-положении, а затем в каждом третьем положении

 <400> 22

tcagttttgc atggatttgc aca 23

<210> 23
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 и 15

<400> 23
 tgcattggatt tgcac 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15

<400> 24
 tgcattggatt tgcac 15

<210> 25
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1, 3-5, 7-10, 12 и 13

<400> 25
 catggatttg cac 13

<210> 26
 <211> 11
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1-3, 5-8, 10 и 11

<400> 26
 tggatttgca c 11

<210> 27
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-OMe

<400> 27
 tgcattggatt tgcac 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-фтор

 <400> 28
 tgcattggatt tgcac 15

 <210> 29
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полный комплемент геп-мер, LNA в положениях 1-4 и 20-23

 <400> 29
 cccctatcac gattagcatt aa 22

 <210> 30
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полный комплемент, блок-мер, LNA в положениях 7-14

 <400> 30
 cccctatcac gattagcatt aa 22

 <210> 31
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полный комплемент, LNA смешанный мономер-LNA, в 3-положении, а затем в каждом третьем положении

 <400> 31
 cccctatcac gattagcatt aa 22

 <210> 32
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15

 <400> 32

tcacgattag catta 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15

<400> 33
 tcacgattag catta 15

<210> 34
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1-5, 8-11, 12 и 13

<400> 34
 acgattagca tta 13

<210> 35
 <211> 11
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1-3, 5-7, и 9-11

<400> 35
 gattagcatt a 11

<210> 36
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-ОМе

<400> 36
 tcacgattag catta 15

<210> 37
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-фтор

<400> 37
 tcacgattag catta 15

<210> 38
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полный комплемент гзп-мер, LNA в положениях 1-4 и 20-23

<400> 38
 tcaacatcag tctgataagc ta 22

<210> 39
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полный комплемент, блок-мер, LNA в положениях 7-14

<400> 39
 tcaacatcag tctgataagc ta 22

<210> 40
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полный комплемент, LNA смешанный мономер-LNA, в 3-положении, а затем в каждом третьем положении

<400> 40
 tcatcatcag tctgataagc tt 22

<210> 41
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1,3,6,7,10,12,14 и 15

<400> 41
 tcagtctgat aagct 15

<210> 42
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15

<400> 42
 tcagtctgat aagct 15

<210> 43
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1-5, 7-10, 12 и 13.

 <400> 43
 agtctgataa gct 13

 <210> 44
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1-3, 5, 7-11

 <400> 44
 tcagtctgat aagct 15

 <210> 45
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-Оме

 <400> 45
 tcagtctgat aagct 15

 <210> 46
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-фтор

 <400> 46
 tcagtctgat aagct 15

 <210> 47
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полный комплемент гэл-мер, LNA в положениях 1-4 и 20-23

 <400> 47

tctcgcgtgc cgttcggttct tt 22

<210> 48
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полный комплемент, блок-мер, LNA в положениях 7-14

<400> 48
 tctcgcgtgc cgttcggttct tt 22

<210> 49
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полный комплемент, LNA смешанный мономер-LNA, в 3-положении, а затем в каждом третьем положении

<400> 49
 tctcgcgtgc cgttcggttct tt 22

<210> 50
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15

<400> 50
 gtgccgttcg ttctt 15

<210> 51
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1, 3, 5-7, 10-12, 14 и 15

<400> 51
 gtgccgttcg ttctt 15

<210> 52
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1-5, 7, 9-13

<400> 52

gccgttcggtt ctt 13

<210> 53
 <211> 11
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Остатки LNA в положениях 1-4, 6-11

<400> 53
 cggttcggttct t 11

<210> 54
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-ОМе

<400> 54
 gtgccgttcg ttctt 15

<210> 55
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Все остатки LNA, за исключением остатков в положениях 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, которые представляют собой 2'-фтор

<400> 55
 gtgccgttcg ttctt 15

<210> 56
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Фосфориоатный остов, LNA в положении 2, а затем в каждом третьем положении

<400> 56
 ccattgtcac actcca 16

<210> 57
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фосфортиоатный остов, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем положении

<400> 57
ccattgtcac actcca 16

<210> 58
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Фосфортиоатный остов - геп-мерная конструкция, содержащая LNA в положениях 1-3 и 13-15

<400> 58
ccattgtcac actcca 16

<210> 59
<211> 15
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Фосфортиоатный остов, LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 и 15

<400> 59
ccattgtcac actcc 15

<210> 60
<211> 15
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Фосфортиоатный остов, LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 и 15, цитозины LNA являются метилированными

<400> 60
ccattctgcac cctac 15

<210> 61
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Фосфортиоатный остов, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем положении

<400> 61
ccattgtctc aatcca 16

<210> 62
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Фосфортиоатный остов, LNA в положениях 1, 4, 5, 8, 10, 12 и 13

 <400> 62
 attgtcacac tcc 13

 <210> 63
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Полностью фосфортиоатный остов, LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 и 16, все цитозины LNA являются метилированными. LNA предпочтительно представляют собой бета-D-окси-LNA.

 <400> 63
 ccattctgac cctac 15

 <210> 64
 <211> 22
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 64
 uagcuuauca gacugauguu ga 22

 <210> 65
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Геп-мерная конструкция, необязательная FAM-метка у 5'-конца, LNA в положениях 1-3 и 13-15

 <400> 65
 tcagtctgat aagcta 16

 <210> 66
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Геп-мерная конструкция, необязательная FAM-метка у 5'-конца, LNA в положениях 1-3 и 13-15

 <400> 66

tccgtcttag aagata 16

<210> 67
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Необязательная FAM-метка у 5'-конца, LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 13 и 15

<400> 67
 tctgtcagat acgat 15

<210> 68
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Необязательная FAM-метка у 5'-конца, LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 13 и 15

<400> 68
 tcagtctgat aagct 15

<210> 69
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Необязательная FAM-метка у 5'-конца, LNA в положениях 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14 и 15

<400> 69
 tcagtctgat aagct 15

<210> 70
 <211> 7
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 atttgca 7

<210> 71
 <211> 8
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 gatttgca 8

<210> 72
 <211> 9
 <212> ДНК

<213> Homo sapiens	
<400> 72	
ggcttttgca	9
<210> 73	
<211> 7	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 73	
cacactc	7
<210> 74	
<211> 8	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 74	
tcacactc	8
<210> 75	
<211> 9	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 75	
gtcacactc	9
<210> 76	
<211> 7	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 76	
tagcatt	7
<210> 77	
<211> 8	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 77	
ttagcatt	8
<210> 78	
<211> 9	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 78	
attagcatt	9
<210> 79	
<211> 7	
<212> ДНК	

<213> Homo sapiens
 <400> 79
 acgaaca 7

<210> 80
 <211> 8
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 80
 aacgaaca 8

<210> 81
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 81
 gaacgaaca 9

<210> 82
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем
 положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA.
 Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными
 <400> 82
 tgcattggatt tgcaca 16

<210> 83
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем
 положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA.
 Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными
 <400> 83
 tgcattggatt tgcac 15

<210> 84
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 1, а затем в каждом третьем
 положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA.
 Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 84
catggatttg cac 13

<210> 85
<211> 15
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 2, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 85
tgcattgatt tgcac 15

<210> 86
<211> 13
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 2, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 86
catggatttg cac 13

<210> 87
<211> 13
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положениях 1, 4, 5, 8, 10, 12 и 13. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 87
catggatttg cac 13

<210> 88
<211> 15
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 и 15. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 88

tgcatggatt tgcac 15

<210> 89
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 10, 14 и 15. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 89
 tgcatggatt tgcaca 16

<210> 90
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 2, а затем в каждом втором положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 90
 ccattgtcac actcca 16

<210> 91
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 2, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 91
 ccattgtaac tctcca 16

<210> 92
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 92
 ccattgtcac actcca 16

<210> 93
 <211> 15

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 2, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфотиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 93
 ccattgtcac actcc 15

<210> 94
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфотиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 94
 attgtcacac tcc 13

<210> 95
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфотиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 95
 ccattgtcac actcc 15

<210> 96
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 1, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфотиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 96
 attgtcacac tcc 13

<210> 97
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 2, а затем в каждом втором положении. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 97
 attgtcacac tcc 13

<210> 98
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положениях 1, 4, 5, 8, 10, 12 и 13. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 98
 attgtcacac tcc 13

<210> 99
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положениях 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 и 15. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 99
 ccattgtcac actcc 15

<210> 100
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положениях 1, 4, 7, 11, 15. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными

<400> 100
 ccattgtcac actcca 16

<210> 101
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положениях 1-3 и 13-15. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA

предпочтительно являются метилированными

- <400> 101
ccattgtcac actcca 16
- <210> 102
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 2, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными
- <400> 102
tcacgattag cattaа 16
- <210> 103
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными
- <400> 103
atcacgatta gcatta 16
- <210> 104
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 1, а затем в каждом втором положении. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными
- <400> 104
tcacgattag cattaа 16
- <210> 105
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положениях 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14 и 16. Предпочтительно, фосфортиоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными.

<400> 105 atcacgatta gcatta	16
<210> 106 <211> 15 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 2, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными	
<400> 106 gagccgaacg aacaa	15
<210> 107 <211> 13 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 3, а затем в каждом третьем положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными	
<400> 107 gccgaacgaa saa	13
<210> 108 <211> 15 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 1, а затем в каждом втором положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными	
<400> 108 gagccgaacg aacaa	15
<210> 109 <211> 13 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ДНК/LNA-олигонуклеотид, LNA в положении 1, а затем в каждом втором положении. Предпочтительно, фосфориоат, предпочтительно, окси-LNA. Цитозины LNA предпочтительно являются метилированными	
<400> 109 gccgaacgaa saa	13

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Олигонуклеотид, имеющий в длину 8-26 нуклеотидов, где олигонуклеотид содержит коровую ДНК-последовательность в положениях 2-7 или в положениях 3-8, считая от 3'-конца

3'-ctcaca-5' (SEQ ID NO: 7),

где по меньшей мере один остаток ДНК в указанной последовательности заменен соответствующим остатком LNA, где нуклеотидная последовательность олигонуклеотида комплементарна человеческой микро-РНК-последовательности miR-122 (SEQ ID NO: 1), и где олигонуклеотид не содержит область из более чем 5 смежных нуклеотидных остатков ДНК, и где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфориотатную межнуклеозидную связь.

2. Олигонуклеотид по п.1, где олигонуклеотид имеет длину от 10 до 17 нуклеотидов.

3. Олигонуклеотид по п.1, где олигонуклеотид имеет длину 15 или 16 нуклеотидов.

4. Олигонуклеотид по любому из пп.1-3, где по меньшей мере два остатка ДНК в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 олигонуклеотида, считая от 3'-конца, заменены соответствующими остатками LNA и где указанные остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК.

5. Олигонуклеотид по любому из пп.1-3, где по меньшей мере три остатка ДНК в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 олигонуклеотида, считая от 3'-конца, заменены соответствующими остатками LNA и где указанные остатки LNA разделены по меньшей мере одним остатком ДНК.

6. Олигонуклеотид по п.4 или 5, где число смежных остатков ДНК в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 указанного олигонуклеотида, считая от 3'-конца, составляет максимум два.

7. Олигонуклеотид по любому из пп.1-6, где общее число остатков LNA в положениях 1-6, 2-7 или 3-8 указанного олигонуклеотида, считая от 3'-конца, составляет от 2 до 6.

8. Олигонуклеотид по любому из пп.1-7, где первое нуклеотидное основание олигонуклеотида, считая от 3'-конца, представляет собой нуклеотидный аналог, такой как остаток LNA.

9. Олигонуклеотид по любому из пп.1-8, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну область, состоящую по меньшей мере из двух смежных остатков LNA.

10. Олигонуклеотид по любому из пп.1-9, где олигонуклеотид не содержит область из более чем 7 смежных остатков LNA.

11. Олигонуклеотид по п.10, где олигонуклеотид не содержит область из более чем 3 смежных остатков LNA.

12. Олигонуклеотид по любому из пп.1-11, где нуклеотидный мотив для трех крайних нуклеотидов с 5'-конца выбран из группы, состоящей из Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX и XXX, где "X" обозначает остаток LNA, а "x" обозначает остаток ДНК.

13. Олигонуклеотид по любому из пп.1-12, где олигонуклеотид не опосредует основанное на РНКазе Н расщепление комплементарной одноцепочечной молекулы РНК.

14. Олигонуклеотид по любому из пп.1-13, где нуклеотид способен образовывать дуплекс с комплементарной одноцепочечной молекулой РНК с фосфодиэфирными межнуклеозидными связями, где дуплекс имеет T_m по меньшей мере приблизительно 70°C.

15. Олигонуклеотид по любому из пп.1-14, где остаток или остатки LNA представляют собой β-D-окси-LNA.

16. Олигонуклеотид по любому из пп.1-15, где все межнуклеозидные связи представляют собой фосфориотатные связи.

17. Олигонуклеотид по п.1 формулы

5'-C**C**A**ttGT**ca**CaCtCC**-3' (SEQ ID NO 99),

где строчные буквы обозначают азотистые основания нуклеотидов ДНК, прописные буквы обозначают азотистые основания остатков LNA;

цитозины LNA являются необязательно метилированными.

18. Олигонуклеотид по п.17, где все межнуклеозидные связи представляют собой фосфориотатные связи.

19. Олигонуклеотид по п.17 или 18, где цитозины LNA представляют собой 5-метилцитозин.

20. Олигонуклеотид по любому из пп.17-19, где остатки LNA представляют собой остатки β-D-окси-LNA.

21. Олигонуклеотид по п.1 формулы

5'-^mC_s^oC_sA_s^ot_st_sG_s^oT_s^oC_sa_s^mC_s^oa_s^mC_s^ot_s^mC_s^{om}C_s^o-3',

где строчные буквы обозначают нуклеотид ДНК, прописные буквы обозначают остатки LNA, ^mC обозначает 5-метилцитозин-LNA, подстрочный индекс s обозначает фосфориотатную межнуклеозидную связь и где остатки LNA представляют собой β-D-окси, на что указывает надстрочный индекс ^o после остатка LNA.

22. Применение олигонуклеотида длиной 8-17 нуклеотидов в отношении клетки или организма, где

олигонуклеотид комплементарен человеческой последовательности miR-122 (SEQ ID NO: 1), для получения лекарственного средства для лечения заболевания или патологического расстройства, ассоциированного с присутствием или повышенной экспрессией микроРНК, такого как заболевание, выбранное из группы, состоящей из повышенного уровня холестерина в плазме, атеросклероза, гиперхолестеринемии или гиперлипидемии и гепатита С.

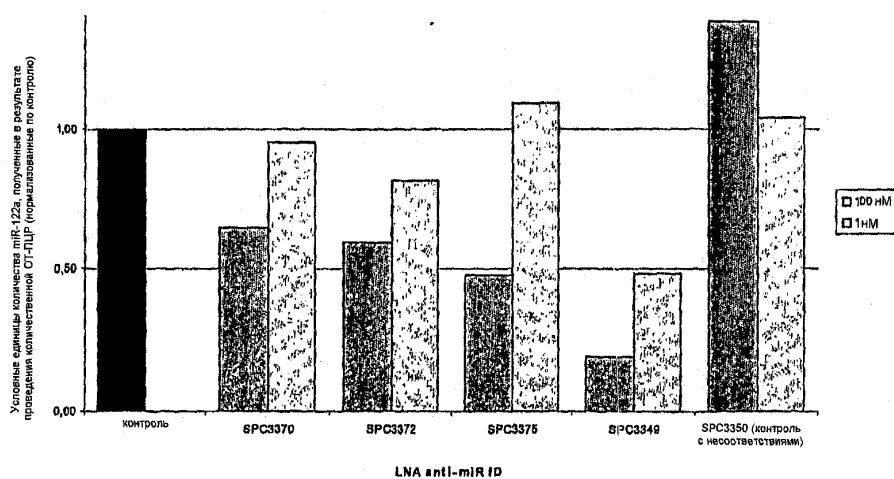
23. Применение по п.22, где олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид, определенный в любом из пп.1-21.

24. Применение по п.23, где заболевание представляет собой гепатит С.

25. Применение по п.24, где олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид, определенный в п.21.

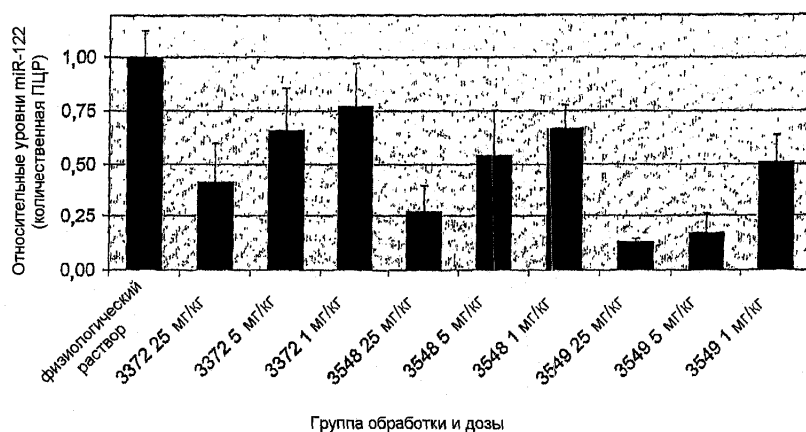
26. Фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид по п.21 и фармацевтически приемлемые разбавители, носитель или адъювант.

Ингибирование miR-122a молекулой LNA-anti-miR122a в клеточной линии Huh-7



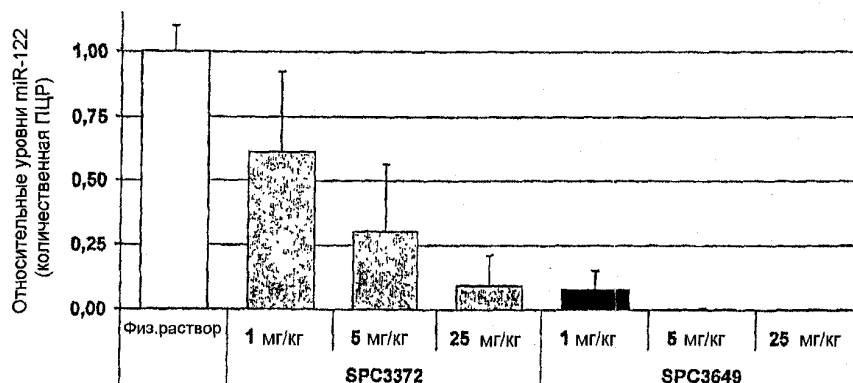
Фиг. 1

Уровни miR-122a в мышечной печени после обработки различными LNA-anti-miR



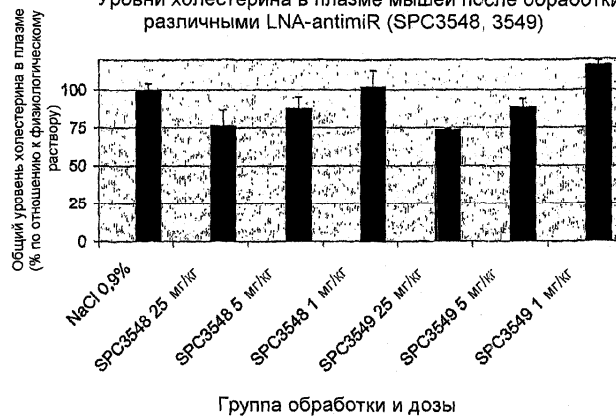
Фиг. 2a

Ингибирование miR-122a молекулой LNA-antimiR in vivo в мышинной печени
(вводили три дозы i.p. (как показано на фигуре) мышам C57/BL6 через день, и мышей умерщвляли через 48 часов после введения последней дозы, PD-06-042/050, miR-06-014/026, среднее и ср.кв.от., n=8)



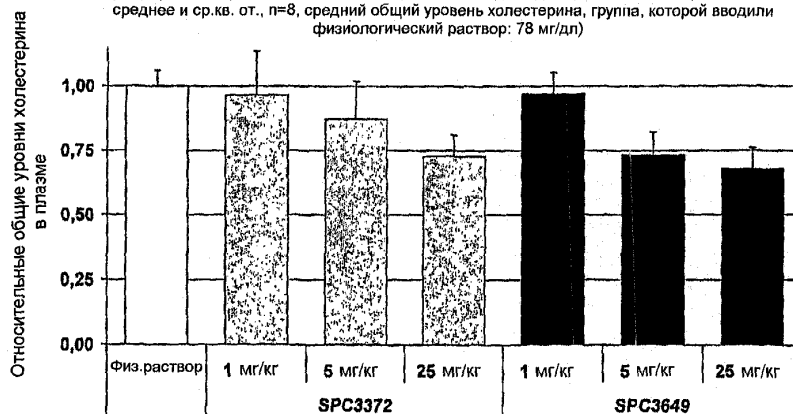
Фиг. 2b

Уровни холестерина в плазме мышей после обработки различными LNA-antimiR (SPC3548, 3549)



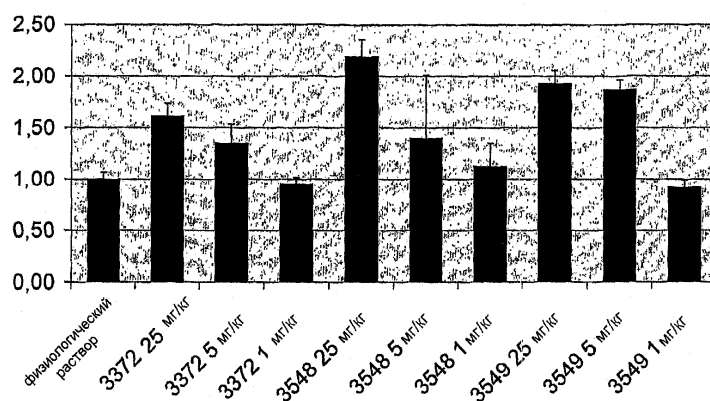
Фиг. 3a

Общий уровень холестерина в плазме мышей, обработанных LNA-antimiR
(вводили три дозы i.p. (как показано на фигуре) мышам C57/BL6 через день, и мышей умерщвляли через 48 часов после введения последней дозы, PD-06-042/050, miR-06-014/026, среднее и ср.кв. от., n=8, средний общий уровень холестерина, группа, которой вводили физиологический раствор: 78 мг/дл)



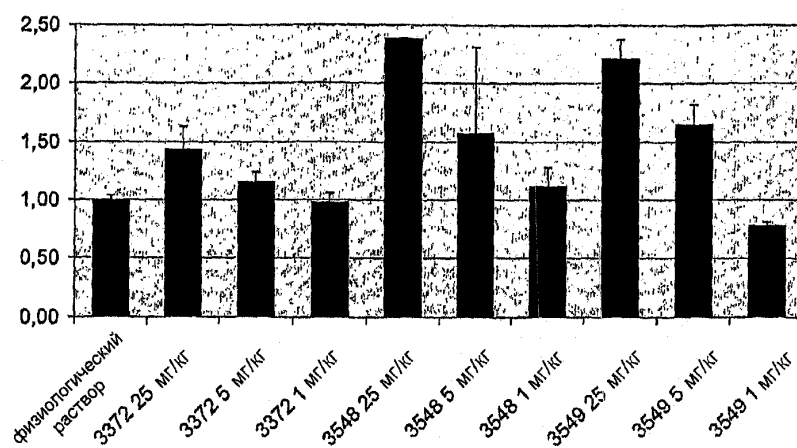
Фиг. 3b

Относительные уровни мРНК Bcdk



Фиг. 4a

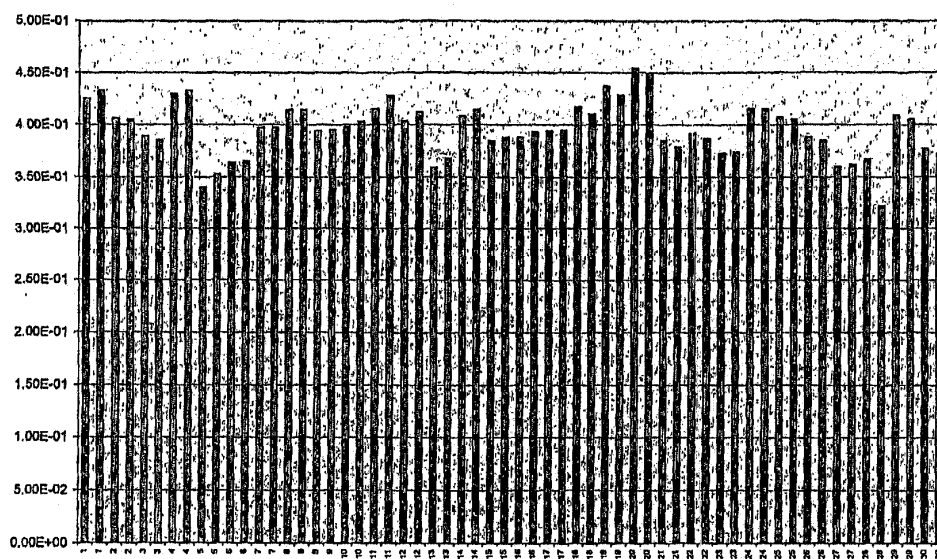
Относительные уровни мРНК AldoA



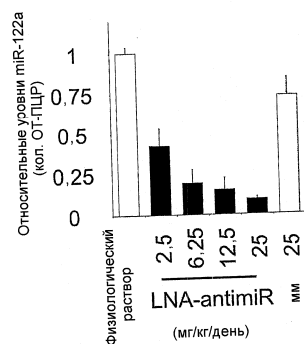
Группа обработки и доза

Фиг. 4b

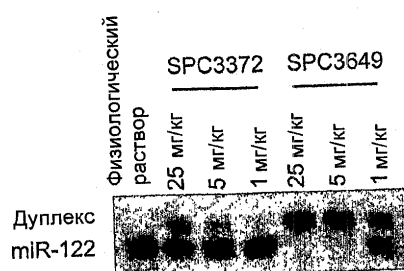
Уровни мРНК GAPDH



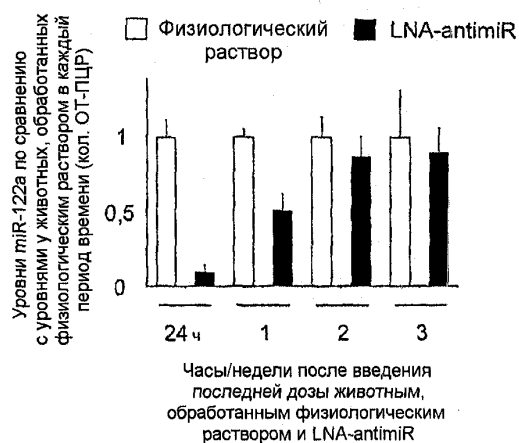
Фиг. 4с



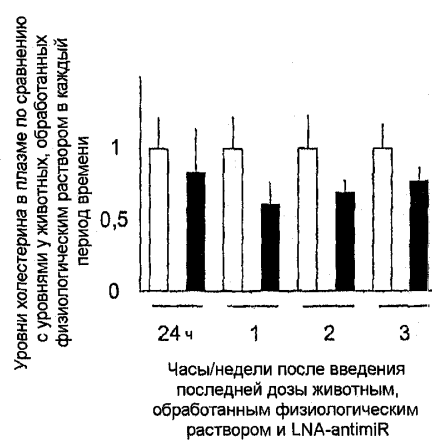
Фиг. 5



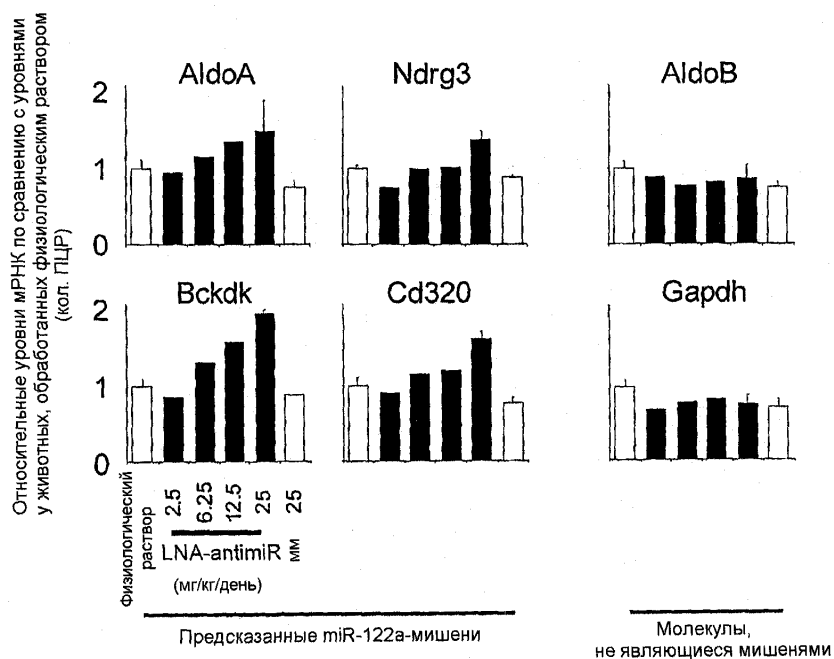
Фиг. 6



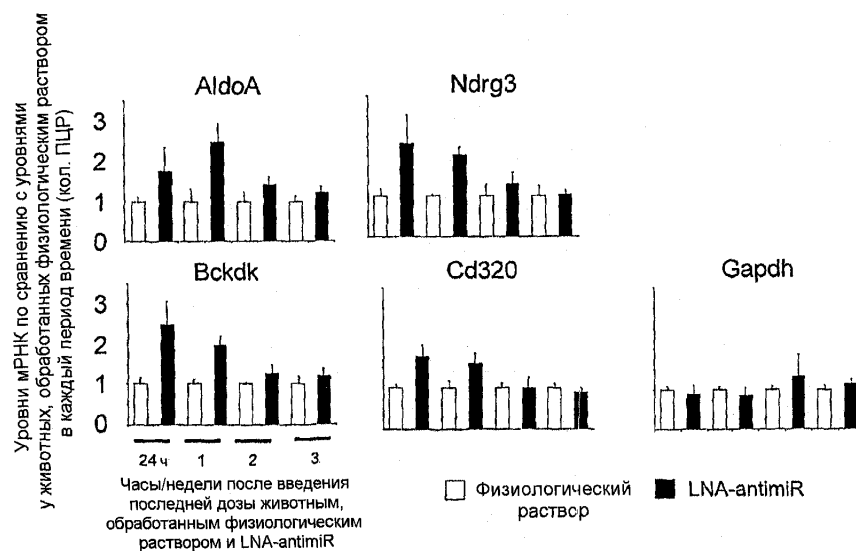
Фиг. 7



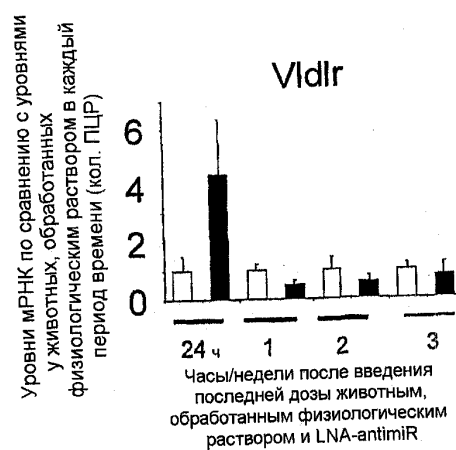
Фиг. 8



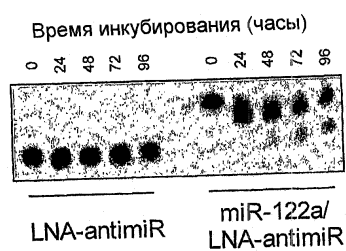
Фиг. 9



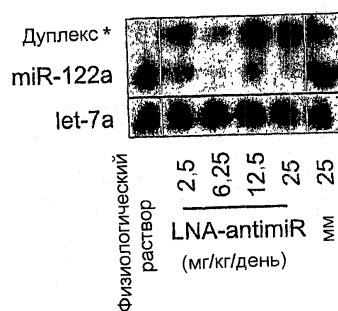
Фиг. 10



Фиг. 11

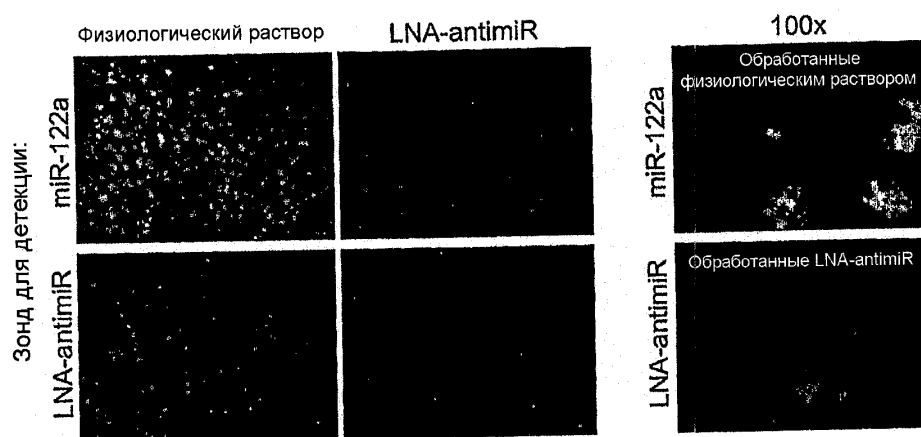


Фиг. 12

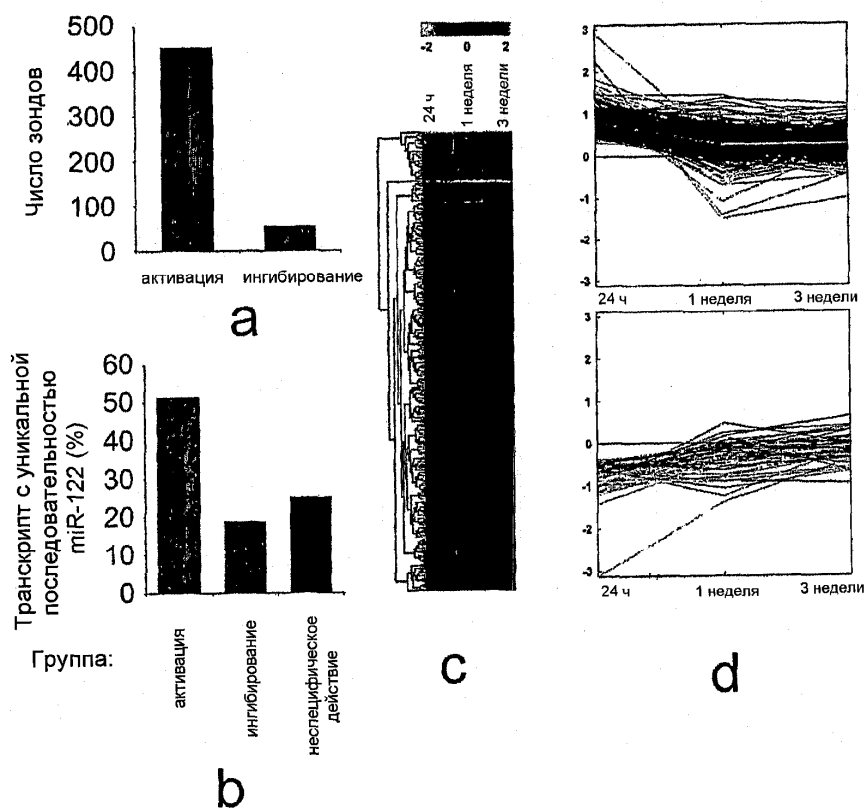


Фиг. 13

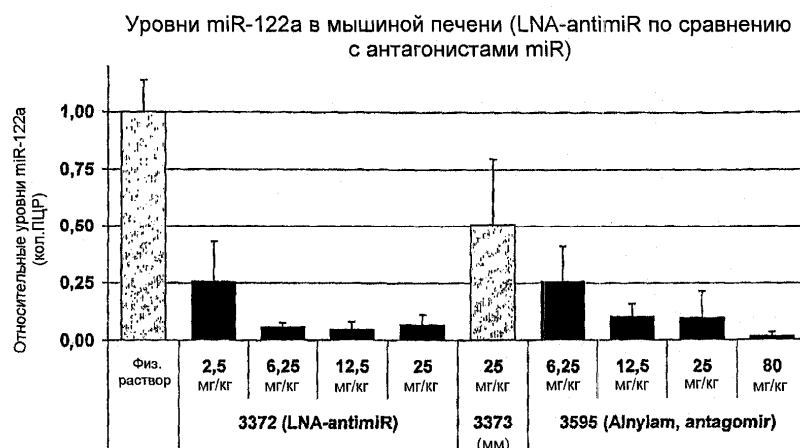
Обработка:



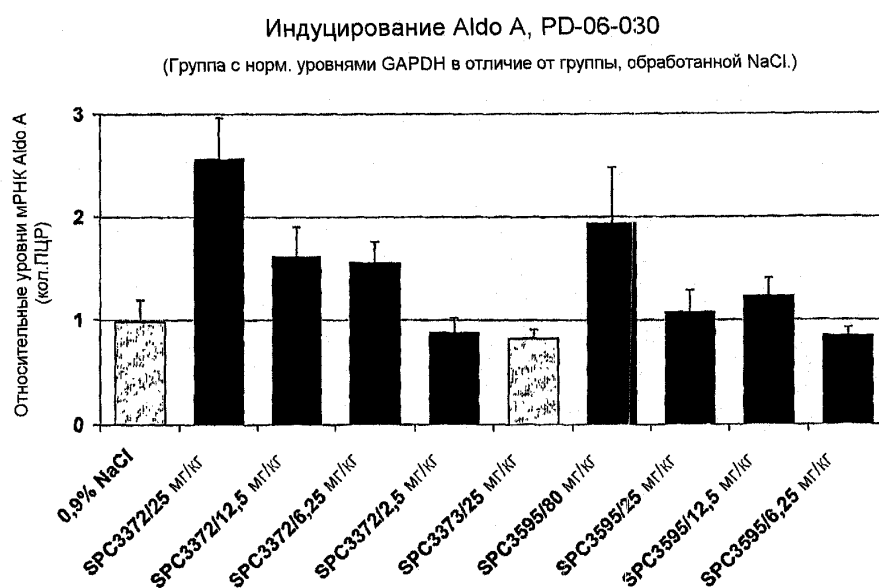
Фиг. 14



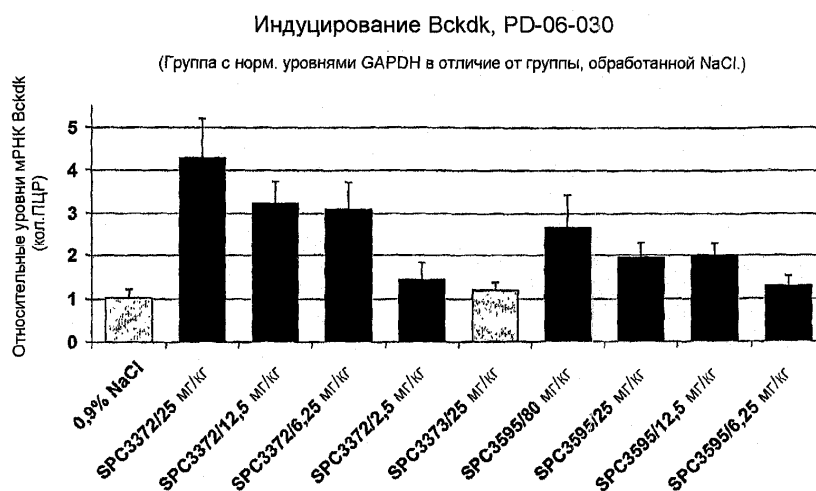
Фиг. 15



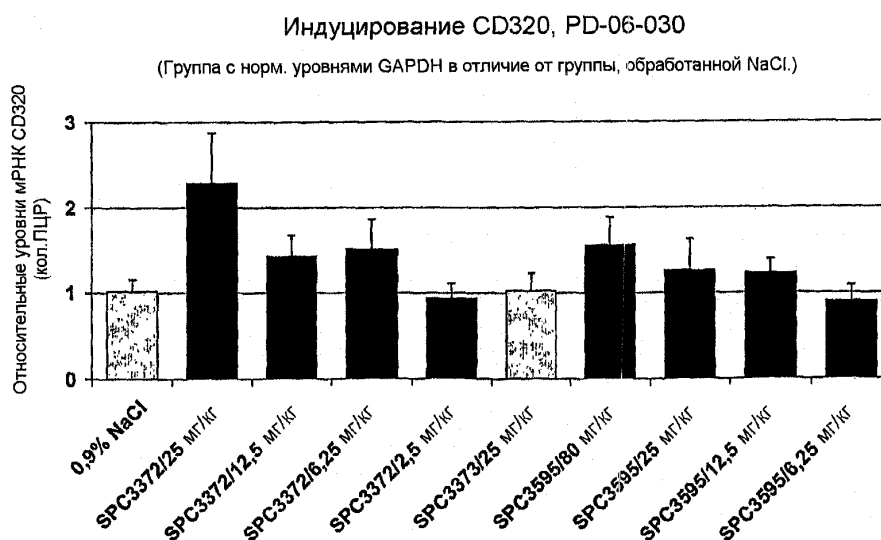
Фиг. 16



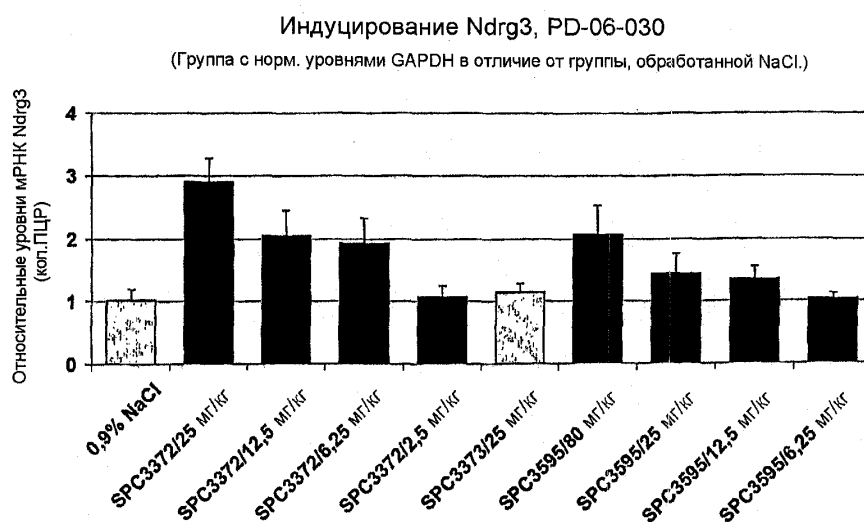
Фиг. 17



Фиг. 18



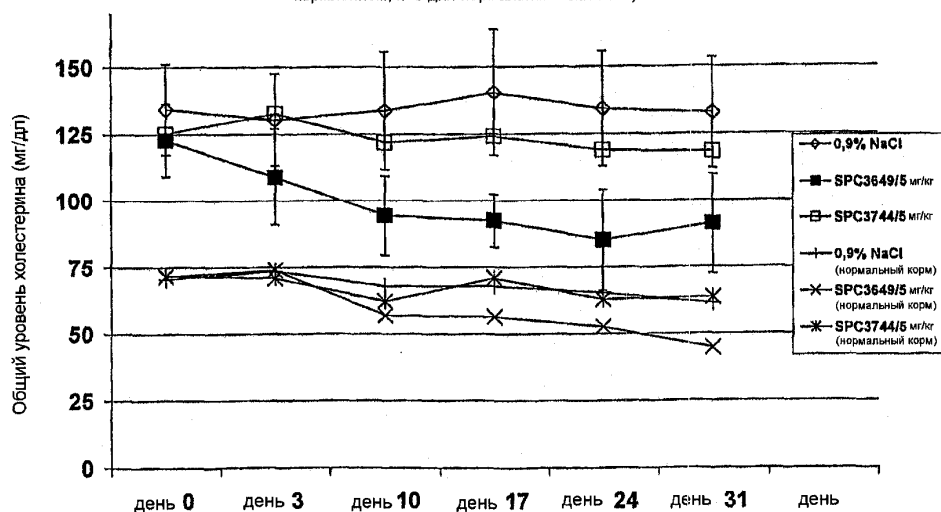
Фиг. 19



Фиг. 20

Общие уровни холестерина в плазме во время всего эксперимента у мышей с ожирением, индуцированным соответствующим кормлением, которые были обработаны LNA-antimiR, являющимся антагонистом miR-122a

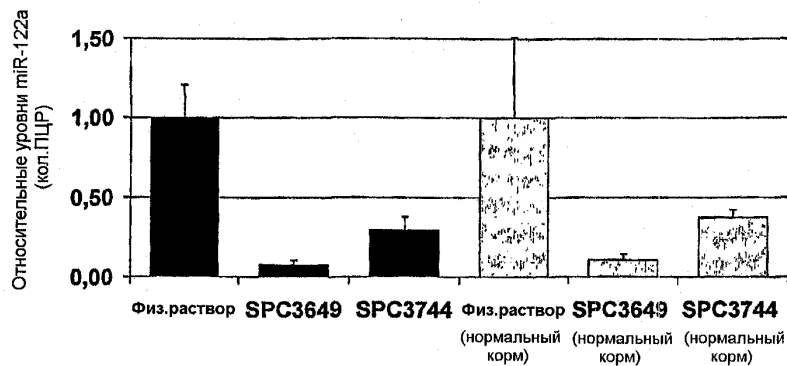
(SPC3649, mm – контроль SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, среднее и ср. кв. от. (только NaCl и 3649), n=10 для животных с ожирением, индуцированным соответствующим кормлением, n=5 для нормальных животных)



Фиг. 21

Уровни miR-122a в печени у мышей с ожирением, индуцированным соответствующим кормлением, которые были обработаны LNA-antimiR

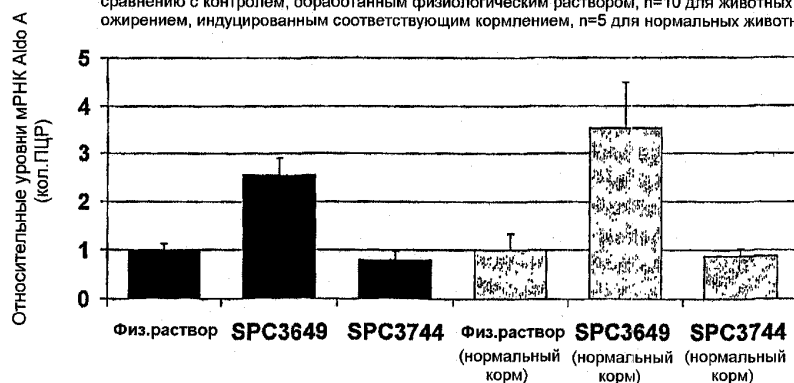
(SPC3649, mm – контроль SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, среднее и ср. кв. от., по сравнению с контролем, обработанным физиологическим раствором, n=10 для животных с ожирением, индуцированным соответствующим кормлением, n=5 для нормальных животных)



Фиг. 22

Уровни экспрессии мРНК альдолазы А в печени у мышей с ожирением, индуцированным соответствующим кормлением, которые были обработаны LNA-antimiR

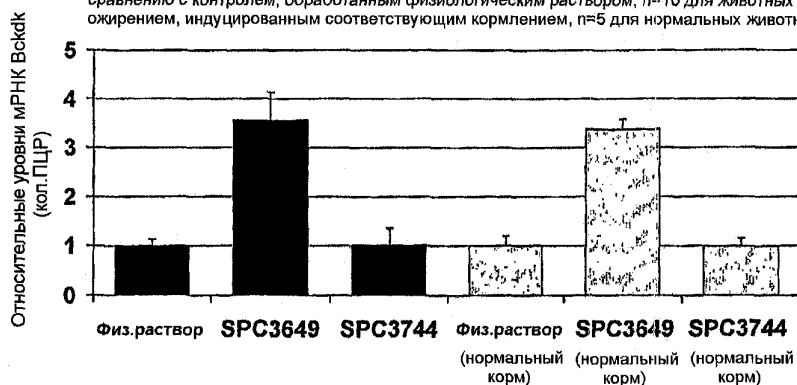
(SPC3649, mт – контроль SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, среднее и ср.кв.от., по сравнению с контролем, обработанным физиологическим раствором, n=10 для животных с ожирением, индуцированным соответствующим кормлением, n=5 для нормальных животных)



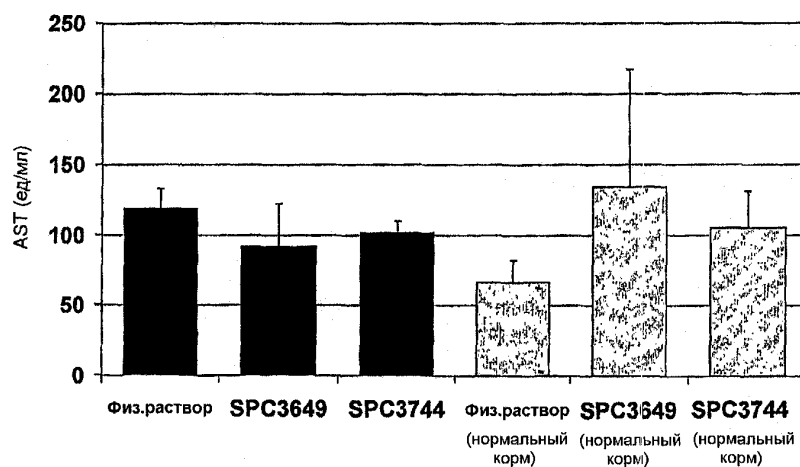
Фиг. 23

Уровни экспрессии мРНК Bckdk в печени у мышей с ожирением, индуцированным соответствующим кормлением, которые были обработаны LNA-antimiR

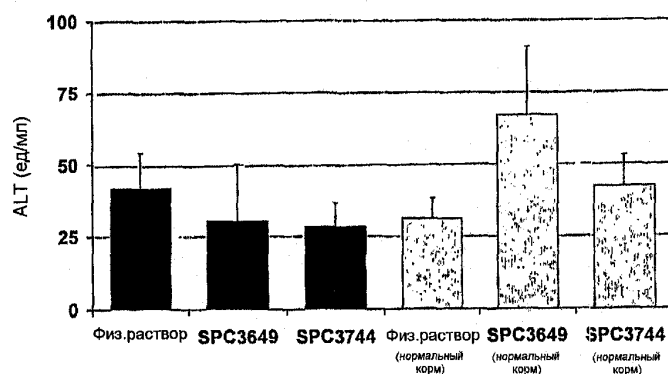
(SPC3649, mт – контроль SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, среднее и ср.кв.от., по сравнению с контролем, обработанным физиологическим раствором, n=10 для животных с ожирением, индуцированным соответствующим кормлением, n=5 для нормальных животных)



Фиг. 24

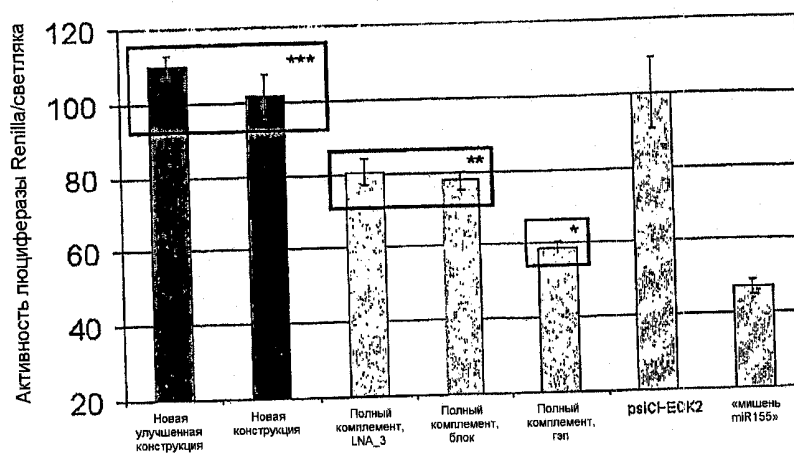


Фиг. 25



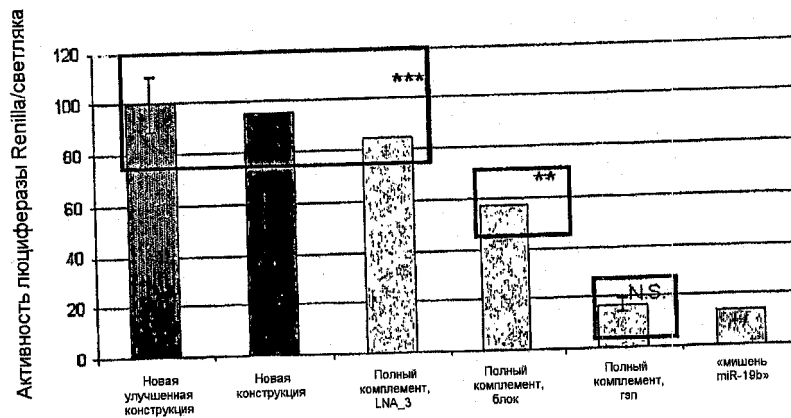
Фиг. 26

LNA-antimiR, 0,1 нМ, клетки 518A2



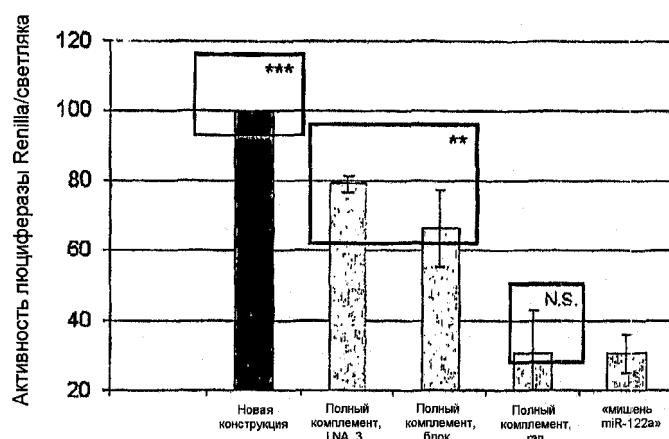
Фиг. 27

LNA-antimiR, 5 нМ, клетки HeLa



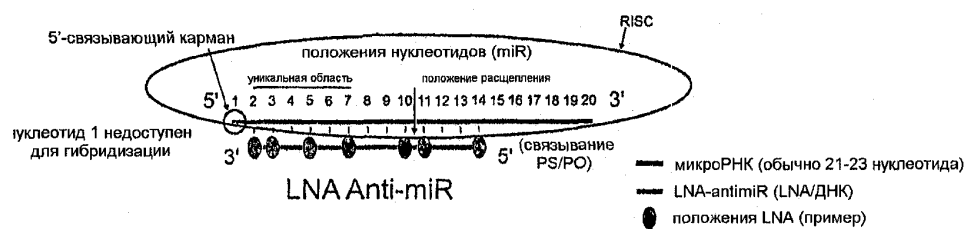
Фиг. 28

LNA-antimiR, 5 нМ, клетки HUH7



Фиг. 29

Зрелая микроРНК в RISC



Фиг. 30

