



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/113 (2006.01); A61K 9/5031 (2006.01); A61K 31/7088 (2006.01); A61P 9/00 (2006.01); C12N 2310/113 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015134770, 23.01.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.01.2014

Дата регистрации:
02.10.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.01.2013 EP 13305082.3

(43) Дата публикации заявки: 03.03.2017 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 02.10.2018 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 24.08.2015

(86) Заявка РСТ:
IB 2014/058500 (23.01.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/115103 (31.07.2014)

Адрес для переписки:
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов
и партнёры"

(72) Автор(ы):

АСИН Мигель-Анхель (ES),
ФЕРРЕТ Эулалия (ES),
ПЕРЕЗ Амадэо (ES),
ГОТАРДА Нёс Белльера (ES),
РОДРИГЕС СИНОВАС Антонио (ES),
ВЕРТ Игнаси Барда (ES),
ГАРСИЯ-ДОРАДО ГАРСИЯ Антонио
Давид (ES)

(73) Патентообладатель(и):

ПЬЕР ФАБР МЕДИКАМЕНТ С.А.С. (FR),
ФУНДАСИО ОСПИТАЛЬ
УНИВЕРСИТАРИ ВАЛЬ Д'ЭБРОН -
ИНСТИТУТ ДЕ РЕСЕРКА (ES)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: BONAUER A. et al., MicroRNA-
92a controls angiogenesis and functional
recovery of ischemic tissues in mice, Science,
2009, V. 324, N. 5935, p. 1710-1713. NAFEE N.
at al., Chitosan-coated PLGA nanoparticles for
DNA/RNA delivery: effect of the formulation
parameters on complexation and transfection
of antisense oligonucleotides, Nanomedicine:
(см. прод.)

(54) КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ИНКАПСУЛИРОВАННЫЙ АНТАГОМИР

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора микроРНК, вовлеченной в ангиогенез и проявляющей антиангиогенную активность, или ее предшественника, где ингибитор микроинкапсулирован в полимерных

биоразлагаемых и биосовместимых микросферах, и может быть использовано в медицине. Изобретение позволяет предотвратить ремоделирование желудочка сердца после острого инфаркта миокарда при интракоронарном введении. 4 н. и 19 з.п. ф-лы, 12 ил., 5 табл., 14 пр.

(56) (продолжение):

Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2007, V. 3, N. 3, p. 173-183. LUO G. et al., RNA interference of MBD1 in BxPC-3 human pancreatic cancer cells delivered by PLGA-polyoxamer nanoparticles, Cancer

biology and therapy, 2009, V. 8, N. 7, p. 594-598. D'ANGELO I. et al., Improved delivery of angiogenesis inhibitors from PLGA: poloxamer blend micro-and nanoparticles, Journal of microencapsulation, 2010, V. 27, N. 1, p. 57-66. CHENG C. et al., Polymer Nanoparticle-Mediated Delivery of MicroRNA Inhibition and Alternative Splicing, Molecular pharmaceutics, 2012, V. 9, N. 5, p. 1481-1488. JAIN R.A., The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices, Biomaterials, 2000, V. 21, N. 23, p.2475-2490. КОРОБОВ Г. А. и др., Ишемическая болезнь сердца: регулирование с помощью микроРНК, Кардиологический вестник, 2011, Т. 6, N. 2, с. 5-9.

R U 2 6 6 8 7 9 4 C 2

R U 2 6 6 8 7 9 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 15/113 (2006.01); *A61K 9/5031* (2006.01); *A61K 31/7088* (2006.01); *A61P 9/00* (2006.01); *C12N 2310/113* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015134770**, **23.01.2014**

(24) Effective date for property rights:
23.01.2014

Registration date:
02.10.2018

Priority:

(30) Convention priority:
24.01.2013 EP 13305082.3

(43) Application published: **03.03.2017** Bull. № **7**

(45) Date of publication: **02.10.2018** Bull. № **28**

(85) Commencement of national phase: **24.08.2015**

(86) PCT application:
IB 2014/058500 (23.01.2014)

(87) PCT publication:
WO 2014/115103 (31.07.2014)

Mail address:
191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov i partnery"

(72) Inventor(s):

**ASIN Migel-Ankhel (ES),
FERRET Eulaliya (ES),
PEREZ Amadeo (ES),
GOTARDA Nes Bellera (ES),
RODRIGES SINOVAS Antonio (ES),
VERT Ignasi Barda (ES),
GARSIYA-DORADO GARSIYA Antonio David (ES)**

(73) Proprietor(s):

**PER FABR MEDIKAMENT S.A.S. (FR),
FUNDASIO OSPITAL UNIVERSITARI VAL
D'EBRON - INSTITUT DE RESERKA (ES)**

(54) COMPOSITION COMPRISING AN ENCAPSULATED ANTAGOMIR

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to a composition comprising an effective amount of at least one microRNA inhibitor involved in angiogenesis and exhibiting anti-angiogenic activity, or a precursor thereof, wherein said inhibitor is microencapsulated in polymer biodegradable and

biocompatible microspheres, and can be used in medicine.

EFFECT: invention makes it possible to prevent ventricular remodeling after an acute myocardial infarction with intracoronary administration.

23 cl, 12 dwg, 5 tbl, 14 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических препаратов для предупреждения или лечения сердечных расстройств, включающих сердечные ишемические расстройства.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Острый инфаркт миокарда (ОИМ), также называемый инфарктом миокарда и общеизвестный как острое сердечно-сосудистое заболевание, представляет основной риск для здоровья в большинстве индустриальных стран мира и остается ведущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире.

Как правило, ОИМ вызван внезапной и устойчивой недостаточностью притока крови к ткани сердца, которая обычно является результатом сужения или окклюзии коронарной артерии. В отсутствие адекватного снабжения кровью ткань становится ишемической, что приводит к гибели кардиомиоцитов (клеток сердечной мышцы) и сосудистых структур.

За последние десятилетия было много достижений в лечении ОИМ, прежде всего, в отношении коронарной реперфузии в сочетании с фармакотерапией. Реперфузионная терапия имела успех в улучшении показателей краткосрочной и долгосрочной заболеваемости и смертности посредством изменения естественного прогрессирования ОИМ за счет сокращения площади, пораженной инфарктом. Тем не менее, при применении двух стратегий реперфузии, доступных в настоящее время, существуют значительные ограничения: фибринолиз приводит в результате к низкой степени проницаемости коронарных сосудов, а первичную ангиопластику невозможно применять часто в первые часы развития ОИМ. Кроме того, у некоторых пациентов с постоянным катетером встречается феномен нарушения микроциркуляции обструктивного генеза или отсутствия реперфузии сосудов, несмотря на нормальный эпикардальный кровоток, что приводит в результате к неблагоприятным функциональным исходам. Это означает, что реперфузионная терапия не предотвращала встречаемость разрушительного ремоделирования миокарда, представляющего собой комплексный самостоятельный репаративный процесс образования коллагенового рубца, приводящего в результате к дилатации желудочка, сократительной дисфункции и последующей сердечной недостаточности. Встречаемость этого феномена приблизительно в 30% случаев ОИМ, главным образом, связана с большим размером инфаркта, обструкцией сосудов и неблагоприятными репаративными реакциями, еще недостаточно понятными.

Поскольку репаративный фиброз и функциональное восстановление ишемических тканей зависит от формирующихся сосудистых сетей, доставляющих кровь, насыщенную кислородом, приложены усилия к улучшению сосудистого ложа путем индукции неоангиогенеза в заживляемой области для достижения направленного преобразования поврежденных областей в функциональную ткань *in situ*.

Терапевтическая индукция ангиогенеза могла бы уменьшить встречаемость данного феномена. Несмотря на это, результаты клинических испытаний с внутривенными проангиогенными факторами в течение нескольких лет оказались неудовлетворительными. Не желая быть связанными теорией, считают, что одна из причин, объясняющих эту неудачу, может состоять в том, что внутривенный путь может не приводить к достижению концентрации, эффективной для стимуляции и поддержания функциональной сосудистой сети при тяжело нарушенных состояниях сердца, и к поддержанию этой концентрации в ткани-мишени.

С целью решения данной проблемы и предотвращения сердечной недостаточности после ОИМ в течение последнего десятилетия было начато исследование, касающееся

возможности регенерации сердечной мышцы и сосудов. Первоначальные исследования введения плюрипотентных клеток-предшественников и инфузии факторов роста кровеносных сосудов показали перспективные результаты, но переход к клиническим условиям показал неспособность этих терапий к регенерации новообразованных сосудов

путем, адекватным для обеспечения восстановления нарушенной сердечной мышцы. На настоящий момент ангиогенез и восстановление популяции клеток поврежденного сердца клеточной терапией, а также специфичными лекарственными средствами и ресинхронизирующей терапией может замедлить прогрессирование данного феномена, но предотвращение его встречаемости остается вызывающим сомнения вопросом для кардиологии. Следовательно, необходимы новые стратегии лечения, предотвращающие нежелательное ремоделирование левого желудочка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к лечению сердечных, предпочтительно ишемических расстройств путем введения композиции, которая реверсирует или предупреждает ремоделирование желудочка посредством модулирования активности или экспрессии микроРНК (рибонуклеиновая кислота). Более конкретно в изобретении предложена композиция, содержащая ингибитор микроРНК, вовлеченной в ангиогенез, где указанный ингибитор предпочтительно включен в новый носитель для доставки, способный к локальному высвобождению ингибитора в ишемическую ткань-мишень. Кроме того, в изобретении предложен способ реверсирования или предупреждения ремоделирования желудочка и наборы, подходящие для указанного способа.

Данное изобретение относится к композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора микроРНК, вовлеченной в ангиогенез, или ее предшественника, где указанный ингибитор микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах.

В некоторых воплощениях композиции, раскрытой выше, микроРНК выбирают из семейства, включающего следующие микроРНК: miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b).

В некоторых воплощениях композиции, раскрытой выше, ингибитор микроРНК представляет собой олигонуклеотид, содержащий от 8 до 49 нуклеотидов в длину, и имеющий последовательность, нацеленную на указанную микроРНК или ее предшественник. В некоторых воплощениях изобретения данный олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, по меньшей мере частично комплементарный последовательности целевой микроРНК или ее предшественника. Данный антисмысловой олигонуклеотид может быть выбран из группы, состоящей из рибонуклеотида, дезоксирибонуклеотида, малой РНК, антагомира, закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК), пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК), морфолино-олигонуклеотида или их комбинации.

В некоторых воплощениях композиции, раскрытой выше, ингибитор микроРНК состоит из антагомира, и предпочтительно состоит из антагомира, включающего нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов, комплементарных нуклеотидам последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей от SEQ ID No. 1 до SEQ ID No. 58, раскрытых в данном изобретении.

В некоторых воплощениях композиции, раскрытой выше, ингибитор микроРНК состоит из антагомира, включающего последовательность SEQ ID No. 59 или 60 и их модификации за исключением замен оснований, и фрагменты, состоящие по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов подпоследовательностей SEQ ID NO: 59 или 60.

5 В некоторых воплощениях композиции, раскрытой выше, микросферы имеют диаметр, не превышающий 25 мкм, включая микросферы, имеющие диаметр от 5 до 20 мкм, предпочтительно от 5 до 15 мкм.

В некоторых воплощениях композиции, раскрытой выше, микросферы получают из полимера, состоящего из поли-d,l-лактида (ПЛА), причем указанный полимер
10 необязательно смешан с одним или более другим полимером.

Данное изобретение также относится к способу реверсирования или предупреждения ремоделирования желудочка у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение этому субъекту эффективного количества композиции, раскрытой выше.

Данное изобретение также относится к популяции биоразлагаемых и биосовместимых
15 микросфер, применяемых при лечении или предупреждении инфаркта миокарда, причем указанные микросферы:

- имеют средний диаметр от 5 до 20 мкм, предпочтительно от 5 до 15 мкм;
- получают из поли-d,l-лактид-ко-гликолида (ПЛГ); поли-d,l-лактида (ПЛА) или их смеси;

20 - включают от 1 масс. % до 15 масс. % терапевтического средства, способного к предупреждению ремоделирования желудочка,

причем указанное терапевтическое средство состоит из ингибитора микроРНК, выбранной из группы, состоящей из miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a,
25 miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b), и более предпочтительно miR-92a, или ее предшественника.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 иллюстрирует морфологию микросфер антагомир-92a - ПЛГ, определенную
30 с помощью сканирующей электронной микроскопии;

Фиг. 2 иллюстрирует распределение размера микросфер антагомир-92a - ПЛГ, определенное с помощью лазерного светорассеяния;

Фиг. 3 иллюстрирует воздействие на гемодинамику и сократимость левого желудочка в результате многократных инъекций микросфер вплоть до 120 мг;

35 Фиг. 4 иллюстрирует воздействие на гемодинамику и сократимость левого желудочка в результате многократных инъекций микросфер вплоть до 240 мг;

Фиг. 5 иллюстрирует протокол исследования молекулярного воздействия однократной интракоронарной инъекции микросфер согласно изобретению;

40 Фиг. 6 иллюстрирует специфичность ингибирования miR-92a микросферами согласно изобретению;

Фиг. 7 иллюстрирует, что инкапсулированный антагомир-92a индуцирует ангиогенез в ткани, пораженной инфарктом. Плотность сосудов в зоне, пораженной инфарктом, вычислена путем деления общего числа кровеносных сосудов на общую площадь, пораженную инфарктом. n=20, *p менее 0,01;

45 Фиг. 8: Непрямое измерение. Базальный и минимальный индекс резистентности сосудов, измеренный через один месяц после ОИМ, в инфаркт-связанной артерии карликовых свиней, обработанных инкапсулированным антагомир-92a, плацебо или физиологическим раствором, (а) Базальный индекс резистентности сосудов (ИРС)

вычисляли путем умножения давления (мм рт.ст.), оцениваемого с помощью проводника с датчиком давления, расположенным в верхушке левой передней нисходящей артерии (LAD) (Pd), на коронарный кровоток (мл/мин), количественно определяемый с помощью датчика, помещенного в дистальный сегмент LAD. Минимальный индекс резистентности сосудов (ИРС_{тип}) вычисляли при тех же параметрах, измеренных при максимальной гиперемии, достигаемой при внутривенной инфузии 140 микро/кг/мин аденозина, вводимого через проводник 12F в бедренную вену. n=12, *p менее 0,01, **p=0,05 (b)

Корреляция между общим числом сосудов в некротической области и ИРС. R^2 0,41, p=0,02, n=12. (c) Корреляция между общим числом сосудов в некротической области и минимальным ИРС. R^2 0,27, p=0,08, n=12;

Фиг. 9: Прямое измерение. Базальную и истинную микроциркуляторную резистентность измеряли через один месяц после ОИМ в инфаркт-связанной артерии карликовых свиней, обработанных и не обработанных инкапсулированным антагомиром-92а. (a) Базальную микроциркуляторную резистентность (базальную МР) вычисляли путем деления давления (мм рт.ст.), оцениваемого с помощью проводника с датчиком давления, расположенным в верхушке LAD (Pd), на коронарный кровоток (мл/мин), количественно определяемый с помощью датчика, помещенного в дистальный сегмент LAD. Базальная МР была достоверно ниже в обработанной группе по сравнению с контролями ($7,47 \pm 1,33$ по сравнению с $19,62 \pm 2,98$, p=0,005). n=13. Истинную микроциркуляторную резистентность (ИМР (тип)) вычисляли, измеряя те же параметры во время максимальной гиперемии, достигаемой при внутривенной инфузии 140 микро/кг/мин аденозина, вводимого через проводник 12F в бедренную вену. Достоверно более низкую ИМР (тип) наблюдали в обработанной группе по сравнению с контролем ($5,0 \pm 1,15$ по сравнению с $14,49 \pm 2,4$, p=0,006). n=13. (b) Корреляция между плотностью сосудов во всей некротической области и базальной ИМР. $R^2=0,35$, p=0,033, n=13. (c) Корреляция между плотностью сосудов во всей некротической области и ИМР (тип). $R^2=0,31$, p=0,047, n=13.

Фиг. 10: Через один месяц после ОИМ присутствие перегородочно-верхушечной дискинезии (ПВД) оценивали с помощью эхокардиографа слепым методом по отношению к предназначенной обработке. Показан процент животных с перегородочно-верхушечной дискинезией у обработанных и необработанных животных (83,3% по сравнению с 16,7%, p=0,03). n=20.

Фиг. 11: Оценка воздействия инкапсулированного антагомира-92а и не инкапсулированного антагомира-92а на экспрессию miR92a in vitro.

Фиг. 12: Воздействие инкапсулированных антагомиров 17 и 20а на их соответствующие микроРНК.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ниже приведены некоторые определения, являющиеся релевантными в отношении описания воплощений, охваченных настоящим изобретением, в целом.

МикроРНК (miR) представляют собой малые некодирующие РНК, выявляемые в качестве критических регуляторов биологических процессов.

"МикроРНК", "миРНК" или "miR" означает некодирующую РНК, имеющую длину от приблизительно 18 до приблизительно 25 нуклеотидов. Эти miR могут иметь происхождение из множественных источников, включающих индивидуальный ген, кодирующий микроРНК, из интронов гена, кодирующего белок, или из полицистронного транскрипта, который часто кодирует множественные близкородственные микроРНК.

Современные знания показывают, что микроРНК транскрибируются РНК

полимеразой II (pol II) или РНК полимеразой III (pol III) и образуются из исходных транскриптов, называемых первичными транскриптами микроРНК (при-микроРНК), длина которых, как правило, составляет несколько тысяч оснований. При-микроРНК претерпевают процессинг в ядре посредством РНКазы Дроша до предшественников, имеющих форму шпильки и длину приблизительно от 70 до 100 нуклеотидов (пре-микроРНК). После транспортировки в цитоплазму шпилечные пре-микроРНК претерпевают дальнейший процессинг посредством дайсера с получением двунитевых микроРНК; затем одна из нитей, так называемая зрелая микроРНК (иногда могут использоваться обе нити) включается в индуцируемый РНК комплекс сайленсинга (RISC), где она связывается со своими целевыми мРНК за счет комплементарности пар оснований. В относительно редких случаях, в которых основание микроРНК точно спаривается с целевой матричной РНК (мРНК), она способствует распаду мРНК. Чаще микроРНК образуют несовершенные гетеродуплексы с целевыми мРНК, либо влияя на стабильность мРНК, либо ингибируя трансляцию мРНК.

"Последовательность стебель-петля" подразумевает РНК, имеющую шпилечную структуру и содержащую зрелую последовательность микроРНК. Последовательности пре-микроРНК и последовательности стебель-петля могут перекрываться. Примеры последовательностей стебель-петля находятся в базе данных микроРНК, известной как miRBase.

"Предшественник микроРНК" означает транскрипт, имеющий происхождение из геномной ДНК, и содержащий некодирующую, структурированную РНК, включающую одну или более последовательностей микроРНК. Например, в некоторых воплощениях изобретения предшественник микроРНК представляет собой пре-микроРНК. В некоторых воплощениях изобретения предшественник микроРНК представляет собой при-микроРНК.

Приведенное ниже описание следует стандартной системе номенклатуры, где "miR-X" со строчной буквой относится к пре-микроРНК, тогда как "miR-X" с заглавной буквой относится к зрелой форме. Когда две зрелые микроРНК имеют происхождение из противоположных плеч одной и той же пре-микроРНК, их обозначают суффиксом -3p или -5p. Когда известны относительные уровни экспрессии, звездочка после названия указывает на микроРНК, экспрессирующуюся при низких уровнях относительно микроРНК в противоположном плече шпильки.

В приведенном ниже описании, если не указано иное, использование выражения miR-X относится к зрелой микроРНК, включающей обе формы -3p и -5p, если они есть.

Во избежание сомнений в настоящем описании выражения микроРНК, мРНК и miR обозначают один и тот же продукт.

В контексте настоящего изобретения задача состоит в модулировании ангиогенеза или ангиогенных процессов, как следствие, с конкретным сосредоточением на микроРНК, вовлеченной в ангиогенез. Таким образом, задача изобретения состоит в модулировании по меньшей мере одной микроРНК, принадлежащей к семейству микроРНК, вовлеченных в модулирование ангиогенеза.

Под выражением "семейство микроРНК" подразумевают группу микроРНК, обладающих родственной функцией, состоящей в модулировании ангиогенеза или ангиогенных процессов. Более конкретно без ограничений данные микроРНК выбраны из группы, состоящей из микроРНК, презентующих антиангиогенную активность.

Более конкретно без ограничений такие микроРНК выбирают из группы, состоящей из miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая

miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b) или их предшественников. Как очевидно специалисту в данной области техники, любую микроРНК, обладающую модулирующими, предпочтительно антагонистическими, свойствами в отношении ангиогенеза, следует рассматривать как часть данного семейства микроРНК.

Во избежание сомнений выражение микроРНК в приведенном ниже описании, если не указано иное, следует относить к зрелой или процессированной микроРНК после ее отщепления от предшественника. Для незрелых форм используют выражение "предшественники" или "предшественники микроРНК".

В приведенной ниже таблице 1 сгруппированы различные последовательности предшественников микроРНК, охваченных настоящим описанием.

Таблица 1

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
1	mir-92a-1	CUUUCUACACAGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCUGUG UUUCUGUAUGGUUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUUGA GUUUGG
2	mir-92a-2	UCAUCCCUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUAUUGUGU UCUAUAUAAAGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUGGAA GA
3	mir-92b	CGGGCCCCGGGCGGGCGGGAGGGACGGGACGCGGU GCAGUGUUGUUUUUCCCCCGCCAAUAUUGCACUCGU CCCGGCCUCCGGCCCCCCCCGGCCC
4	mir-17	GUCAAAUAAUGUCAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU GAUAUGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGCACUUGUAGCA UUAUGGUGAC
5	mir-503	UGCCCUAGCAGCGGGAACAGUUCUGCAGUGAGCGAU CGGUGCUCUGGGGUUAUUGUUUCCGUGCCAGGGUA
6	mir-16-1	GUCAAGCAGUGCCUUAAGCAGCACGUAUUAUUGGCGUU AAGAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUAACUGUGCUGC UGAAGUAAGGUUGAC
7	mir-16-2	GUUCCACUCUAGCAGCACGUAUUAUUGGCGUAGUGA AAUAUAUAUUAACACCAUAUUAACUGUGCUGCUUA GUGUGAC
8	mir-374a	UACAUCGGCCAUUAUAAUACAACCUGAUAAAGUGUUAU AGCACUUAUCAGAUUGUAUUGUAUUGUCUGUGUA
9	mir-374b	ACUCGGAUGGAUUAUAAUACAACCUGCUAAGUGUCCUA GCACUUAAGCAGGUUGUAUUAUUAUUGUCCGUGUCU
10	mir-374c	ACACGGACAAUGAUAAUACAACCUGCUAAGUGCUAGG ACACUUAAGCAGGUUGUAUUAUUAUCCAUCGAGU
11	mir-24-1	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUAUCAGUUCUCAUUUU ACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGAG
12	mir-24-2	CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACACAGUUG GUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGG
13	mir-483	GAGGGGGAAGACGGGAGGAAAGAAGGGAGUGGUUCC AUCACGCCUCCUACUCCUCUCCUCCCGUCUUCUCCU CUC

14	mir-34a	GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAA GUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUGGGGCC C
15	mir-34b	GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUGU ACUGUGGUGGUUACAAUCACUAAACUCCACUGCCAUC AAACAAGGCAC
16	mir-34c	AGUCUAGUUACUAGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGCUA AUAGUACCAAUCACUAAACCACACGGCCAGGUAAAAAG AUU
17	mir-20a	GUAGCACUAAAGUGCUUUAUAGUGCAGGUAGUGUUUAG UUAUCUACUGCAUUAUGAGCACUAAAAGUACUGC
18	mir-20b	AGUACCAAAGUGCUCUAGUGCAGGUAGUUUUGGCAU GACUCUACUGUAGUAUGGGCACUCCAGUACU
19	mir-15a	CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGGA UUUUGAAAAGGUGCAGGCCAUUUGUGCUGCCUCAA AAUACAAGG
20	mir-15b	UUGAGGCCUUAAGUACUGUAGCAGCACAUCAUGGUU UACAUGCUACAGUCAAGAUGCGAAUCAUUAUUUGCUG CUCUAGAAAUUUAAGGAAAUUCAU

В приведенной ниже таблице 2 для каждой микроРНК указаны последовательности микроРНК и соответствующие остатки в соответствующих последовательностях предшественников (см. таблицу 1).

Таблица 2

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Остатки из предшественника
21	miR-92a-3p	uauugcasiuguccggccugu	48-69
22	miR-92a-1-5p	agguugggaucgguugcaaugcu	11-33
23	miR-92a-2-5p	ggguggggauuuguugcauuac	9-30
24	miR-92b-3p	uauugcacucguccggccucc	61-82
25	miR-92b-5p	agggacgggacgcgugcagug	20-41
26	miR-17-3p	acugcagugaaggcaciuguag	51-72
27	miR-17-5p	caaagugcuuacagugcagguag	14-36

28	miR-503-3p	gggguaauuguuuuccgcugccagg	46-68
29	miR-503-5p	uagcagcgggaacaguucugcag	6-28
30	miR-16-1-3p	ccaguaauaacugugcugcuga	56-77
31	miR-16-2-3p	ccaauauuacugugcugcuua	53-74
32	miR-16-5p	uagcagcacguaaaauuuggcg	14-35 (для miR-16-1) или 10-31 (для miR-16-2)
33	miR-374a-3p	cuuaucagauuguauuguaauu	42-63
34	miR-374a-5p	uuauaaauacaaccugauaagug	12-33
35	miR-374b-3p	cuuagcagguuguauuuaucauu	41-62
36	miR-374-5p	auauaaauacaaccugcuaagug	11-32
37	miR-374c-3p	cacuuagcagguuguauuuauau	39-60
38	miR-374c-5p	auaaauacaaccugcuaagugcu	13-34
39	miR-24-1-3p	uggcucaguucagcaggaacag	44-65
40	miR-24-1-5p	ugccuacugagcugauaucagu	7-28
41	miR-24-2-3p	uggcucaguucagcaggaacag	50-71
42	miR-24-2-5p	ugccuacugagcugaaacacag	13-34
43	miR-483-3p	ucacuccucuccucccgucuu	48-68
44	miR-483-5p	aagacgggaggaaagaaggag	8-29
45	miR-34a-3p	caaucagcaaguauacugcccu	64-85
46	miR-34a-5p	uggcagugucuuagcugguugu	22-43
47	miR-34b-3p	caaucacuaacuccacugccau	50-71
48	miR-34b-5p	uaggcagugucauuagcugauug	13-35
49	miR-34c-3p	aaucacuaaccacacggccagg	46-67
50	miR-34c-5p	aggcaguguaguuuagcugauugc	13-35

51	miR-20a-3p	acugcauuauagagcacuuaaag	44-65
52	miR-20a-5p	uaaagugcuuauagugcagguag	8-30
53	miR-20b-3p	acuguaguaugggcacuuccag	44-65
54	miR-20b-5p	caaagugcucauagugcagguag	6-28
55	miR-15a-3p	caggccauauugugcugccuca	51-72
56	miR-15a-5p	uagcagcacauaaugguuugug	14-35
57	miR-15b-3p	cgaaucauuauuugcugcucua	58-79
58	miR-15b-5p	uagcagcacaucaugguuuaca	20-41

Если не указано иное, последовательности предшественников и микроРНК, на которые ссылаются в изобретении, представляют собой последовательности человека. Тем не менее, в некоторых случаях последовательности микроРНК человека гомологичны последовательностям микроРНК из других видов.

В качестве примера, здесь можно упомянуть, что miR-92a человека гомологична miR из других видов. Более конкретно miR-92a человека гомологична miR из *dme* (*Drosophila melanogaster*), *mmu* (*Mus musculus*), *rno* (*Rattus norvegicus*), *dps* (*Drosophila pseudoobscura*), *aga* (*Anopheles gambiae*), *dre* (*Danio rerio*), *mml* (*Macaca mulatta*), *xtr* (*Xenopus tropicalis*), *ame* (*Apis mellifera*), *odi* (*Oikopleura dioica*), *cin* (*Ciona intestinalis*), *csa* (*Ciona savignyi*), *cfa* (*Canis familiaris*) и свиньи или *ssc* (*Sus scrofa*).

Основываясь на этом общем знании, специалист в данной области техники легко обнаружит гомологию между другими последовательностями микроРНК человека и последовательностями микроРНК из других видов.

Нуклеотидные последовательности зрелых микроРНК и их соответствующие последовательности стебель-петля, раскрытые в данном изобретении, представляют собой последовательности, находящиеся в базе данных онлайн поиска последовательностей микроРНК miRBase и в аннотации. Вводимые данные в базу данных последовательностей miRBase представляют собой предсказанную шпильчатую часть транскрипта микроРНК (стебель-петля) с информацией о локализации и последовательности зрелой последовательности микроРНК. Последовательности микроРНК стебель-петля в базе данных не являются строгими предшественниками микроРНК (пре-микроРНК), и могут в некоторых случаях включать пре-микроРНК и некоторую фланкирующую последовательность из предполагаемого первичного транскрипта.

Таким образом, задача настоящего изобретения состоит в разработке композиций для лечения или предупреждения ремоделирования желудочка после ОИМ, содержащих ингибитор микроРНК или комбинацию ингибиторов нескольких микроРНК, вовлеченных в различные взаимодействия, управляющих физиологией ангиогенеза, или их предшественников.

Тем не менее, в большинстве опубликованных исследований для введения ингибиторов микроРНК животным используют внутривенный путь. Манипуляции с микроРНК, вовлеченными в регуляцию экспрессии генов кровеносных сосудов, представляют новую терапевтическую мишень при ишемической болезни. В пределах биомедицинского сектора происходит экспоненциальный рост в исследованиях по

введению модуляторов РНК, специально сконструированных для ингибирования конкретной последовательности РНК.

Авторы Dimmeler et al показали улучшение сократимости и восстановления функции левого желудочка после ингибирования miR-92a специфичным ингибитором микроРНК, вводимым системно. В связи с тем, что полицистронный кластер микроРНК 17-92a сцеплен с канцерогенезом, и в связи с повсеместностью клеточного типа микроРНК внутривенное введение в повторяющихся инъекциях miR или анти-miR вызывает беспокойство в отношении безопасности.

Благодаря тому факту, что микроРНК контролируют комплексные процессы и присутствуют в различных клеточных биохимических путях, высока вероятность того, что они также запускают значительные побочные эффекты. В настоящее время проблема, среди прочего, состоит в том, что терапии ингибиторами микроРНК не являются селективными.

Кроме того, с учетом повсеместности и низкой органоспецифичности этих молекул, системное введение может привести к выполнению регуляторных функций в тканях, где эти микроРНК обладают различными клеточно-специфичными функциями, или где они обычно не экспрессируются. Данная ошибочная регуляция может, вероятно, приводить к запуску побочных эффектов. Среди потенциальных рисков канцерогенез, связанный с манипуляциями с микроРНК, остается одной из основных проблем при применении данной терапии к патологии человека. Кроме того, с целью получения адекватно поддерживаемой концентрации в клетках-мишенях, ингибиторы микроРНК необходимо повторно инъектировать в очень высоких дозах. Хотя экспериментирование на мелких животных в контролируемых условиях имеет минимальные ограничения, переход к людям предполагает препятствия для биологической безопасности, а также логистические и экономические затруднения.

С целью решения этих проблем и обеспечения переноса данного терапевтического подхода на пациентов рассмотрено создание высвобождающего носителя для транспортировки ингибиторов микроРНК и их высвобождения непосредственно в органе-мишени. Соответствующий носитель направлял бы ингибитор микроРНК прямо в больную ткань, обеспечивая, таким образом, снижение дозировки, чтобы избежать введения в виде повторных инъекций и сведения к минимуму потенциально нежелательных биологических воздействий на другие органы.

Задача, таким образом, состоит в улучшении селективности с целью избегания побочных эффектов данных терапий посредством высвобождения ингибиторов микроРНК только в ткани-мишени. Данная проблема решена согласно изобретению путем микроинкапсуляции ингибиторов микроРНК в биоразлагаемых и биосовместимых микросферах.

Таким образом, задача настоящего изобретения состоит в разработке композиций для лечения или предупреждения ремоделирования желудочка после ОИМ, содержащих по меньшей мере один микроинкапсулированный ингибитор микроРНК, принадлежащей к семейству микроРНК, связанных с модулированием ангиогенеза, где указанное семейство микроРНК включает без ограничения miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b) или их предшественник.

Микроинкапсуляция ингибиторов микроРНК в микросферах облегчает внутриартериальное введение после транслуминальной ангиопластики, таким образом,

микросферы доставляются и удерживаются только в сосудах, также называемых капиллярами, поврежденной области; таким образом, инкапсулированные ингибиторы микроРНК могут высвобождаться локально.

Интракоронарная инъекция через инфаркт-зависимую артерию ОИМ обеспечивает поддержание микросфер в коронарной микроциркуляции и пролонгированное высвобождение ингибиторов микроРНК непосредственно в ишемической ткани-мишени. Ингибиторы микроРНК индуцируют неоангиогенез, который усиливает функциональное восстановление сократимости поврежденной ткани, а также благоприятное послеинфарктное ремоделирование.

Неожиданно в данном изобретении показано, что ингибитор микроРНК и, в частности, ингибитор микроРНК, принадлежащей к семейству микроРНК, связанных с модулированием ангиогенеза, при микроинкапсуляции в соответствующих микросферах успешно высвобождается в поврежденную область миокарда, блокируя биологическую активность целевой микроРНК. Как показано в примерах данного изобретения, введение селективным интракоронарным путем данного ингибитора микроРНК, то есть, в качестве неограничивающего примера, ингибитора miR-92a, микроинкапсулированного в полимерные биоразлагаемые и биосовместимые микросферы, индивидуумам, перенесшим инфаркт миокарда, приводит к функциональному восстановлению миокарда.

Таким образом, микросферы, поддерживаемые в микроциркуляции, дают возможность пролонгированного высвобождения ингибитора микроРНК непосредственно в ишемическую ткань-мишень. Пролонгированное действие ингибиторов микроРНК (также известное как понижающая регуляция) микроРНК-мишени приводило в результате к значительному росту кровеносных сосудов и подавлению нежелательного ремоделирования в заживляемой области через один месяц после повреждения.

Как показано в примерах данного изобретения, продемонстрировано, что встречаемость нежелательного ремоделирования левого желудочка можно предотвратить путем индукции васкулогенеза посредством локального и пролонгированного ингибирования микроРНК, принадлежащей к семейству микроРНК, связанных с модулированием ангиогенеза, инкапсулированным ингибитором соответствующей микроРНК в инфаркт-связанной артерии. Данный способ представляет собой новый способ доставки, облегчающий последующий безопасный переход геномодулирующей терапии к пациентам, страдающим острым инфарктом миокарда.

Эти результаты явно показывают, что композиция, содержащая ингибитор микроРНК, принадлежащей к семейству микроРНК, связанных с модулированием ангиогенеза, такой как miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b), или ее предшественника, как раскрыто в данном изобретении дает возможность эффективного локального высвобождения данного ингибитора в терапевтически эффективных количествах и с терапевтически эффективной скоростью высвобождения.

В первом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора микроРНК, вовлеченной в ангиогенез, или ее предшественника, где данный ингибитор микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей эффективное

количество по меньшей мере одного ингибитора микроРНК, выбранной из семейства, включающего miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b), или ее предшественника, где данный ингибитор микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах.

Еще в одном другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора miR-92a или ее предшественника, причем указанный ингибитор микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах.

Под выражением "микросферы" необходимо понимать сферические частицы, имеющие размер от 1 мкм до нескольких сотен мкм. Выражение "микрочастицы" включает и "микросферы", и "микрокапсулы". В настоящем описании используют выражение "микросфера", но должно быть понятно, что возможна его замена "микрокапсулой", и в интересах специалиста в данной области техники использование "микросфер" и "микрокапсул" эквивалентно.

Под выражением "инкапсулированный" или "микроинкапсулированный" необходимо понимать включенный или заключенный в частицы для защиты или для модифицированного высвобождения.

Иными словами, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора микроРНК, вовлеченной в ангиогенез, причем указанный ингибитор микроРНК предпочтительно выбирают из группы, включающей miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a and miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b) или ее предшественник, или альтернативно состоящей из них, причем указанный ингибитор микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах.

Иными словами, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора miR-92a или ее предшественника, где данный ингибитор микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах.

"Фармацевтическая композиция" означает смесь веществ, подходящих для введения индивидууму, включающую фармацевтическое средство. Например, фармацевтическая композиция может содержать ингибитор микроРНК и стерильный водный раствор.

В воплощении композиции по изобретению указанная микроРНК, вовлеченная в ангиогенез, состоит из зрелой микроРНК.

В воплощении композиции по изобретению указанная микроРНК, вовлеченная в ангиогенез, состоит из следующих зрелых микроРНК:

а) miR-92a, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 21, 22 или 23, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 21, 22 или 23;

б) miR-92b, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 24 или 25, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 24 или 25;

с) miR-17, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID No. 26 или 27, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 26 или 27;

d) miR-503, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 28 или 29, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 28 или 29;

e) miR-16, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 30, 31 или 32, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 30, 31 или 32;

f) miR-374, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 33, 34, 35, 36, 37 или 38, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 33, 34, 35, 36, 37 или 38;

g) miR-24, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 39, 40, 41 или 42, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 39, 40, 41 или 42;

h) miR-483, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 43 или 44, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 43 или 44;

i) miR-34, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 45, 46, 47, 48, 49 или 50, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 45, 46, 47, 48, 49 или 50;

j) miR-20, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 51, 52, 53 или 54, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 51, 52, 53 или 54; и

k) miR-15, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 55, 56, 57 или 58, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID No. 55, 56, 57 or 58.

В другом воплощении композиции по изобретению данная miR-92a состоит из зрелой miR-92a, содержащей последовательность SEQ ID No. 21 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, предпочтительно 95% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO 21.

В другом воплощении композиции по изобретению данная miR-92a состоит из зрелой miR-92a, содержащей последовательность SEQ ID No. 22 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, предпочтительно 95% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO 22.

В другом воплощении композиции по изобретению данная miR-92a состоит из зрелой miR-92a, содержащей последовательность SEQ ID No. 23 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, предпочтительно 95% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO 23.

В смысле настоящего изобретения "процент идентичности" между двумя последовательностями нуклеиновых кислот означает процент идентичных нуклеотидных остатков между двумя последовательностями, подлежащими сравнению, полученный после оптимального выравнивания, причем указанный процент является исключительно статистическим, и различия между двумя последовательностями распределены по их длине случайным образом. Сравнение двух последовательностей нуклеиновых кислот традиционно проводят путем сравнения последовательностей после их оптимального выравнивания, где данное сравнение можно проводить по сегментам или путем использования "окна выравнивания". Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, в дополнение к сравнению вручную, с помощью

алгоритма локальной гомологии Смита-Ватермана (1981), с помощью алгоритма локальной гомологии Нидлмана-Вунша (1970), способом поиска подобий (Пирсон и Липман, 1988.) или с помощью компьютерной программы с использованием этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, либо с помощью программы сравнения BLAST NR или BLAST P).

Процент идентичности между двумя последовательностями нуклеиновых кислот определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей, в которых последовательность нуклеиновой кислоты для сравнения может иметь повторы или делеции по сравнению с референсной последовательностью для оптимального выравнивания между двумя последовательностями. Процент идентичности вычисляют путем определения числа положений, в которых нуклеотидный остаток идентичен между двумя последовательностями, предпочтительно между двумя полноразмерными последовательностями, деления числа идентичных положений на общее число положений в окне выравнивания и умножения результата на 100 с получением процента идентичности между двумя последовательностями.

Как подразумевают в данном изобретении, нуклеотидные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с референсной последовательностью, включают последовательности, обладающие по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% нуклеотидной идентичностью с указанной референсной последовательностью.

В воплощении композиции по изобретению указанная микроРНК, вовлеченная в ангиогенез, состоит из предшественника микроРНК.

В воплощении изобретения данный предшественник микроРНК, вовлеченной в ангиогенез, состоит из следующих предшественников:

- a) mir-92a-1, содержащего последовательность SEQ ID No. 1 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 1;
- b) mir-92a-2, содержащего последовательность SEQ ID No. 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 2;
- c) mir-92b, содержащего последовательность SEQ ID No. 3 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 3;
- d) mir-17, содержащего последовательность SEQ ID No. 4 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 4;
- e) mir-503, содержащего последовательность SEQ ID No. 5 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 5;
- f) mir-16-1, содержащего последовательность SEQ ID No. 6 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 6; и
- g) mir-16-2, содержащего последовательность SEQ ID No. 7 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 7;
- h) mir-374a, содержащего последовательность SEQ ID No. 8 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 8;
- i) mir-374b, содержащего последовательность SEQ ID No. 9 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 9;
- j) mir-374c, содержащего последовательность SEQ ID No. 10 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 10;
- k) mir-24-1, содержащего последовательность SEQ ID No. 11 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 11;
- l) mir-24-2, содержащего последовательность SEQ ID No. 12 или последовательность,

обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 12;

m) mir-483, содержащего последовательность SEQ ID No. 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 13;

5 n) mir-34a, содержащего последовательность SEQ ID No. 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 14;

o) mir-34b, содержащего последовательность SEQ ID No. 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 15;

p) mir-34c, содержащего последовательность SEQ ID No. 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 16;

10 q) mir-20a, содержащего последовательность SEQ ID No. 17 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 17;

r) mir-20b, содержащего последовательность SEQ ID No. 18 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 18;

15 s) mir-15a, содержащего последовательность SEQ ID No. 19 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 19, и

t) mir-15b, содержащего последовательность SEQ ID No. 20 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID No. 20.

В общем смысле ингибитор представляет собой молекулу, подавляющую другую молекулу или предотвращающую вступление этой другой молекулы в реакцию.

20 Как используют в данном описании, термин "ингибитор miR-X или mir-X" относится к любой молекуле или к любому соединению, которые снижают или ослабляют экспрессию и/или активность miR-X, либо mir-X, либо по меньшей мере одного предшественника. Вследствие этого данное ингибирование должно предотвращать ингибирование неоангиогенеза, то есть стимулировать неоангиогенез и, таким образом,

25 предотвращать нежелательное ремоделирование сердечной мышцы после инфаркта. В одном воплощении изобретения ингибитор данной микроРНК, вовлеченной в ангиогенез, представляет собой олигонуклеотид содержащий от 8 до 49 нуклеотидов в длину, имеющий последовательность, нацеленную на данную микроРНК, где указанную микроРНК предпочтительно выбирают из группы, включающей следующие

30 микроРНК: miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b) или их предшественники.

35 В другом воплощении изобретения ингибитор miR-92a представляет собой олигонуклеотид содержащий от 8 до 49 нуклеотидов в длину, имеющий последовательность, нацеленную на указанную miR-92a.

Выражение "нацеленный на" означает обладание нуклеотидной последовательностью, дающей возможность гибридизации с целевой нуклеиновой кислотой с индукцией

40 желаемого действия. В некоторых воплощениях изобретения желаемое действие представляет собой снижение и/или ингибирование экспрессии целевой нуклеиновой кислоты.

"Гибридизация" означает отжиг комплементарных нуклеиновых кислот, происходящий посредством "комплементарности нуклеотидов", то есть способности

45 двух нуклеотидов к нековалентному спариванию посредством водородных связей.

В некоторых воплощениях изобретения олигонуклеотиды ингибиторы микроРНК имеют от 8 до 49 нуклеотидов в длину.

Обычному специалисту в данной области техники понятно, что эти олигонуклеотиды

включают 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или 49 нуклеотидов в длину или любой диапазон в этих пределах. В некоторых воплощениях изобретения олигонуклеотиды согласно изобретению имеют от 10 до 20 нуклеотидов в длину.

5 Обычному специалисту в данной области техники понятно, что эти олигонуклеотиды включают 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов в длину или любой диапазон в этих пределах.

В некоторых воплощениях изобретения олигонуклеотид имеет последовательность, комплементарную микроРНК или ее предшественнику.

10 В одном воплощении композиции по изобретению данный олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, по меньшей мере частично комплементарный целевой микроРНК, вовлеченной в ангиогенез, где указанную целевую микроРНК предпочтительно выбирают из miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34
15 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b), или ее предшественника.

В другом воплощении композиции по изобретению данный олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, по меньшей мере частично
20 комплементарный miR-92a.

Выражение "антисмысловой олигонуклеотид" относится к олигонуклеотиду, имеющему нуклеотидную последовательность, комплементарную специфичной нуклеотидной последовательности (называемой смысловой последовательностью) и способную к гибридизации со смысловой последовательностью.

25 "Комплементарность" означает способность к спариванию нуклеотидов между первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой.

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, комплементарную микроРНК или ее предшественнику, что означает, что последовательность антисмыслового
30 олигонуклеотида по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична комплементу микроРНК или ее предшественника, или что эти две последовательности гибридизуются в жестких условиях гибридизации.

Соответственно, в некоторых воплощениях изобретения нуклеотидная последовательность антисмыслового олигонуклеотида может иметь одну или более
35 неспаренных пар оснований по отношению к ее последовательности-мишени микроРНК или предшественника и способна к гибридизации с ее целевой последовательностью.

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид имеет последовательность, полностью комплементарную микроРНК или ее предшественнику, что означает, что нуклеотидная последовательность антисмыслового олигонуклеотида
40 на 100% идентична комплементу микроРНК или ее предшественника.

В контексте настоящего изобретения "комплементарность" означает антисмысловой олигонуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную комплементу нуклеотидной последовательности miR-92a или ее предшественника на протяжении участка длиной 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43,

44, 45, 46, 47, 48 или 49 нуклеотидов, или что эти две последовательности гибридизуются в жестких условиях гибридизации.

"Процент комплементарности" означает число комплементарных нуклеотидов в нуклеиновой кислоте, деленное на длину нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях изобретения процент комплементарности олигонуклеотида означает число нуклеотидов, комплементарных нуклеиновой кислоте-мишени, деленное на длину олигонуклеотида.

В одном воплощении изобретения последовательность антисмыслового олигонуклеотида "полностью комплементарна" последовательности микроРНК-мишени, вовлеченной в ангиогенез, предпочтительно выбранной из группы, включающей miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b), и более предпочтительно miR-92a, или их предшественники, что означает, что каждый нуклеотид антисмыслового олигонуклеотида способен к спариванию с нуклеотидом в каждом соответствующем положении в целевой микроРНК или ее предшественнике.

В некоторых воплощениях антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению имеет последовательность, частично или полностью комплементарную

последовательности:

а) miR-92a, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 21, 22 или 23, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 21, 22 или 23;

б) miR-92b, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 24 или 25, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 24 или 25;

в) miR-17, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 26 или 27, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 26 или 27;

г) miR-503, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 28 или 29, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 28 или 29; и

д) miR-16, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 30, 31 или 32, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 30, 31 или 32;

е) miR-374, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 33, 34, 35, 36, 37 или 38, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 33, 34, 35, 36, 37 или 38;

ж) miR-24, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 39, 40, 41 или 42, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 39, 40, 41 или 42;

з) miR-483, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 43 или 44, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 43 или 44;

и) miR-34, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 45, 46, 47, 48, 49 или 50, или последовательность, обладающую по меньшей

мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 45, 46, 47, 48, 49 или 50;

5 j) miR-20, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 51, 52, 53 или 54, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 51, 52, 53 или 54; и

10 k) miR-15, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 55, 56, 57 или 58, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью по меньшей мере одной из SEQ ID No. 55, 56, 57 или 58.

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению имеет последовательность, частично или полностью комплементарную последовательности:

15 a) miR-92a-1, содержащего последовательность SEQ ID No. 1, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 1;

b) miR-92a-2, содержащего последовательность SEQ ID No. 2, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 2;

c) miR-92b, содержащего последовательность SEQ ID No. 3, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 3;

20 d) miR-17, содержащего последовательность SEQ ID No. 4, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 4;

e) miR-503, содержащего последовательность SEQ ID No. 5, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 5;

25 f) miR-16-1, содержащего последовательность SEQ ID No. 6, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 6; и

g) miR-16-2, содержащего последовательность SEQ ID No. 7, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 7;

h) miR-374a, содержащего последовательность SEQ ID No. 8, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 8;

30 i) miR-374b, содержащего последовательность SEQ ID No. 9, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 9;

j) miR-374c, содержащего последовательность SEQ ID No. 10, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 10;

35 k) miR-24-1, содержащего последовательность SEQ ID No. 11, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 11;

l) miR-24-2, содержащего последовательность SEQ ID No. 12, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 12;

m) miR-483, содержащего последовательность SEQ ID No. 13, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 13;

40 n) miR-34a, содержащего последовательность SEQ ID No. 14, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 14;

o) miR-34b, содержащего последовательность SEQ ID No. 15, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 15;

45 p) miR-34c, содержащего последовательность SEQ ID No. 16, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 16;

q) miR-20a, содержащего последовательность SEQ ID No. 17, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 17;

r) miR-20b, содержащего последовательность SEQ ID No. 18, или последовательность,

обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 18;

s) mir-15a, содержащего последовательность SEQ ID No. 19, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 19, и

t) mir-15b, содержащего последовательность SEQ ID No. 20, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью SEQ ID No. 20.

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению имеет последовательность, частично комплементарную последовательности mir-92a-1 (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению имеет последовательность, полностью комплементарную последовательности mir-92a-1 (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению имеет последовательность, частично комплементарную последовательности mir-92a-2 (SEQ ID NO: 2).

В некоторых воплощениях изобретения антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению имеет последовательность, полностью комплементарную последовательности mir-92a-2 (SEQ ID NO: 2).

В одном воплощении изобретения антисмысловой олигонуклеотид содержит модифицированный остов нуклеотидов. Например морфолино-модифицированный остов, карбаматный, силоксановый, сульфидный, сульфоксидный и сульфоновый, формацетильный и тиоформацетильный, метиленформацетильный, рибоацетильный, остов, содержащий алкен, сульфаматный, сульфонатный и сульфонамидный, метиленимино- и метиленигидразино- и амидный остовы.

Морфолино-модифицированные олигонуклеотиды имеют незаряженный остов, в котором сахар ДНК, представляющий собой дезоксирибозу, замещен шестичленным кольцом, и фосфодиэфирная связь замещена фосфородиамидатной связью. Морфолино-модифицированные олигонуклеотиды устойчивы к ферментативному расщеплению и, по-видимому, функционируют как антисмысловые агенты вероятнее посредством остановки трансляции или вмешательства в сплайсинг пре-микроРНК, чем посредством активации РНКазы Н.

Модифицированный остов в характерном случае предпочтителен для повышения устойчивости к нуклеазам. Модифицированный остов также может быть предпочтительным в связи с его измененным сродством к последовательности-мишени по сравнению с немодифицированным остовом. Немодифицированный остов может представлять собой РНК или ДНК.

Другой подходящий антисмысловой олигонуклеотид включает пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК), имеющую модифицированный полиамидный остов. Молекулы на основе ПНК являются истинными миметиками молекул ДНК в отношении распознавания пар оснований. Каркас ПНК состоит из звеньев 7V-(2-аминоэтил)-глицина, связанных пептидными связями, где нуклеотидные основания связаны с каркасом посредством метиленкарбонильных связей.

Следующий подходящий остов включает морфолино-модифицированный нуклеотидный аналог или его эквивалент, в котором сахар рибоза или дезоксирибоза замещен 6-членным кольцом морфолино. Наиболее предпочтительный нуклеотидный аналог или его эквивалент включает морфолино-фосфородиамидатный олигомер (МФО), в котором сахар рибоза или дезоксирибоза замещен 6-членным кольцом морфолино, и анионная фосфодиэфирная связь между соседними кольцами морфолино замещена неионной фосфородиамидатной связью.

Еще в одном следующем воплощении изобретения антисмысловой олигонуклеотид по изобретению содержит замещение одного из немостиковых атомов кислорода в фосфодиэфирной связи. Данная модификация несколько дестабилизирует спаривание оснований, но добавляет значительную устойчивость к расщеплению нуклеазами.

Следующий подходящий антисмысловой олигонуклеотид по изобретению включает одну или более сахарных группировок, моно- или дизамещенных в 2', 3' и/или 5' положении, например, -ОН; -F; замещенным или незамещенным, нормальным или разветвленным низшим (C₁-C₁₀)алкилом, алкенилом, алкинилом, алкарилом, аллилом, арилом или аралкилом, который может быть прерван одним или более гетероатомом; О-, S- или N-алкилом; О-, S- или N-алкенилом; О-, S- или N-алкинилом; О-, S- или N-аллилом; О-алкил-О-алкилом, -метокси, -аминопропокси; -аминокси; метоксиэтокси; -диметиламинооксиэтокси и -диметиламиноэтоксиэтокси.

Сахарная группировка может представлять собой пиранозу или ее производное, либо дезоксипиранозу или ее производное, предпочтительно рибозу или ее производное, либо дезоксирибозу или ее производное. Такие предпочтительные дериватизированные сахарные группировки включают закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК).

ЗНК представляет собой модифицированный РНК нуклеотид, где рибозная группировка ЗНК нуклеотида модифицирована дополнительной мостиковой связью, соединяющей 2' и 4' атомы углерода. Это усиливает стэкинг и предварительную организацию оснований и значительно повышает термостабильность. Эта мостиковая связь "запирает" рибозу в 3'-эндо-структурной конформации, которая часто обнаруживается в А-форме ДНК или РНК. ЗНК нуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, можно при желании смешивать с основаниями ДНК или РНК в олигонуклеотиде.

Согласно изобретению антисмысловой олигонуклеотид выбирают из группы, состоящей из рибонуклеотида, дезоксирибонуклеотида, малой РНК, антагомира, ЗНК, кДНК, ПНК, морфолино-модифицированного олигонуклеотида или их комбинации.

В другом воплощении изобретения антисмысловой олигонуклеотид может состоять из антагомира.

В предпочтительном воплощении композиции по изобретению олигонуклеотид состоит из антагомира.

Антагомиры представляют собой химически сконструированные олигонуклеотиды, применяемые для сайленсинга эндогенных микроРНК. Антагомир представляет собой малую синтетическую РНК или ДНК, точно комплементарную специфичной целевой микроРНК, имеющую либо ошибочное спаривание в сайте расщепления, либо некоторый вид модификации оснований, ингибирующей расщепление. Обычно антагомиры имеют некоторый вид модификации, чтобы сделать их более устойчивыми к расщеплению и способствовать клеточной интернализации. Механизм действия антагомиризации (процесса, посредством которого антагомир ингибирует активность микроРНК) неясен, но считают, что ингибирование происходит посредством необратимого связывания микроРНК. Антагомиры используют для конститутивного ингибирования активности специфичных микроРНК.

В воплощении изобретения антагомир содержит нуклеотидную последовательность, включающую по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных нуклеотидов, комплементарных микроРНК или ее предшественнику, где микроРНК имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей от SEQ ID No. 1 до SEQ ID No. 58.

В воплощении изобретения антагомир содержит нуклеотидную последовательность,

включающую по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных нуклеотидов, комплементарных miR-92a последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, 2 или 3.

В воплощении изобретения антагомир содержит нуклеотидную последовательность, включающую по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных нуклеотидов, комплементарных miR-92a последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 21, 22 или 23.

В другом воплощении изобретения антагомир содержит нуклеотидную последовательность, включающую по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов, комплементарных нуклеотидам последовательности SEQ ID No. 21.

В воплощении изобретения антагомир имеет ДНК остов.

В данном воплощении композиции по изобретению антагомир содержит последовательность SEQ ID No. 59 и ее модификации, за исключением замены его оснований, и фрагменты, состоящие по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59.

В другом воплощении изобретения антагомир имеет РНК остов.

В данном воплощении композиции по изобретению антагомир содержит последовательность SEQ ID No. 60 и ее модификации, за исключением замены его оснований, и фрагменты, состоящие по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 60.

В одном воплощении изобретения антагомир согласно изобретению представляет собой фрагмент, состоящий по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59 или 60.

В одном воплощении изобретения антагомир согласно изобретению представляет собой фрагмент, состоящий по меньшей мере из 9 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59 или 60.

В одном воплощении изобретения антагомир согласно изобретению представляет собой фрагмент, состоящий по меньшей мере из 10 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59 или 60.

В одном воплощении изобретения антагомир согласно изобретению представляет собой фрагмент, состоящий по меньшей мере из 11 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59 или 60.

В одном воплощении изобретения антагомир согласно изобретению представляет собой фрагмент, состоящий по меньшей мере из 12 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59 или 60.

В одном воплощении изобретения антагомир согласно изобретению представляет собой фрагмент, состоящий по меньшей мере из 13 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59 или 60.

В одном воплощении изобретения антагомир согласно изобретению представляет собой фрагмент, состоящий по меньшей мере из 14 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59 или 60.

В одном воплощении изобретения антагомир согласно изобретению представляет собой фрагмент, состоящий по меньшей мере из 15 смежных нуклеотидов подпоследовательности SEQ ID NO: 59 или 60.

В другом воплощении изобретения указанный антагомир последовательности SEQ ID No. 59 или 60 представляет собой по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотид(ов), модифицированных фосфоротиоатной связью (связями) между соседними нуклеотидами.

В другом воплощении изобретения антагомир может включать нуклеотид,

модифицированный 2'-O-метилом, холестериновой группой или любой подобной или эквивалентной модификацией.

Как правило, если фармацевтический препарат, содержащий нуклеиновую кислоту, пептид или белок, вводят перорально или парентерально, он расщепляется ферментами в организме, и эффективность фармацевтического препарата быстро исчезает.

Предприняты различные попытки решения этой проблемы. Одной из них является приготовление инъекционного препарата медленного высвобождения.

На практике проводится исследование по применению стентов в качестве системы для селективного введения микроРНК. Тем не менее, в связи с быстрой эндотелиализацией стентов может быть поставлена задача, касающаяся пролонгированного высвобождения микроРНК, в частности, для биологических процессов, требующих пролонгированного модулирования гена. Кроме того, разработаны липосомы и наночастицы, и их применяют *in vivo*, но перенос их в систему кровообращения с риском серьезных побочных эффектов неизбежен. Кроме того, ни в одном из исследований не продемонстрирована эффективность и безопасность после чрескожного интракоронарного введения без предварительного аортального зажима.

Другой аспект изобретения основан на применении биоразлагаемых и биосовместимых микросфер.

Согласно изобретению разработана и получена система высвобождения, подходящая для локализованного высвобождения олигонуклеотидов в области сердца, основанная на микроинкапсуляции данных олигонуклеотидов с биосовместимыми биоразлагаемыми полимерами. Изобретение дает возможность получить микросферы, значительно заполненные олигонуклеотидами, обладающие высокой эффективностью инкапсуляции и отсутствием молекулярной модификации/деградации. Согласно изобретению без добавления какого-либо стабилизирующего агента или удерживающего вещества, благодаря используемым условиям получения сохраняется чистота и качество молекулы, в частности, характеристики полученной эмульсии, концентрация раствора полимера и отношение между объемами фаз, вовлеченных в процесс инкапсуляции. Кроме того, микросферы обладают соответствующим распределением размера частиц, чтобы обеспечить их удерживание в сосудах области, пораженной инфарктом, не вызывая артериальную эмболизацию и не разрушаясь за счет фагоцитарного действия макрофагов.

Цель настоящего изобретения состоит в разработке микросферы пролонгированного высвобождения, стабильно инкапсулирующей короткоцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту или короткоцепочечную рибонуклеиновую кислоту, и способной к ингибированию экспрессии специфического белка, в частности, белка, ингибирование которого связано с заболеванием, в течение длительного периода.

В общем смысле "биосовместимый" означает совместимый с живыми клетками, тканями, органами или системами, и не налагающий риска повреждения, токсичности или отторжения иммунной системой. Биосовместимая микросфера означает, что микросфера, а также любые продукты распада этой микросферы, нетоксична для реципиента, а также не обладает какими-либо значительными нежелательными или ненаправленными действиями на организм реципиента, такими как иммунологическая реакция в сайте инъекции.

В общем смысле "биоразлагаемый" означает способный к разложению под действием биологических агентов.

Биоразлагаемая микросфера, как определено в данном изобретении, означает микросферу, разлагающуюся или разрушающуюся *in vivo* с образованием химических

соединений меньшей молекулярной массы. Разложение может происходить в результате, например, ферментативных, химических и/или физических процессов.

Подходящие биосовместимые, биоразлагаемые полимеры включают, например, полилактиды, полигликолиды, поли-лактид-ко-гликолиды, полимеры молочной кислоты, полимеры гликолевой кислоты, сополимеры молочной и гликолевой кислот, поликапролактон, поликарбонаты, полиэфирамиды, полиангидриды, полимеры аминокислот, полиортоэфиры, полиацетилы, полицианоакрилаты, сополимеры простых и сложных эфиров, полидиоксаноны, полиалкиленалкилаты, сополимеры полиэтиленгликоля и полиортоэфира, биоразлагаемые полиуретаны, их смеси и сополимеры.

На уровне техники описан ряд методов получения микрочастиц.

Профиль высвобождения лекарственного средства для микрочастицы зависит от многочисленных факторов, включая физико-химические свойства используемых полимеров, взаимодействия между полимером, лекарственным средством и эксципиентами и/или морфологию и композицию полученных в результате микрочастиц.

С целью удерживания микросфер капиллярами миокарда они должны иметь очень определенное распределение размера частиц, чтобы их деструкция посредством фагоцитоза микрофагами, с одной стороны, или эмболизация артерий, с другой стороны, были сведены к минимуму; микроинкапсуляция с использованием биоразлагаемого, биосовместимого полимера обеспечивает контролируемое высвобождение препарата начиная с первых часов вплоть до 2-3 недель, представляющих собой основной период, в течение которого происходит ремоделирование желудочка после ОИМ.

В контексте настоящего изобретения, поскольку предпочтителен интракоронарный путь, средний размер этих микросфер подходит для размера капилляров миокарда; их размер варьирует от 5 до 20, предпочтительно от 5 до 15 микрон, чтобы удерживаться в области сердца, и они не содержат частиц более 25 микрон, чтобы предотвратить артериальную эмболизацию.

В одном воплощении изобретения микросферы представлены диаметром, не превышающим 25 мкм.

В одном воплощении изобретения от 50 до 100% микросфер включено в диапазон от 5 до 25 мкм и не включают частицы более 25 мкм.

В предпочтительном воплощении изобретения от 60 до 100% микросфер включено в диапазон от 5 до 25 мкм и не включают частицы более 25 мкм.

В другом предпочтительном воплощении изобретения от 70 до 100% микросфер включено в диапазон от 5 до 25 мкм и не включают частицы более 25 мкм.

В более предпочтительном воплощении изобретения от 80 до 100% микросфер включено в диапазон от 5 до 25 мкм и не включают частицы более 25 мкм.

Согласно изобретению средний диаметр микросфер находится в диапазоне от 5 до 20 мкм.

Согласно изобретению средний диаметр микросфер находится в диапазоне от 5 до 15 мкм.

В альтернативном воплощении изобретения микросферы представлены средним диаметром от 8 до 11 мкм.

Микросферы согласно изобретению имеют высокое содержание ингибитора микроРНК в биоразлагаемом и биосовместимом полимере для пролонгированного высвобождения лекарственного средства в области, пораженной инфарктом.

Содержание ингибитора микроРНК составляет приблизительно от 1 до 20 масс. %, предпочтительно от 1 до 15 масс. %, и более предпочтительно от 1 до 10 и еще более

предпочтительно от 5 до 10 масс. %. Целостность лекарственного средства сохраняется.

В одном воплощении изобретения микросферы согласно изобретению включают от 1 масс. % до 15 масс. % ингибитора.

В другом воплощении изобретения микросферы согласно изобретению включают
5 от 5 масс. % до 15 масс. % ингибитора.

В другом воплощении изобретения микросферы согласно изобретению включают от 1 масс. % до 10 масс. %, предпочтительно от 5 масс. % до 10 масс. % ингибитора.

Другая характеристика изобретения относится к природе полимера, используемого для получения микросфер.

10 В воплощении изобретения микросферы получают из полимера, состоящего из поли-d,l-лактида (ПЛА). В воплощении изобретения микросферы получают из ПЛА в качестве единственного полимера. В воплощении изобретения микросферы получают из ПЛА, смешанного с одним или более другим биосовместимым полимером.

В другом воплощении изобретения микросферы получают из сополимера, состоящего
15 из поли-d,l-лактид-ко-гликолида (ПЛГ)- В воплощении изобретения микросферы получают из ПЛГ в качестве единственного полимера. В воплощении изобретения микросферы получают из ПЛГ, смешанного с одним или более другим биосовместимым полимером.

Еще в одном другом воплощении изобретения микросферы получают из смеси
20 полимеров, состоящей из поли-d,l-лактид-ко-гликолида (ПЛГ) и поли-d,l-лактида (ПЛА).

Под выражением "смесь" необходимо понимать, что смесь двух или более полимеров получают перед растворением в одном и том же органическом растворителе.

Специалист в данной области техники легко поймет, что, в противоположность сополимеру ПЛГ, молярное отношение лактид:гликолид в полимере ПЛА составляет
25 100:0.

Что касается сополимера ПЛГ, молярное отношение лактид:гликолид в полимере ПЛГ составляет от 50:50 до 95:5.

В предпочтительном воплощении изобретения молярное отношение лактид:гликолид в сополимере ПЛГ составляет от 50:50 до 90:10, и предпочтительно от 50:50 до 80:20.

30 В воплощении изобретения характеристическая вязкость полимера составляет от 0,1 до 0,7 дл/г (от 0,01 до 0,07 м³/кг).

В предпочтительном воплощении изобретения характеристическая вязкость полимера составляет от 0,15 до 0,7 дл/г (от 0,015 до 0,07 м³/кг), предпочтительно от 0,15 до 0,5
35 дл/г (от 0,015 до 0,05 м³/кг).

Данный аспект представляет интерес в том смысле, что характеристическая вязкость связана с молекулярной массой полимера и, следовательно, влияет на скорость высвобождения ингибитора из полимерных микросфер.

Соответственно, цель настоящего изобретения также состоит в разработке способа
40 получения микроинкапсулированного ингибитора miR-92a, не включающего какой-либо адъювант, и состоящего из единой популяции частиц в отношении полимерной композиции.

Таким образом, другой аспект изобретения представляет собой способ микроинкапсуляции ингибитора микроРНК в полимерных микросферах, включающий
45 следующие стадии: (a) растворение ингибитора микроРНК в очищенной воде, не содержащей какой-либо стабилизатор; (b) растворение полимера в органическом растворителе; (c) добавление (a) к (b) с получением первой эмульсии; (d) добавление эмульсии стадии (c) к водному раствору, содержащему поверхностно-активное вещество

(ПАВ) и осмотический агент, с получением второй эмульсии; (е) отверждение и сбор полученных в результате микросфер стадии (d); и (f) высушивание.

Более конкретно изобретение также относится к способу получения композиции, как раскрыто выше, отличающемуся тем, что он включает следующие стадии:

- 5 а) растворение ингибитора микроРНК в очищенной воде, не содержащей какой-либо стабилизатор;
- б) растворение полимера в органическом растворителе;
- с) добавление (а) к (b) с получением первой эмульсии;
- д) добавление эмульсии стадии (с) к водному раствору, содержащему ПАВ и
- 10 осмотический агент, с получением второй эмульсии; и
- е) отверждение и сбор полученных в результате микросфер стадии (d); и
- ф) высушивание полученных микросфер.

Другой аспект изобретения состоит в применении композиции согласно изобретению при лечении инфаркта миокарда.

- 15 Иными словами, изобретение относится к композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора микроРНК или ее предшественника, где указанный ингибитор микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах, причем указанную композицию применяют при лечении инфаркта миокарда.

- 20 В предпочтительном воплощении изобретения инфаркт миокарда состоит из острого инфаркта миокарда.

Еще один другой аспект изобретения относится к способу реверсирования или предупреждения ремоделирования желудочка у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение данному субъекту эффективного количества композиции, как

- 25 раскрыто выше.

Иными словами, изобретение относится к композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора микроРНК или ее предшественника, где данный ингибитор микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах, где данную композицию применяют в способе

- 30 реверсирования или предупреждения ремоделирования желудочка у субъекта, нуждающегося в этом.

Как уже упомянуто, композиция согласно изобретению подходит для введения интракоронарным путем.

Для введения интракоронарным путем микросферы должны быть суспендированы

- 35 в подходящем носителе, либо в физиологическом растворе (фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ)), содержащем или не содержащем ПАВ, либо в другом подходящем носителе для внутривенного введения. Подходящие диспергирующие агенты включают, например, ПАВ, такие как полисорбат 80, полисорбат 20, полиоксиэтиленовый эфир гидрогенизированного касторового масла 60, карбоксиметилцеллюлозу или

- 40 полисахариды, такие как альгинат натрия; возможно также добавление изотонизирующего агента, такого как, например, хлорид натрия, маннит, сорбит или глюкоза. С учетом размера коронарных артерий концентрацию микросфер в среде для введения регулируют с целью ограничения изменения кровотока и предотвращения риска артериальной эмболизации. Эта концентрация может варьировать от 0,05% до
- 45 1%, предпочтительно от 0,1% до 0,5%. Введение можно осуществлять путем однократной инъекции или многократных инъекций, необязательно с последующей инъекцией физиологического раствора. Введение можно осуществлять после чрескожной коронарной ангиопластики, без ограничения, используя тот же катетер.

Способ по изобретению отличается тем, что введение состоит во введении интракоронарным путем.

Данный аспект представляет особый интерес, поскольку он преодолевает несколько предполагаемых ограничений прямого внутривенного введения соединений, таких как олигонуклеотид, подобный антагомиру. Среди прочих предполагаемых ограничений можно указать следующее: i) низкий уровень биологической безопасности вследствие повсеместности и низкой органоспецифичности микроРНК, ii) высокие дозы и многократные инъекции ингибитора микроРНК для получения его эффекта, и iii) высокая теоретическая стоимость расчетной внутривенной дозы.

Неожиданно, как станет очевидным по прочтении приведенных ниже примеров, все эти проблемы преодолены настоящим изобретением.

Более конкретно продемонстрировано следующее:

a) имеется возможность селективного введения инкапсулированного антагомира в артерию, снабжающую больную ткань (см. Пример 5);

b) микросферы удерживаются в коронарных артериях (см. Пример 6);

c) внутриартериальное введение микросфер применяют для эмболизации опухоли, обеспечивающей прерывание постоянного кровотока и предотвращение прогрессирования опухоли, необязательно в комбинации с активными высвобождаемыми веществами. Принимая во внимание данные элементы, учитывают существование риска эмболизации. В связи с этим запланированы исследования с целью удостовериться, что микросферы не вызывают повреждение сердечной мышцы или не производят каких-либо значимых изменений в скорости коронарного кровотока (см. Пример 7);

d) надлежащая стабильность ингибитора микроРНК в носителе и пролонгированное высвобождение данного ингибитора из микросфер; это продемонстрировано его биологическим действием при ингибировании микроРНК в течение вплоть до 10 суток после его введения (Пример 8);

e) введение микросфер с ингибитором микроРНК стимулирует восстановление сократительной способности поврежденной ткани и предотвращает встречаемость нежелательного послеинфарктного ремоделирования (см. Пример 9);

f) при локализованном введении микросфер доза ингибитора может быть снижена до однократной инъекции, что предполагает значительное снижение потенциальных побочных эффектов и явное снижение стоимости.

Доступность надлежащего носителя/системы для контролируемого введения, доставки и высвобождения ингибиторов микроРНК согласно изобретению имеет следующие преимущества:

- Повышенная биологическая безопасность, поскольку биораспределение лекарственного средства тканями и органами, не являющимися терапевтической мишенью, ограничено;

- Избегание многократных внутривенных инъекций i) сокращает госпитализации и амбулаторные посещения за счет повышения качества поддержки пациентов; ii) позволяет избежать необходимости в длительном поддержании введения лекарственного средства, а также потенциальных рисков в результате этого; iii) сводит к минимуму риски, присущие внутривенному введению препаратов (инфекции, локализованные реакции и т.д.);

- Снижение дозы дает возможность уменьшения соответствующих дозозависимых нежелательных эффектов;

- Снижение стоимости за счет снижения необходимых доз, а также персонала и

оборудования, требующегося для многократных инъекций.

В другом воплощении изобретения изобретение относится к популяции биоразлагаемых и биосовместимых микросфер, применяемых при лечении или предупреждении ремоделирования желудочка после инфаркта миокарда, где указанные

микросферы:

- имеют средний диаметр, составляющий от 5 до 15 мкм;
- получают из поли-d,l-лактид-ко-гликолида (ПЛГ); поли-d,l-лактида (ПЛА) или их смеси;
- включают от 1 масс. % до 10 масс. % терапевтического средства, способного к

предупреждению ремоделирования желудочка;

причем указанное терапевтическое средство состоит из ингибитора микроРНК, вовлеченной в ангиогенез, предпочтительно микроРНК, выбранной из группы, состоящей из miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b), и более предпочтительно miR-92a, или ее предшественника, где указанный ингибитор микроРНК предпочтительно представляет собой антагомир.

Изобретение также относится к набору, содержащему по меньшей мере следующие компоненты: i) композицию и/или микросферы согласно изобретению и ii) шприц, или флакон, или ампулу, в которых находится композиция.

В воплощении изобретения набор по изобретению дополнительно содержит растворитель, находящийся в контейнере для растворителя. Контейнер для растворителя может представлять собой флакон, ампулу или предварительно заполненный шприц.

Микросферы и растворитель могут находиться в предварительно заполненном шприце с двумя отделениями.

В воплощении изобретения набор по изобретению может содержать микросферы во флаконе и растворитель в отдельном флаконе.

В воплощении изобретения набор по изобретению может содержать микросферы во флаконе и растворитель в отдельной ампуле.

В воплощении изобретения набор по изобретению может содержать микросферы во флаконе и растворитель в предварительно заполненном шприце.

В воплощении изобретения набор по изобретению может содержать микросферы в предварительно заполненном шприце и растворитель в отдельном флаконе.

В воплощении изобретения набор по изобретению может содержать микросферы в предварительно заполненном шприце и растворитель в отдельной ампуле.

В воплощении изобретения набор по изобретению может содержать микросферы и растворитель по отдельности в шприце с двумя отделениями.

Изобретение будет лучше понято в отношении приведенных ниже примеров.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение микросфер, содержащих антагомир-92a

Микросферы были получены способом выпаривания растворителя из эмульсии вода/масло/вода, с использованием сополимера 50:50 ПЛГ, характеристическая вязкость приблизительно 0,2 дл/г (0,02 м³/кг), содержащий свободные карбоксильные концевые группы. К 0,6 г ПЛГ добавляли 3 мл метиленхлорида. К органическому раствору ПЛГ добавляли 0,3 мл концентрированного раствора Антагомир-92a (I-Ssc-miR-92a; молекулярная масса: 5366 г/моль (также обозначаемая как Дальтон (Да)); последовательность: CCGGGACAAGTGCAAT (SEQ ID No. 59); число оснований ДНК:

9; число оснований ЗНК: 7; изготовитель: IDT (Exiqon)) (222 мг/мл) в очищенной воде и эмульгировали с помощью ультразвука в течение 20 с. Эту первичную эмульсию добавляли к внешней фазе, состоящей из водного раствора 1% (масс/об) поливинилового спирта и 1% (масс/об) хлорида натрия и гомогенизировали в течение 60 с приблизительно при 10300 об/мин. Полученную вторую эмульсию (вода/масло/вода) добавляли к объему очищенной воды и давали возможность испарения метилхлорида путем перемешивания. Полученные микросферы собирали центрифугированием, дважды промывали очищенной водой, а затем лиофилизировали. Средний диаметр микросферы составлял 9 мкм (82% от 5 до 25 мкм, и 0% более 25 мкм), при этом эффективность инкапсуляции составляла 74%.

Фотография полученных микросфер представлена на фиг. 1.

Фиг. 2 иллюстрирует распределение размера микросфер.

Пример 2: Получение микросфер, содержащих РНК

Микросферы были получены способом выпаривания растворителя из эмульсии вода/масло/вода, с использованием сополимера 50:50 ПЛГ, характеристическая вязкость приблизительно 0,2 дл/г (0,02 м³/кг), содержащий свободные карбоксильные концевые группы. К 0,6 г ПЛГ добавляли 3 мл метилхлорида. К органическому раствору ПЛГ добавляли 0,3 мл концентрированного раствора РНК (222 мг/мл) (РНК фирмы Sigma 5000-10000 Да) в очищенной воде, не содержащей РНКаз, и эмульгировали с помощью ультразвука в течение 20 с. Эту первичную эмульсию добавляли к внешней фазе, состоящей из водного раствора, не содержащего РНКазы, 1% (масс/об) поливинилового спирта и 5% (масс/об) маннита и гомогенизировали в течение 60 с приблизительно при 10300 об/мин. Полученную вторую эмульсию (вода/масло/вода) добавляли к объему очищенной воды, не содержащей РНКаз, и давали возможность испарения метилхлорида путем перемешивания. Полученные микросферы собирали центрифугированием, дважды промывали очищенной водой, не содержащей РНКазы, а затем лиофилизировали. Средний диаметр микросферы составлял 10 мкм (86% от 5 до 25 мкм и 0% более 25 мкм), при этом эффективность инкапсуляции составляла 73%.

Пример 3: Получение микросфер плацебо

Микросферы были получены способом выпаривания растворителя из эмульсии вода/масло/вода, с использованием сополимера 50:50 ПЛГ, характеристическая вязкость приблизительно 0,2 дл/г (0,02 м³/кг), содержащий свободные карбоксильные концевые группы. К 0,6 г ПЛГ добавляли 3 мл метилхлорида. К органическому раствору ПЛГ добавляли 0,3 мл очищенной воды и эмульгировали с помощью ультразвука в течение 20 с. Эту первичную эмульсию добавляли к внешней фазе, состоящей из водного раствора 1% (масс/об) поливинилового спирта и 1% (масс/об) хлорида натрия, и гомогенизировали в течение 60 с приблизительно при 10300 об/мин. Полученную вторую эмульсию (вода/масло/вода) добавляли к объему очищенной воды и давали возможность испарения метилхлорида путем перемешивания. Полученные микросферы собирали центрифугированием, дважды промывали очищенной водой, не содержащей РНКазы, а затем лиофилизировали. Средний диаметр микросферы составлял 7 мкм (84% от 5 до 25 мкм и 0% более 25 мкм).

Пример 4: Получение микросфер, содержащих альбумин, меченый флуоресцеинизотиоцианатом

Микросферы были получены способом выпаривания растворителя из эмульсии вода/масло/вода, с использованием сополимера 50:50 ПЛГ, характеристическая вязкость приблизительно 0,2 дл/г (0,02 м³/кг), содержащий свободные карбоксильные концевые

группы. К 0,2 г ПЛГ добавляли 1 мл метиленхлорида. К органическому раствору ПЛГ добавляли 0,1 мл водного раствора альбумина, меченого флуоресцеинизотиоцианатом (20 мг/мл) и эмульгировали с помощью ультразвука в течение 15 с. Эту первичную эмульсию добавляли к внешней фазе, состоящей из водного раствора 1% (масс/об) поливинилового спирта и 1% (масс/об) хлорида натрия, и гомогенизировали в течение 60 с приблизительно при 10300 об/мин. Полученную вторую эмульсию (вода/масло/вода) добавляли к объему очищенной воды и давали возможность испарения метиленхлорида путем перемешивания. Полученные микросферы собирали центрифугированием, дважды промывали очищенной водой, а затем лиофилизировали.

Средний диаметр микросферы составлял 9 мкм (91% от 5 до 25 мкм и 0% более 25 мкм).

Пример 5: Исследование селективного введения в артерию, питающую ткань-мишень

После индукции ОИМ у свиней породы английская крупная белая вводили 30 мг микросфер, содержащих флуоресцентный альбумин, полученный, как указано в примере 4, интракоронарным путем посредством коаксиального баллона 2,5/12, расположенной в артерии, ответственной за ОИМ, питающей область, пораженную инфарктом.

Микросферы были суспендированы *in situ* в 10 мл нормального физиологического раствора, содержащего Твин-80; введение проводили в 2 последовательных инъекциях по 5 мл, после каждой вводили 5 мл нормального физиологического раствора.

Эксперименты показали, что инкапсулированный антагомир можно селективно вводить в артерию, питающую больную ткань.

Пример 6: Исследование удерживания микросфер в капиллярах больной ткани, не дающего возможности выхода в кровоток

На модели свиней было проведено 4 эксперимента путем введения интракоронарным путем посредством коаксиального баллона, расположенного в медиальной нисходящей передней ветви, 2 инъекции, по 5 мл каждая, флуоресцентных микросфер, полученных согласно примеру 4. 4 животных подвергали эвтаназии и получали образцы миокардиальной ткани, примыкающей к нисходящей передней ветви, и контрольной ткани, орошаемой другими коронарными артериями. Образцы наблюдали через оптический флуоресцентный микроскоп, и продемонстрировали присутствие микросфер, удерживаемых в капиллярах поврежденной сердечной мышцы, а также их отсутствие в контрольной ткани.

Чтобы вывести системное биораспределение, у двух из описанных выше животных, кроме ишемической и контрольной ткани миокарда, получали 5 повторных образцов из легкого, селезенки и печени и визуализировали с помощью оптической микроскопии светом В. Флуоресценция была обнаружена исключительно в передней стенке миокарда. Данный анализ выявил, что микросферы удерживаются в сердце, избегая системного высвобождения антагомир-92а (снижение побочных эффектов).

Пример 7: Исследование удерживания микросфер в капиллярах больной ткани без повреждения самой ткани-мишени

Были проведены эксперименты по исследованию потенциальной локальной сердечной токсичности и терапевтического безопасного диапазона дозы. Чтобы определить локальное ишемическое повреждение сердечной мышцы, использовали 2 спаренных пьезоэлектрических кристалла, обладающих высокой чувствительностью при их способности к обнаружению ишемии. При поражении ткани сердечной мышцы ишемией остальная ткань становится дискинетической и отекает; это параллельно с кровяным давлением, производимым остальной прилегающей здоровой тканью, вызывает отделение микрокристаллов и их перемещение дальше друг от друга. Двум свиньям после проведения торакотомии и перикардэктомии вводили две пары микрокристаллов, одну

контрольную пару в латеральную область, и одну пару в переднюю область, питаемую нисходящей передней ветвью, через которую вводили микросферы. Для каждой пары средних кристаллов измеряли расстояние между ними по двум точкам во время сердечного цикла: в конечной диастоле (EDL) и конечной систоле (ESL). Отношение между EDL и ESL выражено параметром SS (укорочение систолы): $(EDL-ESL)/EDL$. Когда сокращение левого желудочка полностью спадает, $EDL=ESL$, и $SS=0$. нормальные значения находятся в диапазоне $0,2 \pm 0,1$. Как показано в прилагаемой иллюстрации, при исследуемой дозе были индуцированы минимальные и транзиторные осцилляции после каждой инъекции, длящиеся несколько секунд, соответствующие первой и второй инъекциям. Кроме того, неожиданно локальные побочные эффекты не наблюдали при многократных интракоронарных инъекциях флуоресцентных микросфер, полученных согласно примеру 4, достигающих 14-кратной дозы исследования. Никакая ограничивающая максимальная доза не была связана с необратимым ишемическим повреждением, гемодинамической реперкуссией или аритмиями.

Кроме того, чтобы обнаружить изменения в коронарном кровотоке, в среднюю LAD был помещен датчик кровотока, измеряющий коронарный кровоток. После интракоронарных инъекций значительных изменений в коронарном кровотоке не наблюдали.

Результаты проиллюстрированы на фиг. 3, где инъецировали 120 мг микросфер, и на фиг. 4, где инъецировали 240 мг микросфер.

Пример 8: Исследование молекулярного действия однократной интракоронарной инъекции микросфер, содержащих малую дозу антагомира

С целью демонстрации того, что малые дозы микроинкапсулированного антагомира могли бы производить молекулярный ответ, измеряли экспрессию *miR-92a in vivo* в ишемической и контрольной ткани после интракоронарного введения инкапсулированного антагомира-92а. 3 свиньям доставляли 60 мг микросфер, содержащих антагомир-92а, полученный согласно примеру 1 ($0,1 \text{ мг/кг}$), в LAD. Животных подвергали эвтаназии через одни сутки, трое суток и 10 суток, и экспрессию *miR-92a* и эндогенной микроРНК в качестве контролей (*miR-123*, *203* и *126*) определяли количественно в 2 повторных инфарктных и контрольных образцах путем выделения суммарной РНК и количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени, используя специфичные праймеры (см. фиг. 5).

В ткани, пораженной инфарктом, полученная в результате экспрессия *miR-92a* претерпевала 8-кратную понижающую регуляцию по сравнению с контрольной тканью, тогда как на экспрессию эндогенных *miR* обработка не влияла. Ингибирование начинало присутствовать уже с 1 суток, и все еще присутствовало на сутки 10, причем, уровни экспрессии были в 5 раз ниже, чем в контрольной области.

В эндогенных *miR* значимая регуляция не была обнаружена. Эти результаты выявили, что носитель/система обеспечивает адекватные условия для обеспечения контролируемой доставки и высвобождения антагомира-92а с получением в результате пролонгированного ингибирования микроРНК-92а при однократном интракоронарном введении.

Эти результаты, представленные на фиг. 6, также подтверждают, что антагомир не разлагается в процессе получения микросфер.

Пример 9: Исследование биологического действия однократной интракоронарной инъекции микросфер, содержащих низкие дозы антагомира

Чтобы продемонстрировать, сопровождается ли молекулярное действие антагомира-92а, транспортируемого микросферами, биологическим действием, было проведено

доклиническое исследование на 26 взрослых карликовых свиньях. Цель данного исследования состояла в том, чтобы изучить, приводит ли ингибирование *mir-92a* в результате селективного интракоронарного введения инкапсулированного антагомира-92a к усилению ангиогенеза в области, пораженной инфарктом, и, следовательно, к предотвращению встречаемости ремоделирования желудочка.

Вводили 3 препарата:

- Физиологический раствор (контрольный препарат)
- Микросферы плацебо, полученные согласно примеру 3
- Микросферы антагомира-92a, полученные согласно примеру 1, при однократной

дозе антагомира 3 мг на карликовую свинью.

Через 4 недели после обработки достоверно более высокая плотность сосудов в некротической области была обнаружена у животных, получавших антагомир-92a, по сравнению с контролями, что, таким образом, подтверждает проангиогенную активность антагомира-92a, наблюдаемую в предшествующем исследовании ($161,57 \pm 58,71$ по сравнению с $68,49 \pm 23,56$ в группе плацебо и по сравнению с $73,91 \pm 24,97$ в группе физиологического раствора, $p=0,001$); ii) плотность кровеносных сосудов (см. фиг. 7).

Микроваскуляризация увеличилась в обеих зонах, в зоне инфаркта и в периферическом крае. Более низкий индекс резистентности сосудов у этих обработанных животных был неоднократно продемонстрирован ($200,67 \pm 104,46$ по сравнению с $511,73 \pm 202,1$ в контролях, $p=0,007$) и достоверно согласовывалась с плотностью сосудов ($R^2 0,41$, $p=0,02$) (см. фиг. 8).

Базальная микроциркуляторная резистентность (базальная МР) и истинная микроциркуляторная резистентность (ИМР (гип)) были значительно ниже в обработанной группе по сравнению с контролями ($7,47 \pm 1,33$ по сравнению с $19,62 \pm 2,98$, $p=0,005$ и $5,0 \pm 1,15$ по сравнению с $14,49 \pm 2,4$, $p=0,006$ соответственно). Базальная и истинная микроциркуляторная резистентность достоверно согласовывались с плотностью сосудов ($R^2 0,35$, $p=0,033$ и $R^2 0,31$, $p=0,047$ соответственно (см. фиг. 9).

Эти данные указывают на то, что инкапсулированный антагомир-92a индуцирует пролонгированный ангиогенез *in vivo*.

После обнаружения роста кровеносных сосудов были дополнительно исследованы его потенциальные преимущества в процессе заживления, который происходит после ОИМ. Чтобы определить действия антагомира-92a на ремоделирование желудочка, сравнивали морфологические и структурные параметры с помощью магнитно-резонансной визуализации сердца *ex vivo* (МРС), и функциональные параметры анализировали с помощью внутрисосудистой эхокардиографии (ВС ЭхоКГ) в обработанных и необработанных группах. Достоверно более высокий процент животных с передней и септо-апикальной дискинезией присутствовал на ВС ЭхоКГ в контролях ($p=0,03$) (см. конкретно фиг. 10) при также достоверном более сильном истончении поврежденной стенки желудочка и неблагоприятных морфометрических изменениях в левом желудочке на МРС *ex-vivo* по сравнению с обработанными животными (таблица 3).

Более конкретно фиг. 10 иллюстрирует результаты анализа дисфункции регионарного движения стенки с помощью внутрисосудистой эхокардиографии (ВС ЭхоКГ). ВС ЭхоКГ проводили путем использования аппарата для ультразвуковой визуализации Vivid Q (GE Healthcare, Belford, UK) и ультразвукового катетера AcuNav 10F (Siemens), помещенного в верхушку правого желудочка.

Результаты этого исследования показывают, что введение микросфер антагомира-92a ассоциировано со статистически достоверным уменьшением нежелательного

ремоделирования после острого инфаркта миокарда.

Таблица 3: Параметры ремоделирования левого желудочка на МРС

	Физиологический раствор (N=6)	Плацебо МЭ (N=5)	Антагомир- 92а МЭ (N=6)	P
Число инфарктных сечений МРС	4,8±0,3	4,8±0,4	5,3±0,2	0,38
T _{max} инфарктной стенки, мм	6,07±0,9	5,61±0,5	9,01±0,6	0,006
T _{нормальной} задней стенки, мм	13,23±0,5	13,52±1,8	11,82±0,7	0,49
Процент минимального истончения, %	54,79±4,9	56,74±4,1	22,71±5,5	0,000
T _{min} инфарктной стенки, мм	3,17±0,4	4,02±0,9	4,35±0,5	0,33
Процент максимального истончения, %	76,40±2,18	69,86±4,72	62,54±4,19	0,05
Длина истонченной стенки, мм	32,2±1,8	31,7±4	20,5±3,6	0,03
D _R /D _N	1,93±0,2	2,02±0,2	1,29±0,1	0,03
D _N , мм	14,88±0,68	13,78±1,59	17,5±1,37	0,12
Нежелательное ремоделирование % (n)	83,3 (5)	80 (4)	16,7 (1)	0,03

Инкапсулированный антагомир-92а предотвращает нежелательное ремоделирование левого желудочка спустя 1 месяц после острого инфаркта миокарда. У каждой карликовой свиньи определяли различные параметры ремоделирования, вычисленные во всех инфарктных сечениях МРС ex-vivo. Показано репрезентативное сечение L2 (представляющее собой L1 верхушки) четырех карликовых свиней. T_{max} инфарктной стенки = средняя максимальная толщина инфарктной стенки, вычисленная как сумма максимальной толщины инфарктной стенки в каждом сечении, деленная на число пораженных сечений; T_{нормальной} задней стенки = средняя измеренная толщина нормальной задней стенки непосредственно за вставкой задней сосочковой мышцы, вычисленная

как сумма толщины задней стенки в каждом пораженном сечении, деленная на число пораженных сечений; средний процент минимального истончения, вычисленный как $[100 - (T_{\text{max}} \text{ инфарктной стенки} / T_{\text{нормальной задней стенки}} \times 100)]$; T_{min} инфарктной стенки = средняя минимальная толщина инфарктной стенки, вычисленная как сумма минимальной

5 толщины инфарктной стенки в каждом пораженном сечении, деленная на число пораженных сечений; средний процент максимального истончения, вычисленный как $[100 - (T_{\text{min}} \text{ инфарктной стенки} / T_{\text{нормальной задней стенки}} \times 100)]$; D_R : средний максимальный диаметр между инфарктной стенкой и контралатеральной нормальной стенкой,

10 вычисленный как сумма максимального диаметра между инфарктной стенкой в каждом инфарктном сечении, деленная на число пораженных сечений; D_N : средний максимальный диаметр между нормальными стенками, образующими прямой угол D_R , и протянутый ближе всего к центру полости желудочка, вычисленный как сумма максимального диаметра между нормальными стенками в каждом инфарктном сечении, деленная на

15 число пораженных сечений; D_R/D_N : средний индекс сферичности, вычисленный как сумма D_R/D_N каждого инфарктного сечения, деленная на число пораженных сечений. Данные таблицы выражены в виде средней величины \pm стандартная ошибка средней величины (s.e.m.).

Результаты репрезентативной МРС показывают следующее:

20 А: ЯМР и ВС ЭхоКГ сердца карликовой свиньи 14 (смерть немедленно после индукции ОИМ): Вследствие смерти немедленно после ОИМ было недостаточно времени для запуска процесса ремоделирования. Поэтому концентрический левый желудочек был виден как имеющий сходные размеры во всех сегментах.

25 В: ЯМР и ВС ЭхоКГ сердца карликовой свиньи от 20 до 30 суток после ОИМ: данные нежелательного ремоделирования желудочка: Через месяц после ОИМ на МРС наблюдали крайнее истощение переднего и септального отделов, а также образование аневризмы с дискинезией на ВС ЭхоКГ, характерной для нежелательного ремоделирования после ОИМ.

30 С: ЯМР и ВС ЭхоКГ сердца карликовой свиньи от 22 до 30 суток после ОИМ: отсутствие ремоделирования желудочка: Через месяц после ОИМ наблюдали некоторое сокращение париетальной области в передней и септальной областях без образования аневризмы и без дискинезии на ВС ЭхоКГ. Этот случай является характерным случаем благоприятных реакций репарации после ОИМ.

35 Пример 10: Исследование индукции сосудистых опухолей или действий антагомир-92а при краткосрочной смертности

В анализе аутопсии, проведенном для всех животных, сосудистые опухоли не наблюдали, что, таким образом, позволяет предположить отсутствие эктопического системного подавления микроРНК-92а в других органах на расстоянии. Смертность исследования составляла 23%. Различий в краткосрочной смертности не наблюдали.

40 Умерла только одна карликовая свинья, назначенная в группу инкапсулированного антагомир-92а, ($p=0,39$).

Таблица 4

N= 26	Физиологический раствор (n=9)	Плацебо МЕ (n=9)	Антагомир-92а МЕ (n=8)
1 месяц наблюдения	6	7	7
Смерть	3	2	1

Пример 11: Исследование проаритмического профиля инкапсулированного антагомир-92а

Чтобы узнать аритмогенный потенциал инкапсулированного антагомир-92а, все случаи аритмии во время процедур регистрировали и анализировали с помощью программы Collect 5S (GE). Кроме того, чтобы решить этот вопрос, имплантируемый петлевой регистратор ЭКГ случайным образом имплантировали в 10 из 26 карликовых свиней исследования, чтобы обнаружить потенциальные эпизоды аритмии до умерщвления, через месяц после инфаркта и лечения. В обработанной группе не наблюдали большего количества ни злокачественных тахиаритмий, ни брадиаритмий по сравнению с контролями, что указывает на то, что вводимый интракоронарно инкапсулированный антагомир-92а не оказывает проаритмического действия.

Таблица 5: Аритмии, обнаруженные в течение исследования

	Физиологический раствор (n=9)	Плацебо МЕ (n=9)	Антагомир- 92а МЕ (n=8)	p
Ишемическая фаза (n=26)				
Аритмий нет, n(%)	2 (22,2)	0	1 (12,5)	0,37
Аритмии, n (%):	7 (77,8)	(100)	7 (87,5)	
- PVC, n	5	7	5	

- NSVT, n	0	1	1	
- Фибрилляция желудочков, n	3	3	3	
Реперфузионная фаза (n=26)				
Аритмий нет, n(%)	5 (55,6)	3 (33,3)	3 (37,5)	0,6
Аритмии, n (%):	4 (44,4)	6 (66,7)	5 (62,5)	
- Синусные паузы, n	1	1	0	
- Нодальный ритм, n	1	0	0	
- IVR, n	0	2	1	
- PVC, n	4	3	3	
- NSVT, n	0	0	1	
В течение 30 суток после ОИМ (n=10)				
Имплантируемый петлевой регистратор ЭКГ	n=4	n=3	n=3	0,88
Аритмий нет, n(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,38
Аритмии, n (%):	2 (50)	3 (100)	3 (100)	
- Синусная тахикардия	2 0	3 1	3 0	
- Синусная пауза	0	0	1	
- PVC или PSVC	2 (50)	0	0	
- Не оцениваемые				

PVC: желудочковая экстрасистола, NSVT: неустойчивая желудочковая

тахикардия,

IVR: идиовентрикулярный ритм,

PSVC: желудочковая экстрасистола

ОИМ: острый инфаркт миокарда

Пример 12: Оценка действий инкапсулированного антагомира-92а и не инкапсулированного антагомира-92а на экспрессию miR92a in vitro

12.1: Материалы и методы

а. Клетки

Использована линия клеток пупочной вены человека, EA.hy926, основанная путем слияния первичных клеток пупочной вены человека с тиогуанин-устойчивым клоном клеток легких A549 (ATCC® CRL-2922™).

б. Обработка

Приблизительно 500000 клеток EA.hy926 высевали на шестилуночные планшеты и инкубировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 2 mM L-глутамина (Sigma, L'Isle d'abeau, France). Затем среду заменяли свежей полной средой RPMI, содержащей соответствующие антагомиры и их соответствующие контроли (ФСБ или микросферы). Клетки EA.hy926 обработаны либо антагомиром-92а (свободным и тремя партиями микросфер антагомира-92а), либо инкапсулированным антагомиром-17, либо инкапсулированным антагомиром-20 при 10 и 150 нМ. Клетки инкубировали дополнительно в течение 24 ч, после чего собирали для выделения РНК. Выделяли суммарную РНК, и микроРНК количественно определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР.

с. Выделение РНК

МикроРНК выделяли из клеток EA.hy926 и тканей карликовых свиней, используя

мини-наборы Qiagen RNeasy (№ по каталогу 74106) и универсальные наборы RNeasy+ (№ по каталогу 73404), соответственно, согласно инструкциям изготовителей (Qiagen, Courtaboeuf, France). Количество и чистоту выделенной РНК оценивали, используя спектрофотометр NanoDrop ND 1000 (Labtech International, Paris, France).

5 d. Обратная транскрипция микроРНК

Обратную транскрипцию микроРНК проводили, используя набор для обратной транскрипции микроРНК TaqMan (Life Technologies, № по каталогу 4366596) в конечном объеме 15 мкл, содержащем 5 нг суммарной РНК и специфичный зонд микроРНК. Образцы инкубировали при 16°C в течение 30 мин и 42°C в течение 30 мин, и обратную транскриптазу инактивировали нагреванием при 85°C в течение 5 мин и охлаждением при 4°C бессрочно.

10 e. ОТ-ПЦР в реальном времени

Теоретическое обоснование. Количественные значения получают на основании числа Ct, при котором начинает обнаруживаться повышение сигнала, связанное с экспоненциальным наращиванием продуктов ПЦР (при использовании программы QuantStudio 6 и 7 Flex согласно руководству изготовителя). Для контроля различий в количествах исходного материала данные нормализовали до геометрического среднего 2 эндогенных контролей (микроРНК103 и микроРНК191), для которых эмпирически показано, что уровни их экспрессии не меняются в зависимости от обработки. Затем величину целевой микроРНК нормализовали таким образом, чтобы величина целевой микроРНК в контроле была равна величине 1. Результаты выражали, используя способ вычисления $\Delta\Delta C_t$ (программа анализа RQ, Applied Biosystems®).

ПЦР амплификация. Все реакции ПЦР проводили, используя систему ПЦР в реальном времени QuantStudio™ 6 Flex и зонды TaqMan (Applied Biosystems®). Условия температурных циклов включали начальную стадию денатурации при 95°C в течение 10 мин и 45 циклов при 95°C в течение 15 с и 65°C в течение 1 мин. Образцы тестировали в двух повторах.

12.2: Результаты

Экспрессия miR-92a ингибируется как свободным, так и инкапсулированным антагомиром-92а при 10 нМ со снижением приблизительно 90%.

Экспрессия miR-92а не обнаружима как со свободным, так и с инкапсулированным антагомиром-92а при 150 нМ.

Ни экспрессия miR-17, ни экспрессия miR-20а достоверно не снижалась в результате обработки антагомиром-92а.

35 Эти данные суммированы на фиг. 11.

Пример 13: Оценка *in vitro* действий трех инкапсулированных антагомиров (антагомира 17, 20а и 92а) на экспрессию их соответствующих miR

13.1. Получение микросфер, содержащих антагомир-17 Микросферы были получены способом выпаривания растворителя из эмульсии вода/масло/вода, с использованием сополимера 50:50 ПЛГ (характеристическая вязкость (i.v.) 0,2 дл/г (0,02 м³/кг)). В органическом растворе ПЛГ эмульгировали раствор антагомир-17 (HSA-miR-17-5p; молекулярная масса: 5305 Да; последовательность: CTGCACTGTAAGCACT (SEQ ID No. 61); от фирмы Exiqon). Полученную эмульсию, в свою очередь, включали в дисперсную водную фазу и гомогенизировали до получения желаемого размера частиц. Наконец, после выпаривания растворителя, полученные микросферы лиофилизировали. Средний диаметр микросфер составлял 10 мкм, и содержание антагомира-17 составляло 7,3%.

13.2. Получение микросфер, содержащих антагомир-20а Микросферы были получены

способом выпаривания растворителя из

эмульсии вода/масло/вода, с использованием сополимера 50:50 ПЛГ (i.v. 0,2 дл/г (0,02 м³/кг)). В органическом растворе ПЛГ эмульгировали раствор антагомир-20а (HSA-miR-20a; молекулярная масса: 5289 Да; последовательность: CTGCACTATAAGCACT (SEQ ID No. 62); от фирмы Exiqon). Полученную эмульсию, в свою очередь, включали в дисперсную водную фазу и гомогенизировали до получения желаемого размера частиц. Наконец, после выпаривания растворителя, полученные микросферы лиофилизировали. Средний диаметр микросфер составлял 10 мкм, и содержание антагомир-20а составляло 6,8%.

13.3. Результаты

Материалы и методы являются такими же, как в Примере 12.

- miR-17 ингибируется до 76% обработкой инкапсулированным антагомир-17 при 10 нМ. Экспрессия miR17 полностью блокируется в результате обработки инкапсулированным антагомир-17 при 150 нМ.

- miR-20a ингибируется до 7% обработкой инкапсулированным антагомир-20а при 10 нМ и до 87% обработкой инкапсулированным антагомир-20а при 150 нМ.

Результаты представлены на фиг. 12.

Пример 14: Оценка *in vitro* трех партий микросфер Антагомир-92а с помощью характеристик содержания, размера и отношения лактид/гликолид

14.1. Получение микросфер с низким содержанием антагомир-92а (L13250: полимер: RESOMER RG502H)

Микросферы были получены способом выпаривания растворителя из эмульсии вода/масло/вода, с использованием сополимера 50:50 ПЛГ (i.v. 0,2 дл/г (0,02 м³/кг)), как описано в примере 1, но с использованием более низкого исходного количества лекарственного средства и более высокой скорости перемешивания с целью получения микросфер с низким содержанием антагомир-92а, имеющих меньший размер частиц. Средний диаметр микросфер составлял 7 мкм, и содержание антагомир-92а составляло 1,5%.

14.2. Получение микросфер с высоким содержанием антагомир-92а (L13262 : полимер : RESOMER RG502H)

Микросферы были получены способом выпаривания растворителя из эмульсии вода/масло/вода, с использованием сополимера 50:50 ПЛГ (i.v. 0,2 дл/г (0,02 м³/кг)), как описано в примере 1, но с использованием большего количества лекарственного средства и более низкой скорости перемешивания с целью получения микросфер с высоким содержанием антагомир-92а, имеющих более высокий размер частиц. Средний диаметр микросфер составлял 15,6 мкм, и содержание антагомир-92а составляло 9,8%.

14.3. Получение микросфер, содержащих антагомир-92а, с использованием полимер длительного высвобождения (L13230 : полимер : LACTEL B6006)

Микросферы были получены способом выпаривания растворителя из эмульсии вода/масло/вода, как описано в примере 1, но с использованием сополимера 85:15 ПЛГ с высокой молекулярной массой (i.v. 0,64 дл/г (0,064 м³/кг)), предназначенного для медленного высвобождения лекарственного средства. Средний диаметр микросфер составлял 12 мкм, и содержание антагомир-92а составляло 3,1%.

14.4. Результаты

Для трех партий микросфер антагомир-92а протестированы следующие характеристики: содержание, размер и отношение лактид/гликолид.

В соответствии с содержанием микросфер партия L13250 протестирована при 2 и 30

нМ, L13262 при 14 и 210 нМ, и L13230 при 4 и 66 нМ,
L13250, L13262 и L13230 полностью блокировали экспрессию miR92a.

5

1

Перечень последовательностей

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
FUNDACIO HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HERBRON-INSTITUT DE
RECERCA

10

<120> Composition comprising an encapsulated antagomir

<130> BR60604

<140> IBPCT/IB2014/058500

<141> 0028-07-06

15

<150> EP13305082

<151> 2013-01-24

<160> 62

<170> BiSSAP 1.3.2

20

<210> 1

<211> 78

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cuuucacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguauaggau ugcacuuguc

60

25

ccggccuguu gaguuugg

78

<210> 2

<211> 75

<212> RNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 2

ucauuccugg guggggauuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguau ugcacuuguc

60

ccggccugug gaaga

75

35

<210> 3

<211> 96

<212> RNA

<213> Homo sapiens

40

<400> 3

cgggcccccgg gcgggcggga gggacgggac gcggugcagu guuguuuuuu cccccgcca

60

uauugcacuc gucccgcccu ccggccccc cggccc

96

45

5 <210> 4
 <211> 84
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

10 <400> 4
 gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga 60
 aggcacuugu agcauuauagg ugac 84

15 <210> 5
 <211> 71
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

20 <400> 5
 ugcccuaagca gcgggaacag uucugcagug agcgauagggu gcucugggggu auuguuuccg 60
 cugccagggu a 71

25 <210> 6
 <211> 89
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

30 <400> 6
 gucagcagug ccuuagcagc acguaaauau ugcgguuag auucuaaaau uaucuccagu 60
 auuaacugug cugcugaagu aagguugac 89

35 <210> 7
 <211> 81
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

40 <400> 7
 guuccacucu agcagcacgu aaauauuggc guagugaaau auauuuuuuu caccauuuu 60
 acugugcugc uuuguguga c 81

45 <210> 8
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

3

5	<400> 8	
	uacaucggcc auuauauac aaccugauaa guguuauagc acuuauacaga uuguauugua	60
	auugucugug ua	72
10	<210> 9	
	<211> 72	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 9	
	acucggagg auauauuaca accugcuaag ugucuuagca cuuagcaggu uguauuuauca	60
	uuguccgugu cu	72
	<210> 10	
20	<211> 70	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 10	
	acacggacaa ugauauuaca accugcuaag ugcuaggaca cuuagcaggu uguauuuauu	60
	ccauccgagu	70
	<210> 11	
30	<211> 68	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 11	
	cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuuuaca cacuggcuca guucagcagg	60
	aacaggag	68
	<210> 12	
40	<211> 73	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 12	
	cucugccucc cgugccuacu gagcugaaac acaguugguu uguguacacu ggcucaguuc	60
	agcaggaaca ggg	73
	<210> 13	

5	<211> 76 <212> RNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 13 gagggggaag acgggaggaa agaagggagu gguuccauca cgccuccuca cuccucuccu cccgucuucu ccucuc	60 76
15	<210> 14 <211> 110 <212> RNA <213> Homo sapiens	
20	<400> 14 ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aauguuaagg aagcaaucag caaguauacu gcccuagaag ugcugcacgu ugugggggccc	60 110
25	<210> 15 <211> 84 <212> RNA <213> Homo sapiens	
30	<400> 15 gugcucgguu uguaggcagu gucauuagcu gauuguacug uggugguuac aaucacuaac uccacugcca ucaaaaacaag gcac	60 84
35	<210> 16 <211> 77 <212> RNA <213> Homo sapiens	
40	<400> 16 agucuaguua cuaggcagug uaguuaugcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac ggccagguaa aaagauu	60 77
45	<210> 17 <211> 71 <212> RNA <213> Homo sapiens	
	<400> 17 guagcacuaa agugcuuaua gugcagguag uguuuaguua ucuacugcau uaugagcacu	60

5	uaaaguacug c	71
	<210> 18	
	<211> 69	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
10		
	<400> 18	
	aguaccaaag ugcucauagu gcagguaguu uuggcaugac ucuacuguag uauaggcacu	60
	uccaguacu	69
15		
	<210> 19	
	<211> 83	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
20		
	<400> 19	
	ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau	60
	ugugcugccu caaaaauaca agg	83
25		
	<210> 20	
	<211> 98	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
30		
	<400> 20	
	uugaggccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac augcuacagu caagaugcga	60
	aucauuuuu gcugcucuag aaaaaaagg aaaucau	98
35		
	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
40		
	<400> 21	
	uauugcacuu gucccgccu gu	22
	<210> 22	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
45		

5	<400> 22 agguugggau cgguugcaau gcu	23
10	<210> 23 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
	<400> 23 ggguggggau uuguugcauu ac	22
15	<210> 24 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
20	<400> 24 uauugcacuc gucccggccu cc	22
	<210> 25 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
25	<400> 25 agggacggga cgcggugcag ug	22
30	<210> 26 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
	<400> 26 acugcaguga aggcacuugu ag	22
35	<210> 27 <211> 23 <212> RNA <213> Homo sapiens	
40	<400> 27 caaagugcuu acagugcagg uag	23
45		

5 <210> 28
<211> 23
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 28
gggguaauugu uuccgcugcc agg 23

10 <210> 29
<211> 23
<212> RNA
<213> Homo sapiens

15 <400> 29
uagcagcggg aacaguucug cag 23

20 <210> 30
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 30
ccaguaauaa cugugcugcu ga 22

25 <210> 31
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

30 <400> 31
ccaauuuac ugugcugcu ua 22

<210> 32
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

35 <400> 32
uagcagcacg uaaauauugg cg 22

40 <210> 33
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

45

5 <400> 33
cuuaucagau uguauuguaa uu 22

10 <210> 34
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 34
uuauaaauaca accugauaag ug 22

15 <210> 35
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

20 <400> 35
cuuagcaggu uguauuuauca uu 22

<210> 36
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

25 <400> 36
auauaaauaca accugcuaag ug 22

30 <210> 37
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
cacuuagcag guuguauuuau au 22

35 <210> 38
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

40 <400> 38
auaaauacaac cugcuaagug cu 22

45

5 <210> 39
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
uggcucaguu cagcaggaac ag 22

10 <210> 40
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

15 <400> 40
ugccuacuga gcugauauca gu 22

20 <210> 41
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 41
uggcucaguu cagcaggaac ag 22

25 <210> 42
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
ugccuacuga gcugaaacac ag 22

30 <210> 43
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

35 <400> 43
ucacuccucu ccucccgucu u 21

40 <210> 44
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

45

5 <400> 44
aagacgggag gaaagaaggg ag 22

10 <210> 45
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 45
caaucagcaa guauacugcc cu 22

15 <210> 46
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

20 <400> 46
uggcaguguc uuagcugguu gu 22

<210> 47
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

25 <400> 47
caaucacuaa cuccacugcc au 22

30 <210> 48
<211> 23
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 48
uaggcagugu cauuagcuga uug 23

35 <210> 49
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

40 <400> 49
aaucacuaac cacacggcca gg 22

45

11

5 <210> 50
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 50
 aggcagugua guuagcugau ugc 23

10 <210> 51
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

15 <400> 51
 acugcauuau gagcacuuaa ag 22

 <210> 52
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

20 <400> 52
 uaaagugcuu auagugcagg uag 23

 <210> 53
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

25 <400> 53
 acuguaguau gggcacuucc ag 22

30 <210> 54
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

35 <400> 54
 caaagugcuc auagugcagg uag 23

 <210> 55
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

40

45

5 <400> 55
caggccauau ugugcugccu ca 22

10 <210> 56
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 56
uagcagcaca uaaugguuug ug 22

15 <210> 57
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

20 <400> 57
cgaaucuuu uuugcugcuc ua 22

<210> 58
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

25 <400> 58
uagcagcaca ucaugguuua ca 22

30 <210> 59
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial sequence

<223> "Antagomir"

<220>
<223> Antagomir

35 <400> 59
ccgggacaag tgcaat 16

<210> 60
<211> 16
<212> RNA
<213> artificial sequence

40 <223> "Antagomir"

45


```

<220>
<223> Antagomir
5  <400> 60
    ccgggacaag ugcaau
                                16

<210> 61
<211> 16
<212> RNA
10 <213> Artificial Sequence

    <223> "Antagomir"

    <220>
    <223> Antagomir

15 <400> 61
    ctgcactgta agcact
                                16

<210> 62
<211> 16
<212> RNA
20 <213> Artificial Sequence

    <223> "Antagomir"

    <220>
    <223> Antagomir

    <400> 62
25 ctgcactata agcact
                                16

```

(57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения ремоделирования желудочка сердца после острого инфаркта миокарда у субъекта, содержащая

30 эффективное количество по меньшей мере одного ингибитора микроРНК, вовлеченной в ангиогенез и проявляющей антиангиогенную активность, или ее предшественника, где указанный ингибитор, представляющий собой антисмысловой олигонуклеотид, комплементарный указанной микроРНК или ее предшественнику, микроинкапсулирован в полимерных биоразлагаемых и биосовместимых микросферах, диаметр которых не

35 превышает 25 мкм, и где указанная микроРНК выбрана из следующих зрелых микроРНК:

- a) miR-92a, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22 или 23, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 21, 22 или 23;
- 40 b) miR-92b, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 или 25, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 24 или 25;
- c) miR-17, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26 или 27, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90%
- 45 нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 26 или 27;
- d) miR-503, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28 или 29, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 28 или 29;

е) miR-16, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 31 или 32, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 30, 31 или 32;

5 f) miR-374, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37 или 38, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37 или 38;

g) miR-24, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42;

10 h) miR-483, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43 или 44, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 43 или 44;

i) miR-34, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 или 50, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 или 50;

15 j) miR-20, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, 52, 53 или 54, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 51, 52, 53 или 54; и

k) miR-15, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55, 56, 57 или 58, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 55, 56, 57 или 58, и

где указанный предшественник микроРНК выбран из следующих предшественников:

a) mir-92a-1, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 1;

25 b) mir-92a-2, содержащего последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 2;

c) mir-92b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 3;

d) mir-17, содержащего последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность, 30 обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 4;

e) mir-503, содержащего последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 5;

f) mir-16-1, содержащего последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 6; и

35 g) mir-16-2, содержащего последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 7;

h) mir-374a, содержащего последовательность SEQ ID NO: 8 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 8;

i) mir-374b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, 40 обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 9;

j) mir-374c, содержащего последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 10;

k) mir-24-1, содержащего последовательность SEQ ID NO: 11 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 11;

45 l) mir-24-2, содержащего последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 12;

m) mir-483, содержащего последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 13;

n) miR-34a, содержащего последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 14;

o) miR-34b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 15;

5 p) miR-34c, содержащего последовательность SEQ ID NO: 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 16;

q) miR-20a, содержащего последовательность SEQ ID NO: 17 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 17;

10 r) miR-20b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 18 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 18;

s) miR-15a, содержащего последовательность SEQ ID NO: 19 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 19, и

t) miR-15b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 20 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 20.

15 2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где указанный ингибитор микроРНК представляет собой олигонуклеотид, содержащий от 8 до 49 нуклеотидов в длину и имеющий последовательность, нацеленную на указанную микроРНК или ее предшественника.

3. Фармацевтическая композиция по п. 2, где указанный олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, по меньшей мере частично комплементарный последовательности целевой микроРНК или ее предшественника.

4. Фармацевтическая композиция по п. 3, где указанный антисмысловый олигонуклеотид выбирают из группы, состоящей из рибонуклеотида, дезоксирибонуклеотида, малой РНК, антагомира, закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК), пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК), морфолино-модифицированного олигонуклеотида или их комбинации.

5. Фармацевтическая композиция по п. 4, где указанный олигонуклеотид состоит из антагомира.

30 6. Фармацевтическая композиция по п. 5, где указанный антагомир содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 16 смежных нуклеотидов, комплементарных нуклеотидам последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 58.

35 7. Фармацевтическая композиция по п. 6, где указанный антагомир содержит последовательность SEQ ID NO: 59 или 60 и их модификации, за исключением замен оснований, и фрагменты, состоящие по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов подпоследовательностей SEQ ID NO: 59 или 60.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где по меньшей мере 50% указанных микросфер имеют диаметр от 5 до 20 мкм, предпочтительно от 5 до 15 мкм.

40 9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где микросферы включают от 1 масс. % до 15 масс. % ингибитора.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где микросферы включают от 1 масс. % до 10 масс. % ингибитора.

45 11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где указанные микросферы получают из полимера, состоящего из поли-D,L-лактида (ПЛА), причем указанный полимер необязательно смешан с одним или более другим полимером.

12. Фармацевтическая композиция по п. 1, где указанные микросферы получают из сополимера, состоящего из поли-D,L-лактид-ко-гликолида (ПЛГ), где указанный полимер

необязательно смешан с одним или более другим полимером.

13. Фармацевтическая композиция по п. 1, где указанные микросферы получают из смеси полимеров, состоящей из поли-d,l-лактид-ко-гликолида (ПЛГ) и поли-d,l-лактида (ПЛА).

14. Фармацевтическая композиция по п. 12 или 13, где молярное отношение лактид : гликолид в полимере ПЛГ составляет от 50:50 до 95:5.

15. Фармацевтическая композиция по п. 12 или 13, где характеристическая вязкость полимера составляет от 0,1 до 0,70 дл/г (от 0,01 до 0,07 м³/кг).

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-7 для применения при лечении инфаркта миокарда.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, где указанный инфаркт миокарда состоит из острого инфаркта миокарда.

18. Способ реверсирования или предупреждения ремоделирования желудочка после острого инфаркта миокарда у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение этому субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-15.

19. Способ по п. 18, где указанное введение состоит во введении интракоронарным путем.

20. Популяция биоразлагаемых и биосовместимых микросфер для применения при лечении или предупреждении инфаркта миокарда, где указанные микросферы:

- имеют средний диаметр от 5 до 15 мкм;

- получают из поли-d,l-лактид-ко-гликолида (ПЛГ), поли-d,l-лактида (ПЛА) или их смеси;

- включают от 1 масс. % до 15 масс. % терапевтического средства, способного к предупреждению ремоделирования желудочка,

причем указанное терапевтическое средство состоит из ингибитора микроРНК, состоящего из антисмыслового олигонуклеотида, комплементарного указанной микроРНК, выбранной из группы, состоящей из miR-92 (включая miR-92a-1, miR-92a-2 и miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (включая miR-16-1 и miR-16-2), miR-374 (включая miR-374a, miR-374b и miR-374c), miR-24 (включая miR-24-1 и miR-24-2), miR-483, miR-34 (включая miR-34a, miR-34b и miR-34c), miR-20 (включая miR-20a и miR-20b), miR-15 (включая miR-15a и miR-15b) и более предпочтительно miR-92a, или ее предшественника, и

где указанная микроРНК выбрана из следующих зрелых микроРНК:

а) miR-92a, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22 или 23, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 21, 22 или 23;

б) miR-92b, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 или 25, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 24 или 25;

в) miR-17, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26 или 27, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 26 или 27;

д) miR-503, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28 или 29, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 28 или 29;

е) miR-16, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 31 или 32, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90%

нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 30, 31 или 32;

f) miR-374, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37 или 38, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37 или 38;

5 g) miR-24, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42;

h) miR-483, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43 или 44, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 43 или 44;

i) miR-34, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 или 50, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 или 50;

15 j) miR-20, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, 52, 53 или 54, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 51, 52, 53 или 54; и

k) miR-15, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55, 56, 57 или 58, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с одной из SEQ ID NO: 55, 56, 57 или 58, и

20 где указанный предшественник микроРНК выбран из следующих предшественников:

a) miR-92a-1, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 1;

b) miR-92a-2, содержащего последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 2;

25 c) miR-92b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 3;

d) miR-17, содержащего последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 4;

30 e) miR-503, содержащего последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 5;

f) miR-16-1, содержащего последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 6; и

g) miR-16-2, содержащего последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 7;

35 h) miR-374a, содержащего последовательность SEQ ID NO: 8 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 8;

i) miR-374b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 9;

40 j) miR-374c, содержащего последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 10;

k) miR-24-1, содержащего последовательность SEQ ID NO: 11 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 11;

l) miR-24-2, содержащего последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 12;

45 m) miR-483, содержащего последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 13;

n) miR-34a, содержащего последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 14;

о) mir-34b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 15;

р) mir-34c, содержащего последовательность SEQ ID NO: 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 16;

5 q) mir-20a, содержащего последовательность SEQ ID NO: 17 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 17;

г) mir-20b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 18 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 18;

10 s) mir-15a, содержащего последовательность SEQ ID NO: 19 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 19, и

т) mir-15b, содержащего последовательность SEQ ID NO: 20 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% нуклеотидной идентичностью с SEQ ID NO: 20.

21. Популяция микросфер по п. 20, где ингибитор представляет собой антагомир.

15 22. Фармацевтический набор для предупреждения или лечения ремоделирования желудочка сердца после острого инфаркта миокарда у субъекта, содержащий по меньшей мере i) композицию по любому из пп. 1-15 и/или популяцию микросфер по п. 20 или 21, где диаметр указанных микросфер не превышает 25 мкм, ii) шприц, или флакон, или ампулу, в которых находится композиция, и iii) необязательно контейнер для растворителя.

20 23. Фармацевтический набор по п. 22, дополнительно содержащий растворитель, находящийся в контейнере для растворителя.

25

30

35

40

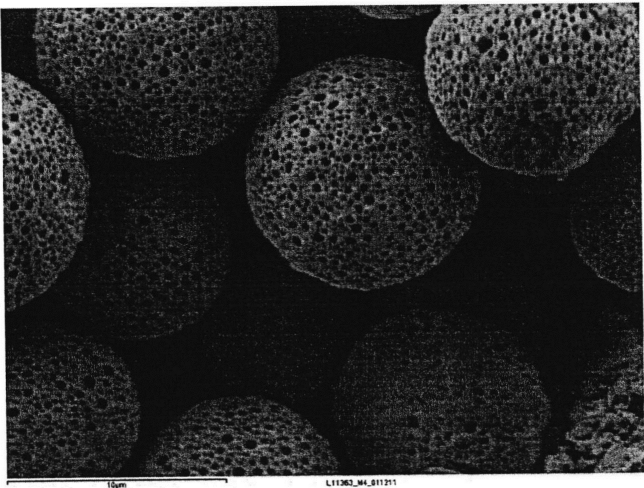
45

WO 2014/115103

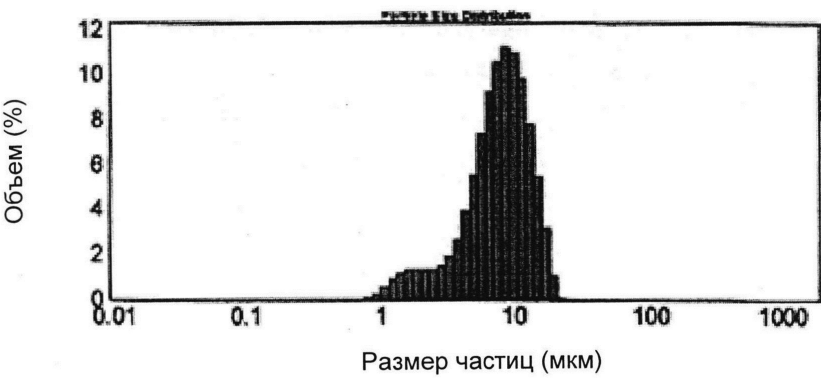
1

PCT/IB2014/058500

Фиг. 1

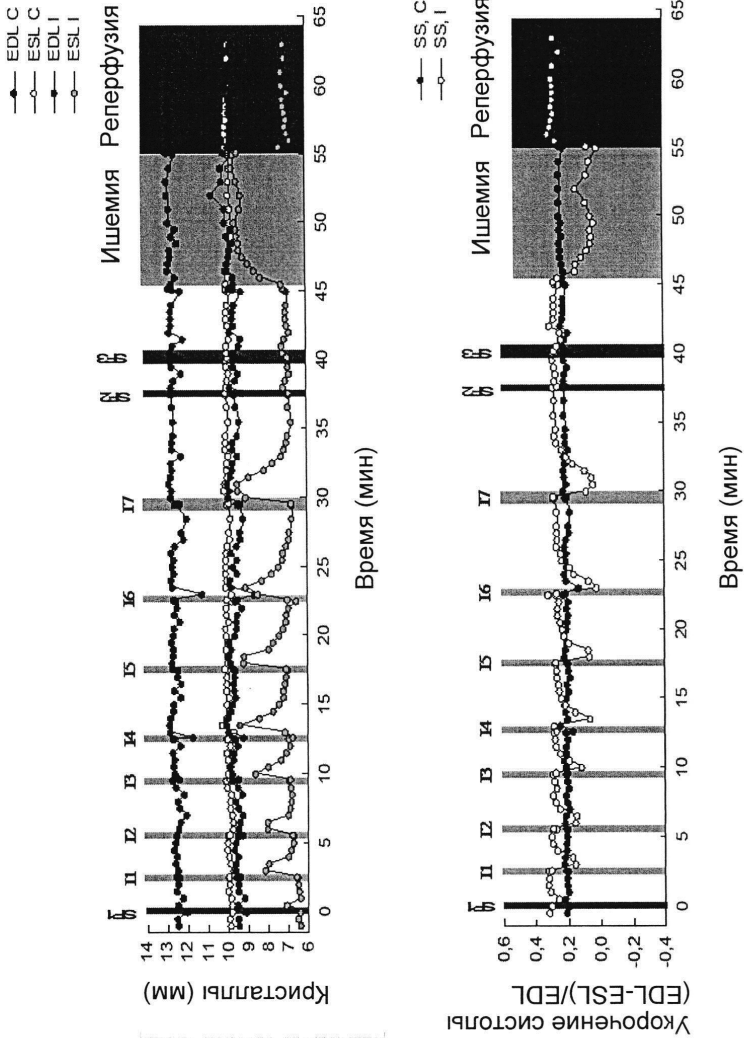


Фиг. 2



Фиг. 3

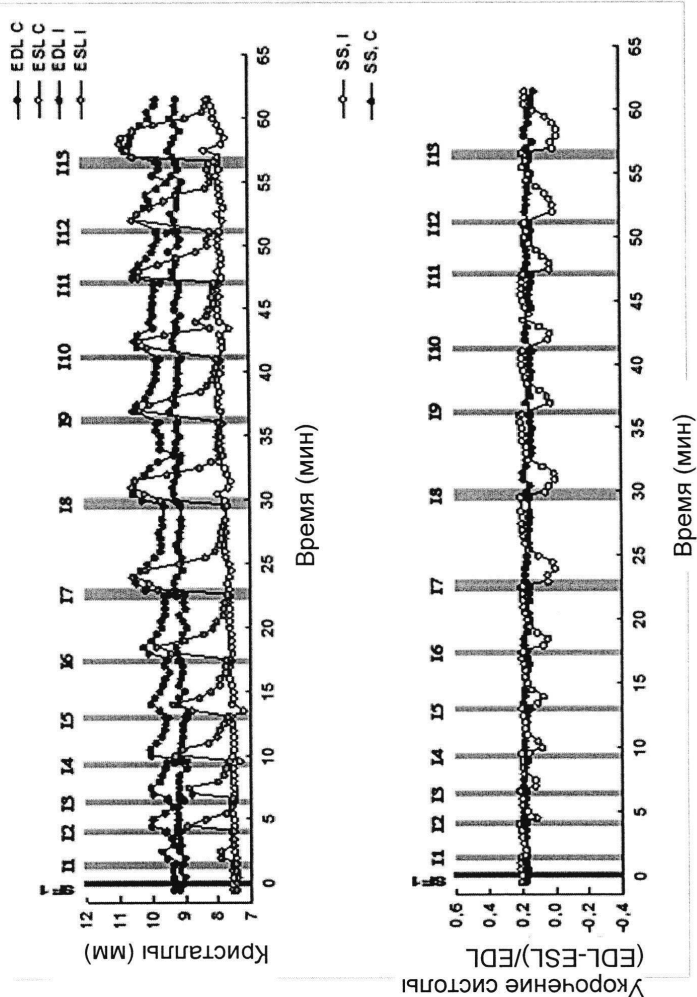
Введение микросфер альбумина: 15 мг × 6 + 30 мг × 1 + SF 10 мл + SF 20 мл + ишемия 5 мин/реперфузия 10 мин



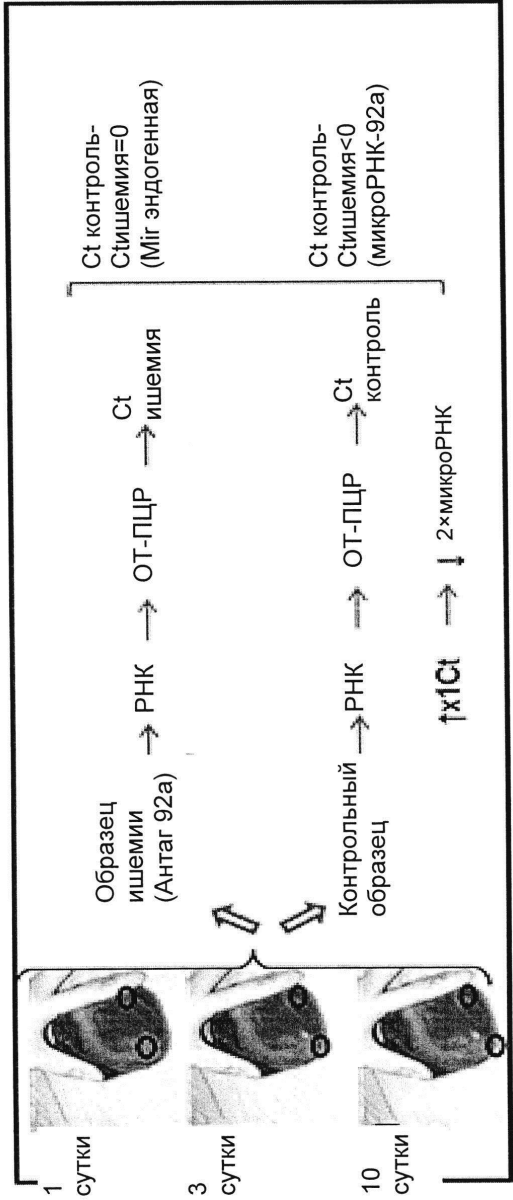
EDL - конечная диастола, ESL - конечная систола, SS –укорочение систолы

Фиг. 4

Введение микросфер альбумина: SF 10 мл + 15 мг × 6 + 30 мг × 2 + 15 мг × 4 + 30 мг × 1

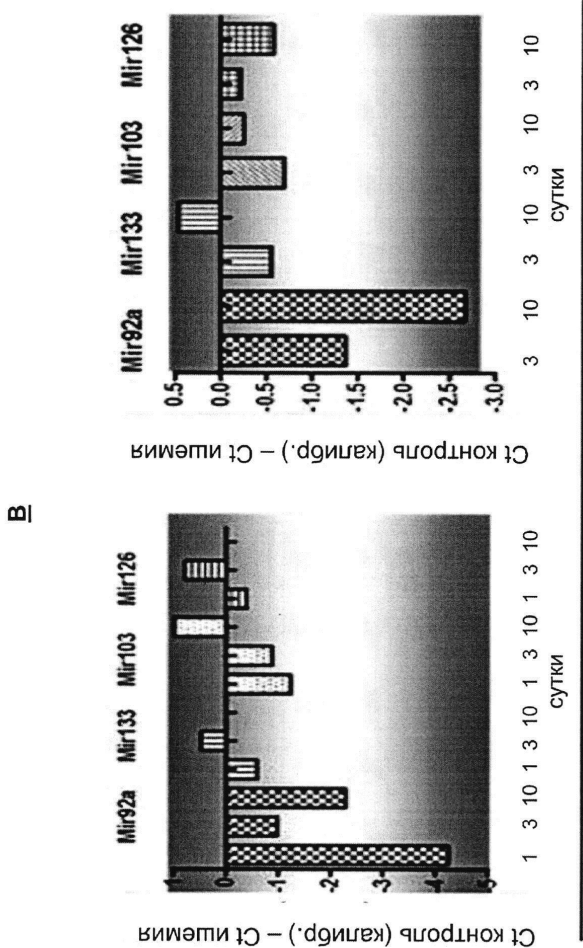


Фиг. 5

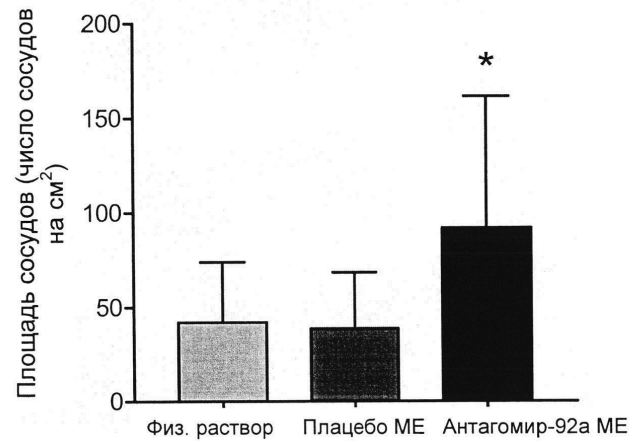


ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

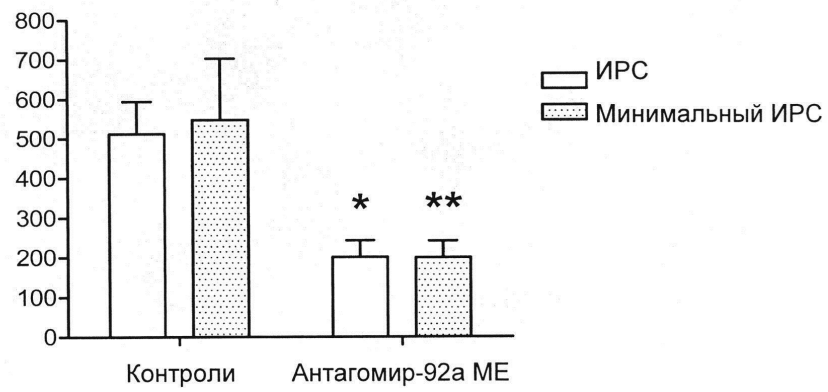
Фиг. 6



Фиг. 7

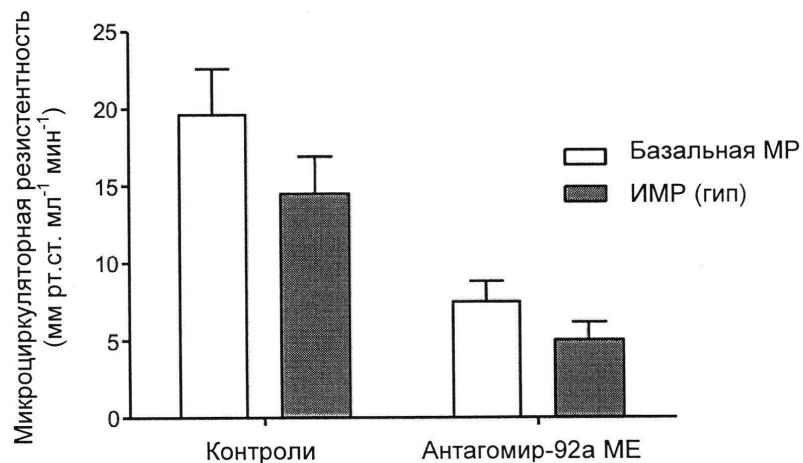


Фиг. 8



ИРС - индекс резистентности сосудов

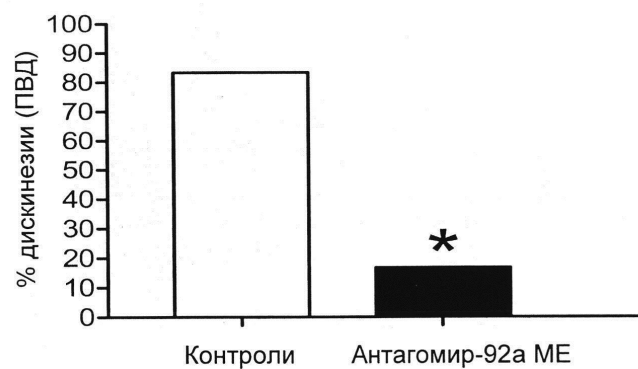
Фиг. 9



МР - микроциркуляторная резистентность

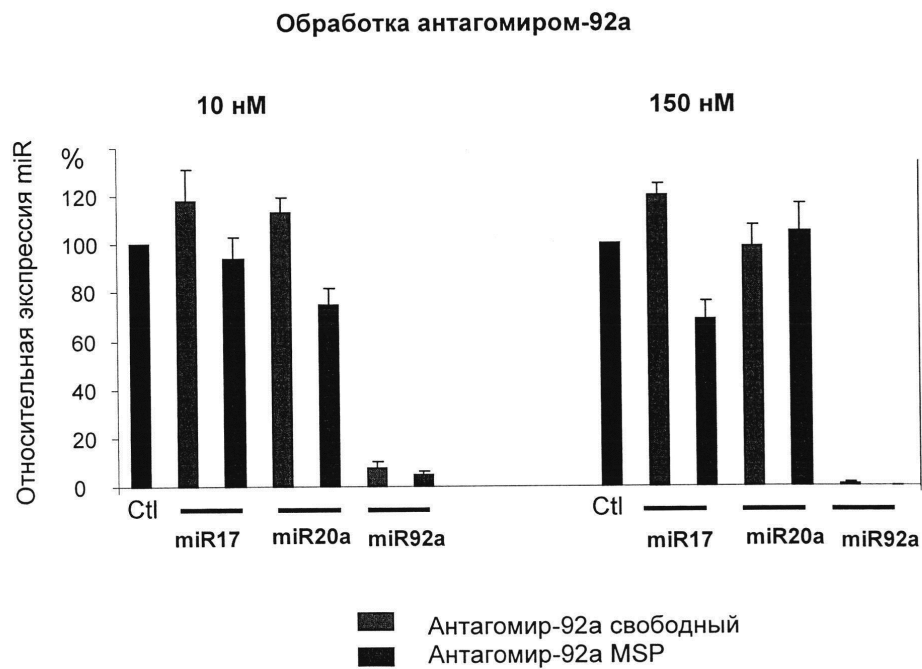
ИМП – истинная микроциркуляторная резистентность

Фиг. 10



ПВД - перегородочно-верхушечная дискинезия

Фиг. 11



Фиг. 12

