

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012146816/10, 14.05.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.05.2010 US 61/334,933

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2014 Бюл. № 17

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 14.12.2012(86) Заявка РСТ:
US 2011/036557 (14.05.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/143640 (17.11.2011)Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, ВОХ-1125,
ПАТЕНТИКА

(71) Заявитель(и):

КУРНА, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):

КОЛЛАРД Джозеф (US),
ХОРКОВА ШЕРМАН Ольга (US)(54) **ЛЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С БЕЛКОМ АПОПТОЗНОГО ОТВЕТА ПРОСТАТЫ PAR4, ПУТЕМ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРИРОДНОГО АНТИСМЫСЛОВОГО ТРАНСКРИПТА ГЕНА PAR4**

(57) Формула изобретения

1. Способ модулирования функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4 в биологической системе, включающий: осуществление контакта указанной системы с по меньшей мере одним антисмысловым олигонуклеотидом длиной от 5 до 30 нуклеотидов, при этом указанный по меньшей мере один олигонуклеотид имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью, которая представляет собой обратный комплемент природной антисмысловой последовательности для полинуклеотида PAR4; что приводит к модулированию функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4.

2. Способ модулирования функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4 в биологической системе по п.1, включающий: осуществление контакта указанной биологической системы с по меньшей мере одним антисмысловым олигонуклеотидом длиной от 5 до 30 нуклеотидов, при этом указанный по меньшей мере один олигонуклеотид имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью, которая представляет собой обратный комплемент полинуклеотида, содержащего от 5 до 30 последовательных нуклеотидов в пределах нуклеотидов 1-354 природного антисмыслового транскрипта, соответствующего SEQ ID NO: 2; что приводит к модулированию функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4.

3. Способ модулирования функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4 в клетках или тканях пациента *in vivo* или *in vitro*, включающий: осуществление контакта указанных клеток или тканей с по меньшей мере одним антисмысловым олигонуклеотидом длиной от 5 до 30 нуклеотидов, при этом указанный олигонуклеотид имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с антисмысловым олигонуклеотидом для полинуклеотида PAR4; что приводит к модулированию функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4 в клетках или тканях пациента *in vivo* или *in vitro*.

4. Способ модулирования функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4 в клетках или тканях пациента по п.3, включающий: осуществление контакта указанной биологической системы с по меньшей мере одним антисмысловым олигонуклеотидом длиной от 5 до 30 нуклеотидов, при этом указанный по меньшей мере один олигонуклеотид имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью, которая представляет собой обратный комплемент полинуклеотида, содержащего от 5 до 30 последовательных нуклеотидов в пределах нуклеотидов 1-354 природного антисмыслового транскрипта, соответствующего SEQ ID NO: 2; что приводит к модулированию функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4.

5. Способ модулирования функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4 в биологической системе, включающий: осуществление контакта указанной системы с по меньшей мере одним антисмысловым олигонуклеотидом, который нацелен на участок природного антисмыслового олигонуклеотида для полинуклеотида PAR4; что приводит к модулированию функции и/или экспрессии полинуклеотида PAR4.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что функция и/или экспрессия гена PAR4 увеличиваются *in vivo* или *in vitro* по сравнению с контролем.

7. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один антисмысловый олигонуклеотид нацелен на природную антисмысловую последовательность для полинуклеотида PAR4.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один антисмысловый олигонуклеотид нацелен на нуклеотидную последовательность, содержащую кодирующие и/или некодирующие нуклеотидные последовательности полинуклеотида PAR4.

9. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один антисмысловый олигонуклеотид нацелен на перекрывающиеся и/или неперекрывающиеся последовательности полинуклеотида PAR4.

10. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один антисмысловый олигонуклеотид содержит одну или более модификаций, выбранных из: по меньшей мере одного модифицированного остатка сахара, по меньшей мере одной модифицированной межнуклеозидной связи, по меньшей мере одного модифицированного нуклеотида и их комбинаций.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что указанные одна или более модификаций включают по меньшей мере один модифицированный остаток сахара, выбранный из: 2'-О-метоксиэтил-модифицированного остатка сахара, 2'-метокси-модифицированного остатка сахара, 2'-О-алкил-модифицированного остатка сахара, бициклического остатка сахара и их комбинаций.

12. Способ по п.10, отличающийся тем, что указанные одна или более модификаций включают по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, выбранную из: фосфотиоата, 2'-О-метоксиэтила (МОЭ), 2'-фтор, алкилфосфоната, фосфодитиоата, алкилфосфонотиоата, фосфорамидата, карбамата, карбоната, триэфирфосфата, ацетамидата, карбоксиметилового эфира и их комбинаций.

13. Способ по п.10, отличающийся тем, что указанные одна или более модификаций

включают по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из: пептидо-нуклеиновой кислоты, закрытой нуклеиновой кислоты, арабинонуклеиновой кислоты (2'-дезоксид-2'-фтор-β-D-арабинонуклеиновой кислоты, FANA), их аналога, производного и комбинаций.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну из олигонуклеотидных последовательностей, соответствующих SEQ ID NOS:3-9.

15. Способ модулирования функции и/или экспрессии гена PAR4 в клетках или тканях млекопитающих *in vivo* или *in vitro*, включающий: осуществление контакта указанных клеток или тканей с по меньшей мере одним олигонуклеотидом малой интерферирующей РНК (миРНК) длиной от 5 до 30 нуклеотидов, причем указанный по меньшей мере один олигонуклеотид миРНК специфичен к антисмысловому полинуклеотиду для полинуклеотида PAR4, при этом указанный по меньшей мере один олигонуклеотид миРНК имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью, которая представляет собой комплемент по меньшей мере примерно пяти последовательных нуклеиновых кислот антисмысловой и/или смысловой молекулы нуклеиновой кислоты для полинуклеотида PAR4; и модулирование функции и/или экспрессии гена PAR4 в клетках или тканях млекопитающих *in vivo* или *in vitro*.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с последовательностью из по меньшей мере примерно пяти последовательных нуклеиновых кислот, которая комплементарна антисмысловой и/или смысловой молекуле нуклеиновой кислоты для полинуклеотида PAR4.

17. Способ модулирования функции и/или экспрессии гена PAR4 в клетках или тканях млекопитающих *in vivo* или *in vitro*, включающий: осуществление контакта указанных клеток или тканей с по меньшей мере одним антисмысловым олигонуклеотидом длиной примерно от 5 до 30 нуклеотидов, специфичным к некодирующим и/или кодирующим последовательностям смысловой и/или природной антисмысловой цепи полинуклеотида PAR4, при этом указанный по меньшей мере один антисмысловый олигонуклеотид имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, соответствующей SEQ ID NOS: 1 и 2; и модулирование функции и/или экспрессии гена PAR4 в клетках или тканях млекопитающих *in vivo* или *in vitro*.

18. Синтетический модифицированный олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере одну модификацию, при этом указанная по меньшей мере одна модификация выбрана из: по меньшей мере одного модифицированного остатка сахара; по меньшей мере одной модифицированной межнуклеотидной связи; по меньшей мере одного модифицированного нуклеотида и их комбинаций; при этом указанный олигонуклеотид представляет собой антисмысловое соединение, которое гибридизуется с и модулирует функцию и/или экспрессию гена PAR4 *in vivo* или *in vitro* по сравнению с нормальным контролем, и при этом указанный олигонуклеотид имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью из по меньшей мере примерно пяти последовательных нуклеиновых кислот, которая комплементарна антисмысловой и/или смысловой молекуле нуклеиновой кислоты для полинуклеотида PAR4 и его аллелей, гомологов, изоформ, вариантов, производных, мутантов, фрагментов или их комбинаций.

19. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.18, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид имеет длину от 5 до 30 нуклеотидов и имеет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью, которая представляет собой обратный комплемент 5-30 последовательных нуклеотидов в

пределах природного антисмыслового транскрипта гена PAR4.

20. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна модификация включает межнуклеотидную связь, выбранную из группы, состоящей из: фосфотиоата, алкилфосфоната, фосфодитиоата, алкилфосфонотиоата, фосфорамидата, карбамата, карбоната, триэфирфосфата, ацетамидата, карбоксиметилового эфира и их комбинаций.

21. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

22. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит остов из фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

23. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, при этом указанный модифицированный нуклеотид выбран из: пептидо-нуклеиновой кислоты, закрытой нуклеиновой кислоты, их аналога, производного и комбинации.

24. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит множество модификаций, при этом указанные модификации включают модифицированные нуклеотиды, выбранные из: фосфотиоата, алкилфосфоната, фосфодитиоата, алкилфосфонотиоата, фосфорамидата, карбамата, карбоната, триэфирфосфата, ацетамидата, карбоксиметилового эфира и их комбинаций.

25. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит множество модификаций, при этом указанные модификации включают модифицированные нуклеотиды, выбранные из: пептидо-нуклеиновых кислот, закрытых нуклеиновых кислот, их аналогов, производных и комбинации.

26. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный остаток сахара, выбранный из: 2'-О-метоксиэтил-модифицированного остатка сахара, 2'-метокси-модифицированного остатка сахара, 2'-О-алкил-модифицированного остатка сахара, бициклического остатка сахара и их комбинации.

27. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит множество модификаций, при этом указанные модификации включают модифицированные остатки Сахаров, выбранные из: 2'-О-метоксиэтил-модифицированного остатка сахара, 2'-метокси-модифицированного остатка сахара, 2'-О-алкил-модифицированного остатка сахара, бициклического остатка сахара и их комбинации.

28. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид имеет длину по меньшей мере примерно от 5 до 30 нуклеотидов и гибридизуется с антисмысловой и/или смысловой цепью полинуклеотида PAR4, при этом указанный олигонуклеотид имеет по меньшей мере примерно 60% идентичность последовательности с последовательностью, которая представляет собой комплемент по меньшей мере примерно пяти последовательных нуклеиновых кислот антисмысловой и/или смысловой кодирующей и/или некодирующей нуклеотидной последовательности полинуклеотида PAR4.

29. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид имеет по меньшей мере примерно 80% идентичность последовательности с последовательностью, которая представляет собой комплемент по меньшей мере примерно пяти последовательных нуклеиновых кислот антисмысловой

и/или смысловой кодирующей и/или некодирующей нуклеотидной последовательности полинуклеотида PAR4.

30. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид гибридизуется с и модулирует экспрессию и/или функцию по меньшей мере одного полинуклеотида PAR4 *in vivo* или *in vitro* по сравнению с нормальным контролем.

31. Синтетический модифицированный олигонуклеотид по п.19, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит последовательности, соответствующие SEQ ID NOS: 3-9.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая один или более олигонуклеотидов, специфичных к одному или более полинуклеотидам PAR4, по п.18 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

33. Фармацевтическая композиция по п.32, отличающаяся тем, что указанные олигонуклеотиды имеют по меньшей мере примерно 40% идентичность последовательности по сравнению с любой из нуклеотидных последовательностей, соответствующих SEQ ID NOS: 3-9.

34. Фармацевтическая композиция по п.32, отличающаяся тем, что указанные олигонуклеотиды содержат нуклеотидные последовательности, соответствующие SEQ ID NOS: 3-9.

35. Фармацевтическая композиция по п.34, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды, соответствующие SEQ ID NOS:3-9, содержат одну или более модификаций или замен.

36. Фармацевтическая композиция по п.35, отличающаяся тем, что указанные одна или более модификаций выбраны из: фосфотиоата, метилфосфоната, пептидо-нуклеиновой кислоты, закрытой нуклеиновой кислоты и их комбинаций.

37. Способ предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с по меньшей мере одним полинуклеотидом PAR4 и/или по меньшей мере одним продуктом, который он кодирует, включающий: введение пациенту терапевтически эффективной дозы по меньшей мере одного антисмыслового олигонуклеотида, который связывается с природной антисмысловой последовательностью указанного по меньшей мере одного полинуклеотида PAR4 и модулирует экспрессию указанного по меньшей мере одного полинуклеотида PAR4; что приводит к предотвращению или лечению заболевания, ассоциированного с указанным по меньшей мере одним полинуклеотидом PAR4 и/или по меньшей мере одним кодируемым им продуктом.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что заболевание, ассоциированное с указанным по меньшей мере одним полинуклеотидом PAR4, выбрано из: заболевания или расстройства, связанного с аномальной функцией и/или экспрессией гена PAR4, рака, аберрантного апоптоза, пролиферативного заболевания или расстройства, сердечнососудистого заболевания или расстройства, воспалительного заболевания или расстройства, неврологического заболевания или расстройства и старения.

39. Способ индукции апоптоза в биологической системе, включающий введение олигонуклеотида длиной от 5 до 30 нуклеотидов и по меньшей мере на 50% идентичного от 5 до 30 последовательным нуклеотидам в пределах последовательности, которая представляет собой обратный комплемент природного антисмыслового транскрипта полинуклеотида PAR4, в указанную систему.

40. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанный природный антисмысловый транскрипт имеет последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 2.

41. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанная биологическая система представляет собой клетку или ткань пациента.

42. Способ индукции апоптоза в биологической системе, включающий введение олигонуклеотида длиной примерно от 5 до 30 нуклеотидов в указанную систему, при

этом указанный олигонуклеотид увеличивает транскрипцию гена-мишени за счет своей нацеленности на природный антисмысловой транскрипт гена и при этом указанный олигонуклеотид по меньшей мере на 50% идентичен последовательности, которая представляет собой обратный комплемент природного антисмыслового транскрипта гена, транскрипция которого увеличивается.

43. Способ идентификации и выбора по меньшей мере одного олигонуклеотида, селективного по отношению к природному антисмысловому транскрипту гена PAR4, выбранному в качестве полинуклеотида-мишени, для введения *in vivo*, включающий: идентификацию по меньшей мере одного олигонуклеотида, содержащего по меньшей мере пять последовательных нуклеотидов, которые по меньшей мере частично комплементарны полинуклеотиду, представляющему собой антисмысловую последовательность для выбранного полинуклеотида-мишени; измерение температуры плавления гибрида антисмыслового олигонуклеотида и указанного полинуклеотида-мишени или полинуклеотида, представляющего собой антисмысловую последовательность для указанного выбранного полинуклеотида-мишени, при строгих условиях гибридизации; и выбор по меньшей мере одного олигонуклеотида для введения *in vivo* на основании полученной информации.

A 9 1 8 9 4 1 2 1 0 2 R U

R U 2 0 1 2 1 4 6 8 1 6 A