



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105029** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 48/00

A61P 9/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2011 10646	(72) Винахідник(и): Олсон Ерік (US), Руїдж Єва ван (US)
(22) Дата подання заявки: 04.02.2010	(73) Власник(и): БОРД ОФ РІДЖЕНТС, ДЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ ТЕХАС СІСТЕМ, 201 West 7th Street Austin, TX 78701, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.04.2014	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/149,915	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2008/016924 A2, 07.02.2008 WO 2008/076324 A2, 26.06.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 04.02.2009	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.11.2011, Бюл.№ 22	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2014, Бюл.№ 7	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2010/023234, 04.02.2010	

(54) ПОДВІЙНЕ НАЦІЛЮВАННЯ НА miR-208 І miR-499 У ЛІКУВАННІ ЗАХВОРЮВАНЬ СЕРЦЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування патологічної гіпертрофії серця, серцевої недостатності або інфаркту міокарда у індивідуума, який потребує цього, що включає введення індивідууму першого антисмислового олігонуклеотиду, який містить послідовність, яка щонайменше частково комплементарна зрілій послідовності miR-208a або miR-208b, і другого антисмислового олігонуклеотиду, який містить послідовність, яка щонайменше частково комплементарна зрілій послідовності miR-499, де перший і другий олігонуклеотиди складають від приблизно 8 до приблизно 18 нуклеотидів в довжину, і де експресія або активність miR-208a або miR-208b і miR-499 знижується у клітинах серця індивідуума.

UA 105029 C2

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

По даній заявці заявляється пріоритет попередньої заявки США №61/149915, поданої 4 лютого 2009 року, яка наводиться у даному документі як посилання у повному обсязі.

ДОГОВІР ПРО ПІДТРИМКУ УРЯДУ

Даний винахід створювався за підтримки уряду у вигляді гранту номер HL53351-06, присудженого Національними Інститутами Здоров'я. Уряд має певні права на винахід.

ОПИС ТЕКСТОВОГО ФАЙЛУ, ПРЕДСТАВЛЕНОГО В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ

Зміст текстового файлу, представленого при цьому в електронному вигляді, наводиться у даному документі як посилання у повному обсязі: Копія списку послідовностей у зчитуваному комп'ютером форматі (назва файлу: MIRG_013_01WO_SeqList_ST25.txt, запис даних: 1 лютого 2010 року, розмір файлу: 5 кілобайт).

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ЯКОЇ СТОСУЄТЬСЯ ВИНАХІД

Даний винахід стосується лікування розладів серця і скелетних м'язів шляхом введення агентів, які модулюють активність або експресію мікроРНК (miРНК). Зокрема, винахід стосується способу лікування або профілактики захворювань серця шляхом інгібування експресії або активності як miR-208a/miR-208b, так і miR-499 у клітинах серця індивідуума, включаючи людину. Крім того, винахід стосується способу лікування або профілактики м'язово-скелетних порушень шляхом збільшення експресії або активності як miR-208b, так і miR-499 у клітинах скелетних м'язів індивідуума.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Захворювання серця і його прояви, до яких належать захворювання коронарної артерії, інфаркт міокарда, застійна серцева недостатність і гіпертрофія серця, на сьогоднішній день у Сполучених Штатах безсумнівно представляють найбільший ризик для здоров'я. Витрати на діагностику, лікування і підтримку пацієнтів, які страждають цими захворюваннями, обходяться у білйони доларів. Два особливо тяжкі прояви захворювання серця являють собою інфаркт міокарда і гіпертрофію серця.

Інфаркт міокарда, широко відомий як серцевий напад, викликається раптовою і тривалою недостатністю кровотоку у тканині серця, яка звичайно є результатом звуження або оклюзії коронарної артерії. Під час відсутності адекватного кровопостачання тканина стає ішемічною, що приводить до загибелі кардіоміоцитів (наприклад, клітин серцевого м'яза) і судинних структур. Некротизована внаслідок загибелі кардіоміоцитів тканина, як правило, заміщається рубцевою тканиною, яка не є скорочуваною, втрачає здатність виконувати функцію серця і часто відіграє згубну роль у роботі серця, внаслідок розширення у процесі серцевого скорочення або внаслідок збільшення розміру і ефективного радіуса шлуночка, який, наприклад, стає гіпертрофічним.

Гіпертрофія серця являє собою пристосувальну реакцію серця практично на всі форми захворювання серця, до яких належать форми, що викликаються гіпертензією, механічним навантаженням, інфарктом міокарда, аритміями серця, ендокринними порушеннями і генетичними мутаціями у генах скорочувальних білків серця. Незважаючи на те, що гіпертрофічна реакція початково являє собою компенсаторний механізм, який збільшує серцевий викид, тривала гіпертрофія може приводити до дилатаційної кардіоміопатії (DCM), серцевої недостатності і раптової смерті. У Сполучених Штатах щорічно серцева недостатність діагностується приблизно у півмільйона індивідуумів зі смертністю, що наближається до 50%.

Велика кількість сигнальних шляхів, що особливо включають спотворену передачу сигналу з участю кальцію, приводить до гіпертрофії серця і патологічного ремоделювання (Heineke & Molkentin, 2006). Гіпертрофічне розростання у відповідь на навантаження залучає різні сигнальні шляхи і патерни експресії генів, відмінні від тих, що включаються при фізіологічній гіпертрофії, яка спостерігається у відповідь на фізичне навантаження. Опосередкована навантаженням гіпертрофія міокарда являє собою складне явище, асоційоване з великим числом згубних наслідків, з різними молекулярними і гістологічними характеристиками, що приводить до фіброзу, дилатації і декомпенсації серця, що через стадію дегенерації і загибелі кардіоміоцитів часто завершується серцевою недостатністю. По суті, було сильне бажання розшифрувати молекулярні механізми, що лежать в основі цього, і відкрити нові терапевтичні мішені для придушення згубного розростання серця і в остаточному підсумку недостатності. Розуміння цих механізмів важливо для створення нових способів лікування гіпертрофії серця і серцевої недостатності.

Останнім часом мікроРНК були залучені до великої кількості біологічних процесів, до яких належать серед іншого регуляція строків розвитку, апоптозу, жирового метаболізму і диференціації гематопоетичних клітин. МікроРНК (miРНК) являють собою невеликі РНК, що не кодують білок, від близько 18 до близько 25 нуклеотидів у довжину, які походять з окремих генів

miRNA, з інтронів генів, що кодують білок, або з поліцистронних транскриптів, які часто кодують велике число близькоспоріднених miRNA. Дивися огляд Carrington et al. (Science, Vol. 301(5631):336-338, 2003). MiRNA діють як репресори мРНК-мішеней шляхом посилення їх деградації при повній комплементарності їх послідовностей або шляхом інгібування трансляції, якщо їх послідовності містять невідповідності.

MiRNA транскрибуються за допомогою РНК-полімерази II (pol II) або РНК-полімерази III (pol III; дивися статтю Qi et al. (2006) Cellular & Molecular Immunology, Vol. 3:411-419) і походять з початкових транскриптів, які позначають первинними транскриптами miRNA (pri-miRNA), розмір яких звичайно складає декілька тисяч нуклеотидів. Pri-miRNA процесуються в ядрі за допомогою РНКаз Droscha до попередників, що мають форму шпильки, розміром від близько 70 до близько 100 нуклеотидів (pre-miRNA). Після перенесення у цитоплазму pre-miRNA у вигляді шпильки додатково процесується за допомогою дайсера до одержання дволанцюжкової miRNA. Зрілий ланцюг miRNA потім вбудовується в індукований РНК комплекс сайленсингу (RISC), де він асоціюється зі своїми мРНК-мішенями за рахунок комплементарності пар основ. У відносно рідких випадках, при яких miRNA повністю спарюється з мРНК-мішенню, вона активує деградацію мРНК. Частіше miRNA утворюють недосконалі гетеродуплекси з мРНК-мішенями, які або впливають на стабільність мРНК, або інгібують трансляцію мРНК.

Нещодавно автори винаходу повідомили про специфічну для серця мікроРНК, miR-208a, яка кодується інтроном гена важкого ланцюга α -міозину (МНС) і необхідна для активації експресії β -МНС у відповідь на навантаження на серце і для придушення у серці генів швидких скелетних м'язів (van Rooij et al., (2007) Science, Vol. 316: 575-579). Даний винахід базується на цьому відкритті і пропонує новий терапевтичний підхід у лікуванні розладів серця і порушень скелетних м'язів.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід базується, зокрема, на виявленні того, що систематичне придушення як miR-208a, так і miR-499 у клітинах серця синергічно впливає на розвиток гіпертрофії серця, підвищеної скорочуваності і патологічного ремоделювання серця у відповідь на навантаження. Автори винаходу несподівано виявили, що період часу для регуляції експресії генів стресу, таких як β -МНС, критично падає при придушенні як miR-208a, так і miR-499 шляхом або одночасного, або послідовного введення інгібіторів miR-208a і miR-499. Таке подвійне націлювання впливає на експресію генів стресу у порівнянні з затримкою у декілька місяців, необхідною для спостереження подібних ефектів при придушенні тільки miR-208a. Відповідно, даний винахід стосується нового терапевтичного підходу у лікуванні патологічної гіпертрофії серця, серцевої недостатності та інфаркту міокарда у індивідуума, який потребує цього, включаючи людину.

В одному з варіантів здійснення спосіб містить введення індивідууму інгібітору miR-208a або miR-208b та інгібітору miR-499, причому після введення експресія або активність miR-208a або miR-208b і miR-499 у клітинах серця індивідуума знижується. У деяких варіантах здійснення після введення інгібіторів експресія або активність miR-208a або miR-208b і miR-499 у клітинах серця індивідуума знижується більш ніж на 60 відсотків. До інгібіторів miR-208 і miR-499 належать антагоміри або антисмислові олігонуклеотиди. В одному з варіантів здійснення інгібітори miRNA кодуються на векторі експресії.

В іншому варіанті здійснення після введення інгібітору miR-208a або miR-208b та інгібітору miR-499 у індивідуума знижується відповідь на навантаження на серце. До відповіді на навантаження на серце належить гіпертрофія кардіоміоцитів, фіброз серця, знижена експресія α -МНС і/або підвищена експресія β -МНС у клітинах серця зазначеного індивідуума. У деяких варіантах здійснення зниження відповіді на навантаження на серце спостерігається менш ніж через два місяці після введення інгібіторів miR-208a/miR-208b і miR-499. У переважному варіанті здійснення зниження відповіді на навантаження на серце спостерігається менш ніж через один тиждень після введення інгібіторів.

У деяких варіантах здійснення інгібітор miR-208a/miR-208b та інгібітор miR-499 вводяться послідовно. Введення двох інгібіторів може бути розділене інтервалом, який може складати від хвилин до тижнів. В одному з варіантів здійснення інгібітор miR-208a/miR-208b та інгібітор miR-499 вводяться з інтервалом щонайменше 24 години. В іншому варіанті здійснення інгібітор miR-208a/miR-208b та інгібітор miR-499 вводяться спільно. Кожний з двох інгібіторів може бути введений у дозі від близько 1 мг/кг до близько 200 мг/кг.

Даний винахід також стосується способу лікування або профілактики порушення скелетних м'язів у індивідуума, який потребує цього, що містить введення індивідууму агоніста miR-208 і агоніста miR-499, де після введення у клітинах скелетних м'язів індивідуума експресія або активність miR-208 і miR-499 підвищується. В одному з варіантів здійснення спосіб містить

введення індивідууму агоніста miR-208b і агоніста miR-499. Агоністи miРНК можуть являти собою полінуклеотиди, що кодують зрілі послідовності miR-208a, miR-208b або miR-499. У деяких варіантах здійснення такі полінуклеотиди функціонально зв'язані з послідовністю промотору і доставляються у клітини індивідуума у векторі експресії.

Агоністи miRNA можуть вводитися разом або послідовно, розділені визначеним часовим інтервалом. У деяких варіантах здійснення після введення індивідууму агоністів miR-499 і miR-208a або miR-208b у клітинах скелетних м'язів індивідуума знижується експресія одного або декількох генів швидких скелетних м'язів. До одного або декількох генів швидких скелетних м'язів можуть належати тропонін I2, тропонін T3, легкий ланцюг міозину швидких скелетних м'язів і альфа-актин скелетних м'язів.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1. У тварин з нокаутом miR-208 спостерігаються менш виражена гіпертрофія серця і фіброз у відповідь на звуження грудної аорти. А. Схематична ілюстрація процедури звуження грудної аорти (ТАВ) (зліва). Гістологічні зрізи серця мишей дикого типу і miR-208-/-, забарвлені після процедури ТАВ або процедури імітації трихромом за Массоном (справа). Відсутність miR-208 зменшує гіпертрофію і фіброз, що спостерігаються у мишей дикого типу, підданих ТАВ протягом 21 дня. В. Відносні рівні експресії важкого ланцюга бета-міозину (β -МНС), передсердного натрійуретичного фактора (ANF) і натрійуретичного пептиду мозку (BNP) у серці тварин дикого типу і miR-208-/- після процедури імітації або ТАВ. С. Вестерн-аналіз рівнів білків α -МНС і β -МНС у серці тварин дикого типу і miR-208-/- після процедури імітації або ТАВ. Як контроль навантаження визначали GAPDH.

Фігура 2. Довгочасний нокдаун miR-208 фенотипіє інгібування відповіді на навантаження у тварин з нокаутом miR-208. А. Послідовність синтетичного олігонуклеотиду, націленого на зрілу послідовність miR-208 (SEQ ID NO:16). Послідовність контролю невідповідностей містить чотири невідповідності основ у порівнянні з послідовністю anti-miR-208 (SEQ ID NO:17). В. Аналіз ПЛР у режимі реального часу вказує на ефективний нокдаун miR-208 у серці тварин, оброблених олігонуклеотидом anti-miR-208. С. Відносні рівні експресії важкого ланцюга бета-міозину (β -МНС), передсердного натрійуретичного фактора (ANF) і натрійуретичного пептиду мозку (BNP) у серці тварин, які одержали олігонуклеотид anti-miR-208 (анти 208) або контроль невідповідностей (mm) після процедури імітації або звуження грудної аорти (ТАВ). У той час як у відповідь на ТАВ індукуються маркери стресу ANF і BNP, у тварин, які одержували anti-miR-208, спостерігається знижена індукція експресії β -МНС.

Фігура 3. Myh7b і miR-499 регулюються за допомогою miR-208. Нозерн-блот, що показує експресію miR-499 у серці мишей дикого типу (+/+), гетерозиготних по miR-208 (+/-) і мишей з нокаутом miR-208 (-/-). Існує пряма кореляція між експресією miR-208 і miR-499, а також Myh7b у мишей дикого типу і мутантів. Як контроль вимірювали експресію GAPDH.

Фігура 4. Myh7b і miR-499 експресуються у серцевому і повільних скелетних м'язах. А. Нозерн-аналіз вказує, що miR-499 експресується у серці і повільних скелетних м'язах (наприклад, камбалоподібному м'язі). ЗТ-ПЛР на Myh7b вказує, що miR-499 експресується спільно зі своїм геном-хазяїном. В. Аналіз ПЛР у режимі реального часу на miR-499 на серцевому і чотирьох типах скелетних м'язів (литковому/підшовному (GP), передньому великогомілковому (TA), довгому розгиначі пальців (EDL) і камбалоподібному) підтверджує, що miR-499 експресується переважно у серці і камбалоподібному м'язі. У TA і EDL можуть бути детектовані лише незначні рівні експресії miR-499. С. Гібридизація *in situ* вказує на те, що у процесі ембріогенезу Myh7b експресується специфічно у серці і сомітах.

Фігура 5. MiR-499 не впливає на експресію міозину. А. Аналіз ЗТ-ПЛР Myh7b показує, що генетична делеція miR-499 не впливає на експресію її гена-хазяїна Myh7b. GP-литковий/підшовний м'яз; TA-передній великогомілковий м'яз; EDL-довгий розгинач пальців. Як контроль вимірювали експресію GAPDH. В. Аналіз вестерн-блот сердець тварин дикого типу (WT), гетерозиготних (+/-) і з нокаутом (KO) miR-499 як на α -, так і β -МНС показує, що делеція miR-499 не впливає на експресію того і іншого гена на рівні білка. С. Пропілітіоурацил (PTU), який блокує біогенез тиреоїдних гормонів і є сильним індуктором β -МНС, продукує зниження α -МНС і підвищення β -МНС як у тварин дикого типу (WT), так і з нокаутом (KO) miR-499.

Фігура 6. Регуляція miR-499 за допомогою *in vivo* нокдауну miR-208. А. Нозерн-аналіз експресії miR-208 і miR-499 через три дні після ін'єкції у хвостову вену зазначеної кількості олігонуклеотиду anti-miR-208 або фізіологічного розчину (Sal). В. Нозерн-аналіз експресії miR-208 і miR-499 у тканині серця тварин, яким ввели або одну дозу 80 мг/кг anti-miR-208, 2 дози по 80 мг/кг anti-miR-208 за два послідовні дні, або помилковий контрольний олігонуклеотид (mm), через два місяці після обробки. С. Аналіз ПЛР у режимі реального часу експресії miR-208, miR-499, miR-208b, α -МНС, Myh7b і β -МНС у тканині серця через два місяці після обробки

однократною дозою anti-miR-208, двома дозами anti-miR-208 за два послідовні дні або двома дозами олігонуклеотиду з невідповідностями за два послідовні дні. D. Аналіз вестерн-блот експресії β -МНС у тканині серця через два місяці після обробки anti-miR-208 (однократною дозою 80 мг/кг або двома послідовними дозами 80 мг/кг) або обробки контролем з невідповідностями (mm).

Фігура 7. Подвійне націлювання на miR-208 і miR-499. A. Нозерн-аналіз miR-208, miR-208b і miR-499 у тканині серця тварин дикого типу і з нокаутом miR-499 вказує на сильну індукцію miR-208b у відповідь на PTU. MiR-208b експресується разом з β -МНС і вказує на її експресію. У тварин з нокаутом miR-499 індукція miR-208b порівнянна з індукцією у тварин дикого типу. Проте, нокдаун miR-208 у тварин з нокаутом miR-499 супресує індукцію експресії miR-208b за допомогою PTU. B. Аналіз ПЛР у режимі реального часу miR-208, α -МНС і β -МНС у тканині серця тварин дикого типу, тварин з нокаутом miR-208, тварин з нокаутом miR-499 і тварин з нокаутом miR-499, оброблених за допомогою anti-miR-208 при наявності і за відсутності PTU.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Серцевий і скелетні м'язи відповідають на велику кількість патофізіологічних стимулів, таких як навантаження, передача сигналу тиреоїдних гормонів і ушкодження, шляхом модуляції експресії ізоформ міозину, які регулюють ефективність скорочення.

Співвідношення ізоформ α - і β -МНС у серці дорослого індивідуума являє собою визначальний фактор скорочуваності серця. У β -МНС, основної ізоформи міозину у серці дорослого індивідуума, спостерігається відносно низька активність АТФази, тоді як α -МНС має високу активність АТФази. У відповідь на велику кількість патологічних стимулів, таких як інфаркт міокарда, гіпертензія та інші розлади, експресія β -МНС зростає, тоді як експресія α -МНС падає з подальшим зниженням активності АТФази міофібрил і зниженою швидкістю скорочення м'язових волокон серця, що приводить в остаточному підсумку до порушення скорочувальної функції. Дивно, що невеликі зміни у вмісті α -МНС у серці можуть значно впливати на функцію серця.

Нещодавно автори винаходу повідомили про специфічну для серця miRNA miR-208a, яка кодується інтроном гена важкого ланцюга α -міозину і необхідна для активації експресії β -МНС у відповідь на навантаження на серце і для репресії генів швидких скелетних м'язів у серці (дивися заявку, що одночасно знаходиться на розгляді, WO 2008/016924, яка наводиться у даному документі як посилання у повному обсязі).

Автори винаходу нещодавно також виявили, що miR-208a також необхідна для експресії у серці близькоспорідненої miRNA miR-499, яка кодується інтроном гена Myn7b (дивися заявку, що одночасно знаходиться на розгляді, PCT/US08/71837, яка наводиться у даному документі як посилання у повному обсязі). Експресія Myn7b і miR-499 у серці, а також у повільних скелетних м'язах контролюється фактором транскрипції MEF2, сигнал-залежним регулятором експресії генів поперечно-смугастих м'язів. Посиленої експресії miR-499 або miR-208 досить, щоб опосередковувати перетворення міофібрил зі швидких у повільні *in vivo*. MiR-208 і miR-499 можуть негативно регулювати експресію Thrap1, корегулятора рецептора тиреоїдних гормонів, і членів сімейства PUR факторів транскрипції, які у свою чергу негативно регулюють експресію β -МНС у серцевому і скелетних м'язах. Sox6 діє як репресор типоспецифічних генів повільних волокон. Нокдаун експресії Sox6 у м'язових трубках дикого типу приводить до істотного підвищення експресії β -МНС. Аналіз промотору β -МНС виявив консенсусну послідовність Sox, що вказує на те, що Sox6 має вирішальне значення у диференціації типу волокон фетальної скелетної мускулатури і регуляції β -МНС у серці. Ці результати досліджень розкривають типовий механізм регуляції, в якому гени Myn регулюють патерни експресії генів поперечно-смугастих м'язів, кодуючи регуляторні miRNA, які визначають скорочуваність і здатність відповідати на сигнал (van Rooij et al. (2009) Developmental Cell, Vol. 17: 662-673).

Даний винахід базується зокрема на виявленні того, що придушення і miR-208, і miR-499 у клітинах серця створює синергістичний ефект у супресії відповіді на навантаження на серце. Інгібування експресії miR-208a у клітинах серця приводить до зниження індукованої навантаженням експресії β -МНС. Проте, цей ефект не проявляється до двох місяців після введення інгібітору miR-208. Автори винаходу несподівано виявили, що інгібування і miR-208a, і miR-499 приводить до супресії експресії β -МНС, індукованої навантаженням, майже відразу ж після введення, таким чином, прискорюючи ефект при відповіді на навантаження на серце. Відповідно, у світлі цих результатів досліджень описуються стратегії впливу на експресію генів скелетних і серцевого м'язів шляхом модуляції експресії miR-208a і miR-499 або одночасно, або послідовно для лікування і профілактики захворювань серця.

MiR-208a локалізована в інтроні гена α -МНС. Точне розташування інтрона залежить від конкретного виду і конкретного транскрипту. Наприклад, у людей miR-208a кодується у 28^{ому}

інтроні гена α -МНС, тоді як у мишей вона кодується у 29^{ому} інтроні. Кодуючі pre-miRNA послідовності miR-208a людини, миші, щура і собаки представлені нижче у вигляді SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:4, відповідно. Послідовність зрілої miR-208a представлена у SEQ ID NO:5. Подібно до α -МНС, miR-208a експресується винятково у серці.

5 Pre-miR-208a людини (SEQ ID NO:1)
ACGGGCGAGC TTTTGGCCCCG GGTATACCT GATGCTCACG TATAAGACGA GCAAAAAGCT
TGTTGGTCAG A

Pre-miR-208a миші (SEQ ID NO:2)
ACGGGTGAGC TTTTGGCCCCG GGTATACCT GACTCTCACG TATAAGACGA GCAAAAAGCT
10 TGTTGGTCAG A

Pre-miR-208a щура (SEQ ID NO:3)
ACGGGTGAGC TTTTGGCCCCG GGTATACCT GACTCTCACG TATAAGACGA GCAAAAAGCT
TGTTGGTCAG A

Pre-miR-208a собаки (SEQ ID NO:4)
15 ACGCATGAGC TTTTGGCTCG GGTATACCT GATGCTCACG TATAAGACGA GCAAAAAGCT
TGTTGGTCAG A

Зріла miR-208a (SEQ ID NO:5)
AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU

20 Аналіз геномної локалізації гена miR-499 показав, що він повинен міститися у 20^{ому} інтроні гена Myn7b, гомолога гена α -МНС. Кодуючі pre-miRNA послідовності miR-499 миші, щура, людини, собаки, опосума, курки і *X. tropicalis* представлені у SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:12, відповідно. SEQ ID NO:13 являє собою структуру стебло-петля послідовності попередника миші, і SEQ ID NO:14 являє собою послідовність зрілої miR-499. Ген Myn7b консервативний у хребетних і експресується
25 лише у серці і повільних скелетних м'язах (наприклад, камбалоподібному м'язі).

Pre-miR-499 миші (SEQ ID NO:6)
TCCCTGTGTC TTGGGTGGGC AGCTGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAGCT CCTCTGCATG
TGAACATCAC AGCAAG

Pre-miR-499 щура (SEQ ID NO:7)
30 TCCCTGTCTT GGGTGGGCAG CTGTTAAGAC TTGCAGTGAT GTTTAGCTCC TCTCCATGTG
AACATCACAG CAAG

Pre-miR-499 людини (SEQ ID NO:8)
CCCCTGTGCC TTGGGCGGGC GGCTGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAACT CCTCTCCACG
TGAACATCAC AGCAAG

35 Pre-miR-499 собаки (SEQ ID NO:9)
CCCTTGACCC CTGGGCGGGC GGCCGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAACT CCTCTCCACG
TGAACATCAC AGCAAG

Pre-miR-499 опосума (SEQ ID NO:10)
CCCCTGCCTC CCCGGGCGGGC AGCTGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAACT CTTCTCTATG
40 TGAACATCAC AACAAG

Pre-miR-499 курки (SEQ ID NO:11)
GGAGCGGCAG TTAAGACTTG TAGTGATGTT TAGATAATGT ATTACATGGA CATCACTTTA
AG

Pre-miR-499 *X. tropicalis* (SEQ ID NO:12)
45 GTCTTAGCGA GGCAGTTAAG ACTTGCAGTG ATGTTTAGTT AAAATCTTTT CATGAACATC
ACTTTAAG

Структура стебло-петля миші послідовності pre-miR-499 (SEQ ID NO:13)
GGGUGGGCAG CUGUUAAGAC UUGCAGUGAU GUUUAGCUCC UCUGCAUGUG
AACAUCACAG CAAGUCUGUG CUGCUGCCU

50 Зріла miR-499 (SEQ ID NO:14)
UUAAGACUUG CAGUGAUGUU U

Автори винаходу також виявили, що геном містить другу версію miR-208a, яку позначають miR-208b, що локалізована у гені β -МНС в інтроні 31 і, подібно до β -МНС, miRNA-208b експресується лише у серці і повільних скелетних м'язах (наприклад, камбалоподібному м'язі).
55 До генів, що регулюються за допомогою miR-208b, належать, наприклад, Sp3, міостатин, PURбета, THRAP1 і гени білків швидких скелетних м'язів. Послідовність цієї miRNA у значній мірі перекривається з miR-208a з гомологією 100% у «затравковій області», області, яка визначає мРНК-мішені визначеної miRNA. Таким чином, miR-208b може істотно впливати на скорочуваність серцевого і скелетних м'язів у людей. Послідовність pre-miR-208b консервативна
60 між деякими видами ссавців (наприклад, людиною, мишею, щуром і собакою). Нижче

представлена послідовність pre-miR-208b, а також послідовність зрілої miR-208b:

pre-miR-208b (SEQ ID NO:18)

TTTCTGATCC GAATATAAGA CGAACAAAAG GTTTGTCTGA GGG

Зріла miR-208b (SEQ ID NO:19)

5 AUAAGACGAA CAAAAGGUUU GU

Зрозуміло, що при використанні послідовностей РНК, описаних у даному документі, у варіантах здійснення, де потрібні дезоксирибонуклеотиди, тимідиновий залишок заміщається на уридиновий залишок. Аналогічно, у варіантах здійснення, де необхідні рибонуклеотиди, у послідовностях ДНК, описаних у даному документі, уридиновий залишок заміщається на тимідиновий залишок.

В одному з варіантів здійснення даний винахід стосується способу лікування патологічної гіпертрофії серця, інфаркту міокарда або серцевої недостатності у індивідуума, який потребує цього, включаючи людину, шляхом націлювання експресії і/або активності однієї з двох або обох miR-208 (наприклад, miR-208a і/або miR-208b або іншими словами miR-208a/miR-208b) і miR-499 у клітинах серця індивідуума. У деяких варіантах здійснення для зниження експресії або активності miR-208a/miR-208b і miR-499 у клітинах серця індивідуума індивідууму вводять інгібітор miR-208a/miR-208b та інгібітор miR-499.

В іншому варіанті здійснення індивідуум, який потребує цього, може мати ризик розвитку патологічної гіпертрофії серця, серцевої недостатності або інфаркту міокарда. У такого індивідуума можуть спостерігатися один або декілька факторів ризику, до яких належать, але ними не обмежуючись, тривала стійка неконтрольована гіпертензія, захворювання клапанів, що не коригується, хронічна стенокардія, нещодавно перенесений інфаркт міокарда, спадкова схильність до захворювання серця або патологічної гіпертрофії. У індивідуума, який знаходиться у групі ризику, може бути встановлена генетична схильність до гіпертрофії серця або він може мати сімейний анамнез гіпертрофії серця.

Переважно, щоб введення індивідууму як інгібітору miR-208a/miR-208b, так і інгібітору miR-499 приводило до пом'якшення у індивідуума одного або декількох симптомів гіпертрофії серця, серцевої недостатності або інфаркту міокарда або до затримки перетворення гіпертрофії серця у серцеву недостатність. Одним або декількома поліпшеними симптомами можуть бути, наприклад, збільшена здатність до фізичного навантаження, збільшений об'єм серцевого викиду, знижений кінцевий діастолічний тиск лівого шлуночка, знижений заклинюючий тиск легеневих капілярів, збільшений серцевий викид, збільшений серцевий індекс, знижений тиск у легеневих артеріях, знижені кінцеві систолічний і діастолічний об'єми лівого шлуночка, зменшений фіброз серця, зменшене відкладення колагену у серцевому м'язі, знижене навантаження на стінку лівого і правого шлуночків, знижене напруження стінки, поліпшена якість життя і знижені показники захворюваності або смертності внаслідок захворювання.

В одному з варіантів здійснення винаходу у індивідуума після введення інгібіторів miR-208 (наприклад, miR-208a і/або miR-208b) і miR-499 знижується відповідь на навантаження на серце. До відповіді на навантаження на серце належать серед іншого гіпертрофія кардіоміоцитів, фіброз серця, знижена експресія α -МНС у клітинах серця і/або підвищена експресія β -МНС у клітинах серця. Введення індивідууму як інгібітору miR-208a/miR-208b, так і інгібітору miR-499 приводить до прискореного ефекту при відповіді на навантаження на серце у порівнянні з введенням якого-небудь одного інгібітору. Наприклад, зменшення відповіді на навантаження на серце відбувається менш ніж через вісім тижнів, менш ніж через шість тижнів, менш ніж через чотири тижні, менш ніж через три тижні, менш ніж через два тижні, менш ніж через один тиждень, менш ніж через п'ять днів, менш ніж через три дні або менш ніж через один день після введення інгібіторів. В іншому варіанті здійснення зменшення відповіді на навантаження на серце відбувається менш ніж через дванадцять годин після введення інгібіторів.

У деяких варіантах здійснення інгібітори miR-208 (наприклад, miR-208a і/або miR-208b) і miR-499 можуть являти собою антисмислові олігонуклеотиди, націлені на послідовності зрілої miR-499 і/або miR-208a, або miR-208b. Антисмислові олігонуклеотиди можуть являти собою рибонуклеотиди або дезоксирибонуклеотиди. Переважно, щоб антисмислові олігонуклеотиди мали щонайменше одну хімічну модифікацію. Наприклад, придатні антисмислові олігонуклеотиди можуть містити одну або декілька «конформаційно змушених» або біциклічних модифікацій цукру нуклеозиду, наприклад, «замкнуті нуклеїнові кислоти». «Замкнуті нуклеїнові кислоти» (LNA) являють собою модифіковані рибонуклеотиди, які містять зовнішній місток між 2' і 4' вуглецьми фрагмента цукру рибози, одержуючи «замкнуту» конформацію, яка надає олігонуклеотидам, що містять LNA, підвищену температурну стабільність. Антисмислові олігонуклеотиди, націлені на miR-208a/miR-208b і miR-499, можуть містити комбінації LNA або інакше модифікованих нуклеотидів і рибонуклеотидів або дезоксирибонуклеотидів.

Альтернативно, антисмислові олігонуклеотиди можуть містити пептидні нуклеїнові кислоти (PNA), які замість цукро-фосфатного кістяка містять пептидний кістяк. До інших хімічних модифікацій, які можуть містити антисмислові олігонуклеотиди, належать, але ними не обмежуючись, модифікації цукру, такі як модифікації 2'-О-алкіл (наприклад, 2'-О-метил, 2'-О-метоксіетил), 2'-фтор і 4'-тіо, і модифікації кістяка, такі як один або декілька фосфоротіоатних, морфоліно або фосфонокарбоксилатних зв'язків (дивися, наприклад, патенти США 6693187 і 7067641, які наводяться у даному документі як посилання у повному обсязі). Наприклад, антисмислові олігонуклеотиди, зокрема більш короткі, (наприклад, менш ніж 15 нуклеотидів) можуть містити одну або декілька модифікацій, що посилюють спорідненість, таких як, але ними не обмежуючись, LNA, біциклічні нуклеозиди, фосфоноформати, 2'-О-алкіл і подібне. У деяких варіантах здійснення придатні антисмислові олігонуклеотиди являють собою 2'-О-метоксіетильні «олігомери з пропусками», які містять 2'-О-метоксіетил-модифіковані рибонуклеотиди як на 5', так і на 3'-кінцях щонайменше з десятима дезоксирибонуклеотидами у центрі. Ці «олігомери з пропусками» здатні запускати РНКазу Н-залежні механізми деградації РНК-мішеней. У даній галузі відомі і придатні для застосування у способах за винаходом й інші модифікації антисмислових олігонуклеотидів для посилення стабільності і підвищення ефективності, такі як описані у патенті США 6838283, який наводиться у даному документі як посилання у повному обсязі. Переважні антисмислові олігонуклеотиди, використовувані для інгібування активності miRNA, мають від близько 5 до близько 50 нуклеотидів у довжину, від близько 10 до близько 30 нуклеотидів у довжину або від близько 20 до близько 25 нуклеотидів у довжину. У деяких варіантах здійснення антисмислові олігонуклеотиди, націлені на miR-208a/miR-208b і miR-499, складають від близько 8 до близько 18 нуклеотидів у довжину і в інших варіантах - від близько 12 до близько 16 нуклеотидів у довжину. Зокрема, може бути використаний будь-який 8-мер або більш довгий олігонуклеотид, який комплементарний miR-208a або miR-208b, тобто будь-яка послідовність anti-miR, яка комплементарна будь-якій безперервній послідовності у miR-208a або miR-208b, починаючи з 5'-кінця miR до 3'-кінця зрілої послідовності. Антисмислові олігонуклеотиди у деяких випадках можуть містити послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності зрілої miRNA, наприклад, щонайменше на близько 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% комплементарна послідовності зрілої miRNA. У деяких варіантах здійснення антисмисловий олігонуклеотид може бути по суті комплементарний послідовності зрілої miRNA, тобто щонайменше на близько 95%, 96%, 97%, 98% або 99% комплементарний послідовності полінуклеотиду-мішені. В одному з варіантів здійснення антисмисловий олігонуклеотид містить послідовність, яка на 100% комплементарна послідовності зрілої miRNA.

В інших варіантах здійснення антисмислові олігонуклеотиди є антагомірами. «Антагоміри» являють собою одноланцюжкові хімічно модифіковані рибонуклеотиди, які щонайменше частково комплементарні послідовності miRNA. Антагоміри можуть містити один або декілька модифікованих нуклеотидів, таких як нуклеотиди з модифікаціями цукру 2'-О-метил. У деяких варіантах здійснення антагоміри містять лише модифіковані нуклеотиди. Антагоміри також можуть містити один або декілька фосфоротіоатних зв'язків, що приводить до одержання частково або повністю фосфоротіоатного кістяка. Для сприяння *in vivo* доставці і стабільності антагомір може бути зв'язаний на своєму 3'-кінці зі стероїдом, таким як холестерин, жирна кислота, вітамін, вуглевод, пептид або інший низькомолекулярний ліганд. Антагоміри, придатні для інгібування miRNA, можуть мати від близько 15 до близько 50 нуклеотидів у довжину, більш переважно, від близько 18 до близько 30 нуклеотидів у довжину і, найбільш переважно, від близько 20 до близько 25 нуклеотидів у довжину. Під «частково комплементарною» розуміють послідовність, яка щонайменше на близько 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% комплементарна послідовності полінуклеотиду-мішені. Антагоміри можуть бути щонайменше на близько 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% комплементарні послідовності зрілої miRNA. У деяких варіантах здійснення антагомір може бути по суті комплементарний послідовності зрілої miRNA, тобто щонайменше на близько 95%, 96%, 97%, 98% або 99% комплементарний послідовності полінуклеотиду-мішені. В інших варіантах здійснення антагоміри на 100% комплементарні послідовності зрілої miRNA.

У деяких варіантах здійснення інгібітори miR-499 і miR-208a/miR-208b являють собою антагоміри, що містять послідовність, яка повністю комплементарна послідовності зрілої miR-499 і зрілої miR-208a або miR-208b. В одному з варіантів здійснення інгібітор miR-499 являє собою антагомір, що має послідовність, яка частково або повністю комплементарна 5'-UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU-3' (SEQ ID NO:14). В іншому варіанті здійснення інгібітор miR-208a являє собою антагомір, що має послідовність, яка частково або повністю комплементарна 5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3' (SEQ ID NO:5). В іншому варіанті здійснення інгібітор

miR-208a являє собою антагомір, що має послідовність 5'-ACAAGCUUUUUGCUCGUCUUAU-3' (SEQ ID NO:15). У ще одному варіанті здійснення інгібітор miR-208a являє собою антагомір, що має послідовність SEQ ID NO:16. В іншому варіанті здійснення інгібітор miR-208b являє собою антагомір, що має послідовність, яка частково або повністю комплементарна 5'-AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU-3' (SEQ ID NO:19).

У деяких варіантах здійснення інгібітори miR-499 і miR-208a або miR-208b являють собою хімічно модифіковані антисмислові олігонуклеотиди. В одному з варіантів здійснення інгібітор miR-499 являє собою хімічно модифікований антисмисловий олігонуклеотид, що містить послідовність, по суті комплементарну 5'-UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU-3' (SEQ ID NO:14). В іншому варіанті здійснення інгібітор miR-208a являє собою хімічно модифікований антисмисловий олігонуклеотид, що містить послідовність, по суті комплементарну 5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3' (SEQ ID NO:5). У ще одному варіанті здійснення інгібітор miR-208b являє собою хімічно модифікований антисмисловий олігонуклеотид, що містить послідовність, по суті комплементарну 5'-AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU-3' (SEQ ID NO:19). Під використовуваним у даному документі виразом «по суті комплементарна» розуміють послідовність, яка щонайменше на близько 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100% комплементарна послідовності полінуклеотиду-мішені (наприклад, послідовності зрілої miRNA або miRNA-попередника).

Антисмислові олігонуклеотиди можуть містити послідовність, яка по суті комплементарна послідовності miRNA-попередника (pre-miRNA) для miR-499 або miR-208a/miR-208b. У деяких варіантах здійснення антисмисловий олігонуклеотид містить послідовність, яка по суті комплементарна послідовності, локалізованій поза областю стебло-петля послідовності pre-miR-499 або pre-miR-208a/miR-208b. В одному з варіантів здійснення інгібітор функції miR-499 являє собою антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність, яка по суті комплементарна послідовності pre-miR-499, вибраній з групи, що складається з SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:12. В іншому варіанті здійснення інгібітор функції miR-208a являє собою антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність, яка по суті комплементарна послідовності pre-miR-208a, вибраній з групи, що складається з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:4. У ще одному варіанті здійснення інгібітор функції miR-208b являє собою антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність, яка по суті комплементарна послідовності pre-miR-208b SEQ ID NO:18.

В іншому варіанті здійснення винаходу для інгібування одночасно і miR-208, і miR-499 може бути використана одна молекула нуклеїнової кислоти. Наприклад, одна нуклеїнова кислота може містити послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності зрілої miR-208a (наприклад, SEQ ID NO:5), і послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності зрілої miR-499 (наприклад, SEQ ID NO:14). В іншому варіанті здійснення одна нуклеїнова кислота може містити послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності зрілої miR-208b (наприклад, SEQ ID NO:19), і послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності зрілої miR-499 (наприклад, SEQ ID NO:14). У ще одному варіанті здійснення одна молекула нуклеїнової кислоти може містити послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності pre-miR-208a (наприклад, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:4), і послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності pre-miR-499 (наприклад, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:12). В іншому варіанті здійснення одна молекула нуклеїнової кислоти може містити послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності pre-miR-208b (наприклад, SEQ ID NO:18), і послідовність, яка щонайменше частково комплементарна послідовності pre-miR-499 (наприклад, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:12). Одна молекула нуклеїнової кислоти додатково може містити один або декілька спейсерних нуклеотидів між послідовностями, що націлюють miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) і miR-499. Наприклад, одна молекула нуклеїнової кислоти може містити від близько 1 до близько 200 спейсерних нуклеотидів, більш переважно, від близько 5 до близько 100 спейсерних нуклеотидів, найбільш переважно, від близько 10 до близько 50 спейсерних нуклеотидів між послідовностями, що націлюють miR-208a/miR-208b і miR-499.

Будь-який з інгібіторів miR-208a/miR-208b і miR-499, описаних у даному документі, може бути доставлений до клітини-мішені (наприклад, клітини серця, клітини скелетного м'яза) за допомогою доставки до клітини вектора експресії, що кодує інгібітори miR-208a/miR-208b і miR-499. Інгібітор miR-208a/miR-208b та інгібітор miR-499 можуть кодуватися тим самим вектором експресії. Альтернативно, інгібітор miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) та інгібітор miR-499 кодуються на окремих векторах експресії. «Вектор» являє собою композицію, яка може бути

використана для доставки цікавлячої нуклеїнової кислоти у внутрішній простір клітини. У даній галузі відома велика кількість векторів, до яких належать, але ними не обмежуючись, лінійні полінуклеотиди, полінуклеотиди, асоційовані з іонною і амфіфільною сполуками, плазмідні віруси. Таким чином, термін «вектор» включає таку, що самостійно реплікується, плазмідну або вірус. До прикладів вірусних векторів належать, але ними не обмежуючись, аденовірусні вектори, аденоасоційовані вірусні вектори, ретровірусні вектори і подібні. Експресуюча конструкція може бути реплікована у живій клітині або вона може бути створена синтетичним шляхом. У даній заявці терміни «експресуюча конструкція», «вектор експресії» і «вектор» використовуються взаємозамінно для демонстрації застосування винаходу у загальному, ілюстративному, значенні і не призначені для обмеження винаходу.

В одному з варіантів здійснення вектор експресії для експресії інгібітору miR-208a/miR-208b і/або miR-499 містить промотор, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, що кодує антисмисловий олігонуклеотид, де послідовність антисмислового олігонуклеотиду, який експресують, частково або повністю комплементарна зрілій послідовності miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) і/або miR-499. Під фразою «функціонально зв'язаний» або «під транскрипційним контролем», використовуюваною у даному документі, розуміють, що промотор знаходиться у правильному місці і орієнтації відносно полінуклеотиду, щоб контролювати ініціацію транскрипції за допомогою РНК-полімерази і експресії полінуклеотиду. В іншому варіанті здійснення вектор експресії може кодувати одну нуклеїнову кислоту, яка націлює обидві miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) і miR-499, як описано у даному документі, де одна нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з промотором. В іншому варіанті здійснення один вектор експресії може кодувати інгібітор miR-208a/miR-208b та інгібітор miR-499, де інгібітор miR-208a/miR-208b запускається промотором, відмінним від промотору інгібітору miR-499.

Під використовуваним у даному документі «промотором» розуміють послідовність ДНК, розпізнавану синтетичним апаратом клітини або вбудованим синтетичним апаратом, необхідну для ініціації специфічної транскрипції гена. До придатних промоторів належать, але ними не обмежуючись, промотори РНК-pol I, pol II, pol III і вірусні промотори (наприклад, промотор ранніх генів цитомегаловірусу (CMV) людини, ранній промотор SV40 і довгий термінальний повтор вірусу саркоми Рауса). В одному з варіантів здійснення промотор являє собою тканино-специфічний промотор. Особливий інтерес представляють специфічні для м'язів промотори і, більш конкретно, специфічні для серця промотори. До них належать промотор легкого ланцюга-2 міозину (Franz et al. (1994) *Cardioscience*, Vol. 5(4): 235-43; Kelly et al. (1995) *J. Cell Biol.*, Vol.129(2): 383-396), промотор альфа-актину (Moss et al. (1996) *Biol. Chem.*, Vol. 271(49):31688-31694), промотор тропоніну 1 (Bhavsar et al. (1996) *Genomics*, Vol. 35(1):11-23); промотор обмінника Na⁺/Ca²⁺ (Barnes et al. (1997) *J. Biol. Chem.*, Vol. 272(17):11510-11517), промотор дистрофіну (Kimura et al. (1997) *Dev. Growth Differ.*, Vol. 39(3):257-265), промотор альфа7 інтегрину (Ziober and Kramer (1996) *J. Bio. Chem.*, Vol. 271(37):22915-22), промотор натрійуретичного пептиду мозку (LaPointe et al. (1996) *Hypertension*, Vol. 27(3 Pt 2):715-22) і промотор альфа В-кристаліну/малого білка теплового шоку (Gopal-Srivastava (1995) *J. Mol. Cell. Biol.*, Vol. 15(12):7081-7090), промотор важкого ланцюга альфа-міозину (Yamauchi-Takahara et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 86(10):3504-3508) і промотор ANF (LaPointe et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, Vol. 263(19):9075-9078).

У деяких варіантах здійснення промотор, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, що кодує інгібітор miR-499 і/або miR-208a/miR-208b, може являти собою індукцйбельний промотор. Індукцйбельні промотори відомі у даній галузі і до них належать, але ними не обмежуючись, промотор тетрацикліну, промотор металотіонеїну IIA, промотор теплового шоку, елементи, що відповідають на стероїд/тиреоїдний гормон/ретиноеву кислоту, аденовірусний пізній промотор та індукцйбельний вірус пухлини молочних залоз мишей LTR. Вектор експресії може кодувати одну нуклеїнову кислоту, яка націлює як miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b), так і miR-499, як описано у даному документі, де одна нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з індукцйбельним промотором. Альтернативно, один вектор експресії може кодувати інгібітор miR-208a/miR-208b та інгібітор miR-499, де інгібітор miR-208a/miR-208b запускається першим індукцйбельним промотором та інгібітор miR-499 запускається другим індукцйбельним промотором. В іншому варіанті здійснення перший вектор експресії може кодувати інгібітор miR-208a/miR-208b, де інгібітор miR-208a/miR-208b функціонально зв'язаний з першим індукцйбельним промотором, і другий вектор експресії може кодувати інгібітор miR-499, де інгібітор miR-499 функціонально зв'язаний з другим індукцйбельним промотором. Також розглядаються й інші комбінації індукцйбельних і конститутивних промоторів для контролю експресії інгібіторів miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) і miR-499. Наприклад, інгібітор miR-208a/miR-208b може бути експресований з вектора, що використовує конститутивний

промотор, тоді як інгібітор miR-499 може бути експресований з вектора, що використовує індукційний промотор.

Даний винахід також стосується способів видалення або очищення від інгібіторів miR-499 і miR-208a/miR-208b після лікування. Спосіб може містити надекспресію сайтів зв'язування інгібіторів miR-499 і miR-208a/miR-208b у тканині серця. В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу видалення або очищення miR-499 і miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) після лікування. В одному з варіантів здійснення спосіб містить надекспресію областей сайтів зв'язування miR-499 і miR-208a/miR-208b у скелетній мускулатурі, використовуючи промотор, специфічний для скелетної мускулатури і серцевого м'яза (м'язової креатинкінази (МCK)). Области сайтів зв'язування переважно містять послідовність затравкової області miR-499 і miR-208a або miR-208b. Затравкова область являє собою 5' ділянку miRNA, що охоплює нуклеотиди 2-8, яка важлива для розпізнавання мішені. У деяких варіантах здійснення сайт зв'язування може містити послідовність з 3' UTR однієї або декількох мішеней miR-499 або miR-208, таких як THRAP1 або PURβ. В іншому варіанті здійснення для ослаблення або припинення дії miRNA після miR-499 і miR-208 може бути введений інгібітор miR-499 і miR-208.

В іншому варіанті здійснення винаходу інгібітор miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) та інгібітор miR-499 вводяться спільно. Інгібітор miR-208 і miR-208 можуть бути введені в одній препаративній формі. Наприклад, для спільного введення двох інгібіторів може бути використана фармацевтична композиція, що містить інгібітор miR-208 та інгібітор miR-499. Альтернативно, інгібітори miR-208 і miR-499 можуть кодуватися однією нуклеїновою кислотою, такою як вектор експресії, описаний у даному документі. Велика кількість спільних введень двох інгібіторів може бути здійснена протягом тривалого періоду часу, наприклад, одного тижня, двох тижнів, трьох тижнів, одного місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців, дев'яти місяців, одного року, двох років, трьох років, чотирьох років або п'яти років.

У деяких варіантах здійснення інгібітор miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) та інгібітор miR-499 вводяться послідовно. В одному з варіантів здійснення інгібітор miR-208 вводиться перед інгібітором miR-499. В іншому варіанті здійснення інгібітор miR-499 вводиться перед інгібітором miR-208. Інтервал, що відокремлює введення інгібіторів miR-208 і miR-499, може знаходитися у діапазоні від декількох хвилин до декількох днів. Наприклад, інтервал може складати від однієї години до близько 72 годин, від 6 годин до близько 48 годин або від близько 12 годин до близько 24 годин. У переважному варіанті здійснення інтервал між введенням інгібітору miR-208 та інгібітору miR-499 складає щонайменше 24 години. Автори винаходу виявили, що введення інгібітору miR-499 щонайменше за близько 24 години до інгібітору miR-208 приводить щонайменше до близько 50% зниження індукованої навантаженням експресії β-МНС через близько три дні після введення інгібітору miR-208. За відсутності інгібітору miR-499 порівнянний вплив на індуковану навантаженням експресію β-МНС не спостерігається щонайменше до близько двох місяців після введення інгібітору miR-208.

В інших варіантах здійснення винаходу для одержання тривалого ефекту може бути використане більш ніж одне послідовне введення інгібіторів miR-208 і miR-499. При цьому може бути використана велика кількість комбінацій. Як ілюстрація, якщо інгібітор miR-499 - це «А», а інгібітор miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) - це «В», то як приклад наводяться наступні перестановки на основі 3 і 4 сумарних введень:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A
A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B
Також розглядаються й інші комбінації.

Переважно, щоб після введення індивідууму інгібітору miR-208 та інгібітору miR-499 експресія або активність miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) і miR-499 у клітинах серця індивідуума знижувалася. У деяких варіантах здійснення після введення інгібітору miR-208 і miR-499 експресія або активність miR-208a/miR-208b і/або miR-499 знижується більш ніж на 50%, більш ніж на 60%, більш ніж на 70%, більш ніж на 75%, більш ніж на 80%, більш ніж на 85%, більш ніж на 90% або більш ніж на 95%. В одному з варіантів здійснення після введення інгібіторів експресія або активність miR-208a/miR-208b і miR-499 у клітинах серця індивідуума знижується більш ніж на 60 відсотків. В іншому варіанті здійснення після введення інгібіторів експресія або активність miR-208a/miR-208b і miR-499 у клітинах серця індивідуума знижується більш ніж на 80 відсотків. У ще одному варіанті здійснення після введення інгібіторів експресія або активність miR-208a/miR-208b і miR-499 у клітинах серця індивідуума знижується більш ніж на 90 відсотків.

Даний винахід також стосується способу регуляції скорочуваності серцевого і/або скелетних м'язів. Волокна скелетної мускулатури дорослої особини можуть бути класифіковані на підтипи, що швидко і повільно скорочуються на основі специфічних скорочувальних і метаболічних властивостей. Ці властивості відображають експресію конкретних наборів швидких і повільних ізоформ скорочувальних білків важких і легких ланцюгів міозину, тропоміозину і тропонінів, а також міоглобіну (Naya et al. (2000) J. Biol Chem, Vol. 275(7):4545-4548). М'язи, що повільно скорочуються, використовуються в основному при тривалих діях, таких як підтримка положення тіла і тривала рухова активність. Волокна, що швидко скорочуються, використовуються в основному при імпульсних активностях, що потребують більших зусиль. Фенотип скелетної мускулатури дорослої особини не статичний, але зате зберігає здатність пристосовуватися до різноманітності виконуваного навантаження і патернів використання скорочуваності, адаптуючись у морфологічних, фенотипічних і скорочувальних властивостях.

Активация декількох генів скорочувальних білків швидких скелетних м'язів спостерігалася у серці мишей з відсутністю обох алелів miR-208a. Ця активация генів скорочувальних білків швидких скелетних м'язів у серці мишей з нокаутом miR-208a вказує на те, що miR-208 звичайно діє як репресор генної програми швидких скелетних м'язів. У мишей, мутантних по miR-208a, спостерігалася супутнє зниження експресії miR-499 (дивися приклад 3), вказуючи на те, що miR-499 також може негативно регулювати експресію генів скорочувальних білків швидких скелетних м'язів. Як зазначено вище, miR-208b також експресується переважно у повільних скелетних м'язах (наприклад, камбалоподібному м'язі). Таким чином, miR-208b може суттєво впливати на скорочуваність серцевого і скелетних м'язів у людей, а також може регулювати генну програму швидких скелетних м'язів і визначати характер волокна. Автори винаходу нещодавно показали, що miR-208b і miR-499 мають важливе значення у визначенні характеру м'язового волокна за рахунок активації програми генів повільних м'язових волокон і придушення швидких. Дії цих miRNA опосередковуються зокрема за допомогою набору транскрипційних репресорів генів повільних міофібрил, подібних до Sox6, PURβ, Sp3 і HP1β. Використовуючи трансгенні по miR-499 тварин з MCK-промотором, специфічним для скелетних м'язів, також показали перетворення у більш уповільнений тип міофібрил. Ще більш дивно, що при впливі на мишей режимом примусової бігової доріжки, трансгенні по miR-499 тварини бігли більш ніж на 50% довше, ніж одноприплідні тварини дикого типу, що вказує на підвищену витривалість внаслідок перепрограмування швидких міофібрил у більш повільний тип волокон. Дивися статтю van Rooij et al. (2009) Developmental Cell, Vol. 17:662-673.

В одному з варіантів здійснення способу регуляції скорочуваності серцевого і/або скелетних м'язів містить введення модулятора експресії або активності miR-499 і miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) у клітини серця і/або скелетних м'язів. В іншому варіанті здійснення способу містить введення модулятора miR-499 і miR-208b. В іншому варіанті здійснення пропонується спосіб регуляції експресії генів скорочувальних білків серця, що містить введення у клітини серця модулятора експресії або активності miR-499 і miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b). В іншому варіанті здійснення пропонується спосіб регуляції експресії генів скорочувальних білків скелетних м'язів, що містить введення у клітини скелетних м'язів модулятора експресії або активності miR-499 і miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b). В іншому варіанті здійснення пропонується спосіб регуляції експресії генів скорочувальних білків скелетних м'язів, що містить введення у клітини скелетних м'язів модулятора експресії або активності miR-499 і miR-208b. У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується способу індукування перемикання типу волокна клітини скелетних м'язів, що містить введення у клітини скелетних м'язів модулятора експресії або активності miR-499 і miR-208 для клітини скелетних м'язів. В іншому варіанті здійснення спосіб індукування перемикання типу волокна клітини скелетних м'язів містить введення у клітини скелетних м'язів модулятора експресії або активності miR-499 і miR-208b. Модулятор може являти собою агоніст або інгібітор експресії або активності miR-499, miR-208 і/або miR-208b. У деяких варіантах здійснення за рахунок контактування клітини з інгібітором miR-499 і miR-208a (або miR-208b) у клітині підвищується експресія THRAP1, PURбета, міостатину, Sp3, HP1β і Sox 6. В інших варіантах здійснення експресія THRAP1, PURбета, міостатину, Sp3, HP1β і Sox 6 у клітині знижується за рахунок контактування клітини з агоністом miR-499 і miR-208a (або miR-208b).

У деяких варіантах здійснення винаходу пропонується спосіб зниження експресії β-МНС у клітинах серця, що містить введення у клітини серця інгібітору експресії або активності miR-499 і miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b). В одному з варіантів здійснення пропонується спосіб зниження експресії β-МНС у клітинах скелетних м'язів, що містить введення у клітини скелетних м'язів інгібітору експресії або активності miR-499 і miR-208b. В інших варіантах здійснення винаходу пропонується спосіб підвищення експресії β-МНС у клітинах серця і/або

клітинах скелетних м'язів, що містить підвищення експресії або активності ендегенних miR-499 і miR-208a (або miR-208b) або введення у клітини серця і/або клітини скелетних м'язів екзогенних miR-499 і miR-208a (або miR-208b).

В одному з варіантів здійснення винаходу пропонується спосіб підвищення експресії гена скорочувального білка швидких скелетних м'язів у клітинах серця, що містить введення у клітини серця інгібітору експресії або активності miR-499 і miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b). В інших варіантах здійснення пропонується спосіб підвищення експресії гена скорочувального білка швидких скелетних м'язів у клітинах скелетних м'язів, що містить введення у клітини скелетних м'язів інгібітору експресії або активності miR-499 і miR-208b. В іншому варіанті здійснення пропонується спосіб зниження експресії гена скорочувального білка швидких скелетних м'язів у клітинах серця і/або клітинах скелетних м'язів, що містить підвищення експресії або активності ендегенних miR-499 і miR-208a (або miR-208b) або введення у клітини серця і/або клітини скелетних м'язів екзогенних miR-499 і miR-208a (або miR-208b). До прикладів генів скорочувальних білків швидких скелетних м'язів, експресія яких може бути підвищена або знижена відповідно до способів даного винаходу, належать, але ними не обмежуючись, тропонін I2, тропонін T3, легкий ланцюг швидкого скелетного міозину або альфа-актин скелетних м'язів.

У скелетній мускулатурі репресія генів повільних волокон і активація генів швидких волокон асоційована з великою кількістю м'язово-скелетних порушень, до яких належать, але ними не обмежуючись, дисфункціональна атрофія, м'язова атрофія у відповідь на антигравітацію і денервація. Таким чином, експресія miR-499 у комбінації з miR-208a або miR-208b у клітинах скелетних м'язів може бути використана для репресії генів швидких волокон, таким чином, активуючи відповідну експресію генів повільних волокон. Відповідно, даний винахід також охоплює спосіб лікування або профілактики м'язово-скелетного порушення у індивідуума, який потребує цього. В одному з варіантів здійснення спосіб містить введення індивідууму агоніста miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b) і агоніста miR-499, де після введення у клітинах скелетних м'язів індивідуума підвищується експресія або активність miR-208a/miR-208b і miR-499. В іншому варіанті здійснення спосіб містить введення індивідууму агоніста miR-208b і агоніста miR-499, де після введення у клітинах скелетних м'язів індивідуума підвищується експресія або активність miR-208b і miR-499. Переважно, щоб після введення агоністів miR-499 і miR-208a (або miR-208b) у клітинах скелетних м'язів індивідуума знижувалася експресія одного або декількох генів швидких скелетних м'язів. До одного або декількох генів швидких скелетних м'язів можуть належати, але ними не обмежуючись, тропонін I2, тропонін T3, легкий ланцюг швидкого скелетного міозину або альфа-актин скелетних м'язів.

В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу лікування або профілактики м'язової атрофії у відповідь на умови зниженої гравітації шляхом введення у скелетний м'яз агоніста miR-499 і miR-208 (наприклад, miR-208a або miR-208b). В іншому варіанті здійснення спосіб лікування або профілактики м'язової атрофії у відповідь на умови зниженої гравітації містить введення у скелетний м'яз агоніста miR-499 і miR-208b. У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується способу лікування або профілактики м'язової атрофії шляхом введення у скелетний м'яз агоніста miR-499 і агоніста miR-208 (наприклад, miR-208a і/або miR-208b). В іншому варіанті здійснення спосіб лікування або профілактики м'язової атрофії містить введення у скелетний м'яз агоніста miR-499 і агоніста miR-208b.

У деяких варіантах здійснення агоніст miR-208 (miR-208a або miR-208b) і агоніст miR-499 являють собою полінуклеотиди, що кодують послідовність зрілої miR-208 (miR-208a або miR-208b) і/або miR-499. В одному з варіантів здійснення полінуклеотид містить послідовність зрілої miR-208a (SEQ ID NO:5) і послідовність зрілої miR-499 (SEQ ID NO:14). В іншому варіанті здійснення полінуклеотид містить послідовність зрілої miR-208b (SEQ ID NO:19) і послідовність зрілої miR-499 (SEQ ID NO:14). В іншому варіанті здійснення агоніст miR-499 і агоніст miR-208 (miR-208a або miR-208b) можуть являти собою полінуклеотид, що містить послідовність pri-miRNA або pre-miRNA для miR-499 і miR-208 (miR-208a або miR-208b). Альтернативно, агоніст miR-208 (miR-208a або miR-208b) і агоніст miR-499 можуть являти собою окремі полінуклеотиди, кожний з яких містить послідовність зрілої miRNA або послідовність pre-miRNA. Полінуклеотид, що містить послідовність зрілої miR-499 і/або miR-208 (miR-208a або miR-208b), може бути одностанцюжковим або двостанцюжковим. Полінуклеотиди можуть містити одну або декілька хімічних модифікацій, таких як замкнуті нуклеїнові кислоти, пептидні нуклеїнові кислоти, модифікації цукру, такі як 2'-О-алкіл (наприклад, 2'-О-метил, 2'-О-метоксіетил), 2'-фтор і 4'-тіо-модифікації, і модифікації кістяка, такі як один або декілька фосфоротіоатних, морфоліно або фосфонокарбоксилатних зв'язків. В одному з варіантів здійснення полінуклеотид, що містить послідовність miR-499, miR-208 і/або miR-208b, кон'югують з холестериним.

В іншому варіанті здійснення агоніст miR-499 і miR-208 (miR-208a або miR-208b) може кодуватися на векторі експресії. Вектор експресії для експресії miR-499 і miR-208 (miR-208a або miR-208b) містить щонайменше один промотор, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, що кодує miR-499 і/або miR-208 (miR-208a або miR-208b). Полінуклеотид, що кодує miR-499, може кодувати послідовність початкової miR-499 (pri-miR-499), послідовність попередника miR-499 (pre-miR-499) або послідовність зрілої miR-499. Полінуклеотид, що кодує miR-208a/miR-208b, може кодувати послідовність початкової miRNA-208a/208b (pri-miR-208/pri-miR-208b), послідовність попередника miRNA-208/208b (pre-miR-208a/pre-miR-208b) або послідовність зрілої miR-208a/208b. У деяких варіантах здійснення вектор експресії містить полінуклеотид, функціонально зв'язаний з промотором, де зазначений полінуклеотид містить послідовність SEQ ID NO:5 і SEQ ID NO:14. В інших варіантах здійснення вектор експресії містить полінуклеотид, функціонально зв'язаний з промотором, де зазначений полінуклеотид містить послідовність SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:14. Такі полінуклеотиди можуть мати від близько 18 до близько 200 нуклеотидів у довжину, від близько 70 до близько 200 нуклеотидів у довжину, від близько 20 до близько 50 нуклеотидів у довжину або від близько 18 до близько 25 нуклеотидів у довжину. В іншому варіанті здійснення вектор експресії може експресувати агоніст miR-499 (наприклад, полінуклеотид, що містить послідовність miR-499) і агоніст miR-208 (наприклад, полінуклеотид, що містить послідовність miR-208a або miR-208b) з різних промоторів. Полінуклеотиди, що кодують miR-499, miR-208a і/або miR-208b, можуть бути локалізовані у нуклеїновій кислоті, що кодує інтрон, або у нуклеїновій кислоті, що кодує нетрансльовану область мРНК, або у некодуючій РНК. В одному з варіантів здійснення вектор експресії може містити послідовності з 20^{ого} інтрона гена Myn7b або послідовності з 31^{ого} інтрона гена Myn7b (β-MHC).

Агоніст miR-208a або miR-208b може бути введений індивідууму разом з агоністом miR-499. Два агоністи можуть бути введені в одній препаративній формі, наприклад, фармацевтичній композиції, що містить агоніст miR-208a або miR-208b і агоніст miR-499. Альтернативно, два агоністи (наприклад, miR-208a і miR-499 або miR-208b і miR-499) можуть являти собою один полінуклеотид, що кодує послідовність зрілої miRNA або послідовність pre-miRNA двох miRNA. Велика кількість поєднаних введенень двох агоністів може бути здійснена протягом тривалого періоду часу, наприклад, одного тижня, двох тижнів, трьох тижнів, одного місяця, двох місяців, трьох місяців, чотирьох місяців, п'яти місяців, шести місяців, дев'яти місяців, одного року, двох років, трьох років, чотирьох років або п'яти років.

У деяких варіантах здійснення агоніст miR-208a або miR-208b і агоніст miR-499 вводять послідовно. В одному з варіантів здійснення агоніст miR-208a або miR-208b вводять перед агоністом miR-499. В іншому варіанті здійснення агоніст miR-499 вводять перед агоністом miR-208a або miR-208b. Інтервал, що відокремлює введення агоністів, може знаходитися у діапазоні від декількох хвилин до тижнів, наприклад, від близько однієї години до близько 72 годин, від 6 годин до близько 48 годин або від близько 12 годин до близько 24 годин. У переважному варіанті здійснення інтервал між введенням агоніста miR-208a або miR-208b і агоніста miR-499 складає щонайменше 24 години.

Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, що містять інгібітор або агоніст miR-499, miR-208a і/або miR-208b. Розглядаючи клінічне застосування, фармацевтичні композиції повинні бути одержані у формі, придатній для наміченого застосування. Як правило, це буде означати одержання композицій, які по суті вільні від пірогенів, а також інших домішок, які можуть бути небезпечні для людини і тварин.

В одному з варіантів здійснення фармацевтична композиція містить ефективну дозу інгібітору miR-499 і/або ефективну дозу інгібітору miR-208a або miR-208b. В іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція містить ефективну дозу агоніста miR-499 і/або ефективну дозу агоніста miR-208a або miR-208b. Під «ефективною дозою» розуміють кількість, достатню для одержання корисного або бажаного клінічного результату. Ефективна доза інгібітору miRNA або агоніста miRNA за винаходом може складати від близько 1 мг/кг до близько 200 мг/кг, від близько 20 мг/кг до близько 160 мг/кг або від близько 40 мг/кг до близько 100 мг/кг. В одному з варіантів здійснення інгібітор miR-208a або miR-208b та інгібітор miR-499 вводять кожний у дозі від близько 20 мг/кг до близько 200 мг/кг. В іншому варіанті здійснення інгібітор miR-208a або miR-208b та інгібітор miR-499 вводять кожний у дозі близько 80 мг/кг. В іншому варіанті здійснення агоніст miR-208a або miR-208b і агоніст miR-499 вводять кожний у дозі від близько 20 мг/кг до близько 200 мг/кг. У ще одному варіанті здійснення агоніст miR-208a або miR-208b і агоніст miR-499 вводять кожний у дозі близько 80 мг/кг. Точне визначення, яку дозу вважати ефективною, може базуватися на факторах, індивідуальних для кожного пацієнта, до яких належать його статура, вік, тип розладу (наприклад, інфаркт міокарда, серцева

недостатність, гіпертрофія серця або м'язово-скелетне порушення) і природа інгібітору або агоніста (наприклад, антагоніст, експресуюча конструкція, антисмисловий олігонуклеотид і т.д.). Тому дози можуть бути легко встановлені фахівцем у даній галузі, виходячи з даного опису і знань у даній галузі.

5 Як носії для доставки олігонуклеотидних інгібіторів функції міРНК, полінуклеотидів, кодуючих агоністів міRNA, або конструкцій, що експресують визначені інгібітори або агоністи міRNA, можуть бути використані колоїдні дисперсні системи, такі як макромолекулярні комплекси, нанокapsули, мікросфери, кульки і системи на основі ліпідів, до яких належать емульсії масло-у-воді, міцели, змішані міцели і ліпосоми. До комерційно доступних жирових емульсій, які придатні для доставки нуклеїнових кислот за винаходом до тканин серця і скелетних м'язів, належать інтраліпід®, ліпозин®, ліпозин® II, ліпозин® III, нутриліпід та інші аналогічні ліпідні емульсії. Переважною колоїдною системою для застосування як носій для доставки *in vivo* є ліпосома (тобто штучний пухирець мембрани). Одержання і застосування таких систем добре відомо у даній галузі. Типові препаративні форми також описуються у патентах США 5981505; 6217900; 6383512; 5783565; 7202227; 6379965; 6127170; 5837533; 6747014 і WO03/093449, які наводяться у даному документі як посилання у повному обсязі.

Для одержання стабільних носіїв для доставки і сприяння поглинанню клітинами-мішенями звичайно буде бажано використовувати придатні солі і буфери. Водні композиції за даним винаходом містять ефективну кількість системи доставки, що містить полінуклеотиди інгібіторів або послідовності полінуклеотидів міRNA (наприклад, ліпосом або інших комплексів, або векторів експресії), розчиненої або диспергованої у фармацевтично прийнятному носії або водному середовищі. Під фразами «фармацевтично прийнятний» або «фармакологічно прийнятний» розуміють молекулярні частинки і композиції, які при введенні тварині або людині не приводять до негативних, алергійних або інших несприятливих реакцій. Під використанням у даному документі терміном «фармацевтично прийнятний носій» розуміють розчинники, буфери, розчини, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові агенти, ізотонічні агенти і агенти, що уповільнюють всмоктування, і подібне, прийнятні для застосування у складанні фармацевтичних препаратів, таких як фармацевтичні препарати, придатні для введення людині. Застосування таких середовищ і агентів для фармацевтично активних речовин добре відомо у даній галузі. За винятком випадків несумісності яких-небудь прийнятих середовищ або агента з активними інгредієнтами за даним винаходом, їх застосування розглядається у терапевтичних композиціях. У композиції можуть бути введені також додаткові активні інгредієнти за умови, що вони не інактивують вектори або полінуклеотиди композицій.

35 До активних композицій за даним винаходом можуть належати класичні фармацевтичні препарати. Введення цих композицій за даним винаходом може відбуватися будь-яким звичайним шляхом, якщо тканина-мішень доступна цим способом. До такого способу введення належать пероральний, назальний і букальний. Альтернативно, введення можна здійснити за допомогою внутрішньошкірної, підшкірної, внутрішньом'язової, внутрішньочеревинної або внутрішньовенної ін'єкції або безпосереднім введенням у тканину серця. Фармацевтичні композиції, що містять інгібітори міРНК, полінуклеотиди, що кодують послідовність міРНК, або експресуючі конструкції, що містять послідовності міРНК, також можуть бути введені за допомогою катетерних систем або систем, які відключають коронарний кровообіг для доставки терапевтичних агентів до серця. У даній галузі відомо велике число катетерних систем для доставки терапевтичних агентів до серця і коронарних судин. Деякі необмежені приклади способів доставки за допомогою катетера або способів відключення коронарних судин, придатні для застосування за даним винаходом, описані у патенті США 6416510; патенті США 6716196; патенті США 6953466, WO 2005/082440, WO 2006/089340, патентній публікації США 2007/0203445, патентній публікації США 2006/0148742 і патентній публікації США 2007/0060907, які наводяться у даному документі як посилання у повному обсязі. Такі композиції звичайно вводилися б у вигляді фармацевтично прийнятих композицій, описаних у даному документі.

Активні сполуки також можуть бути введені парентерально або внутрішньочеревинно. Як ілюстрація, розчини активних сполук у вигляді вільної основи або фармакологічно прийнятих солей можуть бути одержані у воді придатним чином змішаній з сурфактантом, таким як гідроксипропілцелюлоза. Дисперсії також можуть бути одержані у гліцерині, рідких поліетиленгліколях і їх сумішах і в маслах. При звичайних умовах зберігання і використання ці препарати звичайно містять консервант для запобігання росту мікроорганізмів.

До фармацевтичних форм, придатних для застосування у вигляді ін'єкцій або катетерної доставки, належать, наприклад, стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для приготування для негайного прийому стерильних розчинів або дисперсій для ін'єкцій. Як

правило, ці препарати є стерильними і текучими до величини, яка легко вводиться у вигляді ін'єкції. Препарати повинні бути стабільними при умовах виробництва і зберігання, і повинні бути захищені від контамінуючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії і гриби. Придатні розчинники або дисперсійні середовища можуть містити, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь і подібне), їх придатні суміші і рослинні олії. Потрібна текучість може підтримуватися, наприклад, використовуючи покриття, таке як лецитин, у випадку дисперсії зберігаючи необхідний розмір частинок і використовуючи сурфактанти. Запобігання дії мікроорганізмів може бути обумовлене великою кількістю антибактеріальних і протигрибкових агентів, наприклад, парабенів, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти, тимерозалу і подібного. У багатьох випадках буде переважно включати ізотонічні агенти, наприклад, цукри або хлорид натрію. Тривале всмоктування композицій для ін'єкцій може бути обумовлене застосуванням у композиціях агентів, що уповільнюють всмоктування, наприклад, моностеарату алюмінію і желатину.

Стерильні розчини для ін'єкцій можуть бути одержані шляхом введення активних сполук у придатній кількості у розчинник за бажанням поряд з іншими інгредієнтами (наприклад, перерахованими вище) з подальшою стерилізацією. Як правило, дисперсії одержують шляхом введення великого числа стерилізованих активних інгредієнтів у стерильний носій, який містить основне дисперсійне середовище і бажані інші інгредієнти, наприклад, перераховані вище. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних розчинів для ін'єкцій, до переважних способів одержання належать техніки висушування вакуумом і висушування заморожуванням, за допомогою яких одержують порошок активного(их) інгредієнта(ів) плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з його раніше стерилізованого-відфільтрованого розчину.

Композиції за даним винаходом, як правило, можуть бути змішані у нейтральній або сольовій формі. До фармацевтично прийнятних солей належать, наприклад, кислотнo-адитивні солі (утворені вільними аміногрупами білка), одержані з неорганічних кислот (наприклад, соляної або фосфорної кислот) або з органічних кислот (наприклад, оцтової, щавлевої, винної, мигдалевої і подібних). Солі, утворені вільними карбоксильними групами білка також можуть бути одержані з неорганічних основ (наприклад, гідроксидів натрію, калію, амонію, кальцію і заліза) або з органічних основ (наприклад, ізопропіламіну, триметиламіну, гістидину, прокаїну і подібних).

Після змішування розчини переважно вводять способом, сумісним з дозованою препаративною формою, і у такій кількості, яка є терапевтично ефективною. Препаративні форми можуть бути легко введені у великій кількості лікарських форм, таких як розчини для ін'єкцій, капсули, що вивільняють лікарський засіб, і подібне. Для парентерального введення у водному розчині, наприклад, розчин, як правило, придатним чином забуферюють, і рідкий розріджувач спочатку роблять ізотонічним, наприклад, за допомогою достатньої кількості сольового розчину або глюкози. Такі водні розчини можуть бути використані, наприклад, для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного і внутрішньочеревинного введення. Переважно, щоб використовувалися стерильні водні середовища, відомі фахівцям у даній галузі, зокрема з урахуванням даного опису. Як ілюстрація, одна доза може бути розчинена в 1 мл ізотонічного розчину NaCl і або додана до 1000 мл рідини для підшкірного вливання, або введена у задану ділянку інфузії (дивися, наприклад, керівництво «Remington's Pharmaceutical Sciences» 15-е видання, сторінки 1035-1038 і 1570-1580). Дозування обов'язково повинне дещо варіювати в залежності від стану індивідуума, який одержує лікування. Фахівець, відповідальний за введення, у кожному випадку повинен визначати придатну дозу для конкретного індивідуума. Більш того, для введення людині препарати повинні відповідати стандартам стерильності, апірогенності, загальної безпеки і чистоти, які вимагаються службою стандартів у біології FDA.

Будь-яка з композицій, описаних у даному документі, може знаходитися у наборі. В одному з варіантів здійснення набір містить першу фармацевтичну композицію, що містить інгібітор miR-208a або miR-208b, і другу фармацевтичну композицію, що містить інгібітор miR-499. В іншому варіанті здійснення набір містить єдину фармацевтичну композицію, що містить інгібітор miR-208a або miR-208b та інгібітор miR-499. В іншому варіанті здійснення набір містить першу фармацевтичну композицію, що містить агоніст miR-208a або miR-208b, і другу фармацевтичну композицію, що містить агоніст miR-499. У ще одному варіанті здійснення набір містить єдину фармацевтичну композицію, що містить агоніст miR-208a або miR-208b і агоніст miR-499. У деяких варіантах здійснення набір також може включати один або декілька реагентів для трансфекції, що сприяють доставці агоністів або інгібіторів miRNA у клітину.

Компоненти наборів можуть бути упаковані або у водних середовищах, або у ліофілізовану форму. До пристроїв для контейнерів наборів, як правило, будуть належати щонайменше одна пляшечка, тестова пробірка, флакон, пляшка, шприц або інші пристрої для контейнерів, в які

компонент може бути вміщений і переважно придатним чином розділений на аліквоти. За наявності у наборі більше одного компонента, набір також звичайно буде містити другий, третій або інший додатковий контейнер, в який додаткові компоненти можуть бути вміщені окремо (наприклад, стерильний фармацевтично прийнятний буфер і/або інші розріджувачі). Разом з тим, в одній пляшечці може міститися велика кількість комбінацій компонентів. Набори за даним винаходом також звичайно будуть включати пристрої для вміщення нуклеїнових кислот і контейнери для будь-яких інших реагентів, щільно упаковані для продажу. До таких контейнерів можуть належати пластикові контейнери, виготовлені ін'єкційним або видувним формуванням, в яких утримуються бажані ампули.

Якщо компоненти набору пропонуються в одному і/або декількох рідких розчинах, то рідкий розчин являє собою водний розчин, причому особливо переважний стерильний водний розчин.

Проте, компоненти набору можуть бути запропоновані у вигляді сухого(их) порошку(ів). Якщо реагенти і/або компоненти пропонуються у вигляді сухого порошку, порошок може бути відновлений додаванням придатного розчинника. Передбачається, що розчинник також може бути запропонований в іншому контейнері.

Такі набори також можуть включати компоненти, які зберігають або підтримують агоніст miRNA або інгібітори miRNA або які захищають їх від деградації. Такі компоненти можуть бути вільними від ДНКаза, вільними від РНКаза або захищати від нуклеаз (наприклад, РНКаза і ДНКаза). Такі набори, як правило, будуть містити у придатному вигляді різні контейнери для кожного окремого реагенту або розчину.

Набір також буде включати інструкції з використання компонентів набору, а також застосування будь-якого іншого реагенту, не включеного у набір. Інструкції можуть включати варіації, які можуть бути здійснені. Набір також може включати приладдя або пристрої для введення агоніста або інгібітору miRNA більшим числом способів введення, таких як парентеральне введення або введення через катетер.

Припускається, що такі реагенти являють собою варіанти здійснення наборів за винаходом. Такі набори, проте, не обмежуються конкретними позиціями, зазначеними вище, і можуть включати будь-який реагент, використовуваний для маніпуляції або характеристики miRNA.

Наведені далі приклади включені винятково для ілюстрації великої кількості аспектів винаходу. Посилання на miR-208 у прикладах і фігурі стосується miR-208a у мишей. Проте, фахівець у даній галузі повинен у світлі даного опису розуміти, що винахід рівною мірою застосовний до будь-якої людини або іншої тварини і охоплює модулювання і miR-208a, і/або miR-208b.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. У мишей з нокаутом miR-208 у відповідь на перевантаження тиском спостерігаються зменшені гіпертрофія і фіброз серця.

MiR-208 кодується в інtronі гена α -MHC. Подібно до α -MHC, miR-208 експресується специфічно у серці зі слідовою експресією у легені. miR-208 процесується поза pre-mRNA α -MHC, а не транскрибується у вигляді окремого транскрипту. Дивно, проте, що у miR-208 спостерігається надзвичайно тривалий період напіврозпаду - щонайменше 14 днів, і завдяки цьому вона може функціонувати навіть при придушенні експресії mRNA α -MHC.

Мишей з нокаутом miR-208 створювали шляхом одержання вектора, що націлює miR-208, за допомогою SacII і NotI відщеплюючи фрагмент 0,4 т.п.н. (5' плече), що продовжується вище області, що кодує miR-208, і лігуючи фрагмент у націлюючу плазмиду pGKneoF2L2dta вище сайтів loxP і Frt-фланкованої неоміцинової касети. Фрагмент розміром 3,3 т.п.н. (3' плече) відщеплювали за допомогою Sall і HindIII і лігували у вектор між касетою резистентності до неоміцину і касетою негативної селекції Dta. Націлені ES-клітини, що несуть зруйнований алель, ідентифікували за допомогою аналізу Саузерн-блот за допомогою 5' і 3' зондів. Три націлених на miR-208 клони ES ідентифікували і використовували для введення у бластоцист. Одержаних химерних мишей схрещували з мишами C57BL/6 для трансмісії зародкової лінії мутантного алеля.

Незважаючи на те, що генетичної делеції miR-208 у мишей не вистачило для індукції явного фенотипу, аналіз на мікрочіпі сердець тварин дикого типу і miR-208-/- у віці 2 місяців виявив усунення miR-208, що привело до яскраво вираженої експресії великої кількості генів скорочувальних білків швидких скелетних м'язів, які звичайно не експресуються у серці. Таким чином, ці результати вказують на те, що при звичайних умовах miR-208 експресується разом з єдиним специфічним для серця геном MHC для підтримки унікальності кардіоміоцитів за рахунок придушення у серці експресії генів скелетних м'язів.

Найбільш дивну функцію miR-208 виявили за допомогою помилкової відповіді мишей з miR-208, що мовчить, на навантаження на серце (van Rooij et al., (2007) Science, Vol. 316: 575-579). У

відповідь на перевантаження тиском за рахунок звуження грудної аорти (ТАВ), що запускає патологічне ремоделювання серця, гістологічні зрізи серця мишей з нокаутом miR-208 показали практично відсутність гіпертрофії кардіоміоцитів або фіброзу у порівнянні зі зрізами від мишей дикого типу (фігура 1А). Крім того, тварини з нокаутом miR-208 виявилися нездатні активувати експресію β -МНС у відповідь на перевантаження тиском (фігура 1В і С). Навпаки, інші гени, що відповідають на стрес, такі як гени, що кодують ANF і BNP, у мутантних по miR-208 тварин індукувалися у значній мірі (фігура 1В), вказуючи на те, що miR-208 призначена спеціально для контролювання експресії β -МНС, яка може бути відділена від інших аспектів відповіді на навантаження на серце.

Приклад 2. Нокаунт miR-208 фенотипіє тварин з нокаутом miR-208 при відповіді на навантаження.

Для оцінки специфічності впливу відсутності miR-208 на відповідь на навантаження на серце тваринам щодня внутрішньовенно вводили або антагомір, що має послідовність, комплементарну послідовності зрілої miR-208 (анти 208; SEQ ID NO:16), або послідовність, що не співпадає (mm; SEQ ID NO:17). Всі нуклеозиди були 2'-ОМе модифікованими, і дві 5' кінцевих і чотири 3' кінцевих основи містили фосфоротіоатний інтернуклеозид. Холестерин приєднували до 3' кінця супровідного ланцюга через лінкер гідроксипролінол (фігура 2А). Аналіз ПЛР у режимі реального часу сердець тварин, яким вводили антагомір miR-208, через два місяці після лікування показав ефективний нокаунт miR-208 (фігура 2В).

Для тестування впливу *in vivo* придушення miR-208 на відповідь на навантаження на серце тварин, які одержують або антагомір anti-miR-208, або несумісний контроль, піддавали процедурі імітації або процедурі звуження грудної аорти для індукції перевантаження тиском. У тварин, яких обробляли несумісним контролем, спостерігалася характерна відповідь на навантаження з активацією β -МНС, а також інших генів стресу (ANF і BNP). Навпаки, у тварин, яких обробляли антагоміром anti-miR-208, у відповідь на стресовий стимул активації β -МНС не спостерігалася. Проте, спостерігалася підвищення експресії інших генів стресу (ANF і BNP) (фігура 2С). Відповідь на навантаження тварин, оброблених антагоміром anti-miR-208, виявилася помітно схожою на відповідь тварин з нокаутом miR-208, вказуючи, що miR-208 має вирішальне значення у регуляції експресії β -МНС при відповіді на навантаження.

Приклад 3. MiR-208 необхідна для експресії miR-499.

Для подальшого розуміння механізму дії miR-208 у серці автори винаходу визначили патерни експресії miRNA у серці мишей дикого типу і з нокаутом miR-208 за допомогою аналізу на мікрочіпі. Серед декількох miRNA, які активувалися і придушувалися у серці з нокаутом miR-208, автори винаходу виявили, що miR-499 дуже часто зустрічалася у нормальному серці, але не експресувалася вище фонових рівнів у тварин з нокаутом miR-208. Ці результати досліджень підтверджували нозерн-блотом (фігура 3). Аналіз геномної локалізації гена miR-499 показав, що він повинен міститися у 20^{ому} інтроні гена Myn7b, гомолога гена α -МНС. Представляється, що miR-208 регулює Myn7b і таким чином експресію miR-499 на рівні транскрипції, оскільки ЗТ-ПЛР на Myn7b вказує, що мРНК гена-хазяїна дозозалежним чином анулюється за відсутності miR-208 (фігура 3).

Ген Myn7b є консервативним у хребетних і експресується винятково у серці і повільних скелетних м'язах (наприклад, камбалоподібному м'язі) (фігура 4А). Подібним чином, miR-499 має такий самий патерн експресії, як і її ген-хазяїн, що підтвердилося аналізом ПЛР у режимі реального часу (фігури 4А і В). За допомогою гібридизації *in situ*, використовуючи зонд, направлений проти 3' кінця гена Myn7b, було показано, що цей міозин (і miR-499) експресувався у серці так само рано як і E10.5 (фігура 4С). Пізніше у процесі ембріогенезу Myn7b/miR-499 також експресується у сомітах. Ці дані вказують на те, що miR-208 необхідна для запуску додаткового міозину, Myn7b, що приводить до появи зв'язаної з ним miR-499. Крім того, miR-499 придушється у умовах гіпертрофії серця.

Для подальшого розуміння значення miR-499 у патологічній гіпертрофії серця і регуляції скорочуваності м'язів одержували тварин з нокаутом miR-499. Генетична делеція miR-499 не впливала на експресію її гена-хазяїна Myn7b (фігура 5А). Вестерн-блот аналіз серця тварин мутантних по miR-499 і дикого типу як на α -, так і β -МНС показав, що делеція miR-499 не впливає на експресію і того, і іншого гена на білковому рівні (фігура 5В). Для оцінки того, чи впливала miR-499 на регуляцію β -МНС, тварини дикого типу і з нокаутом miR-499 одержали пропілтіурацил (PTU), який індукує гіпотиреозидизм і активує β -МНС. У відповідь на PTU як у тварин дикого типу, так і у тварин з нокаутом miR-499, спостерігалася зниження α -МНС і підвищення β -МНС (фігура 5С). Дивно, що на відміну від miR-208, miR-499 не потрібна для регуляції експресії як α -, так і β -МНС.

Приклад 4. Подвійне націлювання на miR-208 і miR-499.

MiR-208 регулює експресію miR-499, що показано дозозалежним зниженням експресії miR-499 у тварин гетерозиготних по miR-208 і з нокаутом miR-208 (фігура 3 і приклад 3). Для подальшого розуміння взаємодії між miR-208 і miR-499 тваринам дикого типу внутрішньовенно вводили фізіологічний розчин або одну з чотирьох доз (20 мг/кг, 40 мг/кг, 80 мг/кг і 160 мг/кг) синтетичного олігонуклеотиду (наприклад, антагоміру), що має послідовність, комплементарну послідовності зрілої miR-208 (anti-miR-208; SEQ ID NO:16). Нозерн-аналіз тканини серця через три дні після введення у хвостову вену виявив дозозалежне зниження експресії зрілої miR-208, у той же час залишаючи експресію pre-miR-208 інтактною (фігура 6A). Проте, на відміну від моделі генетичної делеції, експресія miR-499 залишилася незмінною. Крім того, рівні експресії β-МНС також виявилися незмінними через три дні після введення антагоміра anti-miR-208 (дані не представлені).

У другій серії експериментів тваринам дикого типу внутрішньовенно вводили або одну дозу anti-miR-208 (80 мг/кг), дві послідовні дози (80 мг/кг) anti-miR-208 за два послідовні дні, або дві послідовні дози (80 мг/кг) олігонуклеотиду несумісного контролю (SEQ ID NO:17) за два послідовні дні. За допомогою нозерн-аналізу тканини серця через два місяці після обробки було показано, що у тварин, оброблених за допомогою anti-miR-208, знижувалася експресія як miR-208, так і miR-499 (фігура 6B). Аналіз ПЛР у режимі реального часу підтвердив ці результати (фігура 6C). Крім того, також було показане зниження експресії miR-208b, яка кодується в інтроні β-МНС і експресується разом з β-МНС. Аналіз ПЛР у режимі реального часу на відповідні гени-хазяїни міозину виявив, що нокдаун miR-208 не впливає на експресію α-МНС, але індукує зниження експресії β-МНС і Myh7b (фігура 6C). Зниження білка β-МНС також спостерігалось через два місяці після обробки за допомогою anti-miR-208 (фігура 6D). Ці результати вказують на те, що регуляція за допомогою miR-208 експресії miR-499 і β-МНС спостерігається після затримки, вказуючи, що miR-208 лежить вище miR-499, яка у свою чергу лежить вище β-МНС. Таким чином, для прискореного зниження експресії β-МНС необхідно, щоб знижувалися як miR-208, так і miR-499. Зниження лише miR-208 приводить до подальшого зниження експресії miR-499, що у свою чергу індукує зниження експресії β-МНС. Для одержання раніше виникаючого ефекту на експресію β-МНС можуть бути націлені як miR-499, так і miR-208 для їх придушення.

Для оцінки спільного впливу придушення як miR-208, так і miR-499 тваринам з нокаутом miR-499 до одержання пропілтіоурацилу (PTU), індуктора експресії β-МНС, вводили олігонуклеотиди anti-miR-208. Аналогічно одержаним раніше результатам PTU індукував зниження експресії α-МНС і підвищення експресії β-МНС/miR-208b (miR-208b експресується разом з β-МНС) як у тварин дикого типу, так і з нокаутом miR-499 без обробки олігонуклеотидами anti-miR-208 (фігура 7A, B). Такі ефекти характерні для відповіді на навантаження на серце. Навпаки, нозерн-аналіз і аналіз ПЛР у режимі реального часу тканини серця тварин з нокаутом miR-499, оброблених олігонуклеотидами anti-miR-208, через два тижні після обробки показали, що підвищення експресії β-МНС/miR-208b у відповідь на PTU не спостерігалось (фігура 7A, B). Відповідь тварин з нокаутом miR-499, оброблених за допомогою anti-miR-208, нагадувала відповідь тварин з нокаутом miR-208 (фігура 7B). Ці результати вказують на те, що ефективне і швидке зниження β-МНС може бути досягнуте шляхом націлювання як miR-208, так і miR-499. Доза олігонуклеотидів anti-miR-208, які вводили тваринам, привела до 60% зниження експресії miR-208. Цей відсоток зниження виявився достатнім для супресії індукції β-МНС за допомогою PTU за відсутності miR-499 (фігура 7B). Ці результати досліджень вказують на те, що зниження як miR-499, так і miR-208 може являти собою ефективну терапевтичну стратегію у лікуванні розладів серця, таких як патологічна гіпертрофія серця і серцева недостатність.

Приклад 5. Нокдаун miR-208 і miR-499 інгібує відповідь на навантаження на серце.

Для подальшої оцінки терапевтичного значення націлювання miR-208 і miR-499 у лікуванні розладів серця мишам внутрішньовенно вводили антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність, комплементарну послідовності зрілої miR-208a (анти-208), антисмисловий олігонуклеотид, що має послідовність, комплементарну послідовності зрілої miR-499 (анти-499), або олігонуклеотидні послідовності як анти-208, так і анти-499. І анти-208, і анти-499 містять комбінацію замкнених нуклеїнових кислот (LNA) і дезоксирибонуклеїнових кислот (ДНК), зв'язаних фосфоротіоатними міжнуклеозидними зв'язками. Для оцінки нокдауну miR-208 і miR-499 використовують аналіз ПЛР у режимі реального часу сердець тварин, яким вводили антисмислові олігонуклеотиди, через проміжок часу від трьох тижнів до двох місяців після обробки.

Для тестування впливу in vivo придушення miR-208 і miR-499 на відповідь на навантаження на серце тварин, які одержують анти-208, анти-499 або обидва олігонуклеотиди і анти-208, і анти-499, піддають процедурі імітації або процедурі звуження грудної аорти для індукції

перевантаження тиском. Припускається, що у необроблених тварин спостерігається типова відповідь на стрес з активацією β -МНС, а також інших генів стресу (ANF і BNP). Навпаки, припускається, що у тварин, яких обробляють і анти-208, і анти-499, спостерігається знижена активація β -МНС у відповідь на стресовий стимул, яка виражена сильніше, ніж у тварин, які одержують який-небудь один антисмисловий олігонуклеотид.

Всі публікації, патенти і патентні заявки, описані і процитовані у даному документі, наводяться у даному документі як посилання у повному обсязі. Зрозуміло, що описаний винахід не обмежується визначеними методологією, протоколами і матеріалами, описаними як їх можливий варіант. Також зрозуміло, що термінологія, використана у даному документі, призначена лише для опису визначених варіантів здійснення і не призначена для обмеження обсягу даного винаходу, який повинен бути обмежений лише доданою формулою винаходу.

Фахівець у даній галузі зрозуміє або здатний переконатися, використовуючи не більш ніж прийняте експериментування, що у даному документі описана велика кількість еквівалентів конкретних варіантів здійснення винаходу. Припускається, що такі еквіваленти повинні охоплюватися наведеною далі формулою винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Board of Regents, The University of Texas System
Olson, Eric
Von Rooij, Eva

<120> ПОДВІЙНЕ НАЦІЛЮВАННЯ НА MIR-208 І MIR-499 У
ЛІКУВАННІ ЗАХВОРЮВАНЬ СЕРЦЯ

<130> MIRG-013/01WO

<150> US 61/149,915

<151> 2009-02-04

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 71

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1
acgggcgagc ttttgcccg ggttatacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct 60
tgttggtcag a 71

<210> 2

<211> 71

<212> ДНК

<213> Mus sp.

<400> 2
acgggtgagc ttttgcccg ggttatacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct 60
tgttggtcag a 71

<210> 3

<211> 71

<212> ДНК

<213> Rattus sp.

<400> 3
acgggtgagc ttttgcccg ggttatacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct 60
tgttggtcag a 71

<210> 4

<211> 71

<212> ДНК

<213> Canis sp.

<400> 4
acgcatgagc ttttggtcgc ggttatacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct 60
tgttggtcag a 71

<210> 5

<211> 22

<212> РНК
 <213> Невідомий

<220>
 <223> зріла miR-208

<400> 5
 auaagacgag caaaaagcuu gu 22

<210> 6
 <211> 76
 <212> ДНК
 <213> Mus sp.

<400> 6
 tccctgtgtc ttgggtgggc agctgttaag acttgacgtg atgttttagct cctctgcatg 60
 tgaacatcac agcaag 76

<210> 7
 <211> 74
 <212> ДНК
 <213> Rattus sp.

<400> 7
 tccctgtctt ggggtggcag ctgttaagac ttgcagtgtat gtttagctcc tctccatgtg 60
 aacatcacag caag 74

<210> 8
 <211> 76
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 ccctgtgtcc ttgggcgggc ggctgttaag acttgacgtg atgtttaact cctctccacg 60
 tgaacatcac agcaag 76

<210> 9
 <211> 76
 <212> ДНК
 <213> Canis sp.

<400> 9
 cccttgcacc ctgggcgggc ggccgttaag acttgacgtg atgtttaact cctctccacg 60
 tgaacatcac agcaag 76

<210> 10
 <211> 76
 <212> ДНК
 <213> Didelphis sp.

<400> 10
 ccctgtcctc cccggcgggc agctgttaag acttgacgtg atgtttaatt cttctctatg 60
 tgaacatcac aacaag 76

<210> 11
 <211> 62
 <212> ДНК
 <213> Gallus sp.

 <400> 11
 ggagcggcag ttaagacttg tagtgatgt tagataatgt attacatgga catcacttta 60
 ag 62

 <210> 12
 <211> 68
 <212> ДНК
 <213> Xenopus tropicalis

 <400> 12
 gtcttagcga ggcagttaag acttgcatgt atgttttagtt aaaatctttt catgaacatc 60
 actttaag 68

 <210> 13
 <211> 79
 <212> РНК
 <213> Mus sp.

 <400> 13
 gggugggcag cuguuaagac uugcagugau guuuagcucc ucugcaugug aacaucacag 60
 caagucugug cugcugccu 79

 <210> 14
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Невідомий

 <220>
 <223> зріла miR-499

 <400> 14
 uuaagacuuu sagugauguu u 21

 <210> 15
 <211> 22
 <212> РНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> антагомир miR-208

 <400> 15
 асаагсуууу угсусгусуу аа 22

 <210> 16
 <211> 22
 <212> РНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>

<223> олігонуклеотид antimiR-208

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> Може являти собою 2'-ОМе-модифікований олігонуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Може містити фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(22)

<223> Може містити фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<400> 16

асаагсуиуи угсисгусиу ау

22

<210> 17

<211> 22

<212> РНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> помилковий олігонуклеотид miR-208

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> Може являти собою 2'-ОМе-модифікований олігонуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Може містити фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(22)

<223> Може містити фосфоротіоатні міжнуклеозидні зв'язки

<400> 17

ассагсуиуи угсисгуау ау

22

<210> 18

<211> 43

<212> ДНК

<213> Невідомий

<220>

<223> pre-miR-208b

<400> 18

tttctgatcc gaatataaga cgaacaaaag gtttgtctga ggg

43

<210> 19

<211> 22

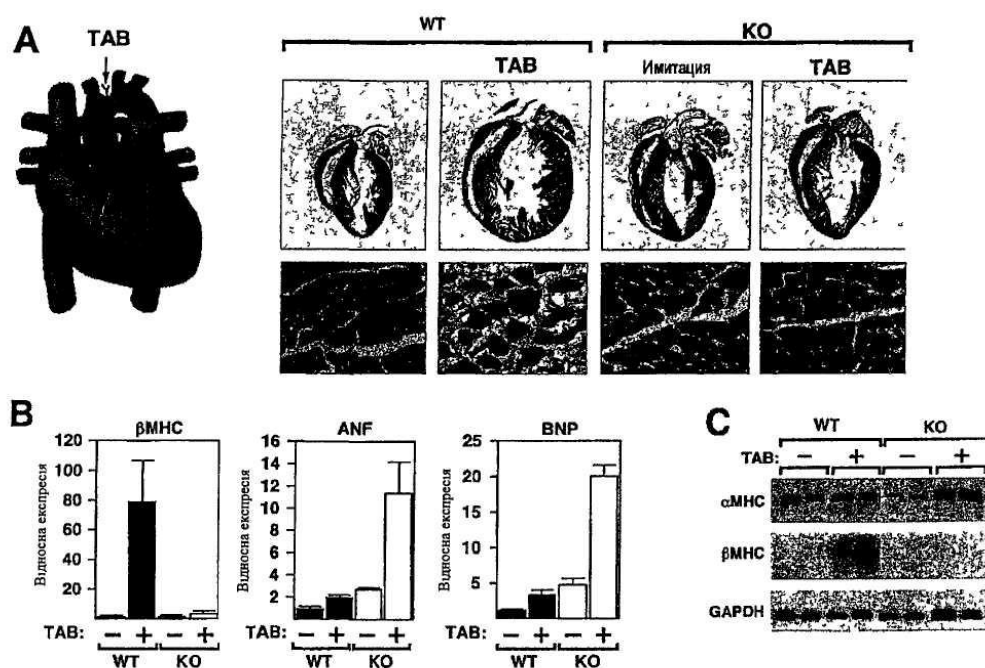
<212> РНК
 <213> Невідомий
 <220>
 <223> зріла miR-208b
 <400> 19
 auaagacgaa caaaagguuu gu

22

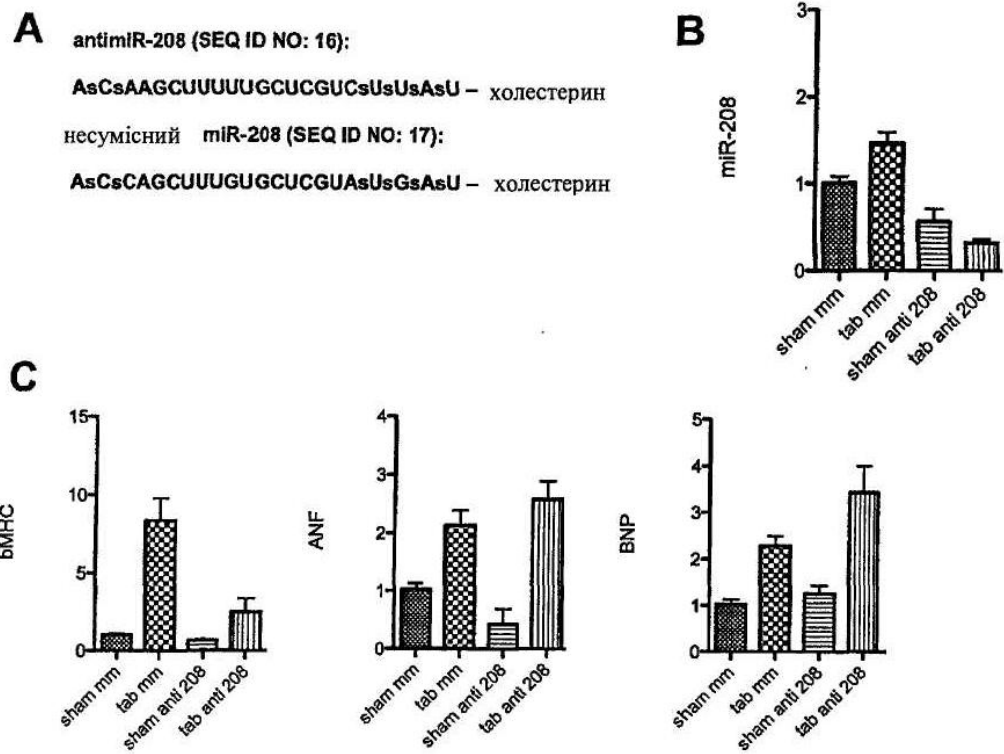
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб лікування патологічної гіпертрофії серця, серцевої недостатності або інфаркту міокарда у індивідуума, за необхідності, що включає введення індивідууму першого антисмислового олігонуклеотиду, який містить послідовність, яка щонайменше частково комплементарна зрілій послідовності miR-208a або miR-208b, і другого антисмислового олігонуклеотиду, який містить послідовність, яка щонайменше частково комплементарна зрілій послідовності miR-499, де перший і другий олігонуклеотиди складають від приблизно 8 до
- 10 приблизно 18 нуклеотидів в довжину, і де експресія або активність miR-208a або miR-208b і miR-499 знижується у клітинах серця індивідуума.
2. Спосіб за п. 1, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид і другий антисмисловий олігонуклеотид вводять спільно.
- 15 3. Спосіб за п. 2, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид і другий антисмисловий олігонуклеотид кодуються вектором експресії.
4. Спосіб за п. 3, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид і другий антисмисловий олігонуклеотид кодуються тим самим вектором експресії.
5. Спосіб за п. 1, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид і другий антисмисловий олігонуклеотид знаходяться в одній молекулі нуклеїнової кислоти, і де перший антисмисловий олігонуклеотид і другий антисмисловий олігонуклеотид розділені одним або декількома
- 20 спейсерними нуклеотидами.
6. Спосіб за п. 5, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид і другий антисмисловий олігонуклеотид розділені від приблизно 10 до приблизно 50 спейсерними нуклеотидами або
- 25 приблизно 5 спейсерними нуклеотидами.
7. Спосіб за п. 1, в якому перший і другий антисмислові олігонуклеотиди вводять послідовно.
8. Спосіб за п. 7, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид вводять перед другим антисмисловим олігонуклеотидом.
9. Спосіб за п. 7, в якому другий антисмисловий олігонуклеотид вводять перед першим антисмисловим олігонуклеотидом.
- 30 10. Спосіб за п. 7, в якому перший і другий антисмислові олігонуклеотиди вводять з інтервалом щонайменше у 24 години.
11. Спосіб за п. 7, в якому кожний перший антисмисловий олігонуклеотид і другий антисмисловий олігонуклеотид вводять в дозі від приблизно 1 мг/кг до приблизно 200 мг/кг.
- 35 12. Спосіб за п. 1, в якому зріла послідовність miR-208a являє собою SEQ ID NO: 5.
13. Спосіб за п. 1, в якому зріла послідовність miR-208b являє собою SEQ ID NO: 19.
14. Спосіб за п. 12 або п. 13, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид містить послідовність, яка щонайменше на 85 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 100 % комплементарна SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 19.
- 40 15. Спосіб за п. 1, в якому зріла послідовність miR-499 являє собою SEQ ID NO: 14.
16. Спосіб за п. 15, в якому другий антисмисловий олігонуклеотид містить послідовність, яка щонайменше на 85 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 100 % комплементарна SEQ ID NO: 14.
17. Спосіб за п. 1, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид і/або другий антисмисловий олігонуклеотид містить щонайменше одну модифікацію цукру або остова.
- 45 18. Спосіб за п. 17, в якому щонайменше одна модифікація цукру являє собою модифікацію цукру в біциклічному нуклеозиді, 2'-О-алкільну модифікацію або 2'-фтор-модифікацію.
19. Спосіб за п. 18, в якому модифікація цукру в біциклічному нуклеозиді являє собою "замкнену нуклеїнову кислоту".
- 50 20. Спосіб за п. 17, в якому вказана щонайменше одна модифікація остова являє собою фосфоротіоатний зв'язок.
21. Спосіб за п. 1, в якому перший антисмисловий олігонуклеотид і/або другий антисмисловий олігонуклеотид має довжину від приблизно 12 до приблизно 16 нуклеотидів.

22. Спосіб лікування патологічної гіпертрофії серця, інфаркту міокарда або серцевої недостатності у індивіда, за необхідності, що включає введення антисмислового олігонуклеотиду, що містить послідовність, яка щонайменше частково комплементарна зрілій послідовності miR-208a або miR-208b і зрілій послідовності miR-499, де експресія або активність
- 5 miR-208a або miR-208b, або miR-499 знижується в клітинах серця індивіда після введення.
23. Спосіб за п. 22, в якому антисмисловий олігонуклеотид має довжину від приблизно 8 до приблизно 18 нуклеотидів і містить послідовність, яка комплементарна безперервній амінокислотній послідовності на 5'-кінці послідовності SEQ ID NO: 5.
24. Спосіб за п. 22, в якому антисмисловий олігонуклеотид кодується експресійним вектором.
- 10 25. Спосіб за п. 22, в якому антисмисловий олігонуклеотид містить щонайменше одну модифікацію цукру і/або остова.
26. Спосіб за п. 25, в якому модифікація цукру являє собою модифікацію цукру в біциклічному нуклеозиді, 2'-О-алкільну модифікацію або 2'-фтор-модифікацію.
27. Спосіб за п. 26, в якому модифікація цукру в біциклічному нуклеозиді являє собою "замкнену
- 15 нуклеїнову кислоту".
28. Спосіб за п. 25, в якому модифікація остова являє собою фосфоротіоатний зв'язок.
29. Спосіб за п. 22, в якому антисмисловий олігонуклеотид має довжину від приблизно 12 до приблизно 16 нуклеотидів.
30. Спосіб за п. 1 або п. 22, в якому експресія або активність miR-208a або miR-208b, або miR-499
- 20 499 знижується більше ніж на 60 % в клітинах серця індивіда після введення.
31. Спосіб за п. 1 або п. 22, в якому у індивіда протягом двох тижнів після введення знижується відповідь на навантаження на серце.
32. Спосіб за п. 31, в якому відповідь на навантаження на серце включає гіпертрофію кардіоміоцитів, фіброз серця, зниження експресії α -MHC в клітинах серця і/або підвищення експресії α -MHC в клітинах серця у вказаного індивіда.
- 25



Фіг. 1



Фиг. 2

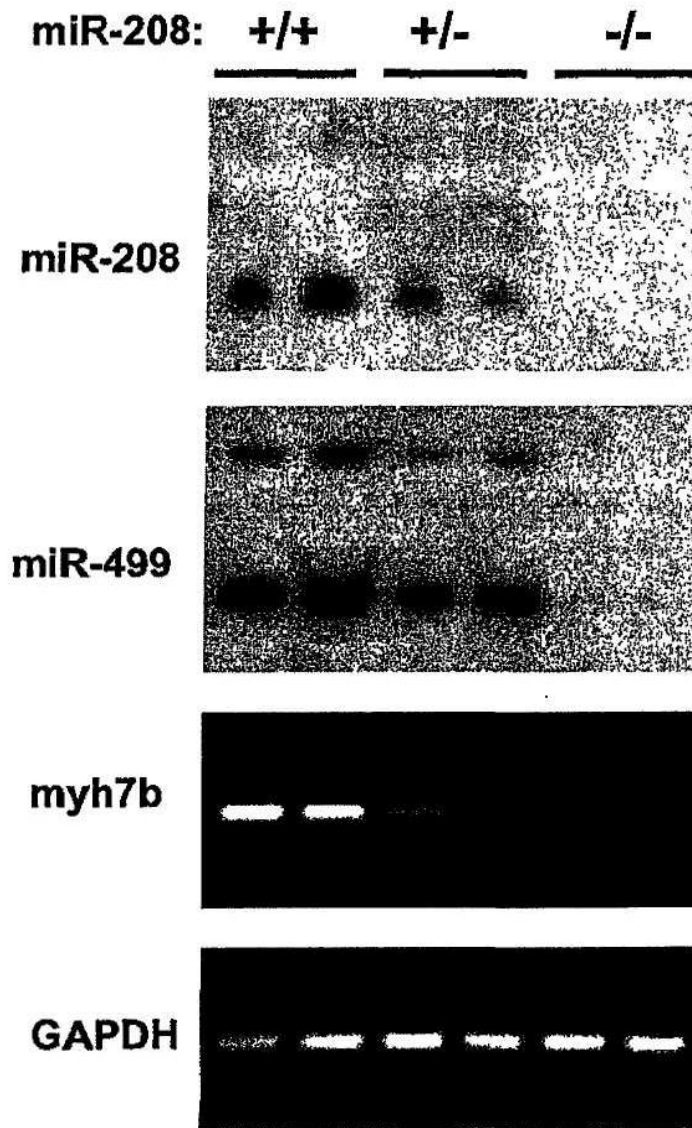


Fig. 3

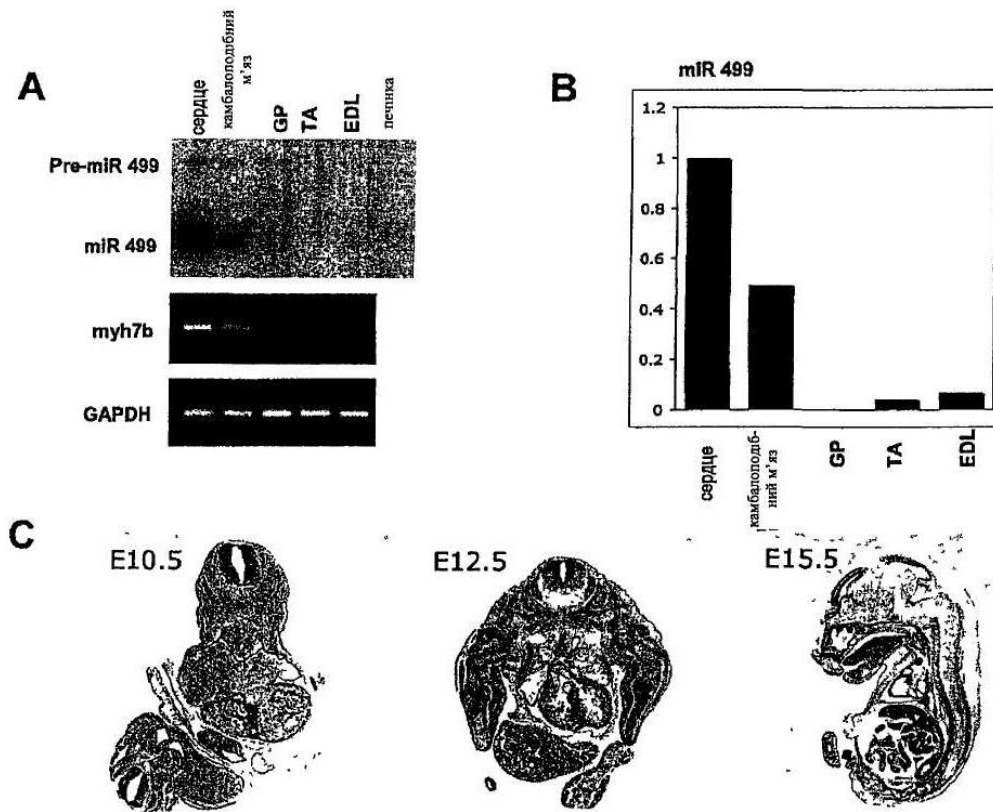


Fig. 4

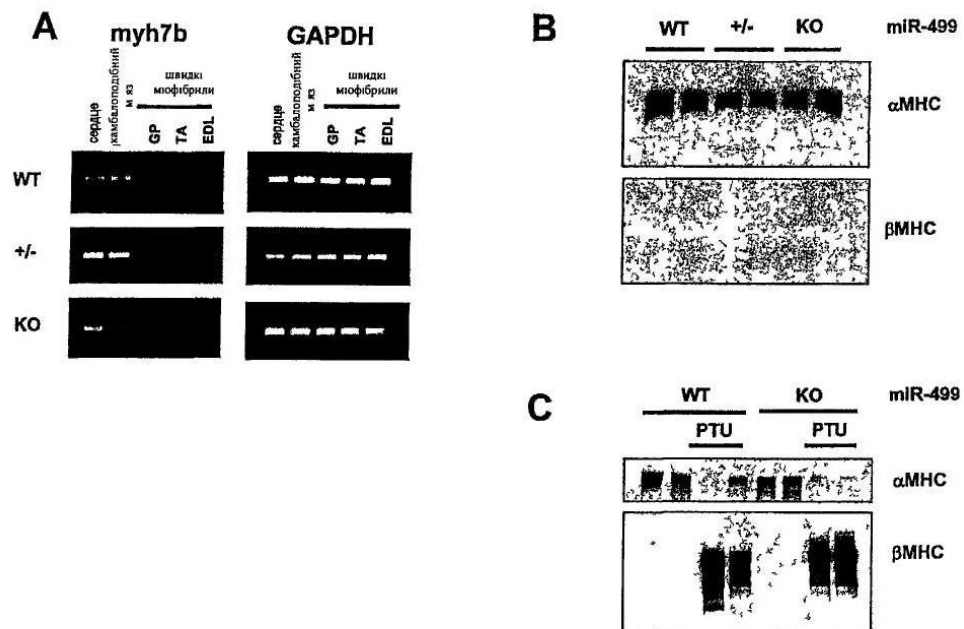
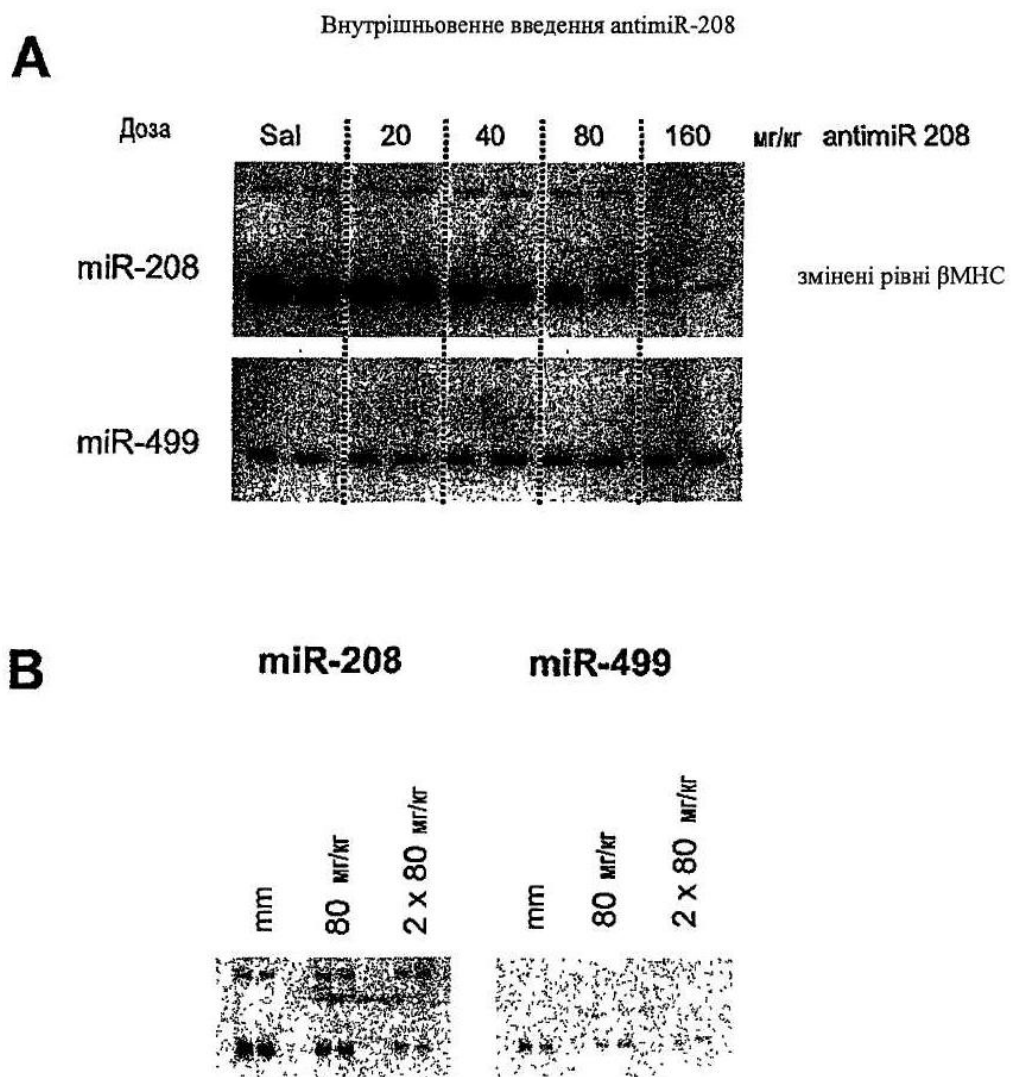
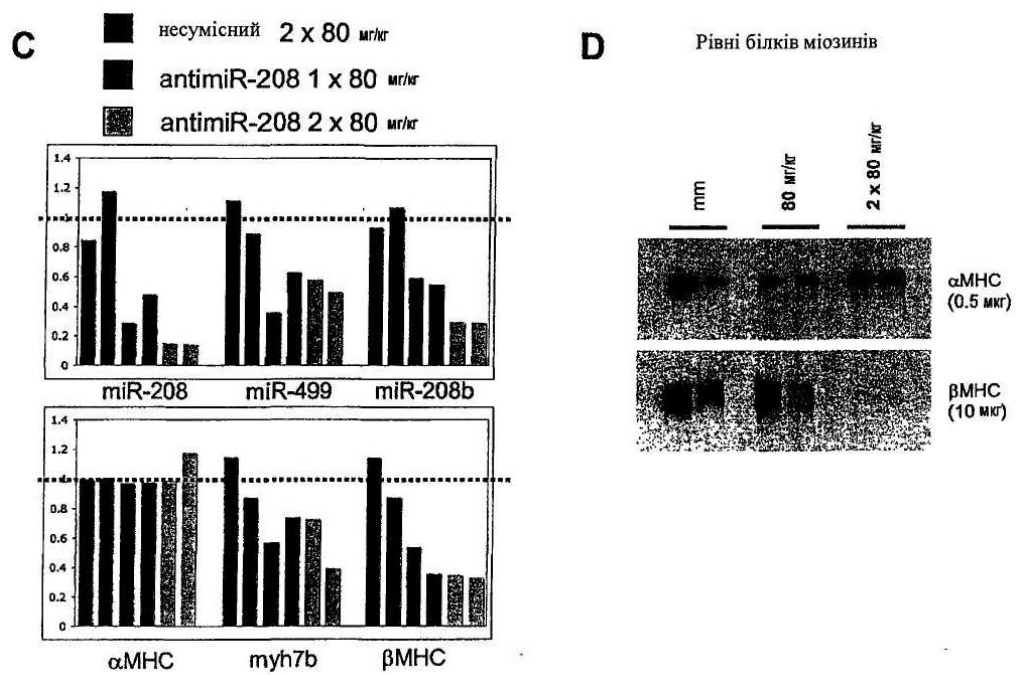


Fig. 5



Фіг. 6A і B



Фіг. 6C і D

A

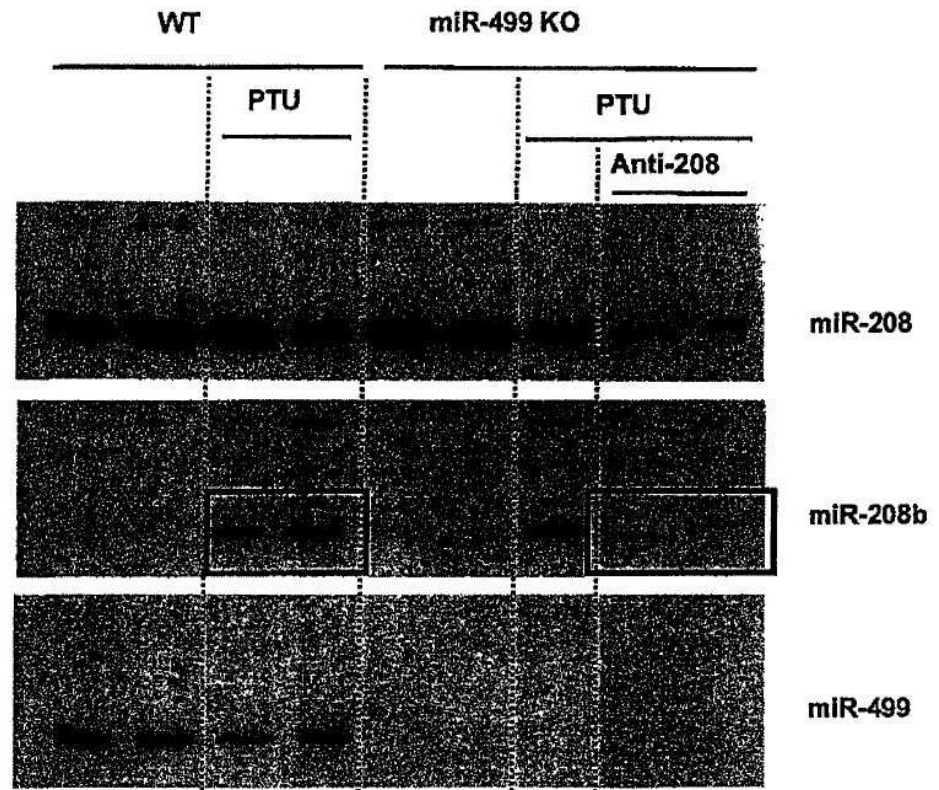
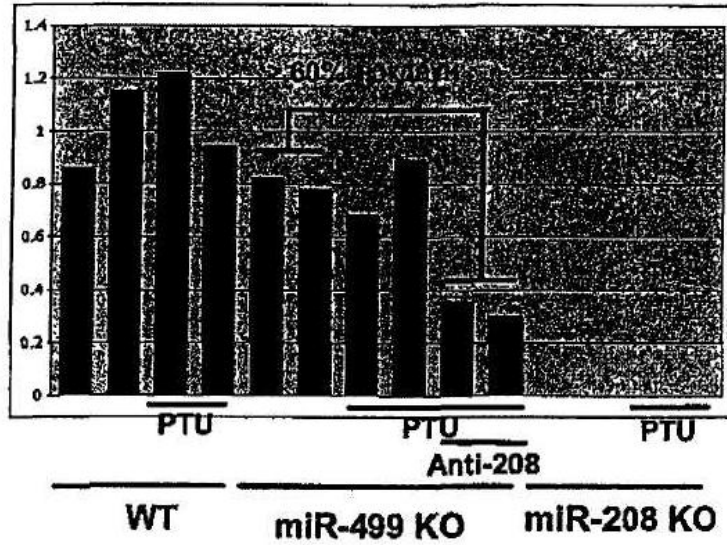


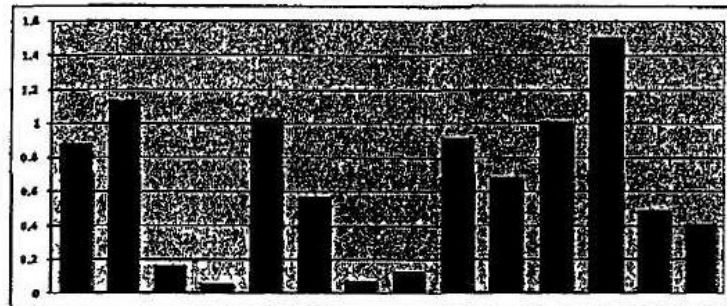
Fig. 7A

B

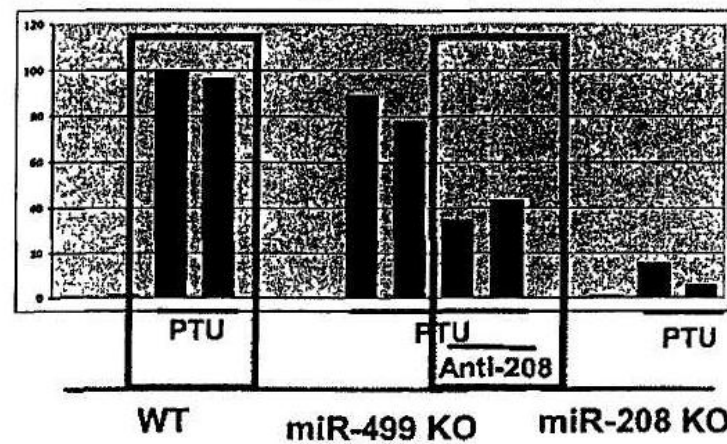
експресія
miR-208



α MHC



β MHC



Фіг. 7В

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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