

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491348 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.23

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)

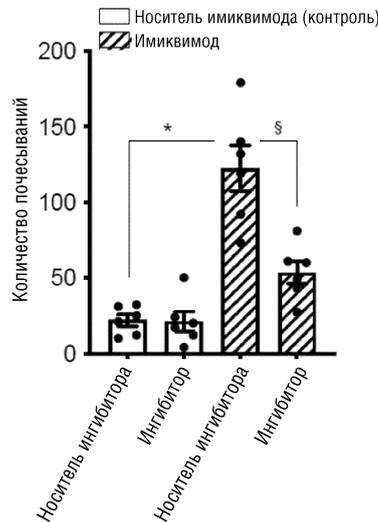
(22) Дата подачи заявки
2022.11.23

(54) АНТИСМЫСЛОВОЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНДУЦИРУЕМОГО ПСОРИАЗОМ ЗУДА И ФОСФОЛИПИДНАЯ ВЕЗИКУЛА, СОДЕРЖАЩАЯ УКАЗАННЫЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД

(31) 102021000029894
(32) 2021.11.25
(33) IT
(86) PCT/IB2022/061349
(87) WO 2023/095030 2023.06.01
(71) Заявитель:
ФЛОНЕКСТ С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Нассини Ромина, Де Логу Франческо,
Джеппетти Пьеранджело (IT)
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида, комплементарного последовательности микроРНК miR-203b-3p человека, для лечения зуда, вызванного псориазом. Настоящее изобретение также относится к фосфолипидной везикуле, содержащей указанный олигонуклеотид, и к применению указанной фосфолипидной везикулы для предупреждения и/или лечения зуда, вызванного псориазом.



A1

202491348

202491348

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 581498EA/042

АНТИСМЫСЛОВОЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНДУЦИРУЕМОГО ПСОРИАЗОМ ЗУДА И ФОСФОЛИПИДНАЯ ВЕЗИКУЛА, СОДЕРЖАЩАЯ УКАЗАННЫЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД

Настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида, комплементарного последовательности микроРНК человека miR-203b-3p, для лечения зуда, вызванного псориазом. Настоящее изобретение также относится к фосфолипидной везикуле, содержащей указанный олигонуклеотид, и к применению указанной фосфолипидной везикулы для лечения зуда, вызванного псориазом.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Псориаз - хроническое воспалительное заболевание кожи, возникающее в результате гиперпролиферации эпидермальных кератиноцитов.

Наиболее частой формой псориаза является бляшковидный псориаз (приблизительно 80% форм псориаза), характеризующийся образованием ярко-красных бляшек, покрытых белыми чешуйками, которые наиболее часто, но не исключительно, располагаются на разгибательных поверхностях конечностей. Помимо бляшковидного псориаза, существуют и другие формы псориаза: пустулезный псориаз, каплевидный псориаз, инверсный псориаз и эритродермический псориаз.

Пустулезный псориаз отличается от всех других форм псориаза появлением желтоватых пустул с гнойным содержимым. Он также ассоциирован с лихорадкой, недомоганием, парестезиями и ощущениями жжения.

Каплевидный псориаз характеризуется розово-красными пятнами, не покрытыми белыми чешуйками.

Что касается обратного псориаза, то он вызывает крупные розовые эритематозные очаги поражения, которые в наиболее тяжелых случаях могут осложняться образованием более или менее глубоких надрывов или трещин, которые вызывают боль и могут кровоточить.

Наиболее тяжелой формой псориаза, но, к счастью, более редкой, является эритродермический псориаз. Эритродермический псориаз характеризуется наличием эритемы, поражающей более 90% поверхности тела, которая ассоциирована также с другими важными симптомами, такими как озноб, ощущение холода, зуд и жжение, общее недомогание, учащенное сердцебиение, астения, лихорадка, отек лимфатических узлов, боли в мышцах и суставах. Эта форма псориаза является особенно инвалидизирующей для пациента и во многих случаях требует госпитализации.

Доступные в настоящее время способы терапии направлены на предотвращение ухудшения заболевания, а не на лечение зуда, который является характерным симптомом псориаза.

В частности, предлагаемые терапевтические решения включают местное лечение, фототерапию ультрафиолетовым (УФ) светом, иммунодепрессанты и системную терапию.

В частности, способы местного лечения основаны на применении кортикостероидов, местных аналогов витамина D₃, ингибиторов кальциневрина и/или тазаротена на псориазическом очаге повреждения.

Однако лечение кортикостероидами не лишено частых побочных эффектов, вызываемых кортикостероидами (раздражение, жжение, сухость кожи, гипопигментация). Поэтому кортикостероиды можно использовать только в течение коротких периодов времени.

Лечение аналогами кальциневрина позволяет избежать побочных эффектов кортикостероидов, но даже на сегодняшний день не ясно, могут ли они увеличить риск лимфомы и рака кожи.

Тазаротен - ретиноид, менее эффективный, чем кортикостероиды - может использоваться в качестве вспомогательного средства, но не в качестве монотерапии.

Другим вариантом лечения псориаза является фототерапия (или терапия УФ-светом), обычно используемая у пациентов с диффузным псориазом. Хотя лечение является более контролируемым, чем местная терапия, и может приводить к ремиссии, длящейся многие месяцы, повторное лечение может увеличить частоту возникновения рака кожи и меланомы, вызываемых УФ-излучением.

Иммунодепрессанты (например, гидроксимочевина, 6-тиогуанин) вызывают очень тяжелые побочные эффекты, имеют узкий предел безопасности и, таким образом, используются только в случаях тяжелого и резистентного псориаза.

Наконец, системное лечение можно проводить с помощью ретиноидов (например, ацитретин) или иммуномодулирующих средств [ингибиторы фактора некроза опухоли-альфа (TNF-альфа), такие как этанерцепт, адалимумаб, инфликсимаб и голимумаб]. Однако из-за потенциальной тератогенности и длительного времени удержания ретиноидов в организме, женщины, получающие терапию ацитретином, не должны быть беременными и иметь беременность в течение как минимум 2 лет после окончания лечения.

Более того, что касается упомянутых выше иммуномодулирующих средств, профиль их безопасности все еще изучается. Действительно, поскольку молекула TNF-альфа экспрессируется в нескольких органах и тканях, ее ингибирование может привести к серьезным побочным эффектам.

Таким образом, с биологической точки зрения было бы полезно идентифицировать специфичный для псориаза биомаркер, ингибирование которого не приводило бы к тяжелым побочным эффектам.

С одной стороны, отсутствие свободных от побочных эффектов лекарственных средств, а с другой стороны, известное наличие симптомов, от которых хронически страдает больной псориазом, прежде всего зуда, побуждают к поиску новых решений для лечения псориаза.

Таким образом, существует явная потребность в предоставлении продукта, который может предупреждать и/или лечить проявления псориаза, особенно зуд, не

вызывая побочных эффектов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявитель направил свои усилия на проблему предоставления новой терапии для лечения псориаза и, в частности, зуда, вызванного псориазом, которая не имеет недостатков и побочных эффектов существующих методов лечения.

Заявитель неожиданно обнаружил, что новая терапия на основе введения антисмыслового олигонуклеотида, комплементарного последовательности микроРНК miR-203b-3p, является пригодной, в частности, для лечения зуда, вызванного псориазом.

В рамках настоящего изобретения термин "антисмысловые олигонуклеотиды" относится к небольшим одноцепочечным молекулам ДНК или РНК, комплементарным определенной последовательности. Последовательность, с которой они связываются, обычно представляет собой молекулу мРНК, которая, будучи связанной с определенной нуклеотидной последовательностью, больше не способна транслироваться в белок.

В частности, антисмысловый олигонуклеотид для применения согласно настоящему изобретению способен связывать микроРНК miR-203b-3p, идентифицированную заявителем как ответственную за зуд при псориазе.

Связывание антисмыслового олигонуклеотида согласно изобретению с микроРНК miR-203b-3p ингибирует активность микроРНК miR-203b-3p и, следовательно, зуд.

Для предоставления эффективной терапии для лечения зуда при псориазе у людей, заявитель провел исследования на модели псориаза на мышах.

МикроРНК miR-203b-3p, присутствующая у мыши, имеет последовательность, которая отличается от человеческой только одним основанием (цитозин вместо пятого урацила ((SEQ: ID: NO. 1), как представлено в примере 2). Заявитель обнаружил, что применение имиквимода (5%) на коже мышей вызывало поражения, аналогичные тем, которые наблюдаются при псориазе у человека, и, в частности, вызывало утолщение эпидермиса, покраснение кожи и наличие бляшек, которые являются ответами, в совокупности количественно оцениваемыми в PASI (Индекс распространенности и тяжести псориаза) (фиг.1В и пример 1). Обработка имиквимодом (5%) у мышей также вызывала зуд.

Заявитель обнаружил, что этот зуд ингибировался подкожным введением олигонуклеотида, комплементарного последовательности микроРНК miR-203b-3p мыши ((SEQ: ID: NO. 2), как показано в примере 2).

Как показано в экспериментальном разделе, путем ингибирования miR-203b-3p мыши с помощью антисмыслового олигонуклеотида, имеющего последовательность, полностью комплементарную (SEQ: ID: NO. 2) последовательности указанной микроРНК miR-203b-3p мыши, стало возможным достигнуть уменьшения зуда в псориазических очагах, индуцированных обработкой имиквимодом (5%), у мышей.

Этот результат открывает путь к новым способам лечения зуда, вызванного псориазом, у человека. В частности, заявитель обнаружил, что антисмысловый олигонуклеотид, комплементарный последовательности микроРНК miR-203b-3p,

присутствующей у человека (SEQ: ID: NO. 3), имеющий последовательность (SEQ: ID: NO. 4) или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, еще более предпочтительно 80%, способен облегчить или, в зависимости от тяжести поражения, полностью излечить зуд, вызванный псориазом. Соответственно, первый аспект настоящего изобретения относится к антисмысловому олигонуклеотиду, комплементарному микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3), причем указанный олигонуклеотид, имеет последовательность (SEQ: ID: NO. 4) или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80%, для применения для лечения зуда, вызванного псориазом.

В предпочтительном варианте олигонуклеотид согласно изобретению обладает по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4).

В особенно предпочтительном варианте олигонуклеотид по изобретению обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4).

Антисмысловой олигонуклеотид для применения согласно изобретению содержит центральную последовательность из 8 нуклеотидов 5'-UUCUUAAC-3', которая распознает и ингибирует центральную часть 5'-GUUAAGAA-3' miR-203b-3p человека. Фактически, указанная центральная последовательность из 8-нуклеотидов 5'-UUCUUAAC-3' особенно важна для спаривания с miR-203b-3p человека и для ее ингибирования.

Антисмысловой олигонуклеотид, описанный в настоящей патентной заявке, может быть успешно использован для лечения зуда, вызванного всеми типами псориаза, предпочтительно для лечения зуда, вызванного бляшковидным псориазом.

Второй аспект настоящего изобретения относится к фосфолипидной везикуле, которая содержит по меньшей мере один антисмысловой олигонуклеотид, комплементарный микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3), причем указанный олигонуклеотид имеет последовательность (SEQ: ID: NO. 4) или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%.

Третий аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одну фосфолипидную везикулу согласно второму аспекту изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к применению олигонуклеотида, комплементарного последовательности микроРНК miR-203b-3p человека, для лечения зуда, вызванного псориазом. Фактически было выявлено, что miR-203b-3p в основном

ответственна за зуд, вызванный псориазом.

МикроРНК представляют собой небольшие эндогенные молекулы одноцепочечной некодирующей РНК длиной приблизительно 20-22 нуклеотида, и они, главным образом, активны в регуляции экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. В частности, микроРНК индуцируют сайленсинг генов вследствие перекрывания с комплементарными последовательностями, присутствующими на молекулах матричной РНК (мРНК). Такое связывание приводит к блокированию трансляции мРНК-мишени в белок посредством микроРНК или деградации указанной мРНК, являющейся мишенью микроРНК.

МикроРНК могут действовать, разрезая молекулу мРНК, дестабилизируя молекулу мРНК путем укорочения поли(А)-хвоста или снижая эффективность трансляции мРНК-мишени. Заявитель неожиданно обнаружил новую функцию микроРНК miR-203b-3p. Действительно, недавно было выявлено, что микроРНК не только выполняют функцию посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, но и действуют как лиганды, активно участвующие в жизни клетки.

Заявитель успешно провел эксперименты на модели псориаза на мышах, чтобы оценить эффективность антисмыслового олигонуклеотида в отношении микроРНК miR-203b-3p мыши при лечении зуда, вызванного псориазом (см. экспериментальный раздел). В частности, на основе последовательности микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1) была получена последовательность, комплементарная miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 2), у которой наблюдалась эффективность в отношении уменьшения зуда в модели псориаза на мышах.

Последовательность микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1) и последовательность олигонуклеотида (SEQ: ID: NO. 2), комплементарного микроРНК miR-203b-3p мыши, указаны ниже:

Последовательность микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1)

5'-UUG AAC UGU CAA GAA CCA CUG G-3'

Последовательность олигонуклеотида, комплементарного микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 2)

5'-CCA GUG GUU CUU GAC AGU UCA A-3'

Заявитель неожиданно обнаружил, что новая терапия на основе введения антисмыслового олигонуклеотида, комплементарного последовательности микроРНК miR-203b-3p человека, может использоваться, в частности, для лечения зуда, вызванного псориазом, у индивидуумов, страдающих от псориаза.

Соответственно, первый аспект настоящего изобретения относится к антисмысловому олигонуклеотиду, комплементарному микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3), причем указанный олигонуклеотид имеет последовательность (SEQ: ID: NO. 4) или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, для применения для

лечения зуда, вызванного псориазом.

В рамках настоящего изобретения термин "идентичность" означает идентичность последовательности, т.е. степень точного соответствия между двумя выровненными олигонуклеотидными последовательностями (также учитывая пропуски).

Антисмысловая олигонуклеотидная последовательность для применения согласно изобретению представлена ниже и обозначена идентификатором (SEQ: ID: NO. 4).

Последовательность антисмыслового олигонуклеотида (SEQ: ID: NO. 4), комплементарная микроРНК miR-203b-3p человека

5'-UCC AGU GGU UCU UAA CAG UUC AA-3' (SEQ: ID: NO. 4)

Антисмысловый олигонуклеотид для применения согласно изобретению способен спариваться с микроРНК miR-203b-3p человека и ингибировать ее действие.

В частности, микроРНК miR-203b-3p человека представляет собой микроРНК, имеющую последовательность, показанную ниже и обозначенную в настоящем описании идентификатором (SEQ: ID: NO. 3).

Последовательность микроРНК miR-203b-3p человека - (SEQ: ID: NO. 3)

5'-UUG AAC UGU UAA GAA CCA CUG GA-3' (SEQ: ID: NO. 3).

MiR-203b-3p представляет собой микроРНК, экспрессируемую на высоком уровне в коже, и результаты этого связаны с механизмами морфогенеза кожи. Фактически было показано, что на эмбриональных стадиях эта микроРНК на высоком уровне экспрессируется в клетках супрабазального слоя эпидермиса и связана с регуляцией механизмов пролиферации и дифференцировки эпидермальных клеток (Sand et al, MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ, J Dermatol Sci, 2009 53:169-75).

Антисмысловый олигонуклеотид для применения согласно изобретению предпочтительно состоит из 23 нуклеотидов и имеет последовательность, полностью комплементарную последовательности микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 4), или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере до 70% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%.

(SEQ: ID: NO. 4) представляет собой последовательность, полностью комплементарную последовательности микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3).

В особенно предпочтительном варианте осуществления указанный антисмысловый олигонуклеотид содержит центральную последовательность из 8 нуклеотидов 5'-UUCUUAAC-3', комплементарную центральной части микроРНК miR-203b-3p человека, имеющей последовательность 5'-GUUAAGAA-3'. В частности, первый урацил (U) центральной последовательности UUCUUAAC соответствует основанию девятого нуклеотида, а последний цитозин (C) центральной последовательности соответствует основанию шестнадцатого нуклеотида в олигонуклеотиде для применения по изобретению. Таким образом, центральная последовательность расположена от девятого нуклеотида до шестнадцатого нуклеотида в олигонуклеотиде для применения по

изобретению из 23 нуклеотидов.

(SEQ: ID: NO. 4) содержит центральную последовательность из 8 нуклеотидов 5'-UUCUUAAC-3', называемую ингибитором последовательности *CORE*. Указанная центральная последовательность, или ингибитор последовательности *CORE*, представляет собой центральную последовательность (SEQ: ID: NO. 4) олигонуклеотида для применения в соответствии с изобретением, подчеркнутую и выделенную полужирным шрифтом выше.

Центральная последовательность, или ингибитор последовательности *CORE*, способна спариваться с центральной частью микроРНК miR-203b-3p человека и ингибировать ее. Центральная часть микроРНК miR-203b-3p человека представляет собой последовательность *CORE* микроРНК miR-203b-3p человека и имеет последовательность 5'-GUUAAGAA-3'.

Центральная часть микроРНК miR-203b-3p человека подчеркнута и выделена полужирным шрифтом в последовательности микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3).

5'-UUG AAC **UGU UAA GAA** CCA CUG GA-3' (SEQ: ID: NO. 3).

Согласно изобретению антисмысловой олигонуклеотид, имеющий последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, способен уменьшать зуд, вызванный псориазом. Существенно, что антисмысловой олигонуклеотид для применения согласно изобретению распознает центральную часть микроРНК miR-203b-3p человека.

Таким образом, олигонуклеотид для применения согласно изобретению, имеющий последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, включающий центральную последовательность 5'-UUCUUAAC-3', способен уменьшать зуд, вызванный псориазом.

Антисмысловой олигонуклеотид, обладающий процентной идентичностью по меньшей мере 70% с олигонуклеотидом для применения согласно изобретению (SEQ: ID: NO. 4), может иметь последовательность, выбранную из следующих последовательностей:

5'-ACA ACU **UGU UCU UAA CAU** GUC CA-3' (SEQ: ID: NO. 5)

5'-UCA CGU **ACU UCU UAA CAU** UUA CA-3' (SEQ: ID: NO. 6)

5'-AUG ACU **GGU UCU UAA CAG** UAG UA-3' (SEQ: ID: NO. 7)

5'-AGC UCA **GGU UCU UAA CAG** UUC AA-3' (SEQ: ID: NO. 8)

5'-UUA AGU **GGU UCU UAA CAG** CUA CA-3' (SEQ: ID: NO. 9)

5'-UGC UGA **GGU UCU UAA CAG** ACC AA-3' (SEQ: ID: NO. 10)

5'-UCA AAC **GGU UCU UAA CAG** UUC AA-3' (SEQ: ID: NO. 11)

5'-UCC CGU **GGU UCU UAA CAG** CUC GA-3' (SEQ: ID: NO. 12)

5'-UGC AGC **GGU UCU UAA CAG** UUA AA-3' (SEQ: ID: NO. 13).

Последовательности (SEQ: ID: NO. 5) - (SEQ: ID: NO. 7) отличаются на 7

оснований относительно антисмысловой олигонуклеотидной последовательности (SEQ: ID: NO. 4), полностью комплементарной микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3).

В рамках настоящего изобретения предполагается, что последовательность, отличающаяся на 7 оснований от последовательности (SEQ: ID: NO. 4), имеет 70% идентичность последовательности с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4).

Последовательности (SEQ: ID: NO. 8)-(SEQ: ID: NO. 10) отличаются на 5 оснований от антисмысловой олигонуклеотидной последовательности (SEQ: ID: NO. 4), полностью комплементарной микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3).

В рамках настоящего изобретения предполагается, что последовательность, отличающаяся на 5 оснований от последовательности (SEQ: ID: NO. 4), имеет идентичность последовательности 78% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4).

Последовательности (SEQ: ID: NO. 11)-(SEQ: ID: NO. 13) отличаются на 3 основания от антисмысловой олигонуклеотидной последовательности (SEQ: ID: NO. 4), полностью комплементарной микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3). В рамках настоящего изобретения предполагается, что последовательность, отличающаяся на 3 основания от указанной последовательности (SEQ: ID: NO. 4), имеет идентичность последовательности 87% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4).

В одном из вариантов осуществления антисмысловой олигонуклеотид может иметь последовательность, отличающуюся на 1 или 2 основания от последовательности антисмыслового олигонуклеотида (SEQ: ID: NO. 4).

В рамках настоящего изобретения предполагается, что последовательность, отличающаяся на 1 или 2 основания от последовательности (SEQ: ID: NO. 4), имеет идентичность последовательности более 90% с указанной последовательностью (SEQ: ID: № 4).

Кроме того, все указанные последовательности (SEQ: ID: NO. 5) - (SEQ: ID: NO. 13) содержат центральную последовательность 5'-UUCUUAAC-3', как определено в настоящем описании, подчеркнутую в последовательностях.

Антисмысловой олигонуклеотид для применения согласно изобретению способен распознавать и связывать miR-203b-3p, но не способен распознавать и связывать miR-203a-3p.

В особенно предпочтительном варианте олигонуклеотид для применения согласно изобретению представляет собой антагомир микроРНК miR-203b-3p человека.

В биотехнологии термин "антагомир" предназначен для указания на класс химически сконструированных олигонуклеотидов, используемых для подавления представляющих интерес эндогенных микроРНК. В частности, антагомир представляет собой синтетическую РНК, абсолютно комплементарную представляющей интерес микроРНК, т.е. микроРНК, подлежащей ингибированию. В структуре антагомиров имеются модификации, делающие их более устойчивыми к деградации. Такие

модификации могут представлять собой, например, модификации нуклеотидного сахара, нуклеинового основания или межнуклеотидных связей.

В частности, применение согласно изобретению относится к лечению зуда, вызванного всеми типами псориаза: бляшковидным псориазом, пустулезным псориазом, каплевидным псориазом, инверсным псориазом и эритродермическим псориазом. Предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид, комплементарный микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3), причем указанный олигонуклеотид имеет последовательность (SEQ: ID: NO. 4) или последовательность обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной (SEQ: ID: NO. 4), можно использовать для лечения зуда, вызванного бляшковидным псориазом.

Путем спаривания с микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3) олигонуклеотид для применения согласно изобретению способен ингибировать прямую активность микроРНК miR-203b-3p человека в механизме, ответственном за зуд, вызванный псориазом.

Вторым аспектом настоящего изобретения является продукт, содержащий антисмысловой олигонуклеотид, комплементарный микроРНК miR-203b-3p человека. В частности, второй аспект настоящего изобретения представляет собой фосфолипидную везикулу, которая содержит по меньшей мере один антисмысловой олигонуклеотид, комплементарный микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3), причем указанный олигонуклеотид имеет последовательность (SEQ: ID: NO. 4) или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%.

Как описано выше, (SEQ: ID: NO. 4) представляет собой последовательность, полностью комплементарную микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3).

Фосфолипидная везикула по изобретению может содержать один или несколько олигонуклеотидов, имеющих последовательность, полностью комплементарную микроРНК miR-203b-3p (SEQ: ID: NO. 4), или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%.

В одном варианте осуществления везикула согласно изобретению может содержать один или несколько из олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 5), (SEQ: ID: NO. 6) и (SEQ: ID: NO. 7).

В одном варианте осуществления везикула согласно изобретению может содержать один или несколько из олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 8), (SEQ: ID: NO. 9) и (SEQ: ID: NO. 10).

В одном варианте осуществления везикула согласно изобретению может содержать один или несколько из олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 11), (SEQ: ID: NO. 12) и (SEQ: ID: NO. 13).

В другом варианте осуществления фосфолипидная везикула может содержать один или несколько из олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 5), (SEQ: ID: NO. 6) и (SEQ: ID: NO. 7), и/или один или несколько из олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 8), (SEQ: ID: NO. 9) и (SEQ: ID: NO. 10), и/или один или несколько из олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 11), (SEQ: ID: NO. 12) и (SEQ: ID: NO. 13).

В следующем варианте осуществления фосфолипидная везикула может содержать антисмысловой олигонуклеотид (SEQ: ID: NO. 4) и/или один или несколько нуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 5), (SEQ: ID: NO. 6) и (SEQ: ID: NO. 7), и/или один или несколько из олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 8), (SEQ: ID: NO. 9) и (SEQ: ID: NO. 10), и/или один или несколько из олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 11), (SEQ: ID: NO. 12) и (SEQ: ID: NO. 13).

Фосфолипидная везикула по изобретению может быть выбрана из липосом, фитосом, мицелл или их смесей, предпочтительно из липосом.

Липосомы являются широко используемой системой доставки плохо всасывающихся или низкорастворимых активных веществ, включая фармакологические активные вещества.

Благодаря тензидной природе составляющих их фосфолипидов, липосомы "инкапсулируют" активное вещество, в данном случае один или несколько олигонуклеотидов для применения согласно изобретению.

Преимущественно компоненты фосфолипидных слоев липосомы являются биосовместимыми и, следовательно, липосома не вызывает неблагоприятных эффектов.

Таким образом, ясно, что продукт согласно изобретению преимущественно позволяет доставлять высокие концентрации антисмыслового олигонуклеотида, как описано выше, так что он может действовать на микроРНК-мишень, т.е. микроРНК miR-203b-3p человека, и способствовать уменьшению зуда, вызванного псориазом, или даже его полному устранению.

В одном из вариантов фосфолипидная везикула согласно изобретению представляет собой фитосому.

Фитосомы представляют собой системы высвобождения, структурно родственные липосомам, которые получают путем присоединения отдельных ингредиентов растительных экстрактов к фосфатидилхолину.

Фитосомы представляют собой структуры, в которых активный ингредиент заякорен на полярной головке фосфолипида и становится неотъемлемой частью везикулярной мембраны, в отличие от липосом, в которых активный ингредиент обычно содержится внутри везикулярной структуры, образованной фосфолипидами.

В другом варианте фосфолипидная везикула согласно изобретению представляет собой мицеллу.

Мицеллы представляют собой сферические частицы, в которых фосфолипиды расположены полярными головками наружу, к водной среде, а хвостами внутрь мицелл.

Согласно указанному варианту осуществления мицеллы могут быть однослойными (монослойными) или двухслойными мицеллами (бислойными).

В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная фосфолипидная везикула представляет собой липосому.

В частности, липосома согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения имеет размеры от 100 нм до 800 нм, предпочтительно от 200 нм до 600 нм, еще более предпочтительно 400 нм.

Кроме того, указанная липосома предпочтительно характеризуется индексом полидисперсности от 0,2 до 0,4, предпочтительно 0,3.

Индекс полидисперсности является мерой неоднородности образца на основе размера. Полидисперсность может возникать из-за распределения по размерам в образце, или агломерации или агрегации образца во время выделения или анализа.

Фосфолипидная везикула предпочтительно состоит из кукурузного лецитина, подсолнечного лецитина, соевого лецитина, более предпочтительно из кукурузного лецитина.

Фосфолипидная везикула в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно липосома, может использоваться для лечения зуда, вызванного бляшковидным псориазом, пустулезным псориазом, каплевидным псориазом, инверсным псориазом и эритродермическим псориазом, предпочтительно бляшковидным псориазом. В частности, указанную фосфолипидную везикулу можно использовать для местного применения при псориазических поражениях с целью достижения уменьшения зуда или полного его устранения.

Третий аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей одну или несколько фосфолипидных везикул согласно второму аспекту изобретения и как описано выше.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать смесь липосом, фитосом и мицелл, содержащую один или несколько олигонуклеотидов для применения согласно изобретению.

В одном из вариантов композиция может содержать по меньшей мере одну фосфолипидную везикулу, содержащую по меньшей мере один антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность (SEQ: ID: NO. 4), и/или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%.

Согласно изобретению, композиция может дополнительно содержать один или несколько фармацевтически пригодных или фармацевтически приемлемых эксципиентов.

Выражение "фармацевтически приемлемый" предназначено для определения, без каких-либо конкретных ограничений, любого материала, подходящего для получения фармацевтической композиции, предназначенной для введения живому существу.

Выражение "фармацевтически пригодные эксципиенты" предназначено для

обозначения всех растворителей, разбавителей или других носителей, добавок для диспергирования или суспендирования, поверхностно-активных веществ, обеспечивающих изотоничность средств, загустителей или эмульгаторов, консервантов, твердых связующих веществ, смазывающих веществ и т.п.

Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых эксципиентов, включают, но не ограничиваются ими, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы, порошковую трагакантовую камедь, солод, желатин, тальк, эксципиенты, такие как масло какао и воск для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат, агар, буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия, альгиновую кислоту, апирогенную воду, изотонический солевой раствор, этиловый спирт и фосфатные буферные растворы, другие совместимые нетоксичные смазочные вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, красители, антиадгезивы, средства покрытия, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Фармацевтические формы могут также содержать другие традиционные ингредиенты, такие как консерванты, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, буферы, соли для контроля осмотического давления, эмульгаторы, подсластители, красители, вкусовые добавки и т.п.

Фармацевтическая композиция согласно третьему аспекту изобретения может быть составлена для местного применения, например, в форме крема, порошка или мази. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция имеет состав, пригодный для применения, в форме лечебного пластыря. Лечебные пластыри представляют собой продукты для дермального применения, которые наносятся на кожу и высвобождают заданные количества лекарственного средства контролируемым и постоянным образом.

В предпочтительном варианте композиция по изобретению составлена в форме крема.

Такую композицию, предпочтительно в форме крема, можно наносить местно на одно или несколько псориазических поражений для достижения постепенного уменьшения зуда или полного его устранения. Таким образом, композиция согласно изобретению может быть использована для местного лечения зуда, вызванного псориазом, в частности, бляшковидного псориаза, пустулезного псориаза, каплевидного псориаза, обратного псориаза и эритродермического псориаза.

Кроме того, настоящее описание относится к способу лечения зуда, вызванного псориазом, который включает местное применение по меньшей мере одного антисмыслового олигонуклеотида, имеющего последовательность (SEQ: ID: NO. 4) и/или последовательность обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с

последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%.

В частности, указанный способ лечения зуда, вызванного псориазом, включает местное нанесение одной или нескольких фосфолипидных везикул, как описано выше, предпочтительно в форме крема, по меньшей мере, на одно псориазическое поражение у индивидуума, страдающего от псориаза.

В одном варианте осуществления способ лечения также может включать введение лекарственного средства, обычно используемого для лечения псориаза.

Примерами таких лекарственных средств являются кортикостероиды, местные аналоги витамина D3, ингибиторы кальциневрина и/или тазаротен.

Одно или несколько вышеупомянутых лекарств можно вводить вместе по меньшей мере с одним олигонуклеотидом, имеющим последовательность (SEQ: ID: NO. 4) и/или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%. более предпочтительно по меньшей мере 80%, с последовательностью (SEQ: ID: NO. 4).

Одно или несколько лекарственных средств, обычно используемых для лечения псориаза, предпочтительно выбранных из кортикостероидов, местных аналогов витамина D3, ингибиторов кальциневрина и/или тазаротена, можно вводить до, после или одновременно с местным лечением антисмысловым олигонуклеотидом, как определено выше, возможно, инкапсулированным в фосфолипидную везикулу, как определено выше, или фармацевтической композицией согласно третьему аспекту изобретения.

Таким образом, комбинация фосфолипидной везикулы согласно второму аспекту изобретения с кортикостероидами, местными аналогами витамина D3, ингибиторами кальциневрина и/или тазаротеном для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении зуда, вызванного псориазом, может быть особенно эффективной для обеспечения полного заживления представляющего интерес псориазического поражения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 и 2 представлены эксперименты, проведенные на модели псориаза на мышах.

На фиг.3 представлены данные, полученные в экспериментах с модельными мышами с псориазом и контрольными мышами, которым вводили олигонуклеотид, имеющий последовательность, полностью комплементарную центральной части микроРНК miR-203b-3p мыши.

Подробное описание чертежей может быть найдено далее в примерах.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Модель псориаза на мышах

Исследование ингибирования микроРНК miR-203b-3p мыши антисмысловым олигонуклеотидом, имеющим последовательность, полностью комплементарную микроРНК miR-203b-3p мыши, проводили на мышинной модели псориаза,

индуцированного местной (кожной) обработкой имиквимодом (5%) в течение 6 дней подряд.

Эксперименты *in vivo* проводились в соответствии с итальянским законодательством (DLgs 26/2014) и рекомендациями европейского регламента (Директива ЕС 2010/63/EU). Исследование было проведено после одобрения протокола Министерством здравоохранения (разрешение на исследование № 511/2021-PR).

Для экспериментов использовали самцов мышей C57BL/6J в возрасте 5-8 недель массой 22-25 г, поставляемых компанией Charles River (Милан, Италия). Всего для проведения описанных ниже экспериментов использовали 24 мыши. Животных содержали в условиях контролируемой температуры и влажности (12-часовой цикл темнота/свет, свободный доступ к пище и воде). Эксперименты проводились в помещении с контролируемой температурой (от 20 до 22°C) с 8:00 до 20:00. В конце эксперимента животных умерщвляли посредством ингаляции смеси O₂ 50%/CO₂ 50% в течение 1 минуты.

За день до эксперимента мышам (24) брили спину электробритвой, оставшуюся шерсть удаляли кремом для депиляции.

На следующий день мышам (n=12) проводили местное нанесение 62,5 мг крема имиквимода (5%, Aldara; 3M Pharmaceuticals, Великобритания) на выбритую часть, что соответствует суточной дозе 3,125 мг активного соединения. Используемая доза представляет собой дозу, которая вызывает воспроизводимое воспаление кожи с характеристиками (специфический характер экспрессии цитокинов, гистопатологические изменения и клеточные инфильтраты), сходными с теми, которые наблюдаются у пациентов с псориазом (Van der Fits et al., 2009 Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis *J Immunol*, 2009, 182 (9) 5836-5845.; Yoshiki, R. et al. 2014 IL-23 from Langerhans Cells Is Required for the Development of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis by Induction of IL-17A-Producing $\gamma\delta$ T Cells. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1912-21).

Контрольных животных (n=12) обрабатывали носителем имиквимода, состоявшим из вазелинового крема (контрольный крем).

Нанесение крема осуществляли два оператора, один из которых удерживал животное неподвижно, а другой осуществлял нанесение крема с помощью ватного тампона.

Крем имиквимод (5%) или контрольный крем наносили на выбритую кожу спины мышей каждый день в течение 6 дней подряд.

На фиг.1А схематически показана схема обработки мышей имиквимодом или носителем имиквимода (упоминаемых как контрольные мыши).

Как можно видеть на фиг.1В, обработка кремом имиквимода вызвала у мышей псориазоподобные поражения. На фиг.1В можно видеть показатель PASI (Индекс распространенности и тяжести псориаза), определенный для контрольных мышей и мышей, обработанных имиквимодом. Данные представлены в качестве среднего

значения \pm SEM. * $p < 0,05$ по сравнению с носителем имиквимодом (контроль); статистический анализ с помощью t-критерия Стьюдента.

Индекс PASI - это дерматологический индекс, введенный в конце 1970-х годов для мониторинга эффективности способов лечения псориаза. Для оценки показателя PASI оценивают некоторые параметры и присваивают показатель от 0 (нет псориаза) до 72 (максимальное значение, тяжелый псориаз). В настоящем эксперименте для вычисления PASI оценивали следующие параметры: появление эритемы, образование чешуек и утолщение кожи. Каждый из этих параметров независимо оценивался по шкале от 0 до 4: 0 - нет, 1 - легкая, 2 - умеренный, 3 - значительный, 4 - максимальный. Совокупный показатель (эритема плюс шелушение плюс утолщение) использовали для определения тяжести воспаления (шкала 0-12). Оценку для каждой мыши усредняли. На фиг.1В можно видеть, что совокупный показатель PASI у мышей, обработанных имиквимодом, составляет $7,58 \pm 1,43$ по шкале от 0 до 12. Таким образом, разумно заключить, что обработка имиквимодом вызывала воспаление и типичные псориазные поражения. Таким образом, эти мыши являются хорошими моделями для изучения псориаза и способов лечения, пригодных для излечения указанного заболевания.

Пример 2 - Применение олигонуклеотида, имеющего последовательность, полностью комплементарную микроРНК miR-203b-3p мыши

В частности, заявитель обнаружил, что олигонуклеотид, имеющий последовательность (SEQ: ID: NO. 2), комплементарную последовательности микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1), способен спариваться со всей последовательности микроРНК miR-203b-3p мыши, ингибируя ее действие и блокируя итоговое возникновение зуда.

Последовательность микроРНК miR-203b-3p мыши, обозначаемая идентификатором (SEQ: ID: NO. 1), показана ниже:

Последовательность микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1)

5'-UUG AAC UGU CAA GAA CCA CUG G-3' (SEQ: ID: NO. 1)

Последовательность олигонуклеотида, комплементарного микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1), обозначаемая идентификатором (SEQ: ID: NO. 2), показана ниже:

Последовательность олигонуклеотида, комплементарного микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 2)

5'-CCA GUG GUU CUU GAC AGU UCA A-3' (SEQ: ID: NO. 2)

В частности, у мыши последовательность (SEQ: ID: NO. 2) представляет собой последовательность из 22 нуклеотидов, полностью комплементарную последовательности микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1).

Указанный олигонуклеотид (SEQ: ID: NO. 2) использовали для тестирования эффективности ингибирования микроРНК miR-203b-3p мыши и для оценки эффекта снижения зуда, вызванного псориазом, в моделях псориаза на мышах, так что эти результаты можно было бы транслировать на человека.

(SEQ: ID: NO. 2) представляет собой последовательность, полностью

комплементарную микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1). Аналог последовательности мыши (SEQ: ID: NO. 2) у человека, т.е. последовательность, полностью комплементарная микроРНК miR-203b-3p человека, представляет собой олигонуклеотид, имеющий последовательность (SEQ: ID: NO: 4).

В частности, мышей C57BL/6J обрабатывали имиквимодом (n=12), а контрольных мышей обрабатывали носителем имиквимода (вазелиновый крем) (n=12). Мышей, обработанных либо имиквимодом, либо носителем имиквимода, разделяли на две дополнительных экспериментальных группы, в которых 6 мышам, обработанным имиквимодом, и 6 мышам, обработанным носителем имиквимода, вводили последовательность, комплементарную микроРНК miR-203b-3p мыши (Integrated DNA Technologies IDT, Tema Ricerche), внутривожно (1 нмоль, 10 мкл) в область затылка мыши каждый день в течение 6 дней подряд после обработки имиквимодом или носителем имиквимода.

Кроме того, 6 мышам, обработанным имиквимодом, и 6 мышам, обработанным носителем имиквимода, вводили носитель ингибитора (раствор, в котором была разбавлена комплементарная последовательность, представляющий собой 0,9% раствор хлорида натрия, NaCl).

Введение комплементарной последовательности (SEQ: ID: NO. 2) или носителя проводили один раз в день с 1 по 6 день обработки имиквимодом или носителем имиквимода.

На 7 день после обработки кремом имиквимода (5%) или контрольным кремом и введения ингибитора с последовательностью, комплементарной микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 2), или носителя ингибитора, животных помещали на арену размером 30 × 30 см и записывали 1-часовое видео.

Затем видео просматривалось оператором, который подсчитывал, сколько раз животное почесало задней лапой область, которая была обработана кремом имиквимода (5%) или контрольным кремом после введения ингибитора с последовательностью, комплементарной микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 2), или носителя ингибитора.

Показатель количества раз, когда животное почесало себя задней лапой в области нанесения крема имиквимода (5%) или контрольного крема после введения последовательности, комплементарной микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: № 2), или носителя определяли как количество почесываний, и оно является индексом наличия зуда.

По оси абсцисс на фиг.2 термин "ингибитор" обозначает лечение, проведенное олигонуклеотидом (SEQ: ID: NO. 2), комплементарным микроРНК miR-203b-3p мыши, а термин "носитель ингибитора" указывает на лечение, проведенное раствором, в котором был разбавлен олигонуклеотид, комплементарный микроРНК miR-203b-3p мыши, представлявшим собой 0,9% раствор хлорида натрия, NaCl.

Как можно видеть на фиг.2, обработка имиквимодом (5%) индуцировала значительное увеличение количества почесываний по сравнению с животными,

обработанными контрольным кремом. Введение последовательности, комплементарной микроРНК miR-203b-3p мыши, было способно снизить у мышей, обработанных имиквимодом (5%) (мыши модели псориаза), количество почесываний в области нанесения крема имиквимода (5%).

Этот эксперимент показывает, что последовательность, полностью комплементарная микроРНК miR-203b-3p мыши, способна уменьшать зуд в модели на мышцах псориаза, вызванного имиквимодом (5%).

Данные показаны как среднее значение \pm SEM. * $p < 0,05$ по сравнению с носителем имиквимода (контроль); $\S p < 0,05$ по сравнению с имиквимодом/носителем ингибитора. Статистический анализ проводился с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Бонферрони.

Пример 3 - Применение олигонуклеотида, имеющего последовательность, полностью комплементарную центральной части микроРНК miR-203b-3p мыши

Чтобы определить эффективность центральной последовательности 5'-UUCUUAAC-3' антисмыслового олигонуклеотида для применения у человека, были проведены исследования на мышцах, в частности, путем тестирования олигонуклеотида, комплементарного центральной части микроРНК miR-203b-3p мыши. Указанный олигонуклеотид использовали для оценки эффекта уменьшения зуда, вызванного псориазом, в моделях псориаза на мышцах, так чтобы эти результаты можно было транслировать на человека.

Был получен антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность 5'-UUCUUGAC-3', комплементарную центральной части (последовательности CORE) 5'-GUCAAGAA-3' микроРНК miR-203b-3p мыши. В частности, антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность 5'-UUCUUGAC-3', представляет собой последовательность из 8 нуклеотидов у мыши, которая полностью комплементарна последовательности CORE микроРНК miR-203b-3p мыши.

Антисмысловый олигонуклеотид, используемый в настоящем эксперименте, представляет собой последовательность, полностью комплементарную центральной части, или последовательности CORE, последовательности микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 1), представленной в примере 2.

Последовательность 5'-UUCUUGAC-3' представляет собой центральную последовательность, или ингибитор последовательности CORE, олигонуклеотида, комплементарного центральной последовательности микроРНК miR-203b-3p мыши (SEQ: ID: NO. 2), представленной в примере 2.

Для этого эксперимента мышей C57BL/6J обрабатывали имиквимодом (n=12), а контрольных мышей обрабатывали носителем имиквимода (вазелиновый крем) (n=12). Мышей, обработанных имиквимодом или носителем имиквимода, разделяли на две дополнительных экспериментальных группы, в которых 6 мышам, обработанным имиквимодом, и 6 мышам, обработанным носителем имиквимода, вводили антисмысловый олигонуклеотид, имеющий последовательность 5'-UUCUUGAC-3',

комплементарную центральную часть, или последовательности CORE, микроРНК miR-203b-3p мыши (Integrated DNA Technologies IDT, Tema Ricerche) (обозначаемый "ингибитором CORE seq" на фиг.3), внутрикожно (1 нмоль, 10 мкл) в область затылки мышей каждый день в течение 6 дней подряд после обработки имиквимодом (5%) или носителем имиквимода.

Кроме того, 6 мышам, обработанным имиквимодом (5%), и 6 мышам, обработанным носителем имиквимода, вводили носитель антисмыслового олигонуклеотида, т.е. раствор, в котором была разбавлена последовательность, комплементарная центральной последовательности, или последовательности CORE, представляющий собой 0,9% раствор хлорида натрия, NaCl (называемый "носитель ингибитора CORE seq" на фиг.3).

Введение антисмыслового олигонуклеотида или носителя проводили один раз в день с 1 по 6 день обработки имиквимодом (5%) или носителем имиквимода.

На 7 день после обработки кремом имиквимода (5%) или контрольным кремом и введения олигонуклеотида, имеющего последовательность, комплементарную центральной части микроРНК miR-203b-3p мыши, или носителя, животных помещали на арену размером 30 × 30 см и записывали 1-часовое видео.

Затем видео просматривалось оператором, который подсчитывал, сколько раз животное почесало задней лапой область, которая была обработана кремом имиквимода (5%) или контрольным кремом после антисмыслового олигонуклеотида, как определено выше, или носителя.

Показатель количества раз, когда животное почесало себя, является показателем наличия зуда и определяется как количество царапин на фиг.3.

Как можно видеть на фиг.3, обработка имиквимодом (5%) вызывает значительное увеличение количества почесываний по сравнению с животными, обработанными контрольным кремом. Введение антисмыслового олигонуклеотида, комплементарного центральной части микроРНК miR-203b-3p мыши (представленного на фиг.3 как «ингибитор CORE Seq»), способствовало уменьшению у мышей, обработанных имиквимодом (5%) (модель псориаза на мышах), количества почесываний в области нанесения крема имиквимода (5%).

Этот эксперимент показывает, что олигонуклеотид, имеющий последовательность, полностью комплементарную центральной части микроРНК miR-203b-3p мыши, способен уменьшать зуд в модели на мышах псориаза, индуцированного имиквимодом (5%).

Данные представлены в качестве среднего значения ± SEM. *p < 0,05 по сравнению с носителем имиквимода (контроль); §p < 0,05 против имиквимода/ингибитора CORE Seq. Статистический анализ проводился с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Бонферрони.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид, комплементарный микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3), причем указанный олигонуклеотид имеет последовательность (SEQ: ID: NO. 4) или последовательность, обладающую процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, для применения для лечения зуда, вызванного псориазом.

2. Антисмысловой олигонуклеотид для применения по п.1, где указанный антисмысловой олигонуклеотид содержит центральную последовательность из 8 нуклеотидов 5'-UUCUUAAC-3'.

3. Антисмысловой олигонуклеотид для применения по п.2, где первый урацил (U) в центральной последовательности UUCUUAAC соответствует основанию девятого нуклеотида в олигонуклеотиде для применения согласно изобретению и последний цитозин (C) центральной последовательности соответствует основанию шестнадцатого нуклеотида в олигонуклеотиде для применения согласно изобретению.

4. Антисмысловой олигонуклеотид для применения по п.2 или 3, где указанная центральная последовательность 5'-UUCUUAAC-3' в указанной последовательности (SEQ: ID: NO. 4) связывает центральную часть 5'-GUUAAGAA-3' последовательности (SEQ: ID: NO. 3) микроРНК miR-203b-3p человека.

5. Олигонуклеотид для применения по любому из предшествующих пп., где указанный антисмысловой олигонуклеотид имеет форму антагомира микроРНК miR-203b-3p человека (SEQ: ID: NO. 3).

6. Антисмысловой олигонуклеотид для применения по п.1, где указанный антисмысловой олигонуклеотид, обладающий процентной идентичностью по меньшей мере 70% с указанной последовательностью (SEQ: ID: NO. 4), выбран из группы, которая включает следующие последовательности:

- 5'-ACA ACU UGU UCU UAA CAU GUC CA-3' (SEQ: ID: NO. 5)
- 5'-UCA CGU ACU UCU UAA CAU UUA CA-3' (SEQ: ID: NO. 6)
- 5'-AUG ACU GGU UCU UAA CAG UAG UA-3' (SEQ: ID: NO. 7)
- 5'-AGC UCA GGU UCU UAA CAG UUC AA-3' (SEQ: ID: NO. 8)
- 5'-UUA AGU GGU UCU UAA CAG CUA CA-3' (SEQ: ID: NO. 9)
- 5'-UGC UGA GGU UCU UAA CAG ACC AA-3' (SEQ: ID: NO. 10)
- 5'-UCA AAC GGU UCU UAA CAG UUC AA-3' (SEQ: ID: NO. 11)
- 5'-UCC CGU GGU UCU UAA CAG CUC GA-3' (SEQ: ID: NO. 12)
- 5'-UGC AGC GGU UCU UAA CAG UUA AA-3' (SEQ: ID: NO. 13).

7. Антисмысловой олигонуклеотид для применения по любому из предшествующих пп., где указанный псориаз выбран из бляшковидного псориаза, пустулезного псориаза, каплевидного псориаза, инверсного псориаза и эритродермического псориаза.

8. Антисмысловой олигонуклеотид для применения по п.7, где указанный псориаз

представляет собой бляшковидный псориаз.

9. Фосфолипидная везикула, которая содержит по меньшей мере антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп.1-6.

10. Фосфолипидная везикула по п.9, содержащая по меньшей мере олигонуклеотид, выбранный из группы олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 5), (SEQ: ID: NO. 6), (SEQ: ID: NO. 7), (SEQ: ID: NO. 8), (SEQ: ID: NO. 9), (SEQ: ID: NO. 10), (SEQ: ID: NO. 11), (SEQ: ID: NO. 12) и (SEQ: ID: NO. 13).

11. Фосфолипидная везикула по п.9, содержащая олигонуклеотид, имеющий последовательность (SEQ: ID: NO. 4) и по меньшей мере дополнительный олигонуклеотид, выбранный из группы олигонуклеотидов, имеющих последовательность (SEQ: ID: NO. 5), (SEQ: ID: NO. 6), (SEQ: ID: NO. 7), (SEQ: ID: NO. 8), (SEQ: ID: NO. 9), (SEQ: ID: NO. 10), (SEQ: ID: NO. 11), (SEQ: ID: NO. 12) и (SEQ: ID: NO. 13).

12. Фосфолипидная везикула по любому из пп. 9-11, выбранная из липосом, фитосом, мицелл или их смесей.

13. Фосфолипидная везикула по п.12 в форме липосомы.

14. Фосфолипидная везикула по любому из пп. 9-13 для применения для лечения зуда, вызванного бляшковидным псориазом, пустулезным псориазом, каплевидным псориазом, инверсным псориазом и эритродермическим псориазом.

15. Фосфолипидная везикула по п.14, где указанный псориаз представляет собой бляшковидный псориаз.

16. Фармацевтическая композиция, которая содержит по меньшей мере фосфолипидную везикулу по любому из пп. 9-15 и один или несколько фармацевтически пригодный или фармацевтически приемлемый эксципиент(ов).

17. Фармацевтическая композиция по п.16 в форме крема, порошка или мази.

18. Композиция по п.17 в форме крема для местного применения.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-18 для применения посредством лечебного пластыря.

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-19 для применения для лечения зуда, вызванного бляшковидным псориазом, пустулезным псориазом, каплевидным псориазом, инверсным псориазом и эритродермическим псориазом.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, где указанный псориаз представляет собой бляшковидный псориаз.

22. Способ лечения зуда, вызванного псориазом, включающий местное нанесение на по меньшей мере один псориазический очаг поражения индивидуума, страдающего от псориаза, терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 16-19.

23. Способ лечения по п.22, дополнительно включающий введение по меньшей мере одного лекарственного средства для лечения псориаза.

24. Способ лечения по п.23, где указанное по меньшей мере одно лекарственное средство для лечения псориаза выбрано из кортикостероидов, местных аналогов витамина D3, ингибиторов кальциневрина и/или тазаротена.

25. Способ лечения по п.23 или 24, где указанное по меньшей мере одно лекарственное средство для лечения псориаза вводят до, после или одновременно с местным лечением композицией по пп.16-19.

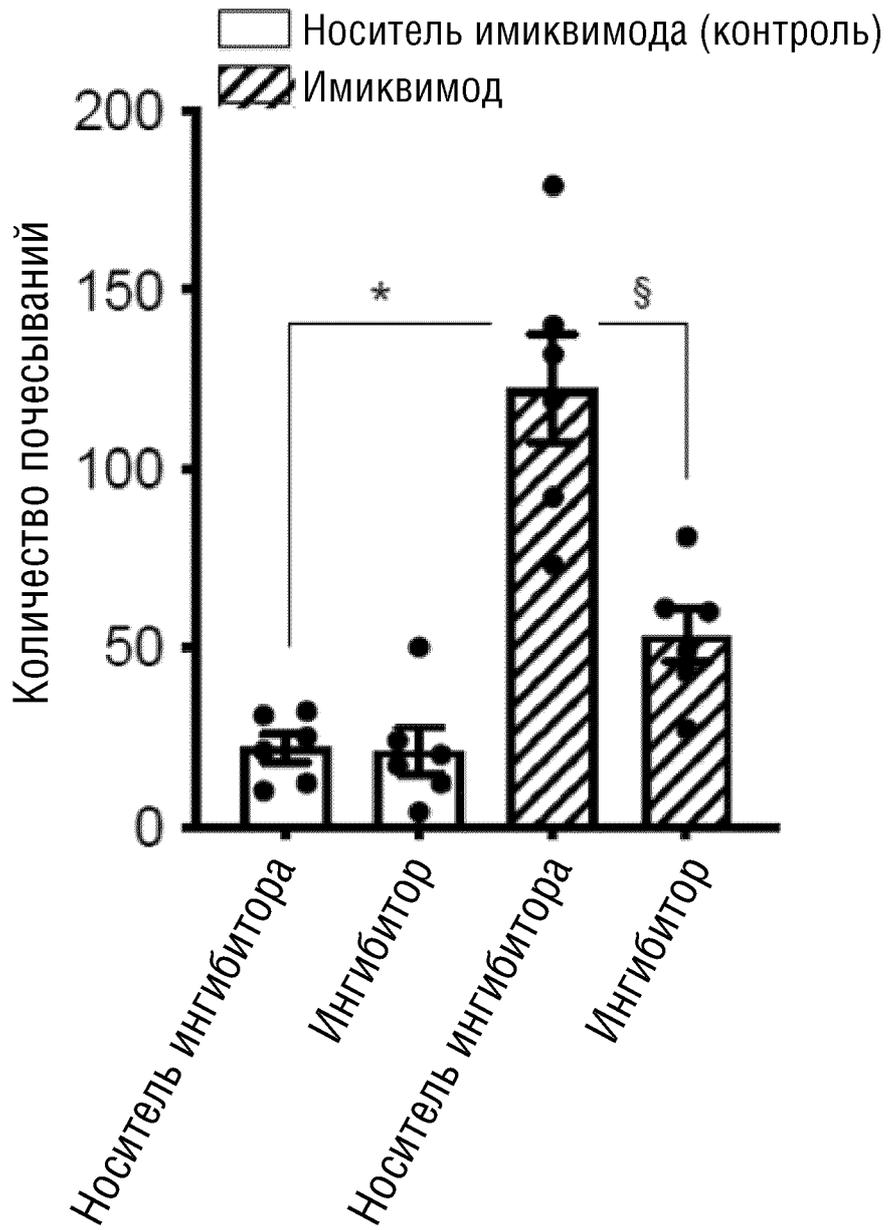
ФИГ.1А



ФИГ.1В



ФИГ.2



ФИГ.3

