

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090393 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.05.20

(22) Дата подачи заявки  
2018.07.30

(51) Int. Cl. *A61K 31/713* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 31/7105* (2006.01)  
*A61K 47/54* (2017.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 11/00* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ОТ ФИБРОЗА

(31) 2017-146957

(32) 2017.07.28

(33) JP

(86) PCT/JP2018/028459

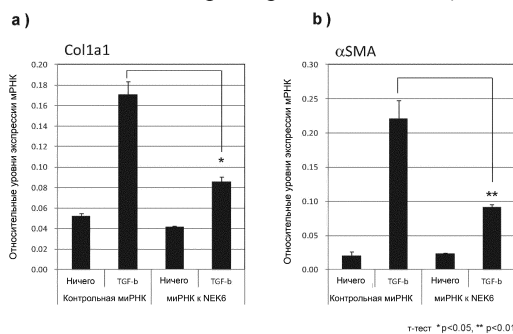
(87) WO 2019/022257 2019.01.31

(71) Заявитель:  
КЁРИН ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО.,  
ЛТД. (JP)

(72) Изобретатель:  
Накао Кадзухиса, Исияма Дзюнити,  
Итикава Ватару, Масуй Ацуси,  
Акасака Юникэ, Тоёфуку Хидэкадзу,  
Хонда Ая (JP)

(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Раскрыт ингибитор фосфорилирования белка SMAD2/3 или терапевтическое средство от фиброза, которое включает в качестве активного ингредиента нуклеиновую кислоту, подавляющую экспрессию гена NEK6 (NIMA-связанной серин/треонинкиназы 6).



A1

202090393

202090393

A1

## ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ОТ ФИБРОЗА

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая подавляет экспрессию гена НЕК6, и к лекарственному средству, включающему молекулу нуклеиновой кислоты в качестве активного ингредиента.

Предшествующий уровень техники

Фиброз представляет собой заболевание, при котором функция органов нарушается из-за чрезмерного накопления коллагена, что приводит к необратимому прогрессированию, и, например, кожа, легкие, печень, поджелудочная железа, почка, костный мозг и т.п. известны как органы, подверженные заболеванию. Идиопатический легочный фиброз (IPF), который является разновидностью фиброза легкого, в Японии считается не поддающимся лечению заболеванием, потому что, хотя распространенность заболевания не высока и представлена примерно двадцатью пациентами на сто тысяч населения, после лечения прогноз сомнителен, так как представлен средним периодом выживания от 2,5 до 5 лет после подтверждения диагноза.

В качестве терапевтических препаратов для лечения IPF Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии были одобрены и были выпущены к настоящему времени пирфенидон и нинтеданиб. Хотя оба лекарственных средства показывают прекращение снижения жизненной емкости и увеличивают выживаемость без прогрессирования и замедляют прогрессирование патологического состояния, их нельзя считать достаточно удовлетворительными с точки зрения терапевтической эффективности, в связи с чем была востребована разработка терапевтического лекарственного средства на основе нового механизма.

Хотя «белок НЕК6», который является мишенью настоящего изобретения, известен как один из семейства серин/треонинкиназ, связанных с NIMA, участвующих в контроле деления клеток, данный белок не привлекал к себе внимание как объект исследования для разработки лекарственного средства до настоящего времени. Хотя сообщалось, что в 2002 году данный белок мог стать целью разработки лекарств от онкологических заболеваний, нет конкретных сообщений о том, что белок НЕК6 взаимодействует с белком SMAD2/3 и способствует фиброгенезу тканей.

Список литературы

Патентная литература

Патентный документ 1: Публикация заявки на патент США № 2004/0097441

Краткое изложение изобретения

Техническая проблема

Задачей настоящего изобретения является создание нового ингибитора фосфорилирования белка SMAD2/3 и терапевтического средства от фиброза.

Решение проблемы

Авторы обратили внимание на факт обнаружения повышения уровня мРНК NEK6 (NIMA-связанной серин/треонинкиназы 6) при анализе модели фиброза легкого, индуцированного блеомицином, затем продолжили свои исследования и в результате обнаружили, что NEK6 контролирует систему передачи сигналов SMAD, которая способствует фиброгенезу далее от TGF- $\beta$ , и пришли к созданию настоящего изобретения.

Настоящее изобретение заключается в следующем:

[1] ингибитор фосфорилирования белка SMAD2/3, включающий нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена NEK6 в качестве активного ингредиента;

[2] терапевтическое средство от фиброза, содержащее нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена NEK6 в качестве активного ингредиента;

[3] терапевтическое средство по [2], где терапевтическое средство от фиброза легкого, фиброза печени или фиброза почки;

[4] двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, состоящей из следующих (a), (b), (c), (d) и (e):

(a) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6 на 3' конце или 5' конце,

(b) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7 на 3' конце или 5' конце,

(c) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8 на 3' конце или 5' конце,

(d) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 9 на 3' конце или 5' конце, и

(e) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 5 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 10 на 3' конце или 5' конце;

[5] Двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты по [4], где от 1 до 11 рибонуклеотидных остатков и/или дезоксирибонуклеотидных остатков дополнительно добавляют к 3' концу направляющей цепи (антисмысловой цепи) и/или сопровождающей цепи (смысловой цепи), чтобы сформировать выступающий конец;

[6] Одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, образующая шпилечную структуру РНК, в которой 3'-конец сопровождающей цепи (смысловой цепи) и 5'-конец направляющей цепи (антисмысловой цепи), указанных в [4] или [5], связаны друг с другом через линкерную последовательность нуклеотидов и/или линкер ненуклеотидной структуры или 3' конец направляющей цепи (антисмысловой цепи) и 5' конец сопровождающей цепи (смысловые цепи), указанных в [4] или [5], связаны друг с другом через линкерную последовательность нуклеотидов и/или линкер ненуклеотидной структуры;

[7] Одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты из следующих (А) или (В), включающая последовательность, подавляющую экспрессию гена НЕК6, выбранную из SEQ ID NO: 1-5:

(А) молекула нуклеиновой кислоты, включающая или состоящая только из области (X), линкерной области (Lx) и области (Xc),

причем область (Xc), линкерная область (Lx) и область (X) расположены в этом порядке от 5' конца к 3' концу,

где область (Xc) является комплементарной области (X),

где линкерная область (Lx) имеет ненуклеотидную структуру, включающую по меньшей мере один из числа пирролидинового остова и пиперидинового скелета, и

где область (X) содержит последовательность, подавляющую экспрессию;

(В) молекула нуклеиновой кислоты, включающая область (Xc), линкерную область (Lx), область (X), область (Y), линкерную область (Ly) и область (Yc) в этом порядке от 5'

конца к 3' концу,

где область (X) и область (Y) связаны и образуют внутреннюю область (Z),

где область (Xc) является комплементарной области (X),

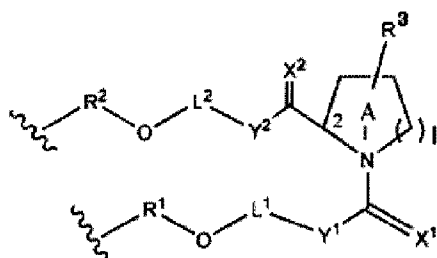
где область (Yc) является комплементарной области (Y), и

где линкерная область (Lx) и/или линкерная область (Ly) имеют нуклеотидную структуру, включающую по меньшей мере один из числа пирролидинового остова и пиперидинового скелета, и

где внутренняя область (Z) содержит последовательность, подавляющую экспрессию;

[8] Одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты по [7], где линкерная область (Lx) и/или (Ly) представлена в виде следующей формулы (I):

[Химическая Формула 1]



... (I)

в которой

$X^1$  и  $X^2$ , каждый независимо, представляют собой  $H_2$ , O, S или NH;

$Y^1$  и  $Y^2$ , каждый независимо, представляют собой одинарную связь,  $CH_2$ , NH, O или S;

$R_3$  представляет собой атом водорода или заместитель, связанный с C-3, C-4, C-5 или C-6 в кольце A;

$L^1$  представляет собой алкиленовую цепь с n числом атомов углерода, где каждый из атомов водорода на алкиленовом атоме углерода может быть замещен или не замещен OH,  $OR^a$ ,  $NHR^a$ ,  $NR^aR^b$ , SH или  $SR^a$ , или

$L^1$  представляет собой полиэфирную цепь, в которой один или несколько атомов углерода в алкиленовой цепи заменены одним или несколькими атомами кислорода,

при условии, что если  $Y^1$  представляет собой NH, O или S, то атом в  $L^1$ , связанный с  $Y^1$ , представляет собой углерод, атом в  $L^1$ , связанный с  $OR^1$ , представляет собой углерод, и атомы кислорода не соседствуют друг с другом;

$L^2$  представляет собой алкиленовую цепь, имеющую m атомов углерода, причем каждый из атомов водорода на алкиленовом атоме углерода может быть замещен или не

замещен OH, OR<sup>c</sup>, NH<sub>2</sub>, NHR<sup>c</sup>, NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>, SH или SR<sup>c</sup>, или

L<sup>2</sup> представляет собой полиэфирную цепь, в которой один или несколько атомов углерода в алкиленовой цепи заменены одним или несколькими атомами кислорода,

при условии, что если Y<sup>2</sup> представляет собой NH, O или S, то атом в L<sup>2</sup>, связанный с Y<sup>2</sup>, представляет собой углерод, атом в L<sup>2</sup>, связанный с OR<sup>2</sup>, представляет собой углерод, и атомы кислорода не соседствуют друг с другом;

R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> и R<sup>d</sup> каждый независимо представляет собой заместитель или защитную группу;

l равно 1 или 2;

m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 30;

n представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 30;

один атом углерода в кольце A, отличный от C-2, может быть заменен азотом, кислородом или серой,

кольцо A может содержать двойную связь углерод-углерод или двойную связь углерод-азот,

область (X<sub>c</sub>) и область (X) каждый связан с линкерной областью (L<sub>x</sub>) через -OR<sup>1</sup>- или OR<sup>2</sup>, и

область (Y<sub>c</sub>) и область (Y) каждый связан с линкерной областью (L<sub>y</sub>) через -OR<sup>1</sup>- или OR<sup>2</sup>-;

где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> могут присутствовать или не присутствовать, и, если присутствуют, каждый из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляет собой нуклеотидный остаток или структуру (I);

[9] Одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты по [7] или [8], где X или Z включают последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-25;

[10] Способ ингибирования фосфорилирования белка SMAD2/3, включающий введение объекту нуклеиновой кислоты, которая подавляет экспрессию гена NEK6;

[11] Способ лечения фиброза, включающий введение объекту нуклеиновой кислоты, которая подавляет экспрессию гена NEK6;

[12] нуклеиновая кислота, которая подавляет экспрессию гена NEK6 для применения при ингибировании фосфорилирования белка SMAD2/3;

[13] нуклеиновая кислота, которая подавляет экспрессию гена NEK6 для применения при лечении фиброза;

[14] Применение нуклеиновой кислоты, которая подавляет экспрессию гена NEK6, для получения ингибитора фосфорилирования белка SMAD2/3; и

[15] Применение нуклеиновой кислоты, которая подавляет экспрессию гена NEK6,

для получения терапевтического средства от фиброза.

[16] Применение по [15], где нуклеиновая кислота, которая подавляет экспрессию гена NEK6, представляет собой нуклеиновую кислоту, включающую последовательность, подавляющую экспрессию в KB-001 -011 (подчеркнутая часть).

Полезные эффекты изобретения

Согласно настоящему изобретению предлагаются новый ингибитор фосфорилирования белка SMAD2/3 и терапевтическое средство от фиброза.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой рисунок, показывающий кодирующую область последовательности NEK6 и сайт-мишень молекулы ssPN, изготовленной в Примере 7.

Фигура 2 представляет собой схематические диаграммы, показывающих пример молекул нуклеиновых кислот в качестве активного ингредиента ингибитора фосфорилирования белка SMAD2/3 по настоящему изобретению (молекула ssPN).

Фигура 3 представляет схематические диаграммы, показывающие пример молекул нуклеиновой кислоты в качестве активного ингредиента ингибитора фосфорилирования белка SMAD2/3 по настоящему изобретению (молекулы ssPN или молекулы ssNc).

Фигура 4 представляет схематические диаграммы, показывающие пример молекул нуклеиновой кислоты в качестве активного ингредиента ингибитора фосфорилирования белка SMAD2/3 по настоящему изобретению (молекулы ssPN или молекулы ssNc).

Фигура 5 представляет схематические диаграммы, показывающие пример молекул нуклеиновой кислоты в качестве активного ингредиента ингибитора фосфорилирования белка SMAD2/3 по настоящему изобретению (молекула ssNc).

Фигура 6 представляет собой график, показывающий количество транскриптов гена NEK6 при введении миРНК.

Фигура 7a представляет результаты вестерн-блоттинга для фосфорилированного белка SMAD3, когда NEK6 был подвергнут нокдауну. Фигура 7b представляет результаты вестерн-блоттинга для фосфорилированного белка SMAD2, когда NEK6 был подвергнут нокдауну.

Фигура 8a представляет результаты совместной иммунопреципитации с анти-NEK6 антителом. Фигура 8b представляет результаты совместной иммунопреципитации с анти-FLAG антителом.

Фигура 9 представляет результаты вестерн-блоттинга для фосфорилированного белка SMAD3, при реакции His-слитого белка NEK6 и GST-слитого белка SMAD3.

Фигура 10a представляет результаты вестерн-блоттинга, когда NEK6 был подвергнут нокдауну. Фигура 10b показывает количество люминесценции люциферазы

светлячка при нокдауне NEK6.

Фигура 11a показывает количество транскриптов гена *Colla1* при нокдауне NEK6.

Фигура 11b показывает количества транскриптов гена  $\alpha$ SMA при нокдауне NEK6.

Фигура 12a показывает количество транскриптов гена *Colla1* при нокдауне NEK6.

Фигура 12b показывает количество транскриптов гена  $\alpha$ SMA при нокдауне NEK6.

Фигура 13 представляет результаты вестерн-блоттинга для фосфорилированного белка SMAD3 (pSMAD3), когда миРНК к NEK6 были введены в звездчатые клетки печени.

Фигура 14 представляет результаты вестерн-блоттинга для фосфорилированного белка SMAD3 (pSMAD3), когда различные миРНК NEK6 были введены в звездчатые клетки печени.

Фигура 15a показывает количество транскриптов NEK6, когда NEK6 был разрушен в звездчатых клетках печени. На Фигуре 15b показаны количества транскриптов фибронектина, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в звездчатых клетках печени. На Фигуре 15c показаны количества транскриптов гена  $\alpha$ SMA, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в звездчатых клетках печени.

Фигура 16 представляет результаты вестерн-блоттинга для фосфорилированного белка SMAD3, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в фибробластах почки.

На Фигуре 17a представлены результаты измерения GPT сыворотки, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях CCl<sub>4</sub>. Фигура 17b представляет результаты измерения GOT сыворотки, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях CCl<sub>4</sub>.

Фигура 18 представляет результаты вестерн-блоттинга для фосфорилированного белка SMAD3, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях CCl<sub>4</sub>.

Фигура 19a показывает количество транскриптов гена NEK6, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях CCl<sub>4</sub>. На Фигуре 19b показаны количества транскриптов гена *Colla1*, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях CCl<sub>4</sub>. На Фигуре 19c показаны количества транскриптов гена *Col3a1*, когда ген NEK6 был подвергнут нокдауну в моделях CCl<sub>4</sub>. На Фигуре 19d показаны количества транскриптов гена *Timp1*, когда ген NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях CCl<sub>4</sub>.

На фигуре 20a показано количество транскриптов гена NEK6, когда NEK6 был подвергнут нокдауну в моделях BDL. На Фигуре 20b показаны количества транскриптов гена *Colla1*, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях BDL. На Фигуре 20c показано количество транскриптов гена *Col3a1*, когда ген NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях BDL. На Фигуре 20d показаны количества транскриптов гена *Timp1*, когда ген NEK6 был подвергнут нокдауну, в моделях BDL.



Фигура 21 представляет результаты патологического анализа печени, когда НЕК6 был подвергнут нокдауну, в моделях CCl<sub>4</sub>. Фигура 21a представляет собой результат группы физиологического раствора, не получавшей CCl<sub>4</sub>. Фигура 21b представляет результат группы введения растворителя, получавшей CCl<sub>4</sub>. Фигура 21c представляет результат группы введения нуклеиновой кислоты, получавшей CCl<sub>4</sub>.

#### Описание воплощений

Используемые в данном документе термины общеупотребимы в данной области, если не указано иное. Кроме того, в настоящем изобретении «количество нуклеотидов» означает, например, «длину» и может также упоминаться как «длина в нуклеотидах». В настоящем изобретении диапазон количества нуклеотидов раскрывает, например, все положительные целые числа, попадающие в диапазон, и в качестве конкретного примера описание «от 1 до 4 нд» означает раскрытие всех «1, 2, 3, 4 нд».

Настоящее изобретение относится к ингибитору фосфорилирования белка SMAD2/3, включающему нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена НЕК6 в качестве активного ингредиента, и к терапевтическому средству от фиброза, включающему нуклеиновую кислоту в качестве активного ингредиента. Далее содержание настоящего изобретения будет описано подробно.

#### (1) Нуклеиновые кислоты, которые подавляют экспрессию гена НЕК6

Белок НЕК6 является одной из 11 семейств NIMA-связанных серин/треонинкиназ, участвующих в контроле клеточного деления, и фосфорилируется (активируется) в M-фазе клеточного цикла.

Ген НЕК6, который является мишенью по настоящему изобретению, представляет собой ген, полученный от млекопитающего, и предпочтительно представляет собой ген человеческого происхождения. Для гена НЕК6 человека описаны 7 вариантов, один из которых, область кодирующей последовательности изоформы 2, показан на Фигуре 1 (SEQ ID NO: 56).

Механизм подавления экспрессии гена НЕК6 молекулой нуклеиновой кислоты ничем конкретно не ограничен и просто необходим для того, чтобы экспрессия была подавлена. Подавление экспрессии гена НЕК6 может быть подтверждено по снижению выработки продукта транскрипции гена НЕК6, снижению выработки продукта трансляции гена НЕК6 или снижению активности продукта трансляции.

Нуклеиновые кислоты, которые подавляют экспрессию гена НЕК6, включают антисмысловые полинуклеотиды, миРНК, молекулы омПН (ssPN), молекулы ssNc, миРНК, рибозимы и т.п. к мРНК НЕК6.

Специалисты в данной области могут легко получить антисмысловые

полинуклеотиды, миРНК, молекулы ssPN, молекулы ssNc и рибозимы на основе нуклеотидной последовательности гена NEK6 человека, описанного выше. Предпочтительно, это нуклеиновая кислота, полученная на основе последовательности области кодирующей последовательности изоформы 2 NEK6 (SEQ ID NO: 56).

## (2) миРНК

миРНК (короткая интерферирующая РНК), одна из нуклеиновых кислот, которые подавляют экспрессию гена NEK6, будет описана ниже.

миРНК представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая состоит из направляющей цепи (антисмысловой цепи) для спаривания с целевым геном и сопровождающей цепи (смысловой цепи), образующей двойную цепь вместе с направляющей цепью. Внутри клетки миРНК включается в комплекс, который называется РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RISC), который включает белок Argonaute (AGO) в качестве центрального ядра, после чего AGO деградирует смысловую цепь, а направляющая цепь остается в RISC. Считается, что область затравки в направляющей нити (7 нд область в положениях 2-8 от 5' конца направляющей нити) играет важную функцию в распознавании последовательности-мишени, и считается, что предпочтительно выбрать область затравки, специфичную для целевого гена, с целью избежать эффекта нецелевого воздействия. Соответственно, в качестве области затравки нуклеиновой кислоты, используемой в качестве активного ингредиента по настоящему изобретению, предпочтительно выбирать последовательность, специфичную к гену NEK6. Соответствующие примеры предусматривают выбор нуклеиновой кислоты, содержащей в качестве области затравки последовательность, которая комплементарна гену NEK6 и не комплементарна гену NEK7 (база данных RefSeq: NM\_133494.2) или в которой один или несколько (например, от 1 до 3) нуклеотидов в области не комплементарны (не соответствуют) гену NEK7. Кроме того, также в качестве полноразмерной последовательности, полезно, например, увеличить количество нуклеотидов, которые комплементарны гену NEK6 и не комплементарны (не соответствуют) гену NEK7 (например, 4 или более, предпочтительно 5-7 нуклеотидов), с целью избежать нецелевого воздействия. Количество нуклеотидов в последовательности, подавляющей экспрессию, содержащейся в направляющей цепи, составляет, например, от 15 до 30, предпочтительно от 19 до 25, более предпочтительно от 19 до 23, еще более предпочтительно от 21, 22, 23 и особенно предпочтительно 23.

Последовательность, подавляющая экспрессию, описанная выше, может дополнительно иметь дополнительную последовательность на 3' конце для образования выступающего конца. Количество нуклеотидов в дополнительной последовательности,

описанной выше, составляет, например, от 1 до 11 и предпочтительно от 1 до 4. Дополнительная последовательность может содержать рибонуклеотидные остатки или дезоксирибонуклеотидные остатки.

Количество нуклеотидов в направляющей цепи составляет, например, от 19 до 50 нд, предпочтительно от 19 до 30 нд, более предпочтительно от 19 до 25 нд, еще более предпочтительно от 19 до 23 нд, еще более предпочтительно 21, 22, 23 и особенно предпочтительно 23 нд.

Количество нуклеотидов в сопровождающей цепи составляет, например, от 19 до 50 нд, предпочтительно от 19 до 30 нд, более предпочтительно от 19 до 25 нд, еще более предпочтительно от 19 до 23 нд, еще более предпочтительно 21, 22, 23 нд и особенно предпочтительно 21 нд.

В сопровождающей цепи область, демонстрирующая комплементарность направляющей цепи, составляет, например, от 19 до 50 нд, предпочтительно от 19 до 30 нд, более предпочтительно от 19 до 25 нд, а еще более предпочтительно от 19 до 23 нд в длину. Область может дополнительно иметь дополнительную последовательность на 3' конце. Количество нуклеотидов в дополнительной последовательности составляет, например, от 1 до 11 нд, и предпочтительно от 1 до 4 нд, и дополнительная последовательность может быть из рибонуклеотидных остатков или дезоксирибонуклеотидных остатков. Например, сопровождающая цепь может быть комплементарной области, показывающей комплементарность направляющей цепи, или может иметь один или несколько нуклеотидов, которые не являются комплементарными, но предпочтительно должны быть комплементарными. Один нуклеотид или несколько нуклеотидов означает, например, 1-3 нд и предпочтительно 1 нд или 2 нд.

миРНК, которая подавляет экспрессию гена NEK6, может быть получена на основе информации о последовательности кДНК гена NEK6, например, в соответствии с системой конструирования миРНК, такой как siSNIPER (R) или siDirect (R), для исследования/диагностики лекарственных средств.

Предпочтительно миРНК к NEK6 представляет собой миРНК, которая специфически действует на NEK6, и примеры включают следующие двухцепочечные нуклеиновые кислоты:

(а) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6 на 3' конце или 5' конце,

(b) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7 на 3' конце или 5' конце,

(c) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8 на 3' конце или 5' конце,

(d) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 9 на 3' конце или 5' конце,

(e) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 5 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 10 на 3' конце или 5' конце.

Таблица 1

SEQ.NO.	5' → 3'
NO.1	AGAGGUUGUUGGAAC
NO.2	CCUUGACACAGUCCU
No.3	CGUGAAUGCAUGUGC
NO.4	GGAGAAGAGAUUCAU
NO.5	GUAUCCGAUGUCAGG
NO.6	GUUCCAACAACCUCU
NO.7	AGGACUGUGUCAAGG
NO.8	GCACAUGCAUUCACG
NO.9	AUGAAUCUCUUCUCC
NO.10	CCUGACAUCGGAUAC

миРНК, которая подавляет экспрессию гена NEK6, также может быть молекулой одноцепочечной нуклеиновой кислоты, образующей шпильчатую структуру РНК, где 3' конец сопровождающей цепи (смысловой цепи) и 5' конец направляющей цепи (антисмысловой цепи) связаны друг с другом через линкерную последовательность нуклеотидных остатков и/или линкер ненуклеотидной структуры или 3'-конец направляющей цепи (антисмысловой цепи) и 5'-конец сопровождающей цепи (смысловой

цепи) связаны друг с другом через линкерную последовательность нуклеотидных остатков и/или линкер ненуклеотидной структуры.

Длина нуклеотидной линкерной последовательности, описанной выше, ничем конкретно не ограничена, но предпочтительно, например, чтобы сопровождающая цепь и направляющая цепь имели длину, которая может образовывать двойную цепь. Количество нуклеотидов в линкерной последовательности имеет нижний предел, например, 1 нд, предпочтительно 2 нд и более предпочтительно 3 нд; и верхний предел составляет, например, 100 нд, предпочтительно 80 нд и более предпочтительно 50 нд. Конкретные примеры количества нуклеотидов в линкерной последовательности составляют от 1 до 100, от 2 до 80 и от 3 до 50.

Примеры линкеров, содержащих ненуклеотидную структуру, описанных выше, включают химические линкеры, такие как гексаэтиленгликоль-линкер, поли(оксифосфино-окси-1,3-пропандиол)-линкер, аллильный линкер или полиэтиленгликолевый линкер; и аминокислотный линкер, имеющий карбаматную структуру. Длина линкера, содержащего ненуклеотидную структуру, не ограничена, но предпочтительно, например, чтобы сопровождающая цепь и направляющая цепь имели длину, которая может образовывать двойную цепь.

### (3) молекулы ssPN

Будет описана молекула ssPN, представляющая собой одну из нуклеиновых кислот, подавляющих экспрессию гена NEK6. Молекула ssPN означает молекулу одноцепочечной нуклеиновой кислоты РНК, имеющую превосходную биологическую стабильность, которая раскрыта в WO 2012/017919, и, в частности, представляет собой следующее.

Молекула ssPN в качестве активного ингредиента по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, подавляющую экспрессию гена NEK6, и характеризуется тем, что содержит область (X), линкерную область (Lx) и область (Xc); где линкерная область (Lx) соединяет область (X) и область (Xc); где по меньшей мере одна из области (X) и области (Xc) включает последовательность, подавляющую экспрессию; где линкерная область (Lx) имеет ненуклеотидную структуру, содержащую по меньшей мере один из числа пирролидинового остова и пиперидинового скелета. Молекула ssPN имеет не связанные 5'-конец и 3'-конец, и может также упоминаться как линейная одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты.

В молекуле ssPN последовательность, подавляющая экспрессию гена NEK6, представляет собой, например, последовательность, которая проявляет подавляющую

активность в отношении экспрессии гена НЕК6, когда молекула ssPN по настоящему изобретению вводится в клетку *in vivo* или *in vitro*. Последовательность миРНК для связывания с мРНК НЕК6 может быть получена в соответствии с существующей системой конструирования миРНК на основе информации о последовательности кДНК гена НЕК6, а молекула ssPN может также использовать последовательность, подавляющую экспрессию, для миРНК в качестве последовательности, подавляющей экспрессию для молекулы ssPN.

Предпочтительно, чтобы последовательность, подавляющая экспрессию, имела, например, 80% или более комплементарности к области-мишени гена НЕК6, которая более предпочтительно составляет 90% или более, еще предпочтительнее 95% или более, еще более предпочтительно 98% или больше и особенно предпочтительно 100%.

В частности, что касается части, соответствующей области затравки миРНК, предпочтительно выбирать последовательность, специфичную для гена НЕК6, как в случае с миРНК.

Предполагается, что подавление экспрессии гена НЕК6, вызванное молекулой ssPN, обусловлено, например, возникновением РНК-интерференции, без ограничения этим механизмом. Молекула ssPN по настоящему изобретению не является молекулой, которая вводится в клетку или тому подобное в виде дцРНК, состоящей из двух одноцепочечных РНК, таких как так называемая миРНК, и, кроме того, вырезание последовательности, подавляющей экспрессию, не обязательно является преимущественно внутриклеточным.

В молекуле ssPN линкерная область (Lx) может иметь, например, нуклеотидную структуру, содержащую пирролидиновый скелет, или может иметь нуклеотидную структуру, содержащую пиперидиновый скелет, или может иметь как нуклеотидную структуру, содержащую пирролидиновый скелет, так и нуклеотидную структуру, содержащую пиперидиновый скелет.

В молекуле ssPN пирролидиновый каркас может представлять собой, например, остов производных пирролидина, в котором один или несколько атомов углерода, составляющих пятичленное кольцо пирролидина, замещены, и, если они замещены, то предпочтительно, чтобы был, например, замещен атом углерода, отличный от углерода, в положении 2 (C-2) в пятичленном кольце. Углерод может быть замещен, например, азотом, кислородом или серой. Пирролидиновый остов может содержать, например, двойную связь углерод-углерод или двойную связь углерод-азот, например, в пятичленном кольце пирролидина. Например, в пирролидиновом скелете углерод и азот, составляющие пятичленное кольцо пирролидина, могут иметь связь с водородом или

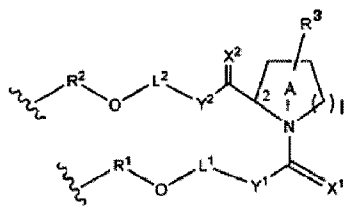
могут иметь связь с заместителем, упомянутым позже. Линкерная область (Lx) может связываться с областью (X) и областью (Xc), например, через любые группы на пирролидиновом скелете, которые предпочтительно представляют собой любой из атомов углерода и азота в пятичленном кольце и предпочтительно представляют собой углерод в положении 2 (C-2) и азот в пятичленном кольце. Примеры пирролидиновых скелетов включают остов на основе пролина и остов на основе пролинола. Скелет на основе пролина и остов на основе пролинола и т.п. представляют собой, например, вещество *in vivo* и его восстановитель и, таким образом, также имеют превосходную безопасность.

В молекуле ssPN пиперидиновый остов может представлять собой, например, остов производных пиперидина, в котором один или несколько атомов углерода, составляющих шестичленное кольцо пиперидина, замещены, и, если они замещены, то предпочтительно, чтобы был, например, замещен атом углерода, отличный от углерода, в положении 2 (C-2) в шестичленном кольце. Углерод может быть замещен, например, азотом, кислородом или серой. Пиперидиновый остов может содержать, например, двойную связь углерод-углерод или двойную связь углерод-азот, например, в шестичленном кольце пирролидина. Например, в пиперидиновом скелете углерод и азот, составляющие шестичленное кольцо пиперидина, могут иметь связь с водородом или могут иметь связь с заместителем, как упомянуто далее. Линкерная область (Lx) может связываться с областью (X) и областью (Xc), например, через любые группы на пиперидиновом скелете, которые предпочтительно представляют собой любой из атомов углерода и азота в шестичленном кольце и предпочтительно представляют собой углерод в положении 2 (C-2) и азот в шестичленном кольце.

Линкерная область, например, может содержать только нуклеотидный остаток, состоящий из нуклеотидной структуры, описанной выше, или может содержать нуклеотидный остаток, состоящий из нуклеотидной структуры и нуклеотидного остатка.

В молекуле ssPN линкерная область представлена, например, следующей формулой (I).

Химическая Формула 2



• • • (I)

В формуле (I), например,

$X^1$  и  $X^2$ , каждый независимо, представляют собой  $H_2$ , O, S или NH;

$Y^1$  и  $Y^2$ , каждый независимо, представляют собой одинарную связь,  $CH_2$ , NH, O или S;

$R^3$  представляет собой атом водорода или заместитель, связанный с C-3, C-4, C-5 или C-6 в кольце A;

$L^1$  представляет собой алкиленовую цепь с  $n$  числом атомов углерода, где каждый из атомов водорода на алкиленовом атоме углерода может быть замещен или не замещен OH,  $OR^a$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^a$ ,  $NR^aR^b$ , SH или  $SR^a$ , или

$L^1$  представляет собой полиэфирную цепь, в которой один или несколько атомов углерода в алкиленовой цепи заменены одним или несколькими атомами кислорода,

при условии, что если  $Y^1$  представляет собой NH, O или S, то атом в  $L^1$ , связанный с  $Y^1$ , представляет собой углерод, атом в  $L^1$ , связанный с  $OR^1$ , представляет собой углерод, и атомы кислорода не соседствуют друг с другом;

$L^2$  представляет собой алкиленовую цепь, содержащую  $m$  атомов углерода, где каждый из атомов водорода на алкиленовом атоме углерода может быть замещен или не замещен OH,  $OR^c$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^c$ ,  $NR^cR^d$ , SH или  $SR^c$ , или

$L^2$  представляет собой полиэфирную цепь, в которой один или несколько атомов углерода в алкиленовой цепи заменены одним или несколькими атомами кислорода,

при условии, что если  $Y^2$  представляет собой NH, O или S, то атом в  $L^2$ , связанный с  $Y^2$ , представляет собой углерод, атом в  $L^2$ , связанный с  $OR^2$ , представляет собой углерод, и атомы кислорода не соседствуют друг с другом;

$R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  и  $R^d$  каждый независимо представляет собой заместитель или защитную группу;

$l$  равно 1 или 2;

$m$  представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 30;

$n$  представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 30;

один атом углерода в кольце A, отличный от C-2, может быть заменен азотом, кислородом или серой,

кольцо A может содержать двойную связь углерод-углерод или двойную связь углерод-азот,

каждая из области (Xc) и области (X) связана с линкерной областью (Lx) через -OR<sup>1</sup>- или OR<sup>2</sup>-;

где  $R^1$  и  $R^2$  могут присутствовать или не присутствовать, и, если присутствуют, каждый из  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляет собой нуклеотидный остаток или структуру (I).



В формуле (I)  $X^1$  и  $X^2$  представляют собой, например, каждый независимо,  $H_2$ , O, S или NH. В формуле (I) « $X^1$  представляет собой  $H_2$ » означает, что  $X^2$  образует  $CH_2$  (метиленовую группу) с атомом углерода, связанным с  $X^1$ . То же самое относится и к  $X^2$ .

В формуле (I)  $Y^1$  и  $Y^2$ , каждый независимо, представляют собой одинарную связь,  $CH_2$ , NH, O или S.

В формуле (I) в кольце A,  $l$  равно 1 или 2. В случае  $l = 1$  кольцо A представляет собой пятичленное кольцо, например, пирролидиновый скелет, описанный выше. Примеры пирролидинового остова включают пролиновый остов и пролинольный скелет, включая их двухвалентные структуры. В случае  $l = 2$  кольцо A представляет собой шестичленное кольцо, например, описанный выше пиперидиновый скелет. В кольце A один атом углерода, отличный от C-2 в кольце A, может быть замещен азотом, кислородом или серой. Кольцо A может также содержать двойную углерод-углеродную связь или двойную углерод-азотную связь внутри кольца A. Кольцо A может, например, быть L-типа или D-типа.

В формуле (I)  $R^3$  представляет собой атом водорода или заместитель, связанный с C-3, C-4, C-5 или C-6 в кольце A. Если  $R^3$  является заместителем, заместитель  $R^3$  может быть одиночным или множественным или отсутствовать, и когда  $R^3$  является множественным, они могут быть одинаковыми или разными. Заместитель  $R^3$  представляет собой, например, галоген, OH,  $OR^4$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^4$ ,  $NR^4R^5$ , SH,  $SR^4$ , оксогруппу (= O), алкил, алкенил, алкинил, галогеналкил, арил, гетероарил, арилалкил, циклоалкил, циклоалкенил, циклоалкилалкил, циклилалкил, гидроксилалкил, алкоксилалкил, аминоксилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкил, гетероарилалкил, силил, силилоксилалкил или т.п.

$R^4$  и  $R^5$  представляют собой, например, каждый независимо заместитель или защитную группу и могут быть одинаковыми или разными. Примеры заместителей, как  $R^4$  и  $R^5$ , включают галоген, алкил, алкенил, алкинил, галогеналкил, арил, гетероарил, арилалкил, циклоалкил, циклоалкенил, циклоалкилалкил, циклилалкил, гидроксилалкил, алкоксилалкил, аминоксилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкил, гетероарилалкил, силила, и силилоксилалкил.

Защитные группы, такие как  $R^4$  и  $R^5$ , представляют собой, например, функциональные группы, которые превращают высокореакционноспособную функциональную группу в неактивную и включают известные защитные группы. Защитная группа может быть реализована на основании, например, описания в источнике (J. F. W. McOmie, «Protecting Groups in Organic Chemistry», Prentice-Hall, London and New York, 1973). Защитная группа ничем конкретно не ограничена, и примеры включают трет-

бутилдиметилсилильную группу (TBDMS), бис (2-ацетоксиэтилокси) метильную группу (ACE), триизопропилсилилоксиметильную группу (ТОМ), 1- (2-цианоэтоксид) этильную группу (СЕЕ), 2-цианоэтоксидметильную группу (СЕМ) и толилсульфонилэтоксидметильную группу (ТЕМ), диметокситритильную группу (DMTr). Если  $R^3$  представляет собой  $OR^4$ , защитные группы конкретно не ограничены, и примеры включают группу TBDMS, группу ACE, группу ТОМ, группу СЕЕ, группу СЕМ и группу ТЕМ.

В формуле (I)  $L^1$  представляет собой алкиленовую цепь, имеющую  $n$  атомов углерода. Каждый из атомов водорода на алкиленовом атоме углерода может быть замещен или не замещен, например, OH,  $OR^a$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^a$ ,  $NR^aR^b$ , SH или  $SR^a$ . Альтернативно,  $L^1$  может представлять собой полиэфирную цепь, в которой один или несколько (например, 1-3) атомов углерода в алкиленовой цепи заменены одним или несколькими атомами кислорода. Полиэфирная цепь представляет собой, например, полиэтиленгликоль. Здесь, если  $Y^1$  представляет собой NH, O или S, то атом в  $L^1$ , связанный с  $Y^1$ , представляет собой углерод, атом в  $L^1$ , связанный с  $OR^1$ , представляет собой углерод, и атомы кислорода не являются соседними друг с другом. Другими словами, например, если  $Y^1$  представляет собой O, то такой атом кислорода и атом кислорода в  $L^1$  не являются соседними, и атом кислорода в  $OR^1$  и атом кислорода в  $L^1$  не являются соседними.

В формуле (I)  $L^2$  представляет собой алкиленовую цепь, имеющую  $m$  атомов углерода. Каждый из атомов водорода на алкиленовом атоме углерода может быть замещен или не замещен, например, OH,  $OR^c$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^c$ ,  $NR^cR^d$ , SH или  $SR^c$ . Альтернативно,  $L^2$  может представлять собой полиэфирную цепь, в которой один или несколько (например, 1-3) атомов углерода в алкиленовой цепи заменены одним или несколькими атомами кислорода. Здесь, если  $Y^2$  представляет собой NH, O или S, то атом в  $L^2$ , связанный с  $Y^2$ , представляет собой углерод, атом в  $L^2$ , связанный с  $OR^2$ , представляет собой углерод, и атомы кислорода не являются смежными друг с другом. Другими словами, например, если  $Y^2$  представляет собой O, то такой атом кислорода и атом кислорода в  $L^2$  не являются соседними, и атом кислорода в  $OR^2$  и атом кислорода в  $L^2$  не являются соседними.

$n$  для  $L^1$  и  $m$  для  $L^2$  ничем конкретно не ограничены, и в каждом из них нижний предел равен, например, 0, а верхний предел также не ограничен.  $n$  и  $m$  могут быть установлены соответствующим образом, например, в соответствии с требуемой длиной области линкера (Lx). Предпочтительно, чтобы  $n$  и  $m$  составляли, например, каждый 0-30, принимая во внимание стоимость производства и выход, и более предпочтительно они

составляют 0-20, а еще более предпочтительно - 0-15.  $n$  и  $m$  могут быть одинаковыми ( $n = m$ ) или разными.  $n + m$  составляет, например, 0-30, предпочтительно 0-20 и более предпочтительно 0-15. Здесь  $n$  из  $L^1$  и  $m$  из  $L^2$  представляют собой количества атомов углерода в каждой алкиленовой цепи, но в случае полиэфирной цепи, в которой один или несколько атомов углерода в алкиленовой цепи  $L^1$  или  $L^2$  замещены атомом кислорода,  $n$  и  $m$  означают сумму числа атомов углерода и числа замещенных атомов кислорода.

$R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  и  $R^d$ , например, каждый независимо представляет собой заместитель или защитную группу. Заместитель и защитная группа  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  и  $R^d$ , например, аналогичны заместителю и защитной группе  $R^4$  и  $R^5$ .

В формуле (I) атомы водорода могут быть, например, каждый независимо замещен галогеном, таким как Cl, Br, F и I.

Область (Xc) и область (X) каждая связана, например, с линкерной областью (Lx) через  $-OR^1-$  или  $-OR^2-$ . Здесь  $R^1$  и  $R^2$  могут присутствовать или не присутствовать. Если присутствуют  $R^1$  и  $R^2$ , каждый из  $R^1$  и  $R^2$  независимо имеет нуклеотидный остаток или структуру формулы (I). Если  $R^1$  и/или  $R^2$  являются нуклеотидными остатками, линкерная область (Lx), например, включает нуклеотидный остаток, состоящий из структуры формулы (I), за исключением нуклеотидных остатков  $R^1$  и/или  $R^2$ , и нуклеотидный остаток. Если  $R^1$  и/или  $R^2$  представляют собой структуры формулы (I), линкерная область (Lx) будет иметь структуру, например, в которой два или более нуклеотидных остатка, состоящих из структур формулы (I), связаны друг с другом. Например, могут быть включены одна, две, три или четыре структуры формулы (I). Таким образом, при включении множества структур формулы (I) могут быть, например, непосредственно связаны или связаны через нуклеотидный остаток. Между тем, если  $R^1$  и  $R^2$  отсутствуют, линкерная область (Lx) включает, например, только нуклеотидный остаток, состоящий из структуры формулы (I).

Комбинации связей области (Xc) и области (X) с  $-OR^1-$  и  $-OR^2-$  конкретно не ограничены, и примеры включают любое из следующих требований.

Требование (1)

Область (Xc) через  $-OR^2-$  и область (X) через  $-OR^1-$  связываются со структурой формулы (I).

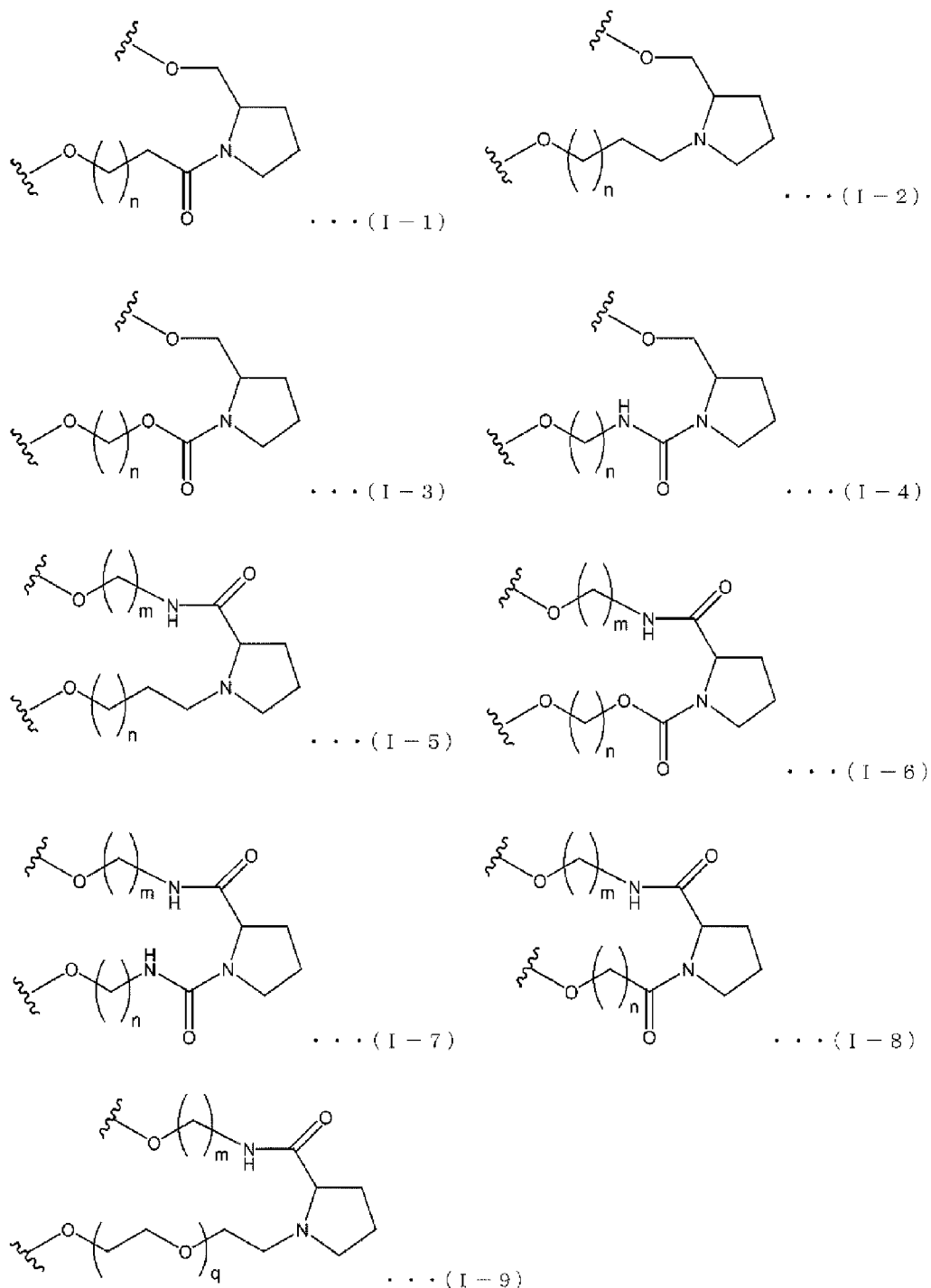
Требование (2)

Область (Xc) через  $-OR^1-$  и область (X) через  $-OR^2-$  связываются со структурой формулы (I).

Примеры структур формулы (I) включают следующую формулу (I-1) - (I-9), и в следующих формулах  $n$  и  $m$  такие же, как в формуле (I). В следующих формулах  $q$

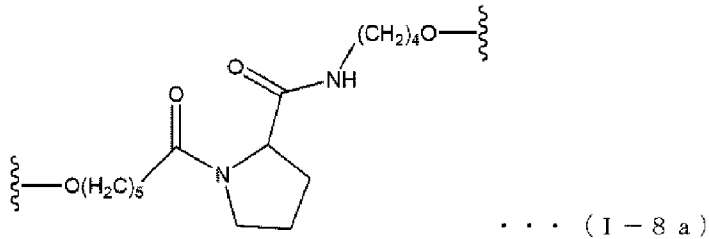
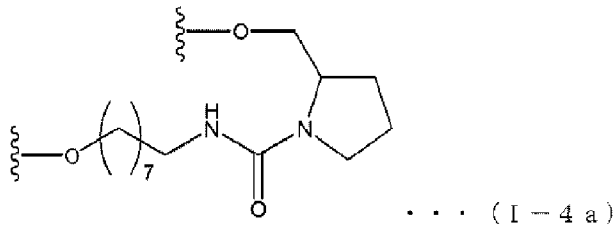
является целым числом от 0 до 10.

Химическая Формула 3



В формулах (I-1) - (I-9)  $n$ ,  $m$  и  $q$  ничем конкретно не ограничены и являются такими, как указано выше. Специфические примеры включают  $n = 8$  в формуле (I-1),  $n = 3$  в (I-2),  $n = 4$  или  $8$  в формуле (I-3),  $n = 7$  или  $8$  в (I-4),  $n = 3$  и  $m = 4$  в формуле (I-5),  $n = 8$  и  $m = 4$  в (I-6),  $n = 8$  и  $m = 4$  в формуле (I-7),  $n = 5$  и  $m = 4$  в (I-8),  $q = 1$  и  $m = 4$  в формуле (I-9). Пример формулы (I-4) ( $n = 8$ ) показан в следующей формуле (I-4a), а пример формулы (I-8) ( $n = 5$ ,  $m = 4$ ) показан в следующей формуле (I-8a).

## Химическая Формула 4



В молекуле ssPN область (Xc) является комплементарной области (X). Следовательно, в молекуле ssPN область (Xc) складывается в направлении области (X), и область (Xc) и область (X) могут образовывать двойную цепь за счет самоотжига.

Например, в молекуле ssPN только область (Xc) может сворачиваться, образуя двойную цепь вместе с областью (X), и, кроме того, новая двойная цепь может образовываться в другой области. Здесь и далее первая молекула ssPN, то есть молекула, в которой образовалась двойная цепи в одном положении, упоминается как «первая молекула ssPN», а последняя молекула ssPN, то есть молекула, образующая двойную цепь в двух положениях, упоминается как «вторая молекула ssPN». Первая молекула ssPN и вторая молекула ssPN будут проиллюстрированы ниже.

## (i) Первые молекулы ssPN

Первая молекула ssPN представляет собой молекулу, состоящую, например, из области (X), области (Xc) и линкерной области (Lx).

Например, первая молекула ssPN может иметь область (Xc), линкерную область (Lx) и область (X) в этом порядке от 5' конца к 3' концу или может иметь область (Xc), линкерную область (Lx) и область (X) в этом порядке от 3' конца к 5' концу.

В первой молекуле ssPN область (Xc) комплементарна области (X). Здесь требуется, чтобы область (Xc) имела последовательность, комплементарную всей области (X) или ее части, и предпочтительно содержит последовательность, комплементарную всей области (X) или ее части или состоит только из компелементарной последовательности. Область (Xc) может быть, например, комплементарной к полной комплементарной области или частично комплементарной области (X), или один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными, но предпочтительно являются комплементарными. Один нуклеотид или несколько нуклеотидов означает, например, 1-3

нд и предпочтительно 1 нд или 2 нд.

В первой молекуле ssPN последовательность, подавляющая экспрессию, содержится по меньшей мере в одной из области (Xc) и области (X). Первая молекула ssPN, например, может иметь одну из последовательностей, подавляющих экспрессию, или может иметь две или более таких последовательностей. В последнем случае, например, первая молекула ssPN может иметь две или более последовательностей, подавляющих экспрессию гена НЕК6, которые являются одинаковыми, или может иметь две или более последовательностей, подавляющих экспрессию гена НЕК6, которые различны. Если первая молекула ssPN имеет две или более последовательностей, подавляющих экспрессию, позиционное положение каждой последовательности, подавляющей экспрессию, ничем конкретно не ограничивается, и она может находиться в любой одной из областей (X) и (Xc) или может быть в другой области.

Пример первых молекул ssPN будет описан в соответствии со схемами на Фигуре 2. Фигура 2 (А) представляет собой схематическую диаграмму, показывающую схему порядка каждой области для молекулы ssPN в качестве примера, а Фигура 2 (В) представляет собой схематическую диаграмму, показывающую состояние, в котором молекула ssPN образует двойную цепь внутри молекулы. Как показано на Фигуре 2 (В), в молекуле ssPN двойная цепь образуется между областью (Xc) и областью (X), а область Lx принимает форму петли в соответствии с длиной. На Фигуре 2 показан только порядок связей областей и относительное расположение каждой области, которая образует двойную цепь, и, например, длина каждой области, форма области линкера (Lx) и т.п. не ограничены этим.

В первой молекуле ssPN количество нуклеотидов в области (Xc) и области (X) особенно не ограничено. Длина каждой области будет проиллюстрирована ниже, но настоящее изобретение не ограничено этим.

Область (Xc) может быть, например, комплементарной всей области (X). Этот случай означает, что область (Xc), например, состоит из нуклеотидной последовательности, комплементарной всей области от 5' конца до 3' конца области (X), и, другими словами, означает, что область (Xc) и область (X) имеют одинаковую длину в нуклеотидах, а также то, что все нуклеотиды в области (Xc) являются комплементарными всем нуклеотидам в области (X).

Область (Xc) также может быть, например, комплементарной части области (X). Этот случай означает, что область (Xc), например, состоит из нуклеотидной последовательности, комплементарной части области (X), и, другими словами, означает, что область (Xc) состоит из нуклеотидной последовательности, имеющей длину,

выраженную в нуклеотидах, на один или несколько нуклеотидов короче области (X), и что все нуклеотиды в области (Xc) являются комплементарными всем нуклеотидам в части области (X). Предпочтительно, чтобы часть области (X) была, например, областью, состоящей из нуклеотидной последовательности, идущей от концевого нуклеотида (первого нуклеотида) на стороне области (Xc) в области (X).

В первой молекуле ssPNN отношения количества нуклеотидов (X) в области (X) и количества нуклеотидов (Xc) в области (Xc) удовлетворяют, например, следующему требованию (3) или (5) и в случае с первым, например, он удовлетворяет следующему требованию (11).

$$X > Xc \dots (3)$$

$$X - Xc = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2 \text{ или } 3,$$

$$\text{более предпочтительно } 1 \text{ или } 2 \dots (11)$$

$$X = Xc \dots (5)$$

Если область (X) и/или область (Xc) содержат последовательность, подавляющую экспрессию, то область, например, может быть областью, состоящей только из последовательности, подавляющей экспрессию, или может быть областью, содержащей последовательность, подавляющей экспрессию.

Количество нуклеотидов в последовательности, подавляющей экспрессию, составляет, например, от 15 до 30 нд, предпочтительно от 19 до 25 нд, более предпочтительно от 19 до 23 нд, еще более предпочтительно 21, 22, 23 нд, и особенно предпочтительно 23 нд. Область, включающая последовательность, подавляющую экспрессию, может иметь, например, дополнительную последовательность на 5' конце и/или на 3' конце экспрессии, подавляющей последовательность. Количество нуклеотидов в дополнительной последовательности составляет, например, от 1 до 31 нд, предпочтительно от 1 до 21 нд и более предпочтительно от 1 до 11 нд.

Количество нуклеотидов в области (X) ничем конкретно не ограничено. Если область (X) включает последовательность, подавляющую экспрессию, нижний предел составляет, например, 19 нд. Верхний предел составляет, например, 50 нд, предпочтительно 40 нд, более предпочтительно 30 нд, а еще более предпочтительно 25 нд. Конкретными примерами количества нуклеотидов в области (X) являются, например, от 19 до 50 нд, предпочтительно от 19 до 30 нд, более предпочтительно от 19 до 25 нд, но еще предпочтительно 21, 22-23 нд и особенно предпочтительно 23 нд.

Количество нуклеотидов в области (Xc) ничем конкретно не ограничено. Нижний предел составляет, например, 19 нд, предпочтительно 20 нд и более предпочтительно 21 нд. Верхний предел составляет, например, 50 нд, предпочтительно 40 нд, более

предпочтительно 30 нд, а еще более предпочтительно 25 нд. Конкретными примерами количества нуклеотидов в области (Xc) являются, например, 19-50 нд, предпочтительно 19-30 нд, более предпочтительно 19-25 нд, но предпочтительно 21, 22- и 23 нд, и особенно предпочтительно 21 нд.

В первой молекуле ssPN длина линкерной области (Lx) ничем конкретно не ограничена. Предпочтительно, чтобы линкерная область (Lx), например, была достаточно длинной для образования двойной цепи между областью (X) и областью (Xc). Если линкерная область (Lx) содержит нуклеотидный остаток, отличный от нуклеотидного остатка, количество нуклеотидов в линкерной области (Lx) имеет нижний предел, например, 1 нд, предпочтительно 2 нд, и более предпочтительно 3 нд, а верхний предел составляет, например, 100 нд, предпочтительно 80 нд и более предпочтительно 50 нд. Конкретные примеры количества нуклеотидов в линкерной области (Lx) составляют от 1 до 100 нд, от 2 до 80 нд и от 3 до 50 нд. Предпочтительно, чтобы линкерная область (Lx) имела структуру, не вызывающую самоотжиг внутри своей собственной области.

Полная длина первой молекулы ssPN ничем конкретно не ограничена. В первой молекуле ssPN сумма количества нуклеотидов (количество нуклеотидов в полном размере) имеет нижний предел, например, 38 нд, предпочтительно 42 нд, более предпочтительно 44 нд, а еще более предпочтительно 48 нд; и верхний предел составляет, например, 300 нд, предпочтительно 200 нд, более предпочтительно 150 нд, еще более предпочтительно 100 нд и особенно предпочтительно 80 нд. Конкретные примеры суммы количества нуклеотидов в полноразмерной первой молекуле ssPN составляют от 38 до 300 нд, от 42 до 200 нд, от 44 до 150 нд, от 48 до 100 нд и от 48 до 80 нд. В первой молекуле ssPN сумма количества нуклеотидов, за исключением количества нуклеотидов в линкерной области (Lx), имеет нижний предел, например, 38 нд, предпочтительно 42 нд, а еще более предпочтительно 44 нд; и верхний предел составляет, например, 300 нд, предпочтительно 200 нд, более предпочтительно 150 нд, еще более предпочтительно 100 нд и особенно предпочтительно 80 нд. Конкретными примерами суммы количества нуклеотидов, за исключением количества нуклеотидов в линкерной области (Lx), являются от 38 до 300 нд, от 42 до 200 нд, от 42 до 150 нд, от 44 до 100 нд и от 44 до 80 нд.

Конкретные примеры первых молекул ssPN, которые подавляют экспрессию гена NEK6, включают следующие одонитевые молекулы нуклеиновых кислот.

KB-001

5'-GAGGGAGUCCAACAACCUCUCC-Lx-  
GGAGAGGUUGUUGGAACUCCCUCCA-3 '(SEQ ID NO: 31)



KB-002

5'-CGAGGCAGGACUGUGUCAAGGCC-Lx-  
GGCCUUGACACAGUCCUGCCUCGCC-3 '(SEQ ID NO: 32)

KB-003

5'-CGUGGAGCACAUGCAUUCACGCC-Lx-  
GGCGUGAAUGCAUGUGCUCCACGGC-3 '(SEQ ID NO: 33)

KB-004

5'-GAUAAGAUGAAUCUCUUCUCCCC-Lx-  
GGGGAGAAGAGAUUCAUCUUAUCUC-3 '(SEQ ID NO: 34)

KB-005

5'-CAGAGACCUGACAUCGGAUACCC-Lx-  
GGGUAUCCGAUGUCAGGUCUCUGGU-3 '(SEQ ID NO: 35)

KB-006

5'-GGAGAUAGAUGAAUCUCUCCCC-Lx-  
GGGAAGAGAUUCAUCUUAUCUCCAU-3 '(SEQ ID NO: 46)

KB-007

5'-CUAUGGAGAUAGAUGAAUCUCC-Lx-  
GGAGAUUCAUCUUAUCUCCAUAGAA-3 '(SEQ ID NO: 47)

KB-008

5'-GCGGACUCCAGAUCGAAAAGCC-Lx-  
GGCUUUUCGAUCUGGAAGUCCGCCA-3 '(SEQ ID NO: 48)

KB-009

5'-CGGACUCCAGAUCGAAAAGACC-Lx-  
GGUCUUUUCGAUCUGGAAGUCCGCC-3 '(SEQ ID NO: 49)

KB-010

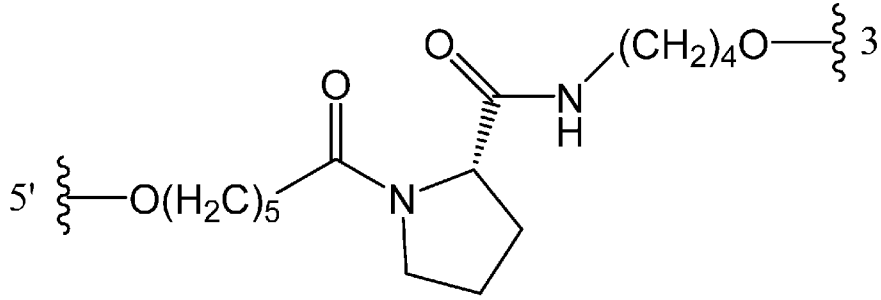
5'-GACUCCAGAUCGAAAAGAAGCC-Lx-  
GGCUUCUUUUCGAUCUGGAAGUCCG-3 '(SEQ ID NO: 50)

KB-011

5'-GACUCGUUUAUCGAAGACAACCC-Lx-  
GGGUUGUCUUCGAUAAACGAGUCCA-3 '(SEQ ID NO: 61)

Где Lx представляет собой линкерную область Lx и представляет собой L-пролин-диамид-амидит со следующей структурной формулой.

## Химическая Формула 5



Кроме того, предпочтительные первые молекулы ssPN включают одноцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает последовательность, которая подавляет экспрессию гена NEK6, выбранную из SEQ ID NO: 1-5, и состоит только из области (X), линкерной области (Lx) и область (Xc), которые расположены от 5' конца к 3' концу в следующем порядке: область (Xc), линкерная область (Lx) и область (X),

где линкерная область (Lx) имеет ненуклеотидную структуру, содержащую по меньшей мере одно из числа пирролидинового остова и пиперидинового скелета, и

где область (X) содержит последовательность, подавляющую экспрессию.

Тем не менее, предпочтительно, область (Xc) представляет собой описанную выше одноцепочечную нуклеиновую кислоту, полностью комплементарную всей области или части области (X). Особенно предпочтительно область (X) представляет собой описанную выше одноцепочечную нуклеиновую кислоту, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-25.

Таблица 2

SEQ.NO.	5' → 3'
NO.11	AGAGGUUGUUGGAACUCCC
NO.12	CCUUGACACAGUGCUGCGU
No.13	CGUGAAUGCAUGUGCUGCA
NO.14	GGAGAAGAGAUUCAUCUUA
NO.15	GUAUCCGAUGUCAGGUCUC
NO.16	AGAGGUUGUUGGAACUCCCUC
NO.17	CGUUGACACAGUCCUGCCUCG
NO.18	CGUGAAUGCAUGUGCUGCCACG
NO.19	GGAGAAGAGAUUCAUGUUAUC
NO.20	GUAUCGGAUGUCAGGUCUCUG
NO.21	AGAGGUUGUUGGAACUCCCUGCA
NO.22	CCUUGACACAGUCCUGCCUCGGC
NO.23	CGUGAAUGCAUGUGCUGCCACGGC
NO.24	GGAGAAGAGAUUCAUCUUAUCUC
NO.25	GUAUCCGAUGUCAGGUCUCUGGU

## (ii) Вторые молекулы ssPN

Вторая молекула ssPN представляет собой, например, молекулу, дополнительно

имеющую область (Y) и область (Yc), комплементарную области (Y) в дополнение к области (X), линкерной области (Lx) и области (Xc). Во второй молекуле ssPN область (X) и область (Y) связаны друг с другом, образуя внутреннюю область (Z). Кроме того, если не указано иное, ко второй молекуле ssPN могут быть применимы описания первой молекулы ssPN.

Например, вторая молекула ssPN может иметь область (Xc), линкерную область (Lx), область (X), область (Y) и область (Yc) в этом порядке от 5' конца к 3' концу. В этом случае область (Xc) также упоминается как 5' боковая область (Xc); область (X) во внутренней области (Z) также упоминается как внутренняя 5' боковая область (X); область (Y) во внутренней области (Z) также упоминается как внутренняя 3' область (Y); и область (Yc) также упоминается как 3' боковая область (Yc). Вторая молекула ssPN может также иметь, например, область (Xc), линкерную область (Lx), область (X), область (Y) и область (Yc) в этом порядке от 5' конца к 3' концу. В этом случае область (Xc) также упоминается как 3' боковая область (Xc); область (X) во внутренней области (Z) также упоминается как внутренняя 3' боковая область (X); область (Y) во внутренней области (Z) также упоминается как внутренняя 5' область (Y); и область (Yc) также упоминается как 5' боковая область (Yc).

Например, во внутренней области (Z) область (X) и область (Y) связаны друг с другом. Область (X) и область (Y), например, непосредственно связаны и не имеют промежуточной последовательности между ними. Внутренняя область (Z) определяется как «состоит из области (X), связанной с областью (Y)», чтобы показать взаимосвязь последовательностей области (Xc) и области (Yc), и без ограничения во внутренней области (Z), область (X) и область (Y) являются отдельными независимыми областями при использовании молекулы ssPN. Другими словами, например, если внутренняя область (Z) имеет последовательности, подавляющие экспрессию, последовательности, подавляющие экспрессию, могут быть расположены в пределах области (X) и области (Y) во внутренней области (Z).

Во второй молекуле ssPN область (Xc) комплементарна области (X). Здесь требуется, чтобы область (Xc) просто имела последовательность, комплементарную всей области (X) или ее части, и предпочтительно содержала последовательность, комплементарную всей или части области (X) или состояла из комплементарной последовательности. Область (Xc) может быть, например, комплементарной полной комплементарной области или частично комплементарной области (X), или один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными, но предпочтительно являются комплементарными. Один нуклеотид или несколько нуклеотидов означает, например, 1-3

нд и предпочтительно 1 нд или 2 нд.

Во второй молекуле ssPN область (Yc) комплементарна области (Y). Здесь требуется, чтобы область (Yc) имела последовательность, комплементарную всей или части области (Y), и предпочтительно содержит последовательность, комплементарную всей или части области (Y) или состояла из комплементарной последовательности. Область (Yc) может быть, например, комплементарной к полной комплементарной области или части комплементарной области (Y), или один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными, но предпочтительно могут быть комплементарными. Один нуклеотид или несколько нуклеотидов означает, например, 1-3 нд и предпочтительно 1 нд или 2 нд.

Во второй молекуле ssPN последовательность, подавляющая экспрессию, например, содержится по меньшей мере в одной области из внутренней области (Z), содержащей область (X) и область (Y), а также область (Xc), и может быть далее содержаться в области (Yc). Предпочтительной является молекула ssPN, в которой последовательность, подавляющая экспрессию, содержится во внутренней области (Z). Если имеется последовательность, подавляющая экспрессию, внутренняя область (Z), например, может иметь последовательность, подавляющую экспрессию, в любой из области (X) и области (Y), или, альтернативно, может иметь последовательность, подавляющую экспрессию, в области (X) и области (Y). Например, вторая молекула ssPN может иметь одну из последовательностей, подавляющих экспрессию, или может иметь две или более из них.

Если вторая молекула ssPN имеет две или более последовательностей, подавляющих экспрессию, относительное расположение каждой последовательностей, подавляющих экспрессию, конкретно не ограничивается, и она может находиться в любой из внутренней области (Z) и области (Xc) или может быть в любой из внутренней области (Z) и области (Xc) и в еще одной другой области.

Например, во второй молекуле ssPN область (Yc) и область (Y) могут быть прямо или косвенно связаны. В первом случае примеры прямых связей включают связи, такие как фосфодиэфирная связь. В последнем случае примеры включают форму, имеющую линкерную область (Ly) между областью (Yc) и областью (Y), в которой область (Yc) и область (Y) связаны друг с другом через линкерную область (Ly).

Если вторая молекула ssPN имеет линкерную область (Ly), линкерная область (Ly) может быть, например, линкером, состоящим из нуклеотидного остатка, или может быть линкером, имеющим ненуклеотидную структуру, содержащую по меньшей мере одно из числа пирролидинового остова и пиперидинового скелета, указанных выше. В последнем

случае область линкера ( $L_y$ ) может быть представлена, например, формулой (I), и может использовать всё из описанного формулой (I) в линкерной области ( $L_x$ ).

Область ( $Y_c$ ) и область (Y), каждая, связаны, например, с линкерной областью ( $L_y$ ) через  $-OR^1-$  или  $-OR^2-$ . Здесь  $R^1$  и  $R^2$  могут присутствовать или не присутствовать, подобно им же в линкерной области ( $L_x$ ), упомянутой выше.

Комбинации связей области ( $X_c$ ) и области (X) и области ( $Y_c$ ) и (Y) с  $-OR^1-$  и  $-OR^2-$  конкретно не ограничены, и примеры включают любое из следующих требований.

Требование (1)

Область ( $X_c$ ) через  $-OR^2-$  и область (X) через  $-OR^1-$  связываются со структурой формулы (I), и

область ( $Y_c$ ) через  $-OR^1-$  и область (Y) через  $-OR^2-$  связываются со структурой формулы (I).

Требование (2)

Область ( $X_c$ ) через  $-OR^2-$  и область (X) через  $-OR^1-$  связываются со структурой формулы (I), и

область ( $Y_c$ ) через  $-OR^2-$  и область (Y) через  $-OR^1-$  связываются со структурой формулы (I).

Требование (3)

Область ( $X_c$ ) через  $-OR^1-$  и область (X) через  $-OR^2-$  связываются со структурой формулы (I), и

область ( $Y_c$ ) через  $-OR^1-$  и область (Y) через  $-OR^2-$  связываются со структурой формулы (I).

Требование (4)

Область ( $X_c$ ) через  $-OR^1-$  и область (X) через  $-OR^2-$  связываются со структурой формулы (I), и

область ( $Y_c$ ) через  $-OR^2-$  и область (Y) через  $-OR^1-$  связываются со структурой формулы (I).

Что касается второй молекулы ssPN, пример молекул ssPN, имеющих линкерную область ( $L_y$ ), будет описан согласно схематическим диаграммам на Фигуре 3. Фигура 3 (A) представляет собой схематическую диаграмму, показывающую схему порядка каждой области от 5' конца к 3' концу примерной молекулы ssPN, а Фигура 3 (B) представляет собой схематическую диаграмму, показывающую состояние, в котором молекула ssPN образует двойную цепь внутри молекулы. Как показано на Фигуре 3 (B), в молекуле ssPN двойные цепи образуются между областью ( $X_c$ ) и областью (X) и между областью (Y) и областью ( $Y_c$ ), а область  $L_x$  и область  $L_y$  принимают формы петель в зависимости от

длины. На Фигуре 3 показаны только порядок связывания каждой области и взаимоложение каждой области, которая образует двойную цепь, и, например, длина каждой области, форма области линкера и т.п. не ограничены этим. Кроме того, на Фигуре 3 область (Xc) показана на 5' конце, но не ограничивается этим, и область (Xc) может быть расположена на 3' конце.

Во второй молекуле ssPN количество нуклеотидов в области (Xc), области (X), области (Y) и области (Yc) ничем конкретно не ограничено. Длина каждой области будет проиллюстрирована ниже, но настоящее изобретение не ограничено этим.

Область (Xc) может быть, например, комплементарной всей области (X). В этом случае предпочтительно, чтобы область (Xc), например, имела ту же длину в нуклеотидах, что и область (X), и состояла из нуклеотидной последовательности, комплементарной всей области (X). Область (Xc) имеет более предпочтительно ту же длину в нуклеотидах, что и область (X), и все нуклеотиды в области (Xc) являются комплементарными всем нуклеотидам в области (X). Более того, без ограничения указанным, например, один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными.

Область (Xc) также может быть, например, комплементарной части области (X). В этом случае предпочтительно, чтобы область (Xc) имела, например, ту же длину в нуклеотидах, что и часть области (X), иными словами, состояла из нуклеотидной последовательности с длиной в нуклеотидах, которая короче на один или несколько нуклеотидов, чем область (X). Область (Xc) имеет более предпочтительно ту же длину в нуклеотидах, что и частичная область в области (X), и все нуклеотиды в области (Xc) являются комплементарными всем нуклеотидам в частичной области в области (X). Предпочтительно, чтобы частичная область в области (X) была, например, областью, состоящей из нуклеотидной последовательности, идущей от концевой нуклеотида (первого нуклеотида) на стороне области (Xc) в области (X).

Область (Yc) может быть, например, комплементарной всей области в области (Y). В этом случае предпочтительно, чтобы область (Yc) имела, например, ту же длину в нуклеотидах, что и область (Y), и состояла из нуклеотидной последовательности, комплементарной всей области (Y). Область (Yc) имеет более предпочтительно ту же длину в нуклеотидах, что и область (Y), и все нуклеотиды в области (Yc) являются комплементарными всем нуклеотидам в области (Y). Более того, без ограничения указанным, например, один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными.

Область (Yc) также может быть, например, комплементарной к части области (Y). В этом случае область (Yc) имеет, например, ту же длину в нуклеотидах, что и часть

области (Y), и, другими словами, предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности с длиной в нуклеотидах, которая короче на один или несколько нуклеотидов, чем область (Y). Область (Yc) имеет более предпочтительно такую же длину в нуклеотидах, что и часть области (Y), и все нуклеотиды в области (Yc) являются комплементарными всем нуклеотидам в части области (Y). Предпочтительно, чтобы часть области (Y) была, например, областью, состоящей из нуклеотидной последовательности, идущей от концевой нуклеотида (первого нуклеотида) на стороне области (Yc) в области (Y).

Во второй молекуле ssPN, отношение количества нуклеотидов (Z) во внутренней области (Z) к количеству нуклеотидов (X) в области (X) и количеству нуклеотидов (Y) в области (Y) и отношение количества нуклеотидов (Z) во внутренней области (Z) к количеству нуклеотидов (Xc) в области (Xc) и количеству нуклеотидов (Yc) в области (Yc) удовлетворяют, например, требованиям следующих формул (1) и (2).

$$Z = X + Y \dots (1)$$

$$Z \geq Xc + Yc \dots (2)$$

Во второй молекуле ssPN отношение количества нуклеотидов (X) в области (X) к количеству нуклеотидов (Y) в области (Y) ничем конкретно не ограничено и, например, удовлетворяет любому из требований следующие формулы.

$$X = Y \dots (19)$$

$$X < Y \dots (20)$$

$$X > Y \dots (21)$$

Во второй молекуле ssPN, отношение количества нуклеотидов (X) в области (X), количества нуклеотидов (Xc) в области (Xc), количества нуклеотидов (Y) в области (Y), и количество нуклеотидов (Yc) в области (Yc) удовлетворяет, например, любому из требований следующих пунктов (a) - (d).

(a) Удовлетворяет требованиям следующих формул (3) и (4).

$$X > Xc \dots (3)$$

$$Y = Yc \dots (4)$$

(b) Удовлетворяет требованиям следующих формул (5) и (6).

$$X = Xc \dots (5)$$

$$Y > Yc \dots (6)$$

(c) Удовлетворяет требованиям следующих формул (7) и (8).

$$X > Xc \dots (7)$$

$$Y > Yc \dots (8)$$

(d) Удовлетворяет требованиям следующих формул (9) и (10).

$$X = X_c \dots (9)$$

$$Y = Y_c \dots (10)$$

В (a) - (d) предпочтительно, чтобы разница между числом нуклеотидов (X) в области (X) и числом нуклеотидов (X<sub>c</sub>) в области (X<sub>c</sub>) и разница между количеством нуклеотидов (Y) в области (Y) и количеством нуклеотидов (Y<sub>c</sub>) в области (Y<sub>c</sub>) удовлетворяла, например, следующим требованиям.

(a) Удовлетворяет требованиям следующих формул (11) и (12).

$$X - X_c = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2, 3 \text{ или } 4,$$

$$\text{более предпочтительно } 1, 2 \text{ или } 3 \dots (11)$$

$$Y - Y_c = 0 \dots (12)$$

(б) Удовлетворяет требованиям следующих формул (13) и (14).

$$X - X_c = 0 \dots (13)$$

$$Y - Y_c = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2, 3 \text{ или } 4,$$

$$\text{более предпочтительно } 1, 2 \text{ или } 3 \dots (14)$$

(c) Удовлетворяет требованиям следующих формул (15) и (16).

$$X - X_c = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2 \text{ или } 3,$$

$$\text{более предпочтительно } 1 \text{ или } 2 \dots (15)$$

$$Y - Y_c = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2 \text{ или } 3,$$

$$\text{более предпочтительно } 1 \text{ или } 2 \dots (16)$$

(d) Удовлетворяет требованиям следующих формул (17) и (18).

$$X - X_c = 0 \dots (17)$$

$$Y - Y_c = 0 \dots (18)$$

Что касается вторых молекул ssPN из (a) - (d), пример каждой структуры будет описан согласно схематическим диаграммам на Фигуре 4. На Фигуре 4 представлены ssPN, содержащие линкерную область (L<sub>x</sub>) и линкерную область (L<sub>y</sub>): (A) является примером молекул ssPN в (a); (B) является примером молекул ssPN из (b); (C) является примером молекул ssPN (c); и (D) является примером молекул ssPN из (d). На Фигуре 4 пунктирные линии представляют состояние формирования двойной цепи путем самоотжига. В молекулах ssPN на Фигуре 4 количество нуклеотидов (X) в области (X) и количество нуклеотидов (Y) в области (Y) представлены как «X < Y» формулы (20), без ограничения указанным, но они могут быть представлены как «X = Y» формулы (19) или «X > Y» формулы (21). Кроме того, Фигура 4 представляет схематические диаграммы, на которых очень хорошо показаны взаимосвязь между областью (X) и областью (X<sub>c</sub>) и взаимосвязь между областью (Y) и областью (Y<sub>c</sub>), и, например, длина каждой области, форма, наличие или отсутствие линкерной области (L<sub>y</sub>) и т.п. не ограничены этим.



Молекулы ssPN из (a) - (c) имеют структуры, например, в которых каждая из области (Xc) с областью (X) и области (Yc) с областью (Y) образует двойную цепь тем самым имея нуклеотиды, не выровненные ни с областью (Xc), ни с областью (Yc) во внутренней области (Z); и они также могут рассматриваться как нуклеотиды, не образующие двойных цепей. Во внутренней области (Z) невыровненные нуклеотиды (также называемые нуклеотидами, не образующими двойную цепь) в дальнейшем именуется «свободными нуклеотидами». На Фигуре 4 область свободных нуклеотидов обозначена буквой «F». Количество нуклеотидов в области (F) ничем конкретно не ограничено. Количество нуклеотидов (F) в области (F) составляет, например, количество нуклеотидов «X – Xc» в случае молекулы ssPN по (a), количество нуклеотидов «Y - Yc» в случае молекулы ssPN по (b) сумму количеств нуклеотидов «X - Xc» и нуклеотидов «Y – Yc» в случае молекулы ssPN по (c).

Напротив, молекула ssPN (d) имеет структуру, например, в которой вся область внутренней области (Z) выровнена с областью (Xc) и областью (Yc), и она также может рассматриваться как структура, в которой вся область внутренней области (Z) образует двойную цепь. Здесь в молекуле ssPN (d) 5'-конец области (Xc) и 3'-конец области (Yc) не связаны.

Сумма количества нуклеотидов в области (Xc), области (Yc) и свободных нуклеотидов (F) во внутренней области (Z) будет количеством нуклеотидов во внутренней области (Z). Таким образом, длины области (Xc) и области (Yc) определяются соответствующим образом, например, в соответствии с длиной внутренней области (Z) и количеством и положением свободных нуклеотидов.

Количество нуклеотидов во внутренней области (Z) составляет, например, 19 нд или более. Нижний предел количества нуклеотидов составляет, например, 19 нд, предпочтительно 20 нд и более предпочтительно 21 нд. Верхний предел количества нуклеотидов составляет, например, 50 нд, предпочтительно 40 нд и более предпочтительно 30 нд. Конкретными примерами количества нуклеотидов во внутренней области (Z) являются, например, от 19 до 50 нд, от 20 до 40 нд, от 21 до 30 нд и от 21 до 25 нд.

Если внутренняя область (Z) включает последовательность, подавляющую экспрессию, внутренней областью (Z) может быть, например, область, состоящая только из последовательности, подавляющей экспрессию, или область, включающая последовательность, подавляющую экспрессию. Количество нуклеотидов последовательности, подавляющей экспрессию, составляет, например, от 15 до 30 нд, предпочтительно от 19 до 25 нд, более предпочтительно от 19 до 23 нд, еще более

предпочтительно, 21 нд, 22 нд, 23 и особенно предпочтительно 23 нд. Внутренняя область (Z), если включает последовательность, подавляющую экспрессию, может также иметь дополнительную последовательность на 5' конце и/или на 3' конце последовательности, подавляющей экспрессию. Количество нуклеотидов дополнительной последовательности составляет, например, от 1 до 31 нд, предпочтительно от 1 до 21 нд, более предпочтительно от 1 до 11 нд, еще более предпочтительно от 1 до 7 нд, и еще более предпочтительно от 1 до 3 нд.

Количество нуклеотидов в области (Xc) составляет, например, от 1 до 49 нд, предпочтительно от 1 до 39 нд и более предпочтительно от 1 до 29 нд. Количество нуклеотидов в области (Yc) составляет, например, от 1 до 49 нд, предпочтительно от 1 до 39 нд и более предпочтительно от 1 до 29 нд. Предпочтительно, чтобы количество нуклеотидов в любой области (Xc) или (Yc) составляло от 1 до 4 нд, но предпочтительно, чтобы оно составляло 1 нд, 2 нд или 3 нд.

Количество нуклеотидов во внутренней области (Z), области (Xc) и области (Yc) может быть представлено, например, как « $Z \geq Xc + Yc$ » в формуле (2). В качестве конкретного примера, количество нуклеотидов « $Xc + Yc$ », например, такое же, как количество во внутренней области (Z), или меньше, чем во внутренней области (Z). В случае последнего « $Z - (Xc + Yc)$ » составляет, например, от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 4 и более предпочтительно от 1, 2 или 3. « $Z - (Xc + Yc)$ » соответствует, например, количеству нуклеотидов (F) свободной области (F) во внутренней области (Z).

Во второй молекуле ssPN длины линкерной области (Lx) и линкерной области (Ly) ничем конкретно не ограничены. Линкерная область (Lx) является такой, как указано выше. Если структурные единицы линкерной области (Ly) содержат нуклеотид, количество нуклеотидов в линкерной области (Ly) имеет нижний предел, например, 1 нд, предпочтительно 2 нд и более предпочтительно 3 нд; и верхний предел составляет, например, 100 нд, предпочтительно 80 нд и более предпочтительно 50 нд. Конкретные примеры количества нуклеотидов в каждой из линкерных областей включают, без ограничения указанным, от 1 до 50 нд, от 1 до 30 нд, от 1 до 20 нд, от 1 до 10 нд, 1- до 7 нд и от 1 до 4-х нд. Предпочтительно, чтобы линкерная область (Ly) была структурой, не вызывающей самоотжиг в пределах своей собственной области.

Линкерная область (Ly) может быть, например, такой же или отличной от линкерной области (Lx).

Полная длина второй молекулы ssPN ничем конкретно не ограничена. Во второй молекуле ssPN сумма количества нуклеотидов (количество нуклеотидов полноразмерной последовательности) имеет нижний предел, например, 38 нд, предпочтительно 42 нд,

более предпочтительно 44 нд, но все же предпочтительно 48 и особенно предпочтительно 50 нд; и верхний предел составляет, например, 300 нд, предпочтительно 200 нд, более предпочтительно 150 нд, еще более предпочтительно 100 нд и особенно предпочтительно 80 нд. Конкретными примерами суммы количества нуклеотидов полной длины второй молекулы ssPN являются от 38 до 300 нд, от 42 до 200 нд, от 44 до 150 нд, от 48 до 100 нд и от 50 нд до 80 нд. Во второй молекуле ssPN сумма количества нуклеотидов, за исключением нуклеотидов в линкерной области (Lx) и линкерной области (Ly), имеет нижний предел, например, 38 нд, предпочтительно 42 нд, более предпочтительно 44 нд, а еще более предпочтительно 48 нд и особенно предпочтительно 50 нд; и верхний предел составляет, например, 300 нд, предпочтительно 200 нд, более предпочтительно 150 нд, еще более предпочтительно 100 нд, еще более предпочтительно 80 нд и особенно предпочтительно 60 нд. Конкретные примеры суммы количества нуклеотидов за исключением нуклеотидов в линкерной области (Lx) представляют от 38 до 300 нд, от 42 до 200 нд, от 44 до 150 нд, от 48 до 100 нд, 48. - до 80 нд и от 50 до 60 нд.

В молекуле ssPN просто требуется, чтобы линкерная область (Lx) имела ненуклеотидную структуру, а структурные единицы конкретно не ограничиваются. Примеры структурных единиц включают нуклеотидные остатки. Примеры нуклеотидных остатков включают рибонуклеотидные остатки и дезоксирибонуклеотидные остатки. Примеры нуклеотидных остатков включают немодифицированные нуклеотидные остатки без модификации и модифицированные нуклеотидные остатки с модификацией. Молекулы ssPN могут, например, содержать модифицированный нуклеотидный остаток, что позволяет улучшить устойчивость к нуклеазам и повысить стабильность. Молекула ssPN может также, например, дополнительно содержать ненуклеотидный остаток, отличный от нуклеотидного остатка.

Предпочтительно, чтобы каждая из структурных единиц области (Xc), области (X), области (Y) и области (Yc) была нуклеотидным остатком. Каждая из областей, например, состоит из следующих остатков (1) - (3):

- (1) немодифицированный нуклеотидный остаток,
- (2) модифицированный нуклеотидный остаток,
- (3) немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток.

Линкерная область (Lx), например, может состоять только из ненуклеотидного остатка или может состоять из ненуклеотидного и нуклеотидного остатка. Линкерная область (Lx) состоит, например, из следующих остатков (4) - (7):

- (4) ненуклеотидный остаток,

- (5) нуклеотидный остаток и немодифицированный нуклеотидный остаток,
- (6) нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток,
- (7) нуклеотидный остаток, немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток.

Структурные единицы линкерной области (L<sub>y</sub>) ничем конкретно не ограничены, и примеры включают нуклеотидные остатки и нуклеотидные остатки. Линкерная область, например, может состоять только из нуклеотидного остатка или может состоять только из нуклеотидного остатка, или может состоять из нуклеотидного остатка и нуклеотидного остатка. Линкерная область состоит, например, из следующих остатков (1) - (7):

- (1) немодифицированный нуклеотидный остаток,
- (2) модифицированный нуклеотидный остаток,
- (3) немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток,
- (4) нуклеотидный остаток,
- (5) нуклеотидный остаток и немодифицированный нуклеотидный остаток,
- (6) нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток,
- (7) нуклеотидный остаток, немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток.

Примеры молекул ssPN включают молекулу, состоящую только из нуклеотидных остатков, за исключением линкерной области (L<sub>x</sub>), и молекулы, содержащей нуклеотидный остаток, отличный от нуклеотидного остатка. В молекуле ssPN нуклеотидные остатки, например, могут быть только немодифицированными нуклеотидными остатками или могут быть только модифицированными нуклеотидными остатками, или могут быть как немодифицированным нуклеотидным остатком, так и модифицированным нуклеотидным остатком. Если молекула ssPN содержит немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток, количество модифицированного нуклеотидного остатка конкретно не ограничено, а составляет, например, «один или несколько», в частности, например, от 1 до 5, предпочтительно 1 до 4, более предпочтительно от 1 до 3 и наиболее предпочтительно от 1 до 2. Если молекула ssPN содержит нуклеотидный остаток, количество нуклеотидных остатков конкретно не ограничено, но составляет, например, «один или несколько», и, в частности, например, 1 или 2.

В молекуле ssPN предпочтительно, чтобы нуклеотидный остаток представлял собой, например, рибонуклеотидный остаток. В этом случае молекула ssPN по

настоящему изобретению также упоминается, например, как «молекула P-ssRNA». Примеры молекул P-ssRNA включают молекулу, состоящую только из рибонуклеотидных остатков, за исключением линкерной области (Lx), и молекулы, содержащей ненуклеотидный остаток, отличный от рибонуклеотидного остатка. В молекуле P-ssRNA, например, рибонуклеотидные остатки могут быть только немодифицированными рибонуклеотидными остатками или могут быть только модифицированными рибонуклеотидными остатками или могут содержать как немодифицированный рибонуклеотидный остаток, так и модифицированный рибонуклеотидный остаток.

Если молекула P-ssRNA содержит, например, модифицированный остаток рибонуклеотида, отличный от немодифицированного рибонуклеотидного остатка, количество модифицированных рибонуклеотидных остатков ничем конкретно не ограничено, и составляет, например, «один или несколько», в частности, например, от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, более предпочтительно от 1 до 3 и наиболее предпочтительно от 1 до 2. Примеры модифицированных остатков рибонуклеотидов, соответствующих немодифицированным остаткам рибонуклеотидов, включают остаток дезоксирибонуклеотидов с заменой остатка рибозы остатком дезоксирибозы. Если молекула P-ssRNA содержит, например, дезоксирибонуклеотидный остаток, отличный от немодифицированного рибонуклеотидного остатка, количество дезоксирибонуклеотида ничем конкретно не ограничено, и составляет, например, «один или несколько», в частности, например, от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, более предпочтительно от 1 до 3 и наиболее предпочтительно 1 или 2.

Предпочтительные молекулы ssPN, которые подавляют экспрессию гена NEK6, включают одноцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность, подавляющую экспрессию гена NEK6, выбранную из SEQ ID NO: 1-5, и содержит область (Xc), линкерную область (Lx), область (X), область (Y), линкерную область (Ly) и область (Yc) в этом порядке от 5' конца к 3' концу,

где область (X) и область (Y) связаны друг с другом, образуя внутреннюю область (Z),

где область (Xc) является комплементарной области (X),

где область (Yc) является комплементарной области (Y), и

где линкерная область (Lx) и линкерная область (Ly) имеют ненуклеотидную структуру, включающую по меньшей мере один из числа пирролидинового остова и пиперидинового скелета, и

где внутренняя область (Z) содержит последовательность, подавляющую экспрессию.

(4) молекула ssNc

Будет описана молекула ssNc, которая является одной из нуклеиновых кислот, которые подавляют экспрессию гена НЕК6.

Молекула ssNc означает молекулу нуклеиновой кислоты с одноцепочечной РНК, раскрытую в WO2012/05368, и, в частности, является следующей.

Молекула ssNc представляет собой одноцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, подавляющую экспрессию, которая подавляет экспрессию целевого гена, и

содержит 5' боковую область (Xc), внутреннюю область (Z) и 3' боковую область (Yc) в этом порядке от 5' конца к 3' концу,

причем внутренняя область (Z) состоит из внутренней 5' боковой области (X), связанной с внутренней 3' боковой областью (Y),

где 5' боковая область (Xc) является комплементарной внутренней 5' боковой области (X),

где 3' боковая область (Yc) является комплементарной внутренней 3' боковой области (Y),

где по меньшей мере одна из внутренней области (Z), 5' боковой области (Xc) и 3' боковой области (Yc) содержит последовательность, подавляющую экспрессию.

Молекула ssNc имеет несвязанные 5'-конец и 3'-конец, и может также упоминаться как линейная одноцепочечная нуклеотидная молекула. Например, молекула ssNc по настоящему изобретению имеет внутреннюю область (Z), в которой внутренняя 5' область (X) и внутренняя 3' область (Y) непосредственно связаны.

В молекуле ssNc 5' боковая область (Xc) является комплементарной внутренней 5' боковой области (X), а 3' боковая область (Yc) является комплементарной внутренней 3' боковой области (Y). Следовательно, на 5' конце область (Xc) сворачивается в направлении области (X), и область (Xc) и область (X) могут образовывать двойную цепь путем самоотжига, тогда как на 3' конце область (Yc) сгибается в направлении области (Y), а область (Yc) и область (Y) могут образовывать двойную цепь за счет самоотжига.

Молекула ssNc, таким образом, может образовывать двойную цепь внутри молекулы и имеет структуру, явно отличающуюся от структуры, в которой две отдельные одноцепочечные РНК образуют двухцепочечную РНК с полным отжигом, например, как миРНК, используемые для обычной РНК-интерференции.

Описание для молекул ssPN может быть применимо к последовательности, подавляющей экспрессию, в молекуле ssNc.

Предполагается, что подавление экспрессии гена НЕК6 молекулой ssNc

обусловлено, например, принятием структуры, в которой последовательность, подавляющая экспрессию, расположена по меньшей мере в одной из числа внутренней области (Z), 5' боковой области (Xc) и 3' боковой области (Yc), что приводит к РНК-интерференции или явлению, похожему на РНК-интерференцию (явлению, подобному РНК-интерференции). Здесь механизмы молекул ssNc также не ограничены, как и в случае с механизмами молекул ssPN. Молекула ssNc не является молекулой, которая вводится в клетку или т.п. в виде дцРНК, состоящей из двух одноцепочечных РНК, таких как так называемая миРНК, и, кроме того, удаление последовательности, подавляющей экспрессию, необязательно преимущественно в клетке. Таким образом, можно также считать, что молекулы ssNc обладают, например, функцией, подобной РНК-интерференции.

В молекуле ssNc последовательность, подавляющая экспрессию, содержится по меньшей мере в одной из числа внутренней области (Z), 5' боковой области (Xc) и 3' боковой области (Yc). Например, молекула ssNc может иметь одну из последовательностей, подавляющих экспрессию, или может иметь две или более из них. В последнем случае, например, молекула ssNc может иметь две или более одинаковых последовательностей, подавляющих экспрессию гена НЕК6, или может иметь две или более разных последовательностей, подавляющих экспрессию гена НЕК6. Если молекула ssNc имеет две или более последовательностей, подавляющих экспрессию, относительное расположение каждой последовательности, подавляющей экспрессию, конкретно не ограничивается, и она может находиться в любой одной области из внутренней области (Z), 5' боковой области (Xc) и 3' боковой области (Yc) или может находиться в разных областях.

Во внутренней области (Z) внутренняя 5' боковая область (X) и внутренняя 3' боковая область (Y) связаны друг с другом. Область (X) и область (Y), например, непосредственно связаны и не имеют промежуточной последовательности между ними. Внутренняя область (Z) обозначена как «состоит из внутренней 5' боковой области (X), связанной с внутренней 3' боковой областью (Y)», чтобы показать взаимосвязь последовательностей 5' боковой области (Xc) и 3' боковой области (Yc) и не ограничена, тем, что во внутренней области (Z) внутренняя 5' боковая область (X) и внутренняя 3' боковая область (Y) являются отдельными независимыми областями, например, при использовании молекулы ssNc. Другими словами, например, если внутренняя область (Z) имеет последовательности, подавляющие экспрессию, последовательности, подавляющие экспрессию, могут быть расположены в пределах области (X) и области (Y) во внутренней области (Z).

В молекуле ssNc 5' боковая область (Xc) является комплементарной внутренней 5' боковой области (X). Здесь требуется, чтобы область (Xc) просто имела последовательность, комплементарную всей области (X) или ее частичной области, и предпочтительно, чтобы она, в частности, например, содержала последовательность, комплементарную всей области (X) или ее части или состояла из комплементарной последовательности. Область (Xc) может быть, например, полностью комплементарной к полной комплементарной области или частичн комплементарной области (X), или один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными, но предпочтительно быть комплементарными. В молекуле ssNc 3' боковая область (Yc) является комплементарной внутренней 3' боковой области (Y). Здесь требуется, чтобы область (Yc) просто имела последовательность, комплементарную всей области (Y) или ее части, и предпочтительно, чтобы она, в частности, например, содержала последовательность, комплементарную всей или части области (Y) или состояла из комплементарной последовательности. Область (Yc) может быть, например, полностью комплементарной к полной комплементарной области или частично комплементарной области (Y), или один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными, но предпочтительно быть комплементарными. Один нуклеотид или несколько нуклеотидов означает, например, 1-3 нд, предпочтительно 1 нд или 2 нд.

Например, в молекуле ssNc 5'-боковая область (Xc) и внутренняя 5'-боковая область (X) могут быть прямо или косвенно связаны. В первом случае примеры прямых связей включают фосфодиэфирную связь. В последнем случае примеры включают форму, имеющую линкерную область (Lx) между областью (Xc) и областью (X), в которой область (Xc) и область (X) связаны друг с другом через линкерную область (Lx).

Например, в молекуле ssNc 3' боковая область (Yc) и внутренняя 3' боковая область (Y) могут быть прямо или косвенно связаны. В первом случае примеры прямых связей включают фосфодиэфирную связь. В последнем случае примеры включают форму, имеющую линкерную область (Ly) между областью (Yc) и областью (Y), в которой область (Yc) и область (Y) связаны друг с другом через линкерную область (Ly).

Например, молекула ssNc может иметь как линкерную область (Lx), так и линкерную область (Ly) или может иметь одну любую из них. Последние случаи включают форму, которая имеет линкерную область (Lx) между 5' боковой областью (Xc) и внутренней 5' боковой областью (X) и не имеет линкерную область (Ly) между 3' боковой областью (Yc) и внутреннюю 3' боковую область (Y), другими словами, в которой область (Yc) и область (Y) непосредственно связаны. Между тем, примеры последних случаев включают форму, которая имеет линкерную область (Ly) между 3'



боковой областью (Yc) и внутренней 3' боковой областью (Y) и не имеет линкерную область (Lx) между 5' боковой областью (Xc) и внутренней 5' боковой областью (X), другими словами, в которой область (Xc) и область (X) непосредственно связаны.

Предпочтительно, чтобы линкерная область (Lx) и линкерная область (Ly) имели структуру, не вызывающую самоотжиг внутри своих собственных областей.

Что касается молекулы ssNc, пример молекул ssNc, не имеющих линкерной области, будет описан согласно схематическим диаграммам на Фигуре 5. Фигура 5 (A) представляет собой схематическую диаграмму, показывающую схему порядка каждой области от 5' конца к 3' концу молекулы ssNc, а Фигура 5 (B) представляет собой схематическую диаграмму, показывающую состояние, в котором молекула ssNc образует двойную цепь внутри молекулы. Как показано на Фигуре 5 (B), в молекуле ssNc 5'-боковая область (Xc) сворачивается, и двойная цепь образуется между 5' боковой областью (Xc) и внутренней 5' боковой областью (X); и 3' боковая область (Yc) сворачивается, и двойная цепь образуется между 3' боковой областью (Yc) и внутренней 3' боковой областью (Y). На Фигуре 5 показан только порядок связывания каждой области и относительное расположение каждой области, которая образует двойную цепь, и, например, длина каждой области и т.п. не ограничена этим.

Что касается молекулы ssNc, пример молекул ssNc, имеющих линкерную область, будет описан согласно схематическим диаграммам на Фигуре 3. Фигура 3 (A) представляет собой схематическую диаграмму, показывающую схему порядка расположения каждой области от 5' конца к 3' концу примерной молекулы ssNc, а Фигура 3 (B) представляет собой схематическую диаграмму, показывающую состояние, в котором молекула ssNc образует двойную цепь внутри молекулы. Как показано на Фигуре 3 (B), в молекуле ssNc двойные цепи образуются между 5' боковой областью (Xc) и внутренней 5' боковой областью (X) и между внутренней 3' боковой областью (Y) и 3' боковой областью (Yc) и область (Lx) и (Ly) принимают форму петли. На Фигуре 3 показан только порядок связывания каждой области и относительное расположение каждой области, которая образует двойную цепь, и, например, длина каждой области и т.п. не ограничена этим.

В молекуле ssNc количество нуклеотидов в 5' боковой области (Xc), внутренней 5' боковой области (X), внутренней 3' боковой области (Y) и 3' боковой области (Yc) ничем конкретно не ограничено, и, например, является следующим.

5' боковая область (Xc) может, например, быть комплементарной всей области внутренней 5' боковой области (X). В этом случае предпочтительно, чтобы область (Xc), например, имела ту же длину в нуклеотидах, что и область (X), и состояла из нуклеотидной последовательности, комплементарной всей области от 5' конца до 3' конца

области (X). Область (Xc) более предпочтительно имеет ту же длину в нуклеотидах, что и область (X), и предпочтительно, чтобы все нуклеотиды в области (Xc) были комплементарны всем нуклеотидам в области (X). Более того, это ничем конкретно не ограничено, и, например, один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными.

5' боковая область (Xc) также может быть, например, комплементарной частичной области внутренней 5' боковой области (X). В этом случае предпочтительно, чтобы область (Xc) имела, например, ту же длину в нуклеотидах, что и часть области (X), иными словами, состояла из нуклеотидной последовательности с длиной в нуклеотидах, которая короче на один или несколько нуклеотидов, чем область (X). Область (Xc) более предпочтительно имеет ту же длину в нуклеотидах, что и часть области (X), и предпочтительно, чтобы все нуклеотиды в области (Xc) были комплементарны всем нуклеотидам в части области (X). Предпочтительно, чтобы эта часть области (X) была, например, областью (сегментом), состоящей(им) из нуклеотидной последовательности, идущей от 5' концевой нуклеотида (первого нуклеотида) в области (X).

3' боковая область (Yc) может быть, например, комплементарной всей области внутренней 3' боковой области (Y). В этом случае предпочтительно, чтобы область (Yc), например, имела ту же длину в нуклеотидах, что и область (Y), и состояла из нуклеотидной последовательности, комплементарной всей области от 5' конца до 3' конца области (Y). Область (Yc) более предпочтительно имеет ту же длину в нуклеотидах, что и область (Y), и предпочтительно, чтобы все нуклеотиды в области (Yc) были комплементарны всем нуклеотидам в области (Y). Более того, это ничем конкретно не ограничено, и, например, один или несколько нуклеотидов могут быть не комплементарными.

3' боковая область (Yc) также может, например, дополнять частичную область внутренней 3' боковой области (Y). В этом случае предпочтительно, чтобы область (Yc) имела, например, ту же длину в нуклеотидах, что и часть области (Y), иными словами, состояла из нуклеотидной последовательности с длиной в нуклеотидах, которая короче на один или несколько нуклеотидов, чем область (Y). Область (Yc) более предпочтительно имеет ту же длину в нуклеотидах, что и часть области (Y), и предпочтительно, чтобы все нуклеотиды в области (Yc) были комплементарны всем нуклеотидам в части области (Y). Предпочтительно, чтобы часть области (Y) была, например, областью (сегментом), состоящей из нуклеотидной последовательности, проходящей от 3'-конца нуклеотида (первого нуклеотида) в области (Y).

В молекуле ssNc отношение количества нуклеотидов (Z) во внутренней области (Z)

к количеству нуклеотидов (X) во внутренней 5' боковой области (X) и количеству нуклеотидов (Y) во внутренней 3' боковой области (Y) и связь количества нуклеотидов (Z) во внутренней области (Z) с количеством нуклеотидов (Xс) во внутренней 5' боковой области (Xс) и количеством нуклеотидов (Yс) в 5' боковой области (Yс) удовлетворяют, например, требованиям следующих формул (1) и (2).

$$Z = X + Y \dots (1)$$

$$Z \geq Xс + Yс \dots (2)$$

В молекуле ssNc соотношение длины между числом нуклеотидов (X) во внутренней 5' боковой области (X) и числом нуклеотидов (Y) во внутренней 3' боковой области (Y) ничем конкретно не ограничено, и может удовлетворять, например, любому требованию следующих формул.

$$X = Y \dots (19)$$

$$X < Y \dots (20)$$

$$X > Y \dots (21)$$

В молекуле ssNc соотношение количества нуклеотидов (X) во внутренней 5' боковой области (X), количества нуклеотидов (Xс) в 5' боковой области (Xс), количества нуклеотидов (Y) в внутренней 3' боковой области (Y) и количество нуклеотидов (Yс) в 3' боковой области (Yс) удовлетворяет, например, любому требованию следующего (a) - (d).

(a) Удовлетворяет требованиям следующих формул (3) и (4).

$$X > Xс \dots (3)$$

$$Y = Yс \dots (4)$$

(б) Удовлетворяет требованиям следующих формул (5) и (6).

$$X = Xс \dots (5)$$

$$Y > Yс \dots (6)$$

(с) Удовлетворяет требованиям следующих формул (7) и (8).

$$X > Xс \dots (7)$$

$$Y > Yс \dots (8)$$

(d) Удовлетворяет требованиям следующих формул (9) и (10).

$$X = Xс \dots (9)$$

$$Y = Yс \dots (10)$$

В (a) - (d) предпочтительно, чтобы разность между числом нуклеотидов (X) во внутренней 5' боковой области (X) и количеством нуклеотидов (Xс) в 5' боковой области (Xс) и разница между числом нуклеотидов (Y) во внутренней 3' боковой области (Y) и количеством нуклеотидов (Yс) в 3' боковой области (Yс) удовлетворяла, например, следующим требованиям.

(а) Удовлетворяет требованиям следующих формул (11) и (12).

$$X - X_c = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2, 3 \text{ или } 4,$$

более предпочтительно 1, 2 или 3 ... (11)

$$Y - Y_c = 0 \dots (12)$$

(б) Удовлетворяет требованиям следующих формул (13) и (14).

$$X - X_c = 0 \dots (13)$$

$$Y - Y_c = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2, 3 \text{ или } 4,$$

более предпочтительно 1, 2 или 3 ... (14)

(с) Удовлетворяет требованиям следующих формул (15) и (16).

$$X - X_c = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2 \text{ или } 3,$$

более предпочтительно 1 или 2 ... (15)

$$Y - Y_c = 1-10, \text{ предпочтительно } 1, 2 \text{ или } 3,$$

более предпочтительно 1 или 2 ... (16)

(d) Удовлетворяет требованиям следующих формул (17) и (18).

$$X - X_c = 0 \dots (17)$$

$$Y - Y_c = 0 \dots (18)$$

Что касается молекул ssNc из (а) - (d), пример каждой структуры будет описан согласно схематическим диаграммам на Фигуре 4. Фигура 4 представляет ssNc, содержащий линкерную область (Lx) и линкерную область (Ly): (A) является примером молекул ssNc из (а); (B) является примером молекул ssNc из (b); (C) является примером молекул ssNc из (с); и (D) является примером молекул ssNc из (d). На Фигуре 4 пунктирные линии представляют состояние формирования двойной цепи путем самоотжига. В молекулах ssNc на Фигуре 4 количество нуклеотидов (X) во внутренней 5' боковой области (X) и количество нуклеотидов (Y) во внутренней 3' боковой области (Y) представлены как «X < Y» формулы (20), без ограничения указанным, но они могут быть представлены как «X = Y» формулы (19) или «X > Y» формулы (21). Кроме того, Фигура 4 представляет схематические диаграммы, показывающие только взаимосвязь между внутренней 5' боковой областью (X) и 5' боковой областью (Xc) и взаимосвязь между внутренней 3' боковой областью (Y) и 3' боковой областью (Yc), и, например, длина, форма и т.п. не ограничены этим, и, кроме того, наличие и отсутствие области линкера (Lx) и линкерной области (Ly) также не ограничены этим.

Молекулы ssNc из (а) - (с) имеют структуры, например, в которых каждая из 5' боковой области (Xc) с внутренней 5' боковой областью (X) и 3' боковой областью (Yc) с внутренней 3' боковой областью (Y) образует двойную цепь, имеющую таким образом нуклеотиды, которые не могут быть выровнены ни с 5' боковой областью (Xc), ни с 3'

боковой областью (Yc) во внутренней области (Z); и их также можно рассматривать как структуры, не образующие двойных нитей. Во внутренней области (Z) невыровненные нуклеотиды (также называемые нуклеотидами, не образующими двойную цепь) в дальнейшем именуется «свободными нуклеотидами». На Фигуре 4 область свободных нуклеотидов обозначена буквой «F». Количество нуклеотидов в области (F) ничем конкретно не ограничено. Количество нуклеотидов (F) в области (F) составляет, например, количество нуклеотидов «X - Xc» в случае молекулы ssNc из (a), количество нуклеотидов «Y - Yc» в случае молекулы ssNc из (b), сумма количества нуклеотидов «X - Xc» и количества нуклеотидов «Y - Yc» в случае молекулы ssNc из (c).

Напротив, молекула ssNc из (d) имеет структуру, например, в которой вся область внутренней области (Z) выровнена с 5' боковой областью (Xc) и 3' боковой областью (Yc), и ее также можно рассматривать как структуру, в которой вся область внутренней области (Z) образует двойную цепь. Здесь, в молекуле ssNc из (d), 5' конец 5' боковой области (Xc) и 3' конец 3' боковой области (Yc) не связаны.

Сумма количества нуклеотидов в 5' боковой области (Xc), 3' боковой области (Yc) и свободных нуклеотидов (F) во внутренней области (Z) будет количеством нуклеотидов во внутренней области (Z). Таким образом, длина 5' боковой области (Xc) и 3' боковой области (Yc) определяется соответствующим образом, например, в соответствии с длиной внутренней области (Z) и количеством и положением свободных нуклеотидов.

Количество нуклеотидов во внутренней области (Z) составляет, например, 19 нд или более. Нижний предел количества нуклеотидов составляет, например, 19 нд, предпочтительно 20 нд и более предпочтительно 21 нд. Верхний предел количества нуклеотидов составляет, например, 50 нд, предпочтительно 40 нд и более предпочтительно 30 нд. Конкретными примерами количества нуклеотидов во внутренней области (Z) являются, например, от 19 до 50 нд, от 20 до 40 нд, от 21 до 30 нд и от 21 до 23 нд.

Если внутренняя область (Z) включает последовательность, подавляющую экспрессию, внутренней областью (Z) может быть, например, область, состоящая только из последовательности, подавляющей экспрессию, или область, включающая последовательность, подавляющую экспрессию. Количество нуклеотидов последовательности, подавляющей экспрессию, составляет, например, от 15 до 30 нд, предпочтительно от 19 до 25 нд, более предпочтительно от 19 до 23 нд, еще более предпочтительно, 21, 22, 23 нд и особенно предпочтительно 23 нд. Внутренняя область (Z), если включает последовательность, подавляющую экспрессию, может также иметь дополнительную последовательность на 5' конце и/или на 3' конце последовательности,

подавляющей экспрессию. Количество нуклеотидов дополнительной последовательности составляет, например, от 1 до 31 нд, предпочтительно от 1 до 21 нд, более предпочтительно от 1 до 11 нд, еще более предпочтительно от 1 до 7 нд, и еще более предпочтительно от 1 до 3 нд.

Количество нуклеотидов в 5' боковой области (Xc) составляет, например, от 1 до 49 нд, предпочтительно от 1 до 39 нд и более предпочтительно от 1 до 29 нд. Количество нуклеотидов в 3' боковой области (Yc) составляет, например, от 1 до 49 нд, предпочтительно от 1 до 39 нд и более предпочтительно от 1 до 29 нд. Предпочтительно, чтобы количество нуклеотидов в 5'-боковой области (Xc) и 3'-боковой области (Yc) составляло от 1 до 4 нд, но предпочтительно 1 нд, 2 нд или 3 нд,

Количество нуклеотидов во внутренней области (Z), 5' боковой области (Xc) и 3' боковой области (Yc) может быть представлено, например, как  $\langle Z \geq Xc + Yc \rangle$  в формуле (2). В качестве конкретного примера, количество нуклеотидов  $\langle Xc + Yc \rangle$ , например, такое же, как во внутренней области (Z), или меньше, чем во внутренней области (Z). В последнем случае  $\langle Z - (Xc + Yc) \rangle$  составляет, например, от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 4 и более предпочтительно от 1, 2 или 3.  $\langle Z - (Xc + Yc) \rangle$  соответствует, например, количеству нуклеотидов (F) свободной области (F) во внутренней области (Z).

В молекуле ssNc длины линкерной области (Lx) и линкерной области (Ly) ничем конкретно не ограничены. Предпочтительно, чтобы линкерная область (Lx), например, была достаточно длинной для образования двойной цепи между внутренней 5' боковой области (X) и 5' боковой области (Xc), и для того, чтобы линкерная область (Ly) например, быть достаточно длинным для образования двойной цепи между внутренней 3' боковой областью (Y) и 3' боковой областью (Yc). Если структурные единицы области линкера (Lx) и линкерной области (Ly) содержат нуклеотид, каждый из количества нуклеотидов в линкерной области (Lx) и количества нуклеотидов в линкерной области (Ly) может быть одинаковым или различным, и их нуклеотидные последовательности также могут быть одинаковыми или разными. Количество нуклеотидов в линкерной области (Lx) и линкерной области (Ly) имеет нижний предел, например, 1 нд, предпочтительно 2 нд, и более предпочтительно 3 нд, и верхний предел, например, 100 нд, предпочтительно 80 нд и более предпочтительно 50 нд. Конкретные примеры количества нуклеотидов в каждой из линкерных областей включают, без ограничения указанным, от 1 до 50 нд, от 1 до 30 нд, от 1 до 20 нд, от 1 до 10 нд, 1- до 7 нд и от 1 до 4-х нд.

Полная длина молекулы ssNc ничем конкретно не ограничена. В молекуле ssNc по настоящему изобретению сумма количества нуклеотидов (количество нуклеотидов полноразмерной последовательности), описанной выше, имеет нижний предел, например,

38 нд, предпочтительно 42 нд, более предпочтительно 50 нд, все же предпочтительно 51 нд и особенно предпочтительно 52 нд; и верхний предел составляет, например, 300 нд, предпочтительно 200 нд, более предпочтительно 150 нд, еще более предпочтительно 100 нд, еще более предпочтительно 80 нд и особенно предпочтительно 60 нд. Конкретные примеры суммы количества нуклеотидов полноразмерной молекулы ssNc включают от 38 до 300 нд, от 42 до 200 нд, от 50 до 150 нд, от 51 до 100 нд и от 52 до 80 нд. В молекуле ssNc сумма количества нуклеотидов, за исключением нуклеотидов в линкерной области (Lx) и линкерной области (Ly), имеет нижний предел, например, 38 нд, предпочтительно 42 нд, более предпочтительно 50 нд, все же предпочтительно 51 нд и особенно предпочтительно 52 нд; и верхний предел составляет, например, 300 нд, предпочтительно 200 нд, более предпочтительно 150 нд, еще более предпочтительно 100 нд, еще более предпочтительно 80 нд и особенно предпочтительно 60 нд. Конкретные примеры суммы количества нуклеотидов за исключением того, что в линкерной области (Lx) включают от 38 до 300 нд, от 42 до 200 нд, от 50 до 150 нд, от 51 до 100 нд, от 52 до 80 нд и от 52 до 60 нд.

Примеры нуклеотидных остатков, которые являются основными структурными единицами молекулы ssNc, включают рибонуклеотидные остатки и дезоксирибонуклеотидные остатки. Примеры нуклеотидных остатков включают немодифицированные нуклеотидные остатки без модификации и модифицированные нуклеотидные остатки с модификацией. Молекулы ssNc могут, например, содержать модифицированный нуклеотидный остаток, что позволяет улучшить устойчивость к нуклеазам и повысить стабильность. Молекула ssNc по настоящему изобретению может также, например, дополнительно содержать ненуклеотидный остаток, отличный от нуклеотидного остатка.

В молекуле ssNc предпочтительно, чтобы структурные единицы каждой из числа внутренней области (Z), 5' боковой области (Xc) и 3' боковой области (Yc) были нуклеотидными остатками. Каждая из областей состоит, например, из остатков следующих (1) - (3):

- (1) немодифицированный нуклеотидный остаток,
- (2) модифицированный нуклеотидный остаток,
- (3) немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток.

В молекуле ssNc структурные единицы линкерной области (Lx) и линкерной области (Ly) ничем конкретно не ограничены, и примеры включают нуклеотидный остаток и ненуклеотидный остаток. Линкерная область, например, может состоять только

из нуклеотидного остатка или может состоять только из нуклеотидного остатка, или может состоять из нуклеотидного остатка и нуклеотидного остатка. Линкерная область состоит, например, из остатков следующих (1) - (7).

- (1) немодифицированный нуклеотидный остаток,
- (2) модифицированный нуклеотидный остаток,
- (3) немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток,
- (4) нуклеотидный остаток,
- (5) нуклеотидный остаток и немодифицированный нуклеотидный остаток,
- (6) нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток,
- (7) нуклеотидный остаток, немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток.

Если молекула ssNc имеет как линкерную область (Lx), так и линкерную область (Ly), то, например, структурные единицы обоих могут быть одинаковыми или разными. Конкретные примеры включают форму, в которой структурными единицами обеих линкерных областей являются нуклеотидные остатки, форму, в которой структурными единицами обеих линкерных областей являются нуклеотидные остатки, форму, в которой структурной единицей одной области является нуклеотидный остаток, тогда как структурной единицей другой линкерной области является нуклеотидный остаток.

Примеры молекул ssNc включают молекулу, состоящую только из нуклеотидных остатков, и молекулу, содержащую нуклеотидный остаток, отличный от нуклеотидного остатка. В молекуле ssNc по настоящему изобретению, например, нуклеотидный остаток может представлять собой только немодифицированные нуклеотидные остатки или может представлять собой только модифицированные нуклеотидные остатки или может представлять собой как немодифицированный нуклеотидный остаток, так и модифицированный нуклеотидный остаток. Если молекула ssNc содержит немодифицированный нуклеотидный остаток и модифицированный нуклеотидный остаток, число модифицированных нуклеотидных остатков конкретно не ограничено, а составляет, например, «один или несколько», конкретно, например, от 1 до 5, предпочтительно 1 до 4, более предпочтительно от 1 до 3 и наиболее предпочтительно от 1 до 2. Если молекула ssNc содержит нуклеотидный остаток, число нуклеотидных остатков конкретно не ограничено, а составляет, например, «один или несколько», в частности, например, от 1 до 8, от 1 до 6, от 1 до 4, 1, 2 или 3.

В молекуле ssNc предпочтительно, чтобы нуклеотидный остаток представлял собой, например, рибонуклеотидный остаток. В этом случае молекула ssNc по



настоящему изобретению также упоминается, например, как «молекула N-ssRNA». Примеры молекул N-ssRNA включают молекулу, состоящую только из рибонуклеотидных остатков, и молекулу, содержащую ненуклеотидный остаток, отличный от рибонуклеотидного остатка. В молекуле N-ssRNA, например, рибонуклеотидные остатки могут быть только немодифицированными рибонуклеотидными остатками, могут быть только модифицированными рибонуклеотидными остатками или могут содержать как немодифицированный рибонуклеотидный остаток, так и модифицированный рибонуклеотидный остаток.

Если молекула N-ssRNA содержит, например, модифицированный рибонуклеотидный остаток, отличный от немодифицированного рибонуклеотидного остатка, число модифицированных рибонуклеотидных остатков ничем конкретно не ограничено, и составляет, например, «один или несколько», в частности, например, от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, более предпочтительно от 1 до 3 и наиболее предпочтительно от 1 до 2. Модифицированный рибонуклеотидный остаток, соответствующий немодифицированному рибонуклеотидному остатку, может представлять собой, например, дезоксирибонуклеотидный остаток, в котором остаток рибозы замещен остатком дезоксирибозы. Если молекула N-ssRNA содержит, например, дезоксирибонуклеотидный остаток, отличный от немодифицированного рибонуклеотидного остатка, число дезоксирибонуклеотидных остатков ничем конкретно не ограничено и составляет, например, «один или несколько», в частности, например, 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, более предпочтительно от 1 до 3 и наиболее предпочтительно от 1 или 2.

#### (5) Способ синтеза молекулы ssPN и молекулы ssNc

Способы синтеза молекул ssPN и молекул ssNc ничем конкретно не ограничены и могут использовать обычные известные способы. Примеры способов синтеза включают способ синтеза с помощью метода геной инженерии и метода химического синтеза. Примеры методов геной инженерии включают способ синтеза транскрипции *in vitro*, способ с использованием вектора и способ с использованием ПЦР-кассеты. Вектор ничем конкретно не ограничен, и примеры включают невирусные векторы, такие как плазмиды, и вирусные векторы. Способ химического синтеза ничем конкретно не ограничен, и примеры включают фосфорамидитный способ и Н-фосфонатный способ. Способ химического синтеза может использовать, например, коммерчески доступный автоматический синтезатор нуклеиновых кислот. В способе химического синтеза обычно используется амидит. Амидит конкретно ничем не ограничен, и примеры коммерчески доступных амидитов включают РНК-фосфорамидиты (2'-O-TBDMSi, торговое

наименование, Samchully Pharmaceutical Co., Ltd), амидит ACE, амидит ТОМ, амидит СЕЕ, амидит СЕМ и амидит ТЕМ. Кроме того, молекула ssPN и молекула ssNc по настоящему изобретению могут быть изготовлены в соответствии со способами изготовления, описанными в WO2012/05368, WO2012/17919, WO2013/27843 и WO2016/159374.

#### (6) Антисмысловой полинуклеотид

Антисмысловой полинуклеотид, который является одной из нуклеиновых кислот, которые подавляют экспрессию гена НЕК6, будет описан ниже.

Антисмысловой полинуклеотид представляет собой антисмысловую ДНК и/или антисмысловую РНК и оказывает воздействие при введении в клетку антисмысловой нуклеиновой кислоты, направленное против полноразмерной или частичной РНК гена-мишени.

Механизмы ингибирования экспрессии антисмысловым полинуклеотидом включают:

1) стерическое ингибирование комплекса инициации трансляции путем направления в область от участка 5'-кэпа мРНК до примерно 25 нд ниже иницирующего кодона в качестве последовательности-мишени,

2) деградацию мРНК через РНКазу за счет одноцепочечной ДНК, комплементарной мРНК-мишени, и

3) ингибирование сплайсинга, которое касается пограничной области между экзоном и интроном пре-мРНК в качестве последовательности-мишени (ингибирование созревания мРНК),

но механизм ничем конкретно не ограничен при условии, что он подавляет экспрессию гена НЕК6.

Предпочтительно, чтобы антисмысловой полинуклеотид содержал модифицированный нуклеотидный остаток с точки зрения стабильности связывания с РНК (такой как значение  $T_m$ ), способности распознавания несоответствующих последовательностей, устойчивости к нуклеазе, активности РНКазы Н и тому подобного.

Для модифицированного нуклеотидного остатка предпочтительной является модификация остатка рибозы и фосфатного скелета.

#### (7) миРНК

миРНК, которая является одной из нуклеиновых кислот, которые подавляют экспрессию гена НЕК6, будет описана ниже.

миРНК участвует в регуляции экспрессии генов посредством ингибирования трансляции мРНК в белок или деградации мРНК. миРНК - это короткоцепочечная (от 20

до 25 нт) некодирующая РНК, присутствующая в клетке. Сначала миРНК транскрибируется как однонитевая при-РНК, которая содержит миРНК и ее комплементарную цепь и может принимать структуру шпильчатой петли из ДНК. Затем при-РНК разрезается на части ферментом, называемым Drosha, внутри ядра, превращается в пре-РНК и транспортируется за пределы ядра. Затем пре-РНК дополнительно расщепляется Dicer, тем самым превращаясь в миРНК. миРНК выполняет неполное связывание при гибридизации с 3'-нетранслируемой областью мРНК, чтобы ингибировать синтез белка, кодируемого мРНК.

миРНК, которая подавляет экспрессию гена NEK6, может быть получена на основе названия гена или информации о последовательности мРНК гена-мишени, например, согласно базе данных, такой как miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/index.html>).

#### (8) Нуклеотидные остатки, используемые для нуклеиновой кислоты

Нуклеотидный остаток, используемый для нуклеиновой кислоты в качестве активного ингредиента по настоящему изобретению, содержит сахар, основание и фосфат в качестве компонентов. Примеры нуклеотидных остатков включают рибонуклеотидные остатки и дезоксирибонуклеотидные остатки. Например, остаток рибонуклеотида содержит остаток рибозы в виде сахара и содержит аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U) в качестве основания; и остаток дезоксирибозы, например, имеет остаток дезоксирибозы в виде сахара и содержит аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и тимин (T) в качестве основания.

Нуклеотидные остатки включают немодифицированные нуклеотидные остатки и модифицированные нуклеотидные остатки. В немодифицированном нуклеотидном остатке каждый из компонентов, например, идентичен или по существу идентичен природному компоненту и предпочтительно идентичен или по существу идентичен природному компоненту в человеческом организме.

Модифицированный нуклеотидный остаток представляет собой, например, нуклеотидный остаток, в котором немодифицированный нуклеотидный остаток является модифицированным. Например, в модифицированном нуклеотиде любой из компонентов в немодифицированном нуклеотидном остатке может быть модифицирован. В настоящем изобретении «модификация» представляет собой, например, замену, добавление и/или удаление компонента и замену, добавление и/или удаление атома и/или функциональной группы в компоненте, и может упоминаться как «изменение». Примеры модифицированных нуклеотидных остатков включают природный нуклеотидный остаток и искусственно модифицированный нуклеотидный остаток. Природный модифицированный нуклеотидный остаток описан, например, в Limbach et al. (Limbach et

al., 1994, Summary: the modified nucleosides of RNA, *Nucleic Acids Res.*, 22:2183-2196). Кроме того, модифицированный нуклеотидный остаток может быть, например, альтернативным остатком нуклеотида.

Примеры модификаций нуклеотидных остатков включают модификацию рибозофосфатного остова (далее называемого рибофосфатным остовом).

Например, в рибофосфатном остове остаток рибозы может быть модифицирован. Остаток рибозы может быть, например, модифицирован у углерода в положении 2' и может быть специфически, например, замещен у гидроксильной группы, связанной с углеродом 2', водородом или фтором. При замещении гидроксильной группы на углероде 2' водородом остаток рибозы может быть замещен дезоксирибозой. Остаток рибозы может быть, например, замещен стереоизомером и может быть, например, замещен остатком арабинозы.

Рибофосфатный остов может быть замещен, например, нерибофосфатным остовом, имеющим нерибозный остаток и/или нефосфат. Примеры нерибофосфатных остовов включают незаряженную форму рибофосфатного остова. Примеры нуклеотидных альтернатив, имеющих замещение на нерибофосфатный остов, включают морфолин, циклобутил и пирролидин. В дополнение к этому примеры альтернатив включают искусственные остатки мономера нуклеиновой кислоты. Конкретные примеры включают PNA (пептидная нуклеиновая кислота), LNA (запертая нуклеиновая кислота) и ENA (2'-O, 4'-C-этилен-мостиковые нуклеиновые кислоты), а предпочтительной является PNA.

Например, в рибофосфатном остове фосфатная группа может быть модифицирована. В рибофосфатном остове фосфатная группа, ближайшая к остатку сахара, упоминается как фосфатная группа. Фосфатная группа заряжена отрицательно, и электрические заряды равномерно распределены по двум атомам кислорода, не связанным с остатком сахара. Среди четырех атомов кислорода в фосфатной группе два атома кислорода, не связанные с остатком сахара в фосфодиэфирной связи между нуклеотидными остатками, также в дальнейшем упоминаются как «несвязываемый (не связывающийся) кислород». Напротив, два атома кислорода, связанные с остатком сахара в фосфодиэфирной связи между нуклеотидными остатками, далее именуются как «связываемый (связывающийся) кислород». Предпочтительно, чтобы фосфатная группа подвергалась, например, модификации, чтобы перейти в незаряженное состояние, или модификации, чтобы распределение электрического заряда на несвязываемом атоме стало асимметричного типа.

Фосфатная группа может быть замещена, например, у несвязывающегося кислорода. Кислород может быть, например, замещен любым из числа атомов S (серы), Se

(селена), В (бора), С (углерода), Н (водорода), N (азота) и OR (R, например, представляет собой алкильную группу или арильную группу) и предпочтительно замещен S. Предпочтительно, чтобы в несвязывающих атомах кислорода, например, оба были замещены и более предпочтительно оба были замещены на S. Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселенат, боранофосфат, сложный эфир боранофосфата, фосфонат водород, фосфорамидат, алкил или арилфосфонат и фосфотриэфир, и среди них фосфородитиоат, в котором оба из двух несвязываемых атомов кислорода замещены на S, является предпочтительным.

Фосфатная группа может быть замещена, например, у связывающего кислорода. Кислород может быть замещен, например, любым из числа атомов S (серы), С (углерода) и N (азота). Примеры модифицированных фосфатных групп включают сшивающий фосфороамидат, имеющий замещение на N, сшивающий фосфоротиоат, имеющий замещение на S, и сшивающий метиленфосфонат, имеющий замещение на С. Предпочтительно, чтобы замещение связывающего кислорода было выполнено, например по меньшей мере на одном из числа 5'-концевого нуклеотидного остатка и 3'-концевого нуклеотидного остатка молекулы ssPN по настоящему изобретению; в случае 5'-стороны предпочтительной является замена на С, а в случае 3'-стороны предпочтительной является замена на N.

Фосфатная группа может быть замещена, например, не содержащим фосфора линкером, описанным выше. Линкеры включают, например, силоксан, карбонат, карбоксиметилцеллюлозу, карбамат, амид, тиоэфир, этиленоксид линкера, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксит, метиленимино, метиленметиленомино, метиленгидразо, метилендиметилгидразо и метиленоксиметиленомино, и предпочтительно включают метиленкарбониламино-группу и метиленметиленомино-группу.

Примеры модификаций концевого нуклеотидного остатка включают добавление другой молекулы. Примеры других молекул включают функциональные молекулы, такие как метящее вещество и защитную группу, как упомянуто выше. Примеры защитных групп включают S (серу), Si (кремний), В (бор) и сложноэфирную группу.

Другая молекула, например, может быть добавлена к фосфатной группе нуклеотидного остатка или может быть добавлена к фосфатной группе или сахарному остатку через спейсер. Конечный атом спейсера может быть добавлен или замещен, например, связывающим кислородом фосфатной группы или O, N, S или С остатка сахара. Предпочтительно, чтобы участок связывания остатка сахара был, например, С в положении 3' или С в положении 5' или атомом, связанным с ним. Спейсер также может

быть добавлен или замещен, например, концевым атомом нуклеотидной альтернативы, такой как PNA.

Спейсер ничем конкретно не ограничен и может включать, например,  $-(\text{CH}_2)_n$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{N}$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{O}$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{S}$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , неосновной сахар, амид, карбокси, амин, оксиамин, оксиимин, тиоэфир, дисульфид, тиомочевину, сульфонамид, морфолино и биотиновый реагент, флуоресцеиновый реагент. В формуле  $n$  является положительным целым числом, и  $n = 3$  или  $6$  является предпочтительным.

В дополнение к этому примеры молекул, добавляемых в конец, включают красители, интеркаляторы (например, акридин), сшивающие агенты (например, псорален, митомицин С), порфирин (ТРРС4, техафирин, сапфирин), полициклический ароматический углеводород (например, фенадин, дигидрофенадин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные носители (например, холестерин, желчная кислота, адамантануксусную кислоту, 1-пиренбутировую кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О (гексадецил) глицерин, геранилосигексильную группу гексадецилглицерола, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группа, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3- (олеоил) литохолевую кислоту, О3- (олеоил) холевую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и пептидные комплексы (например, пептиды Antennapedia, пептиды Tat), алкилаторы, фосфат, аминок, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG] 2, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченые радиоактивной меткой маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), ускорители транспорта/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота) и синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, акридин-имидазольные комплексы, тетразамакроциклические комплексы  $\text{Eu}^{3+}$ ).

Молекула нуклеиновой кислоты может иметь модификацию 5' конца, например, фосфатной группой или аналогом фосфатной группы. Примеры фосфатной группы включают 5' монофосфат  $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5')$ , 5' дифосфат  $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ , 5' трифосфат  $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ , 5'-гуанозиновые кэпы (7-метилированные или неметилированные, 7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'), 5'-аденозиновые кэпы (Appp), любая модифицированная или немодифицированная структура нуклеотидного кэпа (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'), 5'-тиофосфат (фосфоротиоат:  $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$ ), 5'-дитиофосфат (фосфородитиоат:  $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$ ), 5'-фосфоротиоловая кислота  $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5')$ , серозамещенный монофосфат, дифосфат и трифосфат (такие как как 5'- $\alpha$ -тиотрифосфат или 5'- $i$ -тиотрифосфат), 5'-фосфорамидат  $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ ,  $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ ), 5'-алкилфосфонат (например,  $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ ,  $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2$ , где R представляет собой

алкил [такой как метил, этил, изопропил или пропил]) и 5'-алкилэфирфосфат (например,  $RP(OH)(O)-O-5'$ , где R представляет собой алкилэфир [такой как метоксиметил или этоксиметил]).

В нуклеотидном остатке основание ничем конкретно не ограничено. Основание может быть, например, природным основанием или неприродным основанием. Основание может быть, например, природного происхождения или синтезированным. В качестве основания может использоваться, например, обычное основание или его модифицированный аналог.

Примеры оснований включают пуриновые основания, такие как аденин и гуанин, и пиримидиновые основания, такие как цитозин, урацил и тимин. Основания в ином случае включают инозин, тимин, ксантин, гипоксантин, нубуларин, изогуанизин и туберцидин. Примеры оснований включают алкильные производные, такие как 2-аминоаденин, 6-метилированный пурин; алкильные производные, такие как 2-пропилированный пурин; 5-галоурацил и 5-галоцитозин; 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин; 6-азоурацил, 6-азоцитозин и 6-азотимин; 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 5-галоурацил, 5-(2-аминопропил) урацил, 5-аминоаллил урацил; 8-галоат, аминированные, тиолированные, тиоалкилированные, гидроксильные и другие 8-замещенные пурины; 5-трифторметилированные и другие 5-замещенные пиримидины; 7-метилгуанин; 5-замещенный пиримидин; 6-азапиримидин; N-2, N-6 и O-6 замещенный пурин (включая 2-аминопропиладенин); 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин; дигидроурацил; 3-деза-5-азоцитозин; 2-амино пурин; 5-алкил урацил; 7-алкилгуанин; 5-алкил цитозин; 7-дезааденин; N6, N6-диметиладенин; 2,6-диаминопурин; 5-амино-аллил-урацил; N3-метилурацил; замещенный 1,2,4-триазол; 2-пиридинос; 5-нитроиндол; 3-нитропиррол; 5-метоксиурацил; урацил-5-оксиуксусная кислота; 5-метоксикарбонилметилурацил; 5-метил-2-тиоурацил; 5-метоксикарбонилметил-2-тиоурацил; 5-метиламино-2-тиоурацил; 3-(3-амино-3-карбокиспропил) урацил; 3-метилцитозин; 5-метилцитозин; N4-ацетилцитозин; 2-тиоцитозин; N6-метиладенин; N6-изопентиладенин; 2-метилтио-N6-изопентиладенин; N-метилгуанин; и O-алкилатные основания. Кроме того, примеры пуринов и пиримидинов включают те, которые раскрыты в Патенте США No. 3,687,808, «Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering», p. 858-859, ed. Kroschwitz J.I., John Wiley & Sons, 1990, и Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, p.613.

#### (9) Определение других терминов

Термины, используемые в описаниях нуклеиновых кислот в качестве активного ингредиента по настоящему изобретению, линкеров и тому подобного, являются такими,

которые обычно используются в данной области, и, например, могут быть определены следующим образом.

В настоящем изобретении «алкил» включает, например, линейные или разветвленные алкильные группы. Количество атомов углерода в алкиле конкретно не ограничено, но составляет, например, от 1 до 30, а предпочтительно от 1 до 6 или от 1 до 4. Примеры алкильных групп включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, н-гексил, изогексил, н-гептил, н-октил, н-нонил, н-децил. Предпочтительно, примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, н-гексил и изогексил.

В настоящем изобретении «алкенил» включает, например, линейные или разветвленные алкенилы. Алкенил включает те, которые имеют одну или несколько двойных связей или тому подобное в алкиле. Количество атомов углерода в алкениле конкретно не ограничено, но, например, аналогично таковому для алкила и предпочтительно составляет 2-8. Примеры алкенила включают винил, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-бутенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 1,3-бутадиенил и 3-метил-2-бутенил.

В настоящем изобретении «алкинил» включает, например, линейные или разветвленные алкинилы. Алкинил включает те, которые имеют одну или несколько тройных связей или тому подобное в алкиле. Количество атомов углерода в алкиниле конкретно не ограничено, но оно, например, аналогично таковому в алкиле и предпочтительно составляет от 2 до 8. Примеры алкинила включают этинил, пропинил и бутинил. Алкинил может дополнительно иметь, например, одну или несколько двойных связей.

В настоящем изобретении «арил» включает, например, моноциклические ароматические углеводородные группы и полициклические ароматические углеводородные группы. Примеры моноциклических ароматических углеводородных групп включают фенил. Примеры полициклических ароматических углеводородных групп включают 1-нафтил, 2-нафтил, 1-антрил, 2-антрил, 9-антрил, 1-фенантрил, 2-фенантрил, 3-фенантрил, 4-фенантрил и 9-фенантрил. Примеры предпочтительно включают фенил и нафтил, такой как 1-нафтил и 2-нафтил.

В настоящем изобретении «гетероарил» включает, например, моноциклические ароматические гетероциклические группы и конденсированные ароматические гетероциклические группы. Примеры гетероарила включают фурил (например, 2-фурил, 3-фурил), тиенил (например, 2-тиенил, 3-тиенил), пирролил (например, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил), имидазолил (например, 1-имидазолил, 2-имидазолил, 4-



имидазолил), пиразолил (например, 1-пиразолил, 3-пиразолил, 4-пиразолил), триазолил (например, 1,2,4-триазол-1-ил, 1, 2,4-триазол-3-ил, 1,2,4-триазол-4-ил), тетразолил (например, 1-тетразолил, 2-тетразолил, 5-тетразолил), оксазолил (например, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил), изоксазолил (например, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил), тиазолил (например, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил), тиадиазолил, изотиазолил-3-изотиазолил (например, 4-изотиазолил, 5-изотиазолил), пиридил (например, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил), пиридадинил (например, 3-пиридадинил, 4-пиридадинил), пиримидинил (например, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил), фуразанил (например, 3-фуразанил), пирадинил (например, 2-пирадинил), оксадиазолил (например, 1,3,4-оксадиазол-2-ил), бензофурил (например, 2-бензо [б] фурил, -бензо [б] фурил, 4-бензо [б] фурил, 5-бензо [b] фурил, 6-бензо [b] фурил, 7-бензо [b] фурил), бензотиенил (например, 2-бензо [b] тиенил, 3-бензо [b] тиенил, 4-бензо [b] тиенил, 5-бензо [b] тиенил, 6-бензо [b] тиенил, 7-бензо [b] тиенил), бензимидазолил (например, 1-бензоимидазолил, 2-бензоимидазолил, 4-бензоимидазолил, 5-бензоимидазолил), дибензофурил, бензоксазолил, бензотиазолил, хиноксалил (например, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 6-хиноксалинил), циннолинил (например, 3-циннолинил, 4-циннолинил, 5-циннолинил, 6-циннолинил, 8-циннолин циннолинил), хиназолил (например, 2-хиназолинил, 4-хиназолинил, 5-хиназолинил, 6-хиназолинил, 7-хиназолинил, 8-хиназолинил), хинолил (например, 2-хинолил, 3-хинолил, 4-хинолил, 5-хинолил, 6-хинолил, 7-хинолил, 8-хинолил), фтарадинил (например, 1-фтарадинил, 5-фтарадинил, 6-фтарадинил), изохинолил (например, 1-изохинолил, 3-изохинолил, 4-изохинолил, 5-изохинолил, 6-изохинолил, 7-изохинолил, 8-изохинолил), пурил, путеридинил (например, 2-путеридинил, 4-путеридинил, 6-путеридинил, 7-путеридинил), карбазолил, фенантридинил, акридинил (например, 1-акридинил, 2-акридинил, 3-акридинил, 4-акридинил, 9-акридинил), индолил (например, 1-индолил, 2-индолил, 3-индолил, 4-индолил, 5-индолил, 6-индолил, 7-индолил), изоиндолил и фенадинил (например, 1-фенадинил, 2-фенадинил) или фенотиадинил (например, 1-фенотиадинил, 2-фенотиадинил, 3-фенотиадинил, 4-фенотиадинил).

В настоящем изобретении «циклоалкил» представляет собой, например, циклическую насыщенную углеводородную группу, в которой число атомов углерода составляет, например, от 3 до 15. Примеры циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклические углеводородные мостиковые группы и спиро-углеводородные группы и предпочтительно включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и мостиковые циклические углеводородные группы.

В настоящем изобретении примеры «мостиковых циклических углеводородных групп» включают бицикло [2.1.0] пентил, бицикло [2.2.1] гептил, бицикло [2.2.2] октил и бицикло [3.2.1] октил, трицикло [2.2. 1.0] гептил, бицикло [3.3.1] нонан, 1-адамантил и 2-адамантил.

В настоящем изобретении примеры «спироуглеводородных групп» включают спиро [3.4] октил.

В настоящем изобретении «циклоалкенил» охватывает, например, циклическую ненасыщенную алифатическую углеводородную группу, в которой количество атомов углерода составляет, например, от 3 до 7. Примеры групп включают циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогексенил и циклогептенил и, предпочтительно, циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогексенил. Циклоалкенил также включает, например, мостиковую циклическую углеводородную группу и спироуглеводородную группу, имеющую ненасыщенную связь в кольце.

В настоящем изобретении примеры «арилалкила» включают бензил, 2-фенетил и нафталинилметил; примеры «циклоалкилалкил» или «циклилалкил» включают циклогексилметил и адамантилметил; и примеры «гидроксиалкила» включают гидроксиметил и 2-гидроксиэтил.

В настоящем изобретении «алкокси» включает алкил-О-группу, и примеры включают метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси и н-бутокси; примеры «алкоксиалкила» включают метоксиметил; и примеры «аминоалкила» включают 2-аминоэтил.

В настоящем изобретении примеры «гетероциклила» включают 1-пирролинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, 1-пирролидинил, 2-пирролидинил, 3-пирролидинил, пирролидинон, 1-имидазолинил, 2-имидазолинил, 4-имидазолинил, 1-имидазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил, имидазолидинон, 1-пиразолинил, 3-пиразолинил, 4-пиразолинил, 1-пиразолидинил, 3-пиразолидинил, 4-пиразолидинил, пиперидинон, пиперидино, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил -пиперидинил, 1-пиперадинил, 2-пиперадинил, пиперадинон, 2-морфолинил, 3-морфолинил, морфолино, тетрагидропиранил и тетрагидрофуранил.

В настоящем изобретении примеры «гетероциклилалкила» включают пиперидинилметил и пиперадинилметил; примеры «гетероциклилалкенила» включают 2-пиперидинилэтенил; и примеры «гетероарилалкила» включают пиридилметил и хинолин-3-илметил.

В настоящем изобретении «силил» включает группу, представленную формулой  $R_3Si$ , в которой R может быть независимо выбран из алкила, арила и циклоалкила,

описанных выше, и примеры включают триметилсилильную группу и трет-бутилдиметилсилильную группу; примеры «силилокси» включают триметилсилилоксигруппу; и примеры «силилоксиалкила» включают триметилсилилоксиметил.

В настоящем изобретении примеры «алкилена» включают метилен, этилен и пропилен.

В настоящем изобретении различные виды групп, упомянутых выше, могут быть замещены. Примеры заместителей включают гидроксид, карбоксид, галоген, галогенированный алкил (например,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CCl}_3$ ), нитро, нитрозо, циано, алкил (например, метил, этил, изопропил, трет-бутил), алкенил (например, винил), алкинил (например, этинил), циклоалкил (например, циклопропил, адамантил), циклоалкилалкил (например, циклогексилметил, адамантилметил), циклоалкенил (например, циклопропенил), арил (например, фенил, нафтил), арилалкил (например, бензил, фенил), гетероарил (например, пиридил, фурил), гетероарилалкил (например, пиридилметил), гетероциклил (например, пиперидил), гетероциклилалкил (например, морфолилметил), алкокси (например, метокси, этокси, пропокси, бупокси), галогенированный алкокси (например,  $\text{OCF}_3$ ), алкенилокси (например, винилокси, аллилокси), арилокси (например, фенилокси), алкилоксикарбонил (например, метоксикарбонил, этоксикарбонил, трет-бупоксикарбонил), арилалкилокси (например, бензилокси), аминоксид (алкиламино, например, [например, алкиламино] диметиламино), ациламино [например, ацетиламино, бензоиламино], арилалкиламино [например, бензиламино, три тиламино], гидроксидамино), алкиламиноалкил (например, диэтиламинометил), сульфамид и оксо.

#### (10) Ингибитор фосфорилирования белка SMAD2/3

Ингибирование фосфорилирования белка SMAD2/3 означает, что фосфорилирование SMAD2 и/или SMAD3, активизированное стимуляцией TGF- $\beta$ , ингибируется (контролируется).

SMAD2/3 является одним из R-SMAD (регулируемых рецептором SMAD), которые подвергаются фосфорилированию рецептором TGF-I типа, а после стимуляции TGF- $\beta$  фосфорилированные (активированные) SMAD2 и SMAD3 иммигрируют вместе с SMAD4, который является ко-SMAD (общий партнер SMAD), в ядро. Как показано в Примере 4, авторы обнаружили, что белок NEK6 взаимодействует с белком SMAD2/3 внутри клетки и способствует фосфорилированию белка SMAD2/3. Фосфорилированный белок SMAD2/3 образует белковый комплекс SMAD, иммигрирует в ядро и усиливает транскрипцию  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ 2-коллагена, интерферона  $\beta$ , интерлейкина-5, VEGF и т.п.

Соответственно, ингибирование SMAD-сигнальной системы ингибитором

фосфорилирования белка SMAD2/3 по настоящему изобретению обеспечивает контроль транскрипции  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ 2-коллагена, интерферона  $\beta$  и т.п., что, в свою очередь, полезно для подавления дифференцировки фибробласта, звездчатой клетки печени или т.п. в миофибробласт, контроля синтеза матрикса, вызываемого фибробластами или т.п., и регуляции воспалительных и иммунных реакций и т.п., в процессе заживления ран.

#### (11) Терапевтическое средство от фиброза

Терапевтическое средство для лечения фиброза по настоящему изобретению представляет собой терапевтическое средство для лечения фиброза печени, цирроза печени, вирусного гепатита, аутоиммунного гепатита, первичного билиарного гепатита, неалкогольного стеатогепатита, алкогольного заболевания печени, первичного склерозирующего холангита, гемохроматоза, болезни Вильсона, дефицита  $\alpha$ 1-антитрипсина, невирусного застойного цирроза печени, лекарственного расстройства печени, панкреатита, фиброза поджелудочной железы, фиброза сетчатки, рубцевания голосовых складок, фиброза слизистой оболочки голосовой полости, фиброза гортани, фиброза легкого, пневмонита, идиопатического фиброза легкого, неспецифического пневмонита, неспецифической организующейся пневмонии, десквамативного пневмонита, респираторного бронхиолит-ассоциированного пневмонита, острый пневмонита, лимфоцитарного пневмонита, саркоидоза, хронической эозинофильной пневмонии, острой эозинофильной пневмонии, лимфангиолейомиоматоза, легочно-альвеолярного протеиноза, синдрома Германского-Пудлака, легочного лангергансоклеточного гистиоцитоза, сидероза, амилоидоза, легочного альвеолярного микролитиаза, гиперчувствительного пневмонита, пневмокониоза, инфекционной болезни легких, лекарственной пневмонии, лучевой пневмонии, муковисцидоза, миелофиброза, фиброза почек, хронической почечной недостаточности, диабетической нефропатии, хронического гломерулонефрита, злокачественного нефросклероза, почечной недостаточности, брюшинного фиброза, коллагеноза, склеродермии, врожденного дискератоза, нефрогенного системного фиброза и, кроме того, заболевания, широко связанные с фиброгенезом, включая фиброгенез дыхательных путей, кишечный фиброгенез, фиброгенез мочевого пузыря, фиброгенез простаты и фиброгенез кожи. Предпочтительно терапевтическое средство предназначено для фиброза печени, цирроза печени, фиброза легких, пневмонита, фиброза почек и хронической почечной недостаточности.

Способ введения терапевтического средства от фиброза по настоящему изобретению ничем конкретно не ограничен, но предпочтительно, чтобы это было парентеральное введение, такое как ингаляция, внутривенная инъекция или трансдермальное введение. Доза молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему

изобретению в терапевтическом способе по настоящему изобретению конкретно ничем не ограничена при условии, что она является эффективным количеством для лечения заболевания, описанного выше, и варьирует в зависимости от типа заболевания, степени тяжести, возраста, массы тела, способа введения и т.п., но обычно может составлять от около 0,0001 до около 100 мг/кг массы тела на один раз для взрослого, например, от около 0,001 до около 10 мг/кг массы тела, и предпочтительно от около 0,005 до около 5 мг/кг массы тела. Такое количество можно вводить с интервалом, например, от трех раз в день до одного раза в месяц, предпочтительно от одного раза в день до недели. Терапевтическое средство от фиброза по настоящему изобретению обычно готовят в виде подходящей фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем и вводят в пероральной или парентеральной форме.

Далее настоящее изобретение будет подробно описано с помощью примеров и т.п., при этом настоящее изобретение не ограничивается ими. В данном случае условия культивирования были при 37°C, при 5% CO<sub>2</sub>. Кроме того, если не указано иное, среда, используемая для клеток LL29 линии легочных фибробластов человека, представляла собой среду F-12K (Gibco®), содержащую 10% FCS; среда, используемая для первичных звездчатых клеток печени (ScienCell Research Laboratories, Inc.), представляла собой среду для звездчатых клеток (ScienCell Research Laboratories, Inc.), содержащую 2% FCS и 1% добавку для роста клеток Stellate (SteCGS, ScienCell Research Laboratories, Inc.),

### Примеры

#### Пример 1: Нокдаун NEK6 с использованием миРНК

В клетках линии LL29 легочных фибробластов человека, полученных из легких пациента с IPF, трансфицировали миРНК к NEK6 человека (ON-TARGET plus SMART pool siRNA, Dharmacon Inc. или Stealth RNAi siRNA, Thermo Fisher Scientific, Inc.) с использованием Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen (TM)). Через 24 часа после трансфекции среду меняли со среды F-12K (Gibco®), содержащей 10% FCS, на среду F-12K, содержащую 0,1% BSA. Через 72 часа после трансфекции из клеток, трансфицированных миРНК, выделяли РНК с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen N.V.). Полученную таким образом РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®) для получения кДНК. Полученную таким образом кДНК подвергали ПЦР в реальном времени с использованием набора для экспрессии генов TaqMan (Applied Biosystems®) для изучения влияния нокдауна NEK6 на количество транскрипта гена NEK6. Количество транскрипта гена NEK6 рассчитывали путем деления измеренного значения для зонда Taqman NEK6 (HS00205221\_m1, Applied Biosystems (R)) на

измеренное значение для зонда 18s. Что касается зонда 18s, то следующий специально синтезированный зонд 18s MGB, специально синтезированный праймер 1 18s и специально синтезированный праймер 2 18s были смешаны таким образом, чтобы получить 0,2 мкМ, 0,4 мкМ и 0,4 мкМ соответственно и провести ПЦР в реальном времени.

Специально синтезированный зонд 18s MGB (Applied Biosystems (R)):

5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGC-3 '(SEQ ID NO: 57)

Специально синтезированный Праймер 1 18s (Thermo Fisher Scientific, Inc.):

5'-CGGCTACCACATCCAAGGAAG-3 '(SEQ ID NO: 58)

Специально синтезированный Праймер 2 18s (Thermo Fisher Scientific, Inc.):

5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3 '(SEQ ID NO: 59)

В качестве последовательностей миРНК использовали ON-TARGET plus SMART pool siRNA (смесь SEQ ID NO: 51-54 в равных количествах) и Stealth RNAi siRNA (SEQ ID NO: 55).

<ON-TARGET plus SMART pool siRNA>

siNEK6: 5'-CUGUCCUCGGCCUAUCUUC-3 '(SEQ ID NO: 51)

siNEK6: 5'-UAUUUGGGUGGUUCAGUUG-3 '(SEQ ID NO: 52)

siNEK6: 5'-CAACUCCAGCACAAUGUUC-3 '(SEQ ID NO: 53)

siNEK6: 5'-UACUUGAUCAUCUGCGAGA-3 '(SEQ ID NO: 54)

<Stealth RNAi siRNA>

siNEK6: 5'-AAGUACUCCAUACUGUCCUCUCC-3 '(SEQ ID NO: 55)

На Фигуре 6а показаны результаты ПЦР в реальном времени для NEK6, когда были введены ON-TARGET plus SMART pool siRNA к NEK6, а на Фигуре 6б показаны результаты для NEK6, когда были введены Stealth RNAi siRNA к NEK6. Введение миРНК к NEK6 подавляло количество транскрипта гена NEK6. Следовательно, было показано, что используемые миРНК к NEK6 эффективно подавляют экспрессию целевого гена.

Пример 2. Влияние нокдауна NEK6 на фосфорилирование белка SMAD2/3.

Чтобы исследовать возможность контроля белком NEK6 сигнала TGF- $\beta$ , в клетках, трансфицированных миРНК к NEK6, анализировали количество фосфорилированного SMAD2/3.

Клетки линии LL29 легочных фибробластов, полученных из легких пациента с IPF, трансфицировали ON-TARGET plus SMART pool siRNA к NEK6 человека (Dharmacon Inc.) или Stealth RNAi siRNA (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с использованием Lipofectamine RNAi MAX. Через 24 часа после трансфекции среду меняли со среды F-12К, содержащей 10% FCS, на среду F-12К, содержащую 0,1% BSA. Через 48 часов после

трансфекции добавляли человеческий белок TGF- $\beta$  (PeproTech, Inc.), чтобы обеспечить конечную концентрацию 5 нг/мл. Через два часа после добавления TGF- $\beta$  клетки лизировали с помощью буфера для образцов 2  $\times$  SDS (100 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 6 М мочевины, 12% глицерина, 2% коктейль ингибиторов протеаз [Nacalai Tesque Inc. ], 1% коктейль ингибиторов фосфатаз [Nacalai Tesque Inc.]), для получения клеточного экстракта. К полученному таким образом клеточному экстракту добавляли  $\beta$ -меркаптоэтанол и бромфеноловый синий так, чтобы обеспечить конечные концентрации 5% и 0,025% соответственно, и затем нагревали при 95°C в течение 4 минут для получения образца. С полученным таким образом образцом проводили SDS-PAGE для разделения белков, содержащихся в образце, в соответствии с их размерами. Затем разделенные белки переносили на мембрану PVDF и подвергали вестерн-блоттингу с антителом против фосфорилированного SMAD3 (Cell Signaling Technology, Inc.), антителом против фосфорилированного SMAD2 (Cell Signaling Technology, Inc.), анти-SMAD2/3 антителом (Cell Signaling Technology, Inc.), анти-NEK6 антителом (Santa Cruz Biotechnology Inc.) и анти- $\beta$ -актин антителом (Sigma-Aldrich Co. LLC.)

На Фигуре 7а показаны результаты вестерн-блоттинга фосфорилированного белка SMAD3, когда NEK6 был подвергнут нокдауну. При использовании миРНК к NEK6 количество белка NEK6 уменьшалось, и количество фосфорилированного SMAD3, повышаемого с помощью TGF- $\beta$ , также уменьшалось. При этом количество общего белка SMAD3 не изменялось. Между тем, на Фигуре 7б показаны результаты вестерн-блоттинга фосфорилированного белка SMAD2, когда NEK6 был подвергнут нокдауну. При использовании миРНК к NEK6 количество белка NEK6 уменьшалось, и количество фосфорилированного SMAD2, повышаемого с помощью TGF- $\beta$ , также уменьшалось. При этом количество общего белка SMAD2 не изменялось.

Следовательно, было показано, что фосфорилирование белка SMAD2/3 подавляется нокдауном NEK6.

Пример 3. Взаимодействие белка NEK6 и белка SMAD3 в клетке.

Чтобы исследовать, будет ли белок NEK6 взаимодействовать с SMAD3 и фосфорилировать SMAD3 внутри клетки, была проведена совместная иммунопреципитация.

В клетки линии LL29 легочных фибробластов человека, полученным из легких пациента с IPF, с помощью X-treme GENE HP (Roche Diagnostics K. K) трансфицировали экспрессирующий вектор, в который был клонирован NEK6 человека (pEZ-M02 Nek6, GeneCopoeia, Inc.), и экспрессирующий вектор, в который клонировали меченный FLAG SMAD3 человека (pEZ-M11 Flag-hSmad3, GeneCopoeia, Inc.). Через 24 часа после

трансфекции среду меняли. Через 48 часов после трансфекции клетки извлекали с помощью буфера для лизиса (175 мМ NaCl, 50 мМ HEPES, pH 7,6, 0,1% NP40, 0,2 мМ EDTA, pH 8,0, 1,4 мМ β-меркаптоэтанол, 1% коктейль ингибиторов протеаз, 1% коктейль ингибиторов фосфатаз), и получали центрифугированием надосадочную жидкость. К надосадочной жидкости добавляли гранулы TrueBlot Anti-Goat IgIP (Rockland Immunochemicals Inc.) и подвергали центрифугированию для устранения неспецифического связывания. К полученной таким образом надосадочной жидкости добавляли нормальные козы IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc.) в качестве контроля или анти-NEK6 антитело и инкубировали при 4°C в течение ночи, а затем добавляли гранулы TrueBlot Anti-Goat IgIP и инкубировали при 4°C в течение 4 часов. После центрифугирования и удаления надосадочной жидкости гранулы TrueBlot Anti-Goat IgIP промывали лизирующим буфером для устранения неспецифического связывания. К гранулам TrueBlot Anti-Goat IgIP добавляли загрузочный буфер 2 × SDS PAGE (100 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% глицерин, 0,2% бромфеноловый синий, 50 мМ DTT), нагревали при 95°C в течение 5 минут и извлекали совместный иммунопреципитат, содержащийся в надосадочной жидкости. Для получения совместного иммунопреципитата с анти-NEK6 антителом проводили Вестерн-блоттинг с анти-SMAD3 антителом (Cell Signaling Technology, Inc.) или анти-NEK6 антителом и определяли, могут ли белок NEK6 и белок SMAD3 иммунопреципитированы совместно.

На Фигуре 8а показаны результаты совместной иммунопреципитации с анти-NEK6 антителом. Белок NEK6 и белок SMAD3 были обнаружены в совместном иммунопреципитате.

Чтобы проанализировать, взаимодействует ли белок SMAD3 с NEK6 и фосфорилируется ли внутри клетки, экспрессирующий вектор для NEK6 человека и экспрессирующий вектор для меченного FLAG-меткой SMAD3 человека трансфицировали в клетки LL29. Через 24 часа после трансфекции среду меняли. Через 48 часов после трансфекции клетки извлекали с помощью буфера для лизиса (250 мМ NaCl, 50 мМ HEPES, pH 7,6, 0,1% NP40, 0,2 мМ EDTA, pH 8,0, 1,4 мМ β-меркаптоэтанол, 1% коктейль ингибиторов протеаз, 1% коктейль ингибиторов фосфатаз), и получали центрифугированием надосадочную жидкость. К полученной таким образом надосадочной жидкости добавляли аффинный гель анти-FLAG M2 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) и инкубировали при 4 °C в течение ночи. Затем проводили центрифугирование для удаления надосадочной жидкости. Аффинный гель Anti-FLAG M2 промывали лизирующим буфером для устранения неспецифического связывания. К аффинному гелю Anti-FLAG M2 добавляли загрузочный буфер 2 × SDS PAGE (100 мМ трис-HCl, pH 6,8,



4% SDS, 20% глицерин, 0,2% бромфеноловый синий, 50 мМ DTT), нагревали при 95 °С в течение 4 минут и извлекали совместный иммунопреципитат, содержащийся в надосадочной жидкости. Полученный таким образом совместный иммунопреципитат разделяли с помощью SDS-PAGE на основании размеров, после чего переносили на мембрану PVDF и подвергали совместный иммунопреципитат вестерн-блоттингу с помощью аффинного геля Anti-FLAG M2 с использованием антитела против фосфорилированного SMAD3, анти-FLAG антитела (Sigma-Aldrich Co. LLC.) и анти-NEK6 антитела, чтобы определить, будут ли совместно иммунопреципитированы белок NEK6 и фосфорилированный белок SMAD3.

На Фигуре 8b показаны результаты совместной иммунопреципитации с анти-FLAG антителом. Белок NEK6 и белок FLAG-SMAD3 детектировали в совместном иммунопреципитате. Более того, трансфекция экспрессирующего вектора NEK6 человека вызывает увеличение количества фосфорилированного белка SMAD3.

Поскольку белок SMAD3 был обнаружен в совместном иммунопреципитате с анти-NEK6 антителом, и наоборот, NEK6 был обнаружен в совместном иммунопреципитате с анти-FLAG антителом, было показано, что белок NEK6 и белок SMAD3 взаимодействуют внутри клетки и образуют комплекс. Кроме того, поскольку количество фосфорилированного белка SMAD3 было повышено путем трансфекции экспрессирующего вектора NEK6 человека, было показано, что белок NEK6 фосфорилирует белок SMAD3 внутри клетки.

#### Пример 4: фосфорилирование белка SMAD3 белком NEK6

Возможность того, что белок NEK6 может напрямую фосфорилировать белок SMAD3 в качестве субстрата, была исследована с использованием очищенных белков NEK6 и SMAD3.

Химерный белок His-NEK6 (Eurofins Scientific SE) и химерный белок GST-SMAD3 (Sigma-Aldrich Co.) LLC.) смешивали с реакционным растворителем (150 мкМ ATP, 50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 1% коктейль ингибиторов фосфатаз) и инкубировали при 30 °С в течение 45 минут. К реакционному раствору добавляли буфер 2 × SDS для образцов, содержащий 5% β-меркаптоэтанол и 0,025% бромфеноловый синий в равных количествах, чтобы завершить реакцию, и затем нагревали при 95° С в течение 5 минут, чтобы получить образец. Используя полученный таким образом образец, проводили SDS-PAGE для разделения белков, содержащихся в реакционном растворе, в соответствии с их размерами. Затем разделенные белки переносили на мембрану PVDF и подвергали вестерн-блоттингу с антителом против фосфорилированного SMAD3, анти-GST антителом (Santa Cruz Biotechnology Inc.) и анти-

NEK6 антителом.

На Фигуре 9 показаны результаты вестерн-блоттинга фосфорилированного белка SMAD3, когда реагировали химерный белок His-NEK6 и химерный белок GST-SMAD3. С помощью белка NEK6 количество фосфорилированного SMAD3 было повышено. Следовательно, было показано, что белок NEK6 непосредственно фосфорилирует белок SMAD3 в качестве субстрата.

Пример 5: Влияние нокдауна NEK6 на транскрипционную активность белкового комплекса SMAD

Чтобы исследовать, будет ли белок NEK6 также контролировать транскрипционную активность, которая генерируется после ядерной транслокации белкового комплекса SMAD, был проведен люциферазный репортерный анализ с ДНК-связывающей последовательностью белкового комплекса SMAD и геном люциферазы. Кроме того, проводили вестерн-блоттинг с использованием клеток LL29, приготовленных тогда же, для проверки нокдауна NEK6.

В человеческие клетки линии фибробластов легких LL29, полученные из легких пациента с IPF, трансфицировали ON-TARGET plus SMART pool siRNA (Dharmacon Inc.), которая является миРНК к NEK6 человека, с использованием Lipofectamine RNAi MAX. Через 24 часа после трансфекции миРНК среду меняли со среды F-12K, содержащей 10% FCS, на среду F-12K, содержащую 0,4% FCS. Через 48 часов после трансфекции миРНК, экспрессирующий вектор, в который клонировали ДНК-связывающую последовательность белкового комплекса SMAD (SMAD-связывающий элемент [SBE]) и ген люциферазы светлячка (pTL-SBE-luc: 5'-AGTATGTCTAGACTGAAGTATGTCTAGACTGAAGTATGTCTAGACTGA-3' [SEQ ID NO: 60], Panomics Inc.), и вектор для калибровки репортерного анализа, который содержит люциферазу Renilla дикого типа (pRL-TK: Promega Corporation), трансфицировали с использованием Lipofectamine LTX с реагентом PLUS (Thermo Fisher Scientific Inc.). Через два часа после трансфекции экспрессирующих векторов добавляли белок TGF- $\beta$  человека, чтобы обеспечить конечную концентрацию 10 нг/мл. Через 24 часа после добавления TGF- $\beta$  клетки лизировали с помощью буфера для образцов 2  $\times$  SDS (100 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 4% SDS, 6 М мочевины, 12% глицерина, 2% коктейля ингибиторов протеаз, 1% коктейля ингибиторов фосфатаз). Белки, содержащиеся в полученном таким образом клеточном экстракте, разделяли с помощью SDS-PAGE с последующим переносом белков на мембрану PVDF и подвергали вестерн-блоттингу с анти-SMAD3 антителом, анти-NEK6 антителом и анти-винкулин антителом. Между тем, клетки LL29, полученные способом, подобным описанному выше, извлекали в соответствии с Dual-Luciferase

Reporter Assay System (Promega Corporation) и измеряли люминесценцию люциферазы светлячка и люциферазы Renilla. Люминесцентное количество люциферазы светлячка калибровали по люминесцентному количеству люциферазы Renilla.

Фигура 10a показывает результаты вестерн-блоттинга, когда NEK6 был подвергнут нокдауну. Было показано, что при использовании миРНК к NEK6 количество белка NEK6 уменьшалось, но количество белка SMAD3 не менялось. На Фигуре 10b показано количество люминесценции люциферазы светлячка, откалиброванное по количеству люциферазы Renilla при нокдауне NEK6. При использовании миРНК к NEK6 количество люминесценции люциферазы светлячка, повышенное с помощью TGF- $\beta$ , снижалось. Следовательно, было показано, что транскрипционная активность белкового комплекса SMAD подавляется нокдауном NEK6.

Пример 6: Влияние нокдауна NEK6 на количество транскриптов генов, связанных с фиброзом

Чтобы исследовать, оказывает ли нокдаун NEK6 терапевтическое воздействие на фиброз, анализировали количество транскриптов генов, связанных с фиброзом, в клетках, трансфицированных миРНК к NEK6.

В человеческие клетки LL29 линии фибробластов легких, полученные из легких пациента с IPF, трансфицировали миРНК к NEK6 человека (ON-TARGET plus SMART pool siRNA, Dharmacon Inc.) с использованием Lipofectamine RNAi MAX. Через 24 часа после трансфекции среду меняли со среды F-12K, содержащей 10% FCS, на среду F-12K, содержащую 0,1% BSA. Через 48 часов после трансфекции добавляли человеческий белок TGF- $\beta$ , чтобы обеспечить конечную концентрацию 1 нг/мл. Через 72 часа после трансфекции РНК выделяли из клеток, трансфицированных миРНК, с использованием набора RNeasy Mini Kit. Полученную таким образом РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора для обратной транскрипции High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit для того, чтобы получить кДНК. Полученную таким образом кДНК подвергали ПЦР в реальном времени с использованием набора для экспрессии генов TaqMan для выявления влияния нокдауна NEK6 на количество транскриптов генов. Количество транскриптов гена Colla1 и гена  $\alpha$ SMA рассчитывали путем деления значения измерения зонда Colla1 Taqman Probe (HS00164004\_m1, Applied Biosystems (R)) или зонда  $\alpha$ SMA Taqman (HS00426835\_g1, Applied Biosystems (R)) на значение измерения зонда 18s.

На Фигуре 11a показано количество транскрипта Colla1 при нокдауне NEK6, а на Фигуре 11b показано количество транскрипта гена  $\alpha$ SMA при нокдауне NEK6. При использовании миРНК к NEK6 количество транскриптов генов Colla1 и  $\alpha$ SMA, повышенных из-за TGF- $\beta$ , снижалось. Следовательно, было показано, что нокдаун NEK6

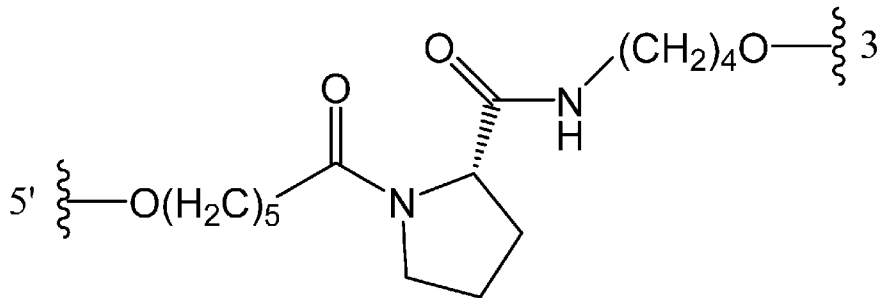
оказывает терапевтическое воздействие на фиброз.

Пример 7: Синтез одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот

Молекулы нуклеиновых кислот, показанные ниже, были синтезированы на основе фосфоамидитного метода с использованием синтезатора нуклеиновых кислот (торговое название: ABI3900 DNA Synthesizer, Applied Biosystems®). Твердофазный синтез осуществляли, используя CPG (стекло с контролируемым размером пор) в качестве твердофазного носителя и ЕММ-амидита (WO2013/027843) в качестве РНК-амидита. Удаление из твердофазного носителя и снятие защиты с защитной группы фосфатной группы, снятие защиты с защитной группы основания и снятие защиты с защитной группы 2'-гидроксильной группы проводили обычными способами. Синтезированные молекулы одноцепочечной нуклеиновой кислоты очищали ВЭЖХ.

В следующих одноцепочечных молекулах нуклеиновых кислот по настоящему изобретению Lx представляет собой линкерную область Lx и является L-пролин-диамид-амидитом следующей структурной формулы.

Химическая Формула 6



Кроме того, подчеркивания в представленных ниже одноцепочечных молекулах нуклеиновых кислот обозначают последовательности, которые подавляют экспрессию гена NEK6.

KB-001

5'-GAGGGAGUCCAACAACCUCUCC-Lx-  
GGAGAGGUUGUUGGAACUCCCUCCA-3' (SEQ ID NO: 31)

KB-002

5'-CGAGGCAGGACUGUGUCAAGGCC-Lx-  
GGCCUUGACACAGUCCUGCCUCGCC-3' (SEQ ID NO: 32)

KB-003

5'-CGUGGAGCACAUGCAUUCACGCC-Lx-  
GGCGUGAAUGCAUGGCUCCACGGC-3' (SEQ ID NO: 33)

KB-004

5'-GAUAAGAUGAAUCUCUUCUCCCC-Lx-

GGGGAGAAGAGAUUCAUCUUAUCUC-3' (SEQ ID NO: 34)

KB-005

5'-CAGAGACCGACAUCCGGAUACCC-Lx-

GGGUAUCCGAUGUCAGGUCUCUGGU-3' (SEQ ID NO: 35)

Пример 8. Оценка *in vitro* молекул ssPN (одноцепочечных молекул нуклеиновой кислоты).

Была проведена *in vitro* оценка молекул ssPN (одноцепочечных молекул нуклеиновой кислоты), предназначенных для НЕК6. Способ измерения для каждого элемента соответствовал вышеупомянутым способам, осуществленным с использованием ON-TARGET plus SMART pool siRNA и Stealth RNAi siRNA (Примеры 1, 2 и 6). Все нуклеиновые кислоты ssPN от KB-001 до -005 уменьшали количество транскрипта НЕК6 и подвергали нокдауну целевой ген. Более того, было подтверждено уменьшение количества фосфорилированного белка SMAD3 в результате действия нуклеиновых кислот ssPN KB-001 - KB-005.

Кроме того, результаты исследования влияния KB-001 и KB-003 на количество транскриптов генов, связанных с фиброгенезом (Colla1 и  $\alpha$ SMA), показаны на Фигуре 12. На фигуре 12a показаны количества транскриптов гена Colla1 при действии KB-001 или KB-003, а на Фигуре 12b показаны количества транскриптов гена  $\alpha$ SMA при действии KB-001 или KB-003. Было подтверждено, что обе молекулы ssPN KB-001 и KB-003 уменьшают количество транскриптов генов, связанных с фиброгенезом. Исходя из этих результатов, можно было подтвердить действие по подавлению фиброгенеза молекулами ssPN (одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот), разработанными для НЕК6.

Пример 9. Проверка антифиброгенезного действия при нокдауне НЕК6 *in vivo*

Для проверки того, оказывает ли нокдаун НЕК6 терапевтическое действие на фиброз, миРНК к НЕК6 вводили мышинной модели блеомицинового легочного фиброгенеза для анализа антифиброгенезного действия.

7-недельным мышам Crl: CD1 (ICR) (Charles River Laboratories Japan, Inc.) вводили блеомицин (Nippon Kayaku Co., Ltd.) в дозе 0,4 мг/кг массы тела для создания модельных мышей с легочным фиброгенезом. миРНК к НЕК6 вводили с частотой от одного до двух дней в максимальной дозе 50 мг/кг массы тела. В течение срока введения миРНК к НЕК6 проводили диагностическую визуализацию с частотой один раз в неделю с помощью микро-КТ для применения на экспериментальных животных. Через 14-30 дней после первоначального введения миРНК к НЕК6 проводили резекцию легкого. Измеряли количество транскриптов генов, связанных с фиброзом, и проводили количественную оценку экспрессии белков, связанных с фиброзом, патологический анализ и т.п. с

использованием резецированного легкого. С помощью этих анализов удалось подтвердить, что фиброгенез подавлен в группе введения миРНК к NEK6 по сравнению с группой, которой не вводили миРНК к NEK6, и показать антифиброгенное действие миРНК к NEK6 у мыши в модели легочного фиброгенеза.

Пример 10. Влияние миРНК NEK6 на фосфорилирование белка SMAD3 в звездчатых клетках печени

Чтобы исследовать возможность контроля белком NEK6 сигнала TGF- $\beta$  в звездчатых клетках печени, анализировали количество фосфорилированного SMAD3 в клетках, трансфицированных миРНК к NEK6.

Первичные звездчатые клетки печени человека, выделенные из печени человека (ScienCell Research Laboratories, Inc.), культивировали на культуральной чашке, покрытой поли-L-лизином (PLL), в течение 5 дней. Затем трансфицировали миРНК для NEK6 человека (KB-004) с использованием Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen™). Через 48 часов после трансфекции среду меняли со среды для звездчатых клеток (ScienCell Research Laboratories, Inc.), содержащей 2% FCS и 1% добавки для роста звездчатых клеток (SteCGS, ScienCell Research Laboratories, Inc.), на среду для звездчатых клеток, содержащую 0,2% FCS и 1% SteCGS. Через 72 часа после трансфекции липополисахарид (LPS, Sigma-Aldrich Co. LLC.) добавляли к среде, чтобы обеспечить конечную концентрацию 100 нг/мл. Через одиннадцать с половиной часов после добавления LPS добавляли человеческий белок TGF- $\beta$  (PeproTech, Inc.) для того, чтобы обеспечить конечную концентрацию 5 нг/мл. Через тридцать минут после добавления TGF- $\beta$  клетки лизировали с помощью буфера для образцов 2  $\times$  SDS (100 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 6 М мочевины, 12% глицерина, 2% коктейль ингибиторов протеаз [Nacalai Tesque Inc.], 1% коктейль ингибиторов фосфатаз [Nacalai Tesque Inc.]) для получения клеточного экстракта.

К полученному таким образом клеточному экстракту добавляли  $\beta$ -меркаптоэтанол и бромфеноловый синий так, чтобы обеспечить конечные концентрации 5% и 0,025% соответственно, и затем нагревали при 95 °C в течение 4 минут для получения образца. С полученным таким образом образцом проводили SDS-PAGE для разделения белков, содержащихся в образце, в соответствии с их размерами. Затем разделенные белки переносили на мембрану PVDF и подвергали вестерн-блоттингу с антителом против фосфорилированного SMAD3 (Cell Signaling Technology, Inc.) и анти-SMAD3 антителом (Cell Signaling Technology, Inc.), антителом против фосфорилированного SMAD2 (Cell Signaling Technology, Inc.) и анти-SMAD2 антителом (Cell Signaling Technology, Inc.), анти-NEK6 антителом (Santa Cruz Biotechnology Inc.) и анти-винкулин антителом (Sigma-

Aldrich Co. LLC.).

На Фигуре 13 показаны результаты вестерн-блоттинга фосфорилированного белка SMAD3 и фосфорилированного белка SMAD2, после трансфекции миРНК к NEK6. Из-за миРНК к NEK6 количество белка NEK6 уменьшалось, и количество фосфорилированного SMAD3 и фосфорилированного SMAD2, повышаемых с помощью TGF- $\beta$ , также уменьшалось. Следовательно, было показано, что фосфорилирование белка SMAD3 и белка SMAD2 подавляется нокдауном NEK6.

Пример 11. Подавление фосфорилирования SMAD3 с помощью миРНК к NEK6 в звездчатых клетках печени

Чтобы исследовать возможность контроля белком NEK6 сигнала TGF- $\beta$ , анализировали количество фосфорилированного SMAD3 в клетках, трансфицированных каждой из миРНК к NEK6.

Первичные звездчатые клетки печени человека, выделенные из печени человека, культивировали в культуральной чашке, покрытой PLL, в течение 5 дней. Затем различные миРНК к NEK6 человека (KB-006, KB-004, KB-011, KB-005, KB-010) трансфицировали с использованием Lipofectamine RNAi MAX. Через 48 часов после трансфекции среду меняли со среды для звездчатых клеток, содержащей 2% FCS и 1% SteCGS, на среду для звездчатых клеток, содержащую 0,2% FCS и 1% SteCGS. Через 72 часа после трансфекции к среде добавляли LPS, чтобы обеспечить конечную концентрацию 100 нг/мл. Через одиннадцать с половиной часов после добавления LPS добавляли человеческий белок TGF- $\beta$ , чтобы обеспечить конечную концентрацию 5 нг/мл. Через тридцать минут после добавления TGF- $\beta$  клетки лизировали с помощью 2  $\times$  буфера для образцов с SDS (100 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 6 М мочевины, 12% глицерина, 2% коктейль ингибиторов протеаз [Nacalai Tesque Inc.], 1% коктейль ингибиторов фосфатаз [Nacalai Tesque Inc.]) для получения клеточного экстракта. К полученному таким образом клеточному экстракту добавляли  $\beta$ -меркаптоэтанол и бромфеноловый синий так, чтобы обеспечить конечные концентрации 5% и 0,025% соответственно, и затем нагревали при 95°C в течение 4 минут для получения образца. С полученным таким образом образцом проводили SDS-PAGE для разделения белков, содержащихся в образце, в соответствии с их размерами. Затем разделенные белки переносили на мембрану PVDF и подвергали вестерн-блоттингу с антителом против фосфорилированного SMAD3 и анти-SMAD3 антителом, анти-NEK6 антителом и анти-винкулин антителом.

На Фигуре 14 показаны результаты вестерн-блоттинга фосфорилированного белка SMAD3, когда NEK6 был подвергнут нокдауну различными типами миРНК к NEK6. При введении различных видов миРНК к NEK6 количество белка NEK6 уменьшалось, и

количество фосфорилированного SMAD3, повышаемого с помощью TGF- $\beta$ , также уменьшалось. Следовательно, было показано, что фосфорилирование белка SMAD3 подавляется нокдауном NEK6 при использовании различных последовательностей миРНК к NEK6.

Пример 12. Влияние миРНК к NEK6 на гены, связанные с фиброзом, в звездчатых клетках печени

Чтобы исследовать, как нокдаун NEK6 проявляет эффективность против фиброза, количество генов, связанных с фиброзом, анализировали в клетках, трансфицированных миРНК к NEK6.

Первичные звездчатые клетки печени человека, выделенные из печени человека, культивировали в культуральной чашке, покрытой PLL, в течение 5 дней. Затем миРНК к NEK6 человека (KB-004) трансфицировали с использованием Lipofectamine RNAi MAX. Через 48 часов после трансфекции среду меняли со среды для звездчатых клеток, содержащей 2% FCS и 1% добавки для роста звездчатых клеток, на среду для звездчатых клеток, содержащую 0,2% FCS и 1% SteCGS. Через 72 часа после трансфекции к среде добавляли LPS, чтобы обеспечить конечную концентрацию 100 нг/мл. Через одиннадцать с половиной часов после добавления LPS добавляли человеческий белок TGF- $\beta$ , чтобы обеспечить конечную концентрацию 5 нг/мл. Через 24 часа после добавления TGF- $\beta$  экстрагировали РНК из клеток, трансфицированных KB-004, с использованием набора RNeasy Mini Kit. Полученную таким образом РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора для обратной транскрипции High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit для того, чтобы получить кДНК. Полученную таким образом кДНК подвергали ПЦР в реальном времени с использованием анализов экспрессии генов TaqMan для выявления влияния нокдауна NEK6 на количество транскриптов генов. Количество транскриптов гена NEK6, гена фибронектина и гена  $\alpha$ SMA рассчитывали путем деления измеренного значения для зонда NEK6 Taqman (HS00205221\_m1, Applied Biosystems (R)), измеренного значения для зонда фибронектин Taqman (HS01549976\_m1, Applied Biosystems (R)), или измеренного значения для зонда  $\alpha$ SMA Taqman (HS00426835\_g1, Applied Biosystems (R)) на измеренное значение для зонда 18s.

На Фигуре 15а показано количество транскрипта NEK6, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, на Фигуре 15b показано количество транскрипта фибронектина, когда NEK6 был подвергнут нокдауну, а на Фигуре 15с показано количество транскрипта гена  $\alpha$ SMA, когда NEK6 был подвергнут нокдауну. Из-за миРНК к NEK6 количество транскриптов генов фибронектина и  $\alpha$ SMA, повышенных из-за TGF- $\beta$ , снижалось. Следовательно, было показано, что нокдаун NEK6 подавляет фиброгенез.



Пример 13: Влияние миРНК к NEK6 на фосфорилирование белка SMAD3 в фибробласте почки

Чтобы исследовать возможность того, как белок NEK6 может контролировать сигнал TGF- $\beta$ , количество фосфорилированного SMAD3 анализировали в клетках, трансфицированных миРНК к NEK6.

В крысиные клетки NRK-49F линии фибробластов почек, трансфицировали миРНК к NEK6 человека (KB-004) с использованием Lipofectamine RNAi MAX. Через 24 часа после трансфекции среду меняли со среды DMEM, содержащей 10% FCS, на среду DMEM, содержащую 0,1% FCS. Через 48 часов после трансфекции добавляли человеческий белок TGF- $\beta$ , чтобы обеспечить конечную концентрацию 5 нг/мл. Через тридцать минут или час после добавления клетки лизировали с помощью буфера для образцов 2  $\times$  SDS (100 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 6 М мочевины, 12% глицерина, 2% коктейля ингибитора протеазы, 1% ингибитора фосфатазы коктейль), для получения клеточного экстракта. К полученному таким образом клеточному экстракту добавляли  $\beta$ -меркаптоэтанол и бромфеноловый синий так, чтобы обеспечить конечные концентрации 5% и 0,025% соответственно, и затем нагревали при 95 °C в течение 4 минут для получения образца. С полученным таким образом образцом проводили SDS-PAGE для разделения белков, содержащихся в образце, в соответствии с их размерами. Затем разделенные белки переносили на мембрану PVDF и подвергали вестерн-блоттингу с антителом против фосфорилированного SMAD3 и анти-SMAD3 антителом, анти-NEK6 антителом (Abcam plc) и анти-винкулин антителом.

Фигура 16 показывает результаты вестерн-блоттинга фосфорилированного белка SMAD3, когда NEK6 был подвергнут нокдауну. При использовании миРНК к NEK6 количество белка NEK6 уменьшалось, и количество фосфорилированного SMAD3, повышаемого с помощью TGF- $\beta$ , также уменьшалось. Следовательно, было показано, что фосфорилирование белка SMAD3 подавляется нокдауном NEK6.

Пример 14: Оценка эффективности миРНК к NEK6 в моделях фиброгенеза печени, вызванного тетрахлорметаном (CCl<sub>4</sub>)

Чтобы проверить эффективность нокдауна NEK6 против фиброза, миРНК к NEK6 вводили внутривенно мышам модели, индуцированной CCl<sub>4</sub>, и подвергали анализу антифиброгенезного действия.

Самцам мышей C57BL/6J в возрасте 7 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.) внутрибрюшинно вводили раствор оливкового масла, содержащий 10 об.% CCl<sub>4</sub> (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) в дозе 10 мл/кг массы тела в день 0, 4, 7 и 11 для создания печеночной модели фиброгенеза у мышей. Группирование выполняли по

массе тела за день до первоначального введения  $CCl_4$ , с созданием группы введения солевого раствора, не получавшей  $CCl_4$  ( $n = 5$ ), группы с введением растворителя, получавшей  $CCl_4$  ( $n = 10$ ), и группы введения нуклеиновой кислоты, получавшей  $CCl_4$  ( $n = 10$ ). Используя KB-004 в качестве миРНК к NEK6 и реагент Invivofectamine 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.) в качестве растворителя для введения, получали в соответствии с протоколом продукта Invivofectamine 3.0 0,3 мг/мл раствора для введения нуклеиновой кислоты. Группе введения нуклеиновой кислоты раствор для введения нуклеиновой кислоты, содержащий KB-004, вводили через хвостовую вену, чтобы обеспечить 3 мг/кг массы тела; и группе введения растворителя растворитель для введения в количестве, равном количеству для группы введения нуклеиновой кислоты, вводили через хвостовую вену за день до первоначального введения  $CCl_4$  и на 10 день после индукции патологии. Оценку нарушения деятельности печени и фиброгенеза проводили на 13 день после индукции патологии (Примеры 15, 16, 17 и 19).

Пример 15: Анализ маркеров нарушения деятельности печени в моделях  $CCl_4$

Фиброгенез понимается как чрезмерный процесс заживления раны при нарушении деятельности клетки или ткани. Таким образом, подавление нарушения деятельности клетки или ткани наряду с фиброгенезом считается эффективным для лечения различных фиброзов. С тем, чтобы выяснить, будет ли нокдаун NEK6 оказывать влияние на нарушение деятельности печени, было проведено измерение маркеров нарушения деятельности печени в моделях  $CCl_4$ .

На 13-й день после индукции патологии проводили взятие крови из хвостовой вены, используя плоскую капиллярную пробирку для отбора крови, которую отстаивали в течение 30 минут или более. Кровь после отстаивания центрифугировали для получения сыворотки. Сывороточные глутамат-пируваттрансаминазу (GPT) и глутаминощавелевоуксусную трансаминазу (GOT) измеряли с использованием теста Transaminase CII-test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Способ измерения проводили в соответствии с инструкцией к реагенту.

На Фигуре 17а показаны результаты измерения сывороточной GPT, а на Фигуре 17b показаны результаты измерения сывороточной GOT. Повышение уровня GPT и GOT в сыворотке, обнаруженное в моделях  $CCl_4$ , подавлялось введением миРНК к NEK6. Следовательно, было показано, что нокдаун NEK6 подавляет нарушение деятельности печени.

Пример 16. Анализ фосфорилирования белка SMAD3 в моделях  $CCl_4$

Чтобы исследовать, будет ли нокдаун NEK6 оказывать влияние на фосфорилирование белка SMAD3, было проанализировано количество

фосфорилированного SMAD3 в моделях CCl<sub>4</sub>.

Печень, собранную на 13 день после индукции патологии, замораживали и измельчали для получения порошка. К порошкообразной печени добавляли буфер для лизиса (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS, 50 mM Трис-HCl, pH 7,5, 1 mM ЭДТА, 1 mM бензилсульфонилфторид, 2% коктейль ингибиторов протеаз, 1% коктейль ингибиторов фосфатаз) и готовили экстракт органа с помощью портативного ультразвукового генератора. К надосадочной жидкости, полученной центрифугированием экстракта органа, добавляли β-меркаптоэтанол и бромфеноловый синий, чтобы обеспечить конечные концентрации 5% и 0,025%, соответственно. Затем проводили нагрев при 95°C в течение 4 минут, чтобы получить образец. С полученным таким образом образцом проводили SDS-PAGE для разделения белков, содержащихся в образце, в соответствии с их размерами. Затем разделенные белки переносили на мембрану PVDF и подвергали вестерн-блоттингу с антителом против фосфорилированного SMAD3 (Abcam plc.) анти-SMAD3 антителом, анти-NEK6 антителом (Abcam plc) и анти-винкулин антителом. Фосфорилированный SMAD3 калибровали по общему количеству SMAD3.

На Фигуре 18 показаны результаты вестерн-блоттинга фосфорилированного белка SMAD3 при нокдауне NEK6. При использовании миРНК к NEK6 количество белка NEK6 уменьшалось, и количество фосфорилированного SMAD3, повышаемого с помощью TGF-β, также уменьшалось. Следовательно, было показано, что нокдаун NEK6 подавляет фосфорилирование белка SMAD3 в печени модели с CCl<sub>4</sub>.

Пример 17: Анализ генов, связанных с фиброзом, в моделях CCl<sub>4</sub>

Чтобы исследовать, будет ли нокдаун NEK6 эффективен против фиброгенеза, в моделях CCl<sub>4</sub> было проанализировано количество транскриптов генов, связанных с фиброзом.

Из печени, собранной на 13 день после индукции патологии, выделяли РНК с помощью реагента QIAzol Lysis (QIAGEN N.V). Затем РНК очищали с использованием набора RNeasy mini kit и подвергали реакции обратной транскрипции с использованием набора для обратной транскрипции High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Количество транскрипта зонда NEK6 Taqman (Mm00480730\_m1, Applied Biosystems, R); зонда Col1a1 Taqman (Mm00801666\_g1, Applied Biosystems (R)), зонда Col3a1 Taqman (Mm01254476\_m1, Applied Biosystems (R)) и зонда Timp1 Taqman (Mm01341361\_m1, Applied Biosystems (R)), относящихся к генам, связанным с фиброзом, измеряли с помощью анализа генной экспрессии TaqMan Gene Expression, и относительные отношения к количеству транскрипта зонда 18s rRNA Taqman (Hs99999901\_s1, Applied Biosystems (R)), который является внутренним контролем, определяли как количество транскрипта

каждого гена.

Количество транскриптов каждого гена в моделях CCl<sub>4</sub> показано на Фигурах 19a-d. Количество транскрипта гена NEK6 уменьшалось при введении миРНК к NEK6. Этим было показано, что KB-004 эффективно подавляет транскрипцию гена-мишени. При этом количество транскриптов генов, связанных с фиброзом (Colla1, Col3a1, Timp1), которые индуцируются при патологии, значительно уменьшилось. Следовательно, было показано, что нокдаун NEK6 подавляет фиброгенез.

Пример 18: Анализ генов, связанных с фиброзом, в моделях фиброгенеза печени, вызванного лигированием желчных протоков (BDL)

Чтобы исследовать эффективность нокдауна NEK6 в отношении фиброза, мышам с моделью фиброгенеза печени, индуцированного лигированием желчных протоков (модели BDL), внутривенно вводили миРНК к NEK6 для анализа количеств транскриптов генов, связанных с фиброзом.

Девятинедельных мышей C57BL/6J (Charles River Laboratories Japan, Inc.) группировали в соответствии с массой тела, готовили раствор KB-004 (0,3 мг/мл) в соответствии с листком-вкладышем реагента для переноса генов Invivofectamine 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.), который вводили через хвостовую вену в дозе 3 мг/кг массы тела (n = 12). Контрольной группе вводили только растворитель (n = 15). На следующий день после введения общий желчный проток лигировали в двух точках для создания модели фиброгенеза печени у мыши. Для ложнооперированной группы солевой раствор (Otsuka Normal Saline) вводили через хвостовую вену, и выполняли только отслоение общего желчного протока (n = 7). Печень собирали на 14 день после перевязки желчных протоков; и количества транскриптов зонда NEK6 Taqman (Mm00480730\_m1, Applied Biosystems (R)) и зонда Colla1 Taqman (Mm00801666\_g1, Applied Biosystems (R)), зонда Col3a1 Taqman (Mm01254476\_m1, Applied Biosystems (R)) Mm01341361\_m1, Applied Biosystems (R)) как генов, связанных с фиброзом, измеряли так же, как описано выше, и относительные отношения к количеству транскрипта зонда GAPDH Taqman (Mm9999995\_g1, Applied Biosystems (R)), который является внутренним контролем, определяли как количество транскрипта каждого гена.

Количество транскриптов каждого гена в моделях BDL показано на Фигурах 20a-d. Количество транскрипта гена NEK6 уменьшалось при введении миРНК к NEK6. Этим было показано, что KB-004 эффективно подавляет транскрипцию гена-мишени. При этом количество транскриптов генов, связанных с фиброзом (Colla1, Col3a1, Timp1), которые индуцируются при патологии, значительно уменьшилось. Следовательно, было показано, что нокдаун NEK6 подавляет фиброгенез.

### Пример 19: Патологический анализ в моделях CCl<sub>4</sub>

Для того чтобы выяснить, будет ли нокдаун НЕК6 оказывать влияние на CCl<sub>4</sub>-индуцированную модель фиброгенеза печени, было проведено гистопатологическое наблюдение.

Внутреннюю правую долю печени собирали на 13 день после индукции патологии и фиксировали 10% нейтральным забуференным раствором формалина. После заделки парафином делали срезы тканей и окрашивали гематоксилин-эозином.

На Фигуре 21 показаны типичные примеры гистопатологии. Фигура 21a представляет результаты для группы введения физиологического раствора, не получающей CCl<sub>4</sub>, Фигура 21b представляет результаты группы введения растворителя, получающей CCl<sub>4</sub>, и Фигура 21c представляет результаты группы введения нуклеиновой кислоты, получающей CCl<sub>4</sub>. Вакуолярная дегенерация, многократно обнаруженная на Фигуре 21b, указывает на клеточное расстройство, а область, которая в избытке присутствует вокруг центральной части и в которой ядра не окрашены, указывает на некроз клеток. Нарушение, некроз и т.п. клеток, обнаруженные в ткани печени модели с CCl<sub>4</sub>, были уменьшены при введении миРНК к НЕК6. Следовательно, было показано, что нокдаун НЕК6 подавляет изменение гистопатологии в модели фиброгенеза печени, вызванного CCl<sub>4</sub>.

### Промышленная применимость

Согласно настоящему изобретению предлагаются новый ингибитор фосфорилирования белка SMAD2/3 и терапевтическое средство от фиброза.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Ингибитор фосфорилирования белка SMAD2/3, включающий нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена NEK6, в качестве активного ингредиента.

2. Терапевтическое средство от фиброза, включающее нуклеиновую кислоту, которая подавляет экспрессию гена NEK6, в качестве активного ингредиента.

3. Двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, состоящей из следующих (a), (b), (c), (d) и (e):

(a) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6 на 3' конце,

(b) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7 на 3' конце,

(c) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8 на 3' конце,

(d) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 9 на 3' конце, и

(e) двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, включающая 19-30 нд направляющей цепи (антисмысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 5 на 5' конце, и 19-30 нд сопровождающей цепи (смысловой цепи), включающей последовательность, показанную в SEQ ID NO: 10 на 3'-конце.

4. Двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты по п. 3, в которой от 1 до 11 рибонуклеотидных остатков и/или дезоксирибонуклеотидных остатков дополнительно добавляют к 3' концу направляющей цепи (антисмысловой цепи) и/или сопровождающей цепи (смысловой цепи) для образования выступающего конца.

5. Молекула одноцепочечной нуклеиновой кислоты, образующая шпилечную структуру РНК, в которой 3'-конец сопровождающей цепи (смысловой цепи) и 5'-конец направляющей цепи (антисмысловой цепи), указанные в пп. 3 или 4, связаны друг с другом через линкерную последовательность нуклеотидных остатков и/или линкер

ненуклеотидной структуры, или 3' конец направляющей цепи (антисмысловой цепи) и 5' конец сопровождающей цепи (смысловые цепи), указанных в п. 3 или 4, связаны друг с другом через линкерную последовательность нуклеотидных остатков и/или линкер ненуклеотидной структуры.

6. Одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты из следующих (А) или (В), включающая последовательность, подавляющую экспрессию гена НЕК6, выбранную из SEQ ID NO: 1-5, причем:

(А) молекула нуклеиновой кислоты включает или состоит только из области (X), линкерной области (Lx) и области (Xc),

причем область (Xc), линкерная область (Lx) и область (X) расположены в этом порядке от 5' конца к 3' концу,

где область (Xc) является комплементарной области (X),

где линкерная область (Lx) имеет ненуклеотидную структуру, включающую по меньшей мере один из числа пирролидинового остова и пиперидинового остова, и

где область (X) содержит последовательность, подавляющую экспрессию;

(В) молекула нуклеиновой кислоты включает область (Xc), линкерную область (Lx), область (X), область (Y), линкерную область (Ly) и область (Yc) в этом порядке от 5' конца к 3' концу,

где область (X) и область (Y) связаны и образуют внутреннюю область (Z),

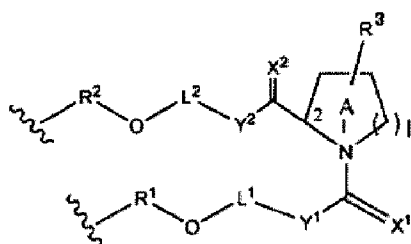
где область (Xc) является комплементарной области (X),

где область (Yc) является комплементарной области (Y), и

где линкерная область (Lx) и/или линкерная область (Ly) имеют ненуклеотидную структуру, включающую по меньшей мере один из числа пирролидинового остова и пиперидинового остова, и

где внутренняя область (Z) содержит последовательность, подавляющую экспрессию.

7. Одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты по п. 6, где линкерная область (Lx) и/или (Ly) представлена в виде следующей формулы (I):



... (I)

в которой

$X^1$  и  $X^2$ , каждый независимо, представляют собой  $H_2$ , O, S или NH;

$Y^1$  и  $Y^2$ , каждый независимо, представляют собой одинарную связь,  $CH_2$ , NH, O или S;

$R^3$  представляет собой атом водорода или заместитель, связанный с C-3, C-4, C-5 или C-6 в кольце A;

$L^1$  представляет собой алкиленовую цепь с  $n$  числом атомов углерода, где каждый из атомов водорода на алкиленовом атоме углерода может быть замещен или не замещен OH,  $OR^a$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^a$ ,  $NR^aR^b$ , SH или  $SR^a$ , или

$L^1$  представляет собой полиэфирную цепь, в которой один или несколько атомов углерода в алкиленовой цепи заменены одним или несколькими атомами кислорода,

при условии, что если  $Y^1$  представляет собой NH, O или S, то атом в  $L^1$ , связанный с  $Y^1$ , представляет собой углерод, атом в  $L^1$ , связанный с  $OR^1$ , представляет собой углерод, и атомы кислорода не соседствуют друг с другом;

$L^2$  представляет собой алкиленовую цепь, имеющую  $m$  атомов углерода, причем каждый из атомов водорода на алкиленовом атоме углерода может быть замещен или не замещен OH,  $OR^c$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^c$ ,  $NR^cR^d$ , SH или  $SR^c$ , или

$L^2$  представляет собой полиэфирную цепь, в которой один или несколько атомов углерода в алкиленовой цепи заменены одним или несколькими атомами кислорода,

при условии, что если  $Y^2$  представляет собой NH, O или S, то атом в  $L^2$ , связанный с  $Y^2$ , представляет собой углерод, атом в  $L^2$ , связанный с  $OR^2$ , представляет собой углерод, и атомы кислорода не соседствуют друг с другом;

$R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$  и  $R^d$  каждый независимо представляет собой заместитель или защитную группу;

$l$  равно 1 или 2;

$m$  представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 30;

$n$  представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 30;

один атом углерода в кольце A, отличный от C-2, может быть заменен азотом, кислородом или серой,

кольцо A может содержать двойную связь углерод-углерод или двойную связь углерод-азот,

область (Xc) и область (X) каждый связан с линкерной областью (Lx) через  $-OR^1-$  или  $OR^2$ ,

область (Yc) и область (Y) каждый связан с линкерной областью (Ly) через  $-OR^1-$  или  $OR^2$ , соответственно,

где  $R^1$  и  $R^2$  могут присутствовать или не присутствовать, и, если присутствуют,



каждый из  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляет собой нуклеотидный остаток или структуру (I).

8. Молекула одноцепочечной нуклеиновой кислоты по п. 6 или 7, где X или Z включают последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-25.

# Фиг. 1

atggcaggacagcccggccacatgcccatggaggagttccaacaacctctgccacacctggggcctgtgcatcctctga

KB-001 ↵

cccacagaggcatccaacacgctgtctttcgctgctgctggcggactccagatcgaaaagaagataggccgaggacagt

tcagcgaggtgtacaaggccacctgctgctggacaggaagacagtggtctgaagaaggtgcagatcttgagatgatgg

acgccaaggcggggcaggactgtgtcaaggagatcggcctcttgaagcaactgaaccacccaaatatcatcaagtatttga

KB-002 ↵

ctcgtttatcgaagacaacgagctgaacattgtgctggagttggctgacgcaggggacctctcgagatgatcaagtaactta

agaagcagaagcggctcatcccggagaggacagtatggaagtacttgtgcagctgtgcagcgccgtggagcacatgcattc

Stealth ↵

KB-003 ↵

acgccgggtgatgcaccgagacatcaagcctgccaacgtgttcacacagccacggcgtcgtgaagctcggtgaccttggtc

tgggccgttcttcagctctgagaccaccgagcccactcctagtggggacgccctactacatgtcaccggagaggatccatg

agaacggctacaacttcaagtccgacatctggtcctgggctgtctgctgtacgagatggcagccctccagagccccttctatg

gagataagatgaatctctctccctgtgccagaagatcgagcagtgctgactacccccactccccggggagcactactccgag

KB-004 ↵

aagttacgagaactggtcagcatgtgcatctgccctgacccccaccagagacctgacatcggatacgtgcaccaggtggcca

KB-005 ↵

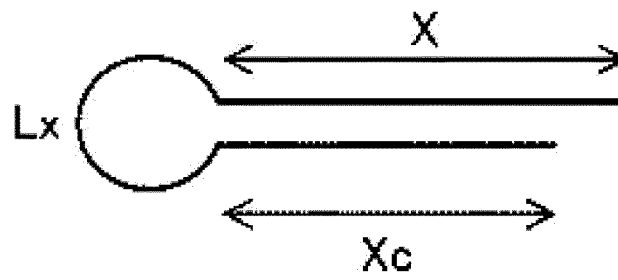
agcagatgcacatctggatgtccagcacctga ↵

Фиг. 2

(A)

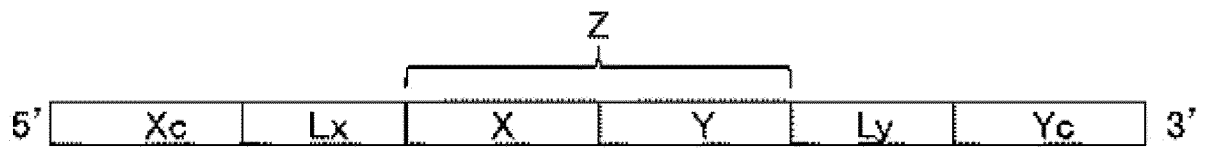


(B)

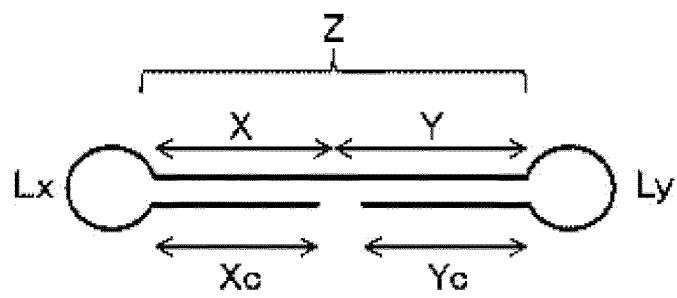


Фиг. 3

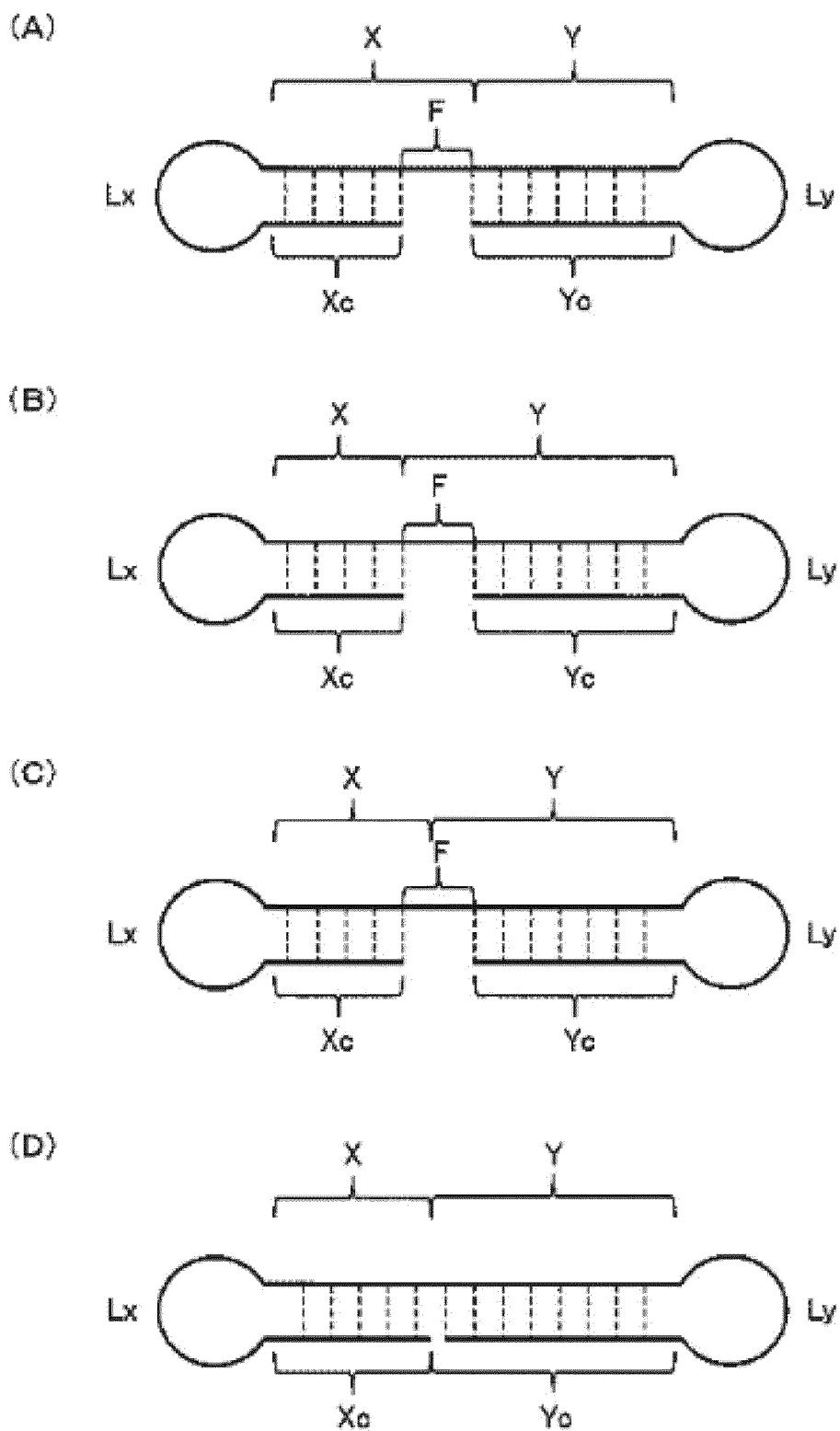
(A)



(B)

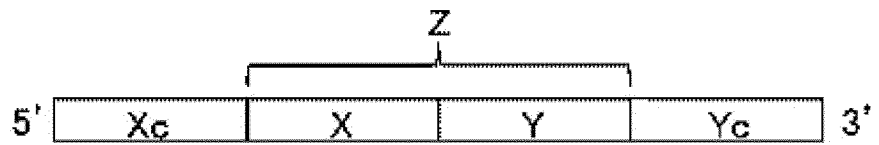


Фиг. 4

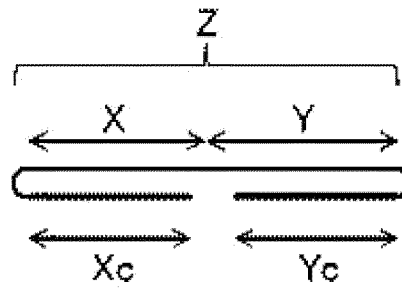


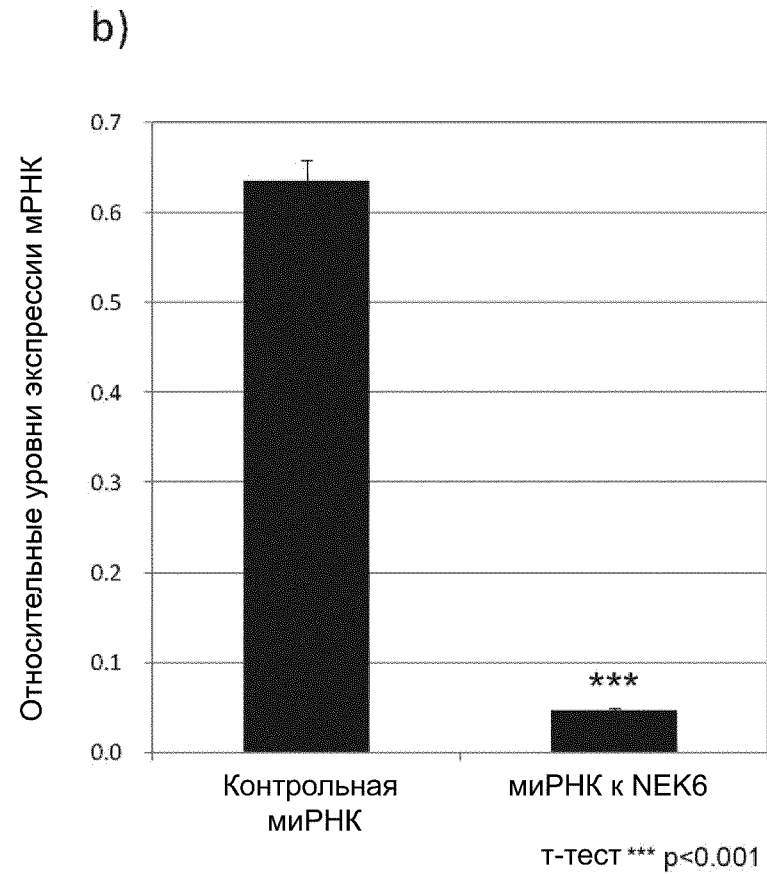
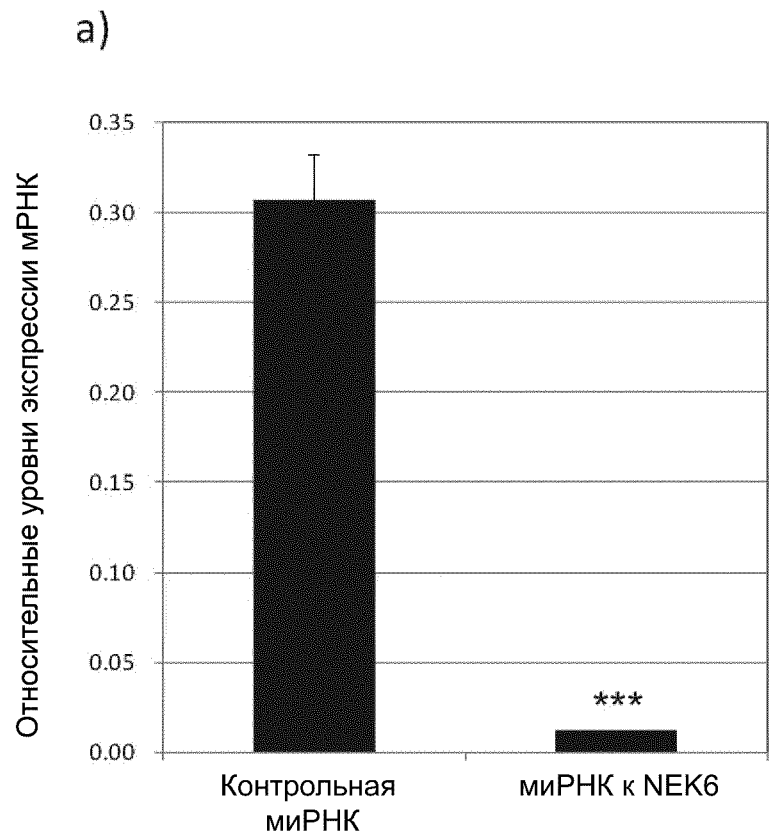
Фиг. 5

(A)

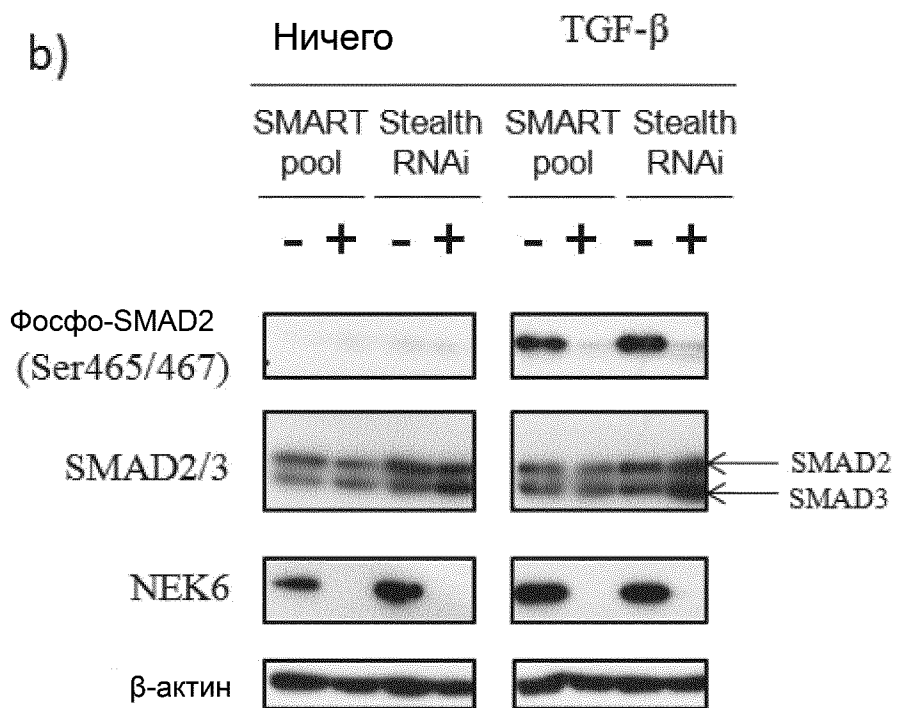
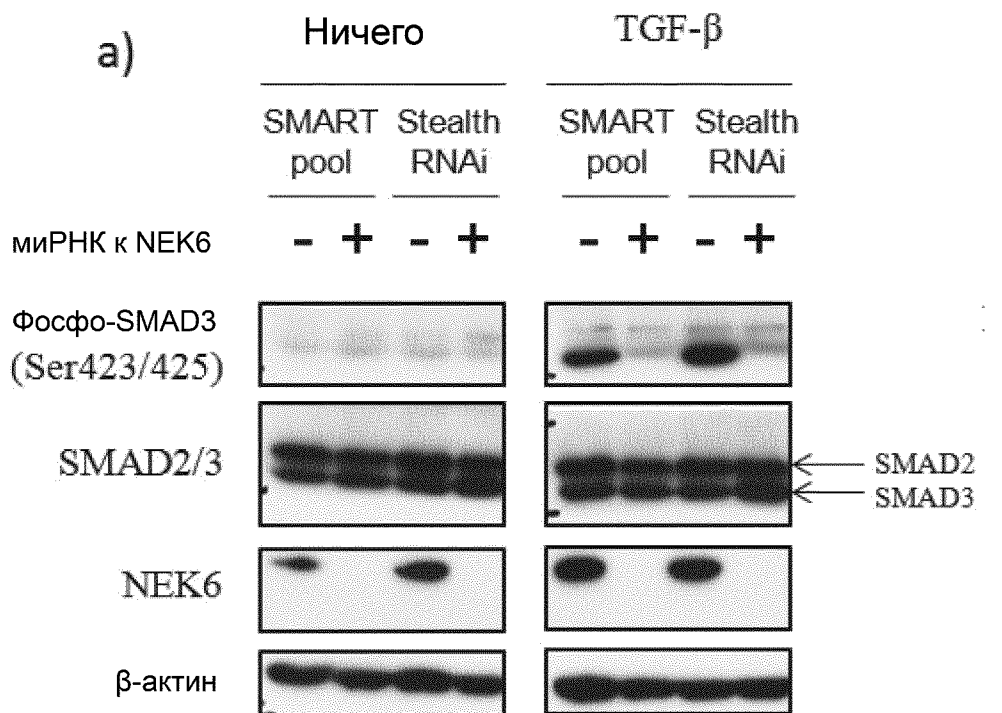


(B)





Фиг. 6

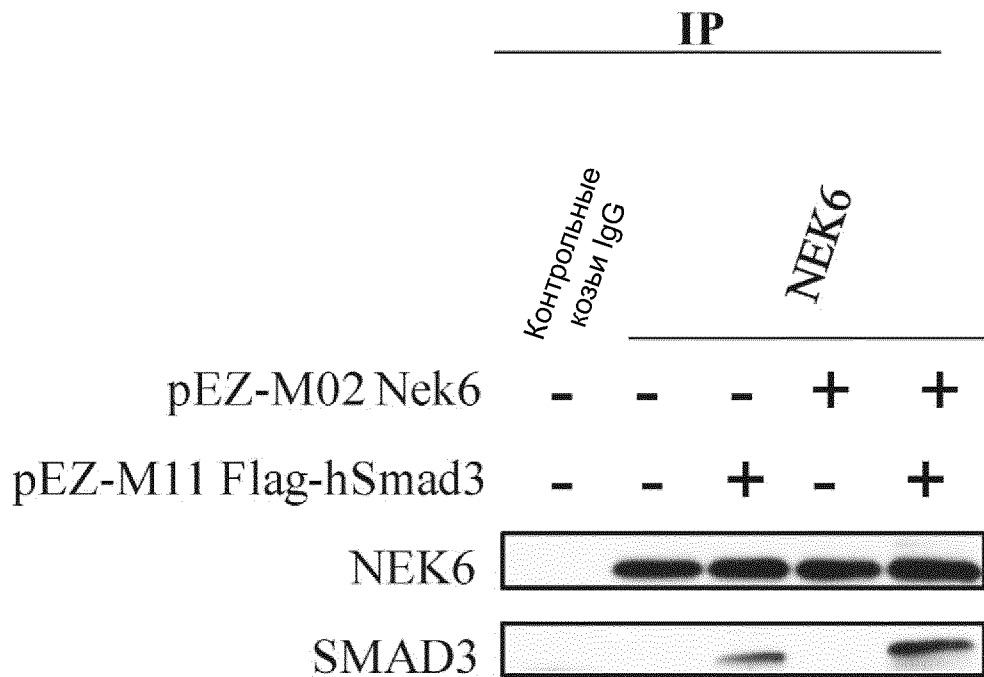


Фиг. 7

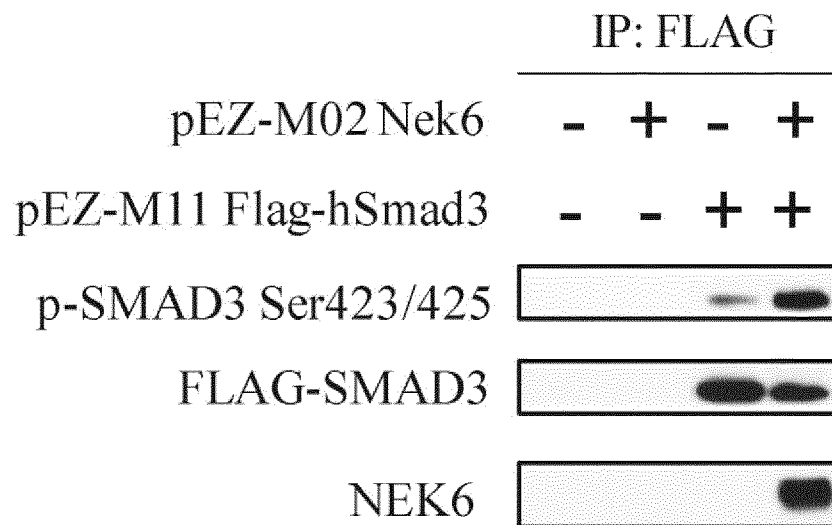


## Фиг. 8

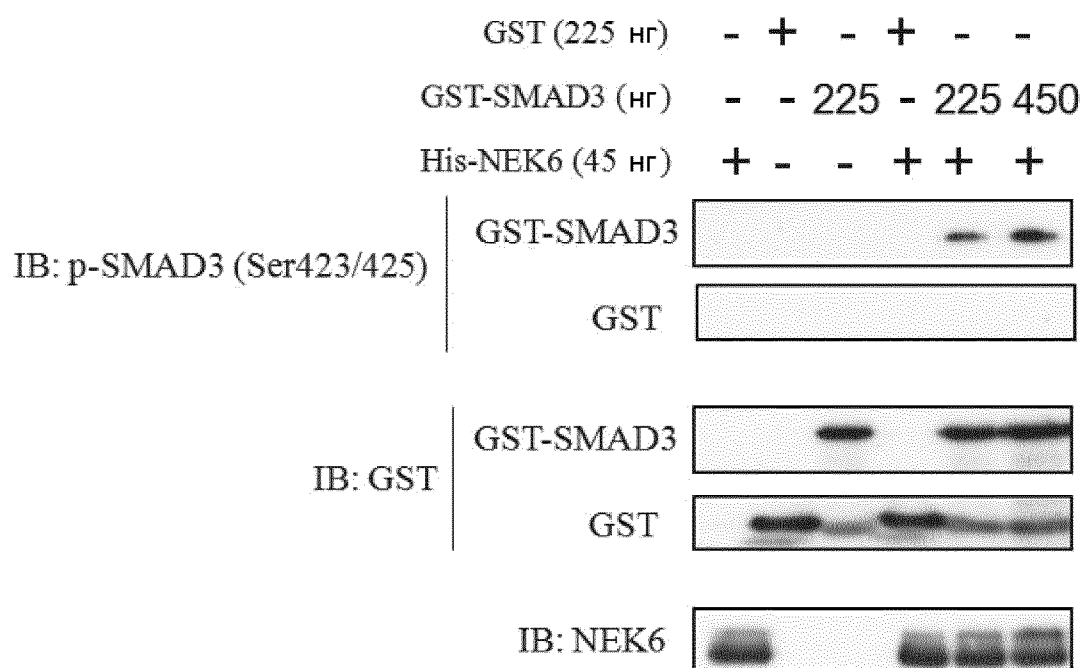
a)



b)

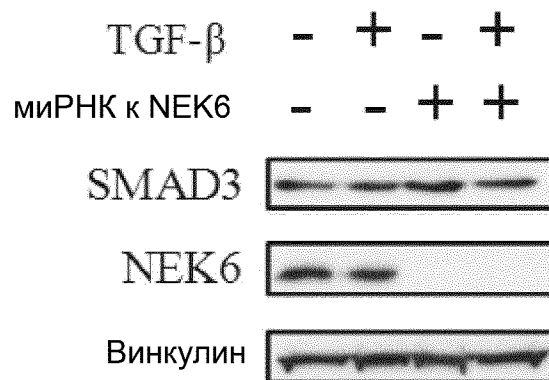


Фиг. 9

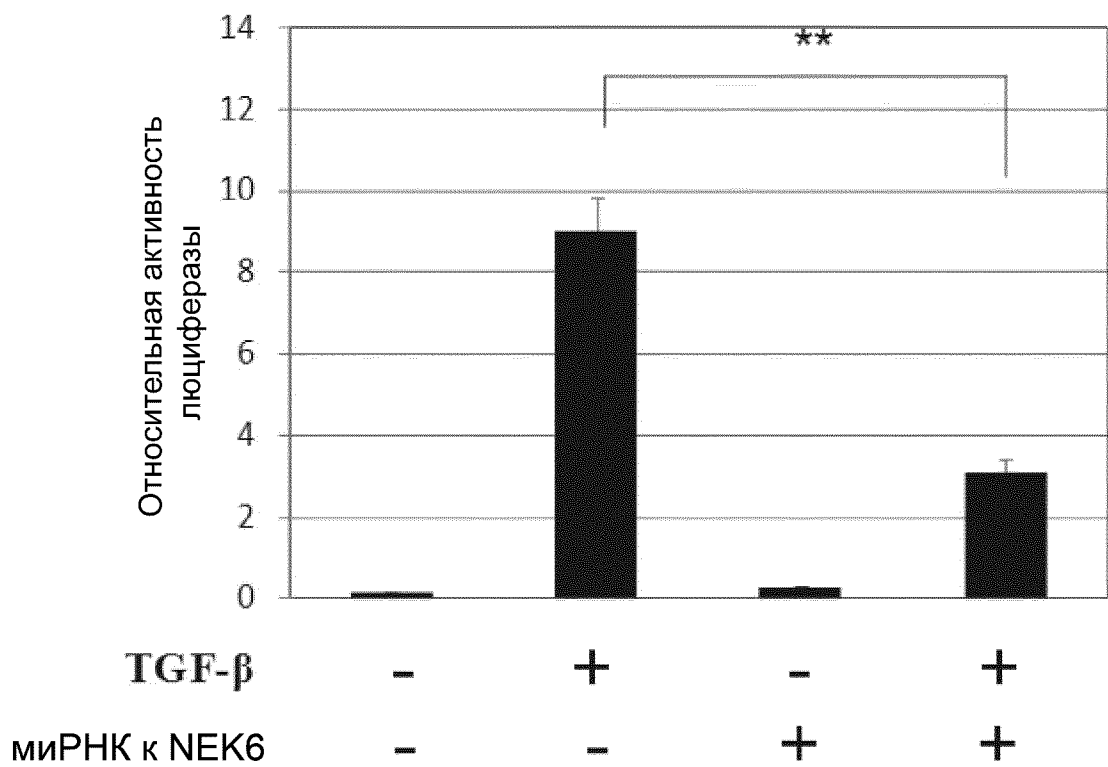


Фиг. 10

a)



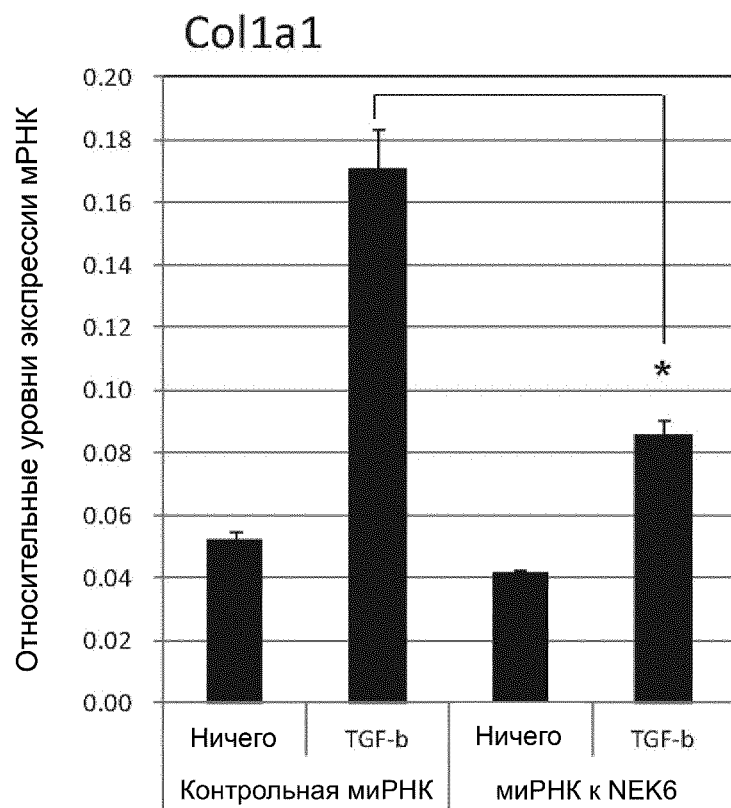
b)



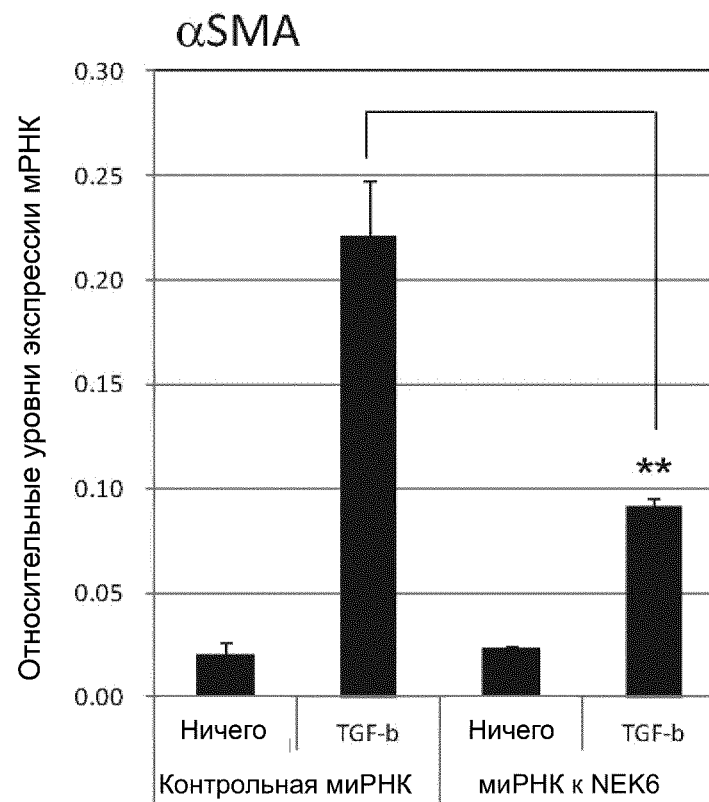
t-тест. \*\* p&lt;0.01

Фиг. 11

a)

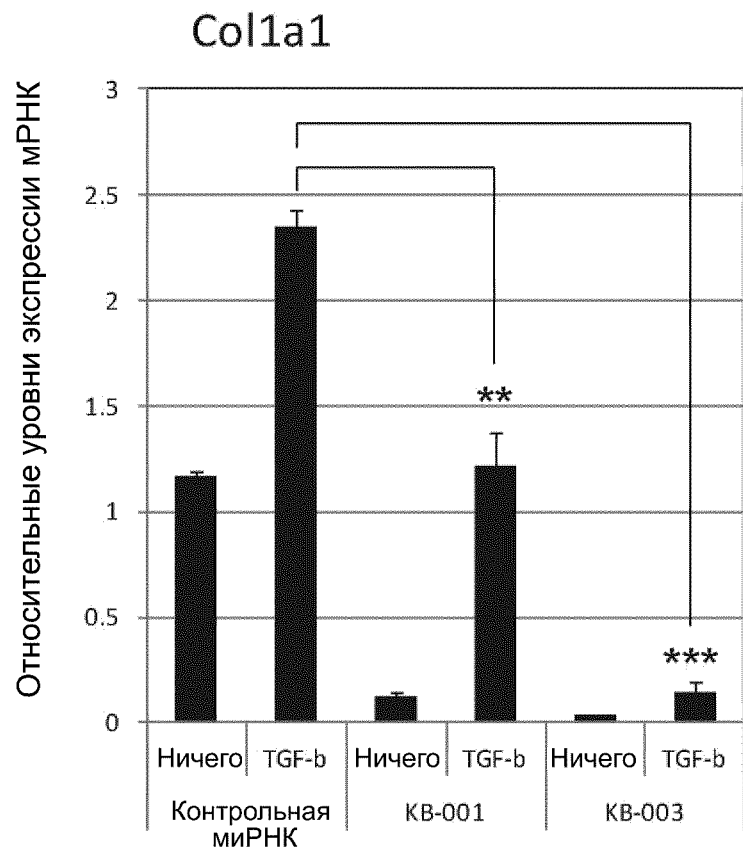


b)

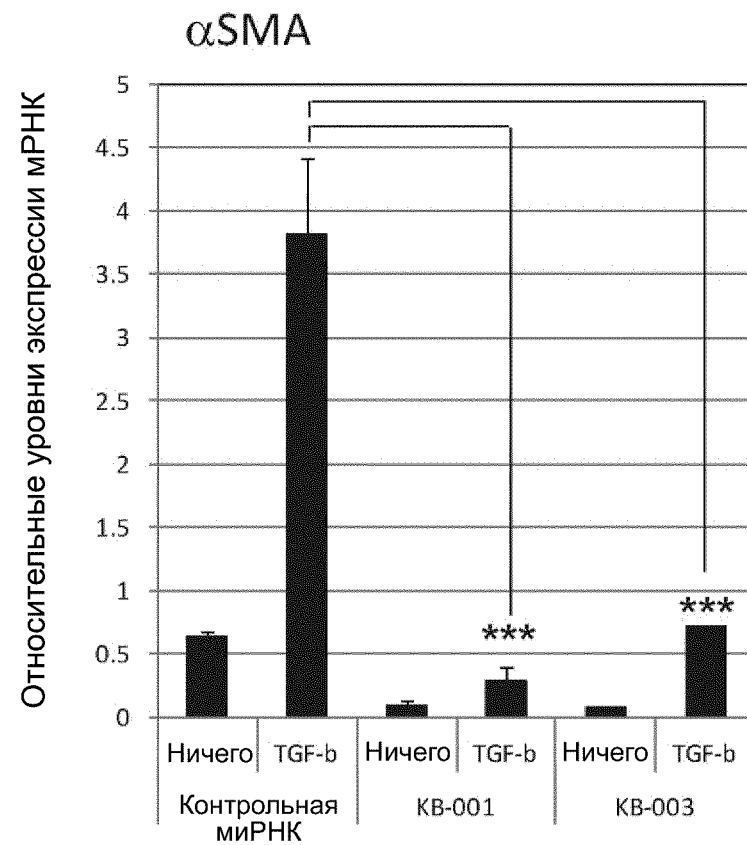


т-тест \*p<0.05, \*\* p<0.01

a)



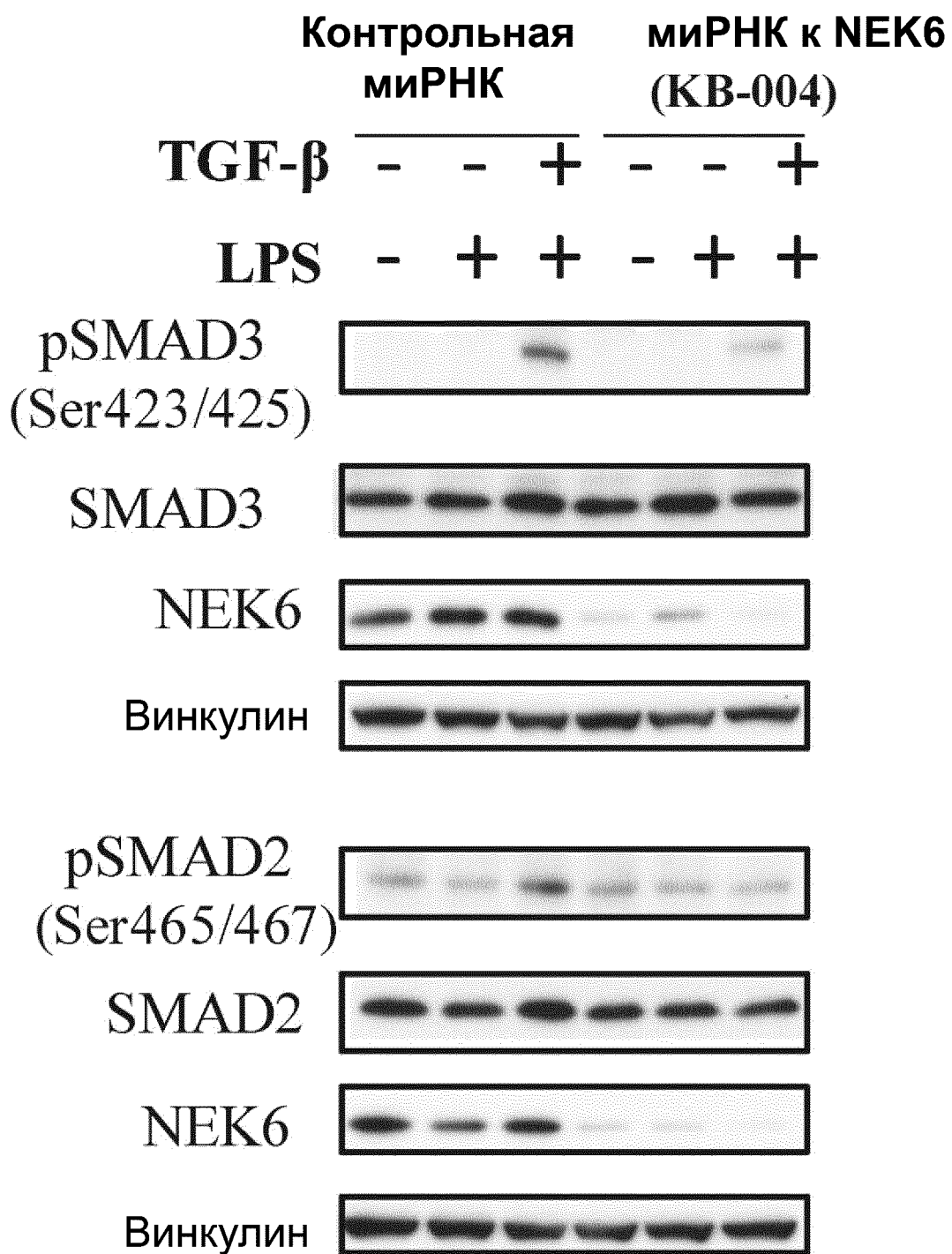
b)



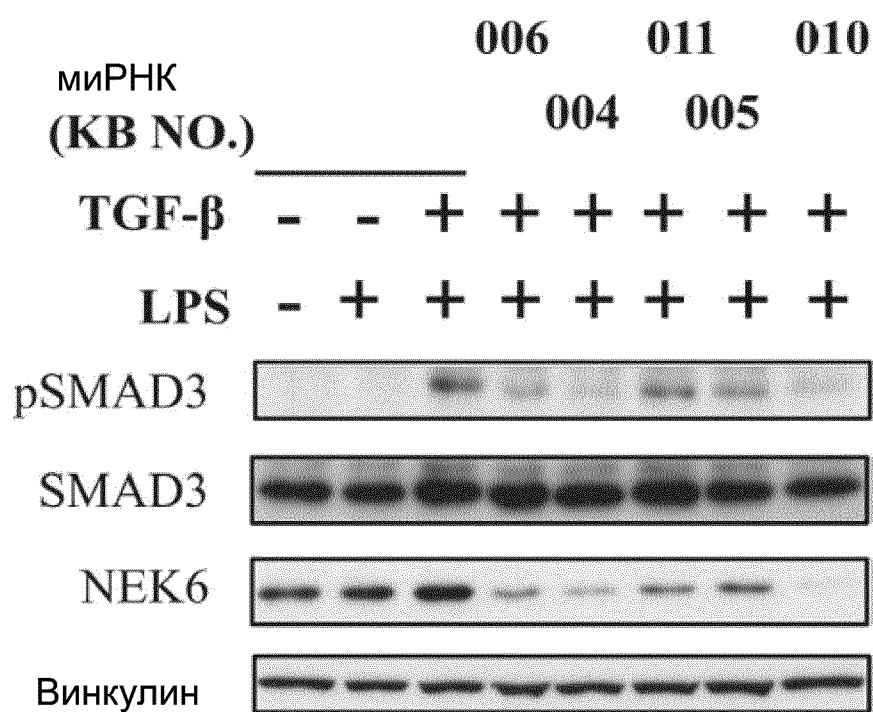
t-тест \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Фиг. 12

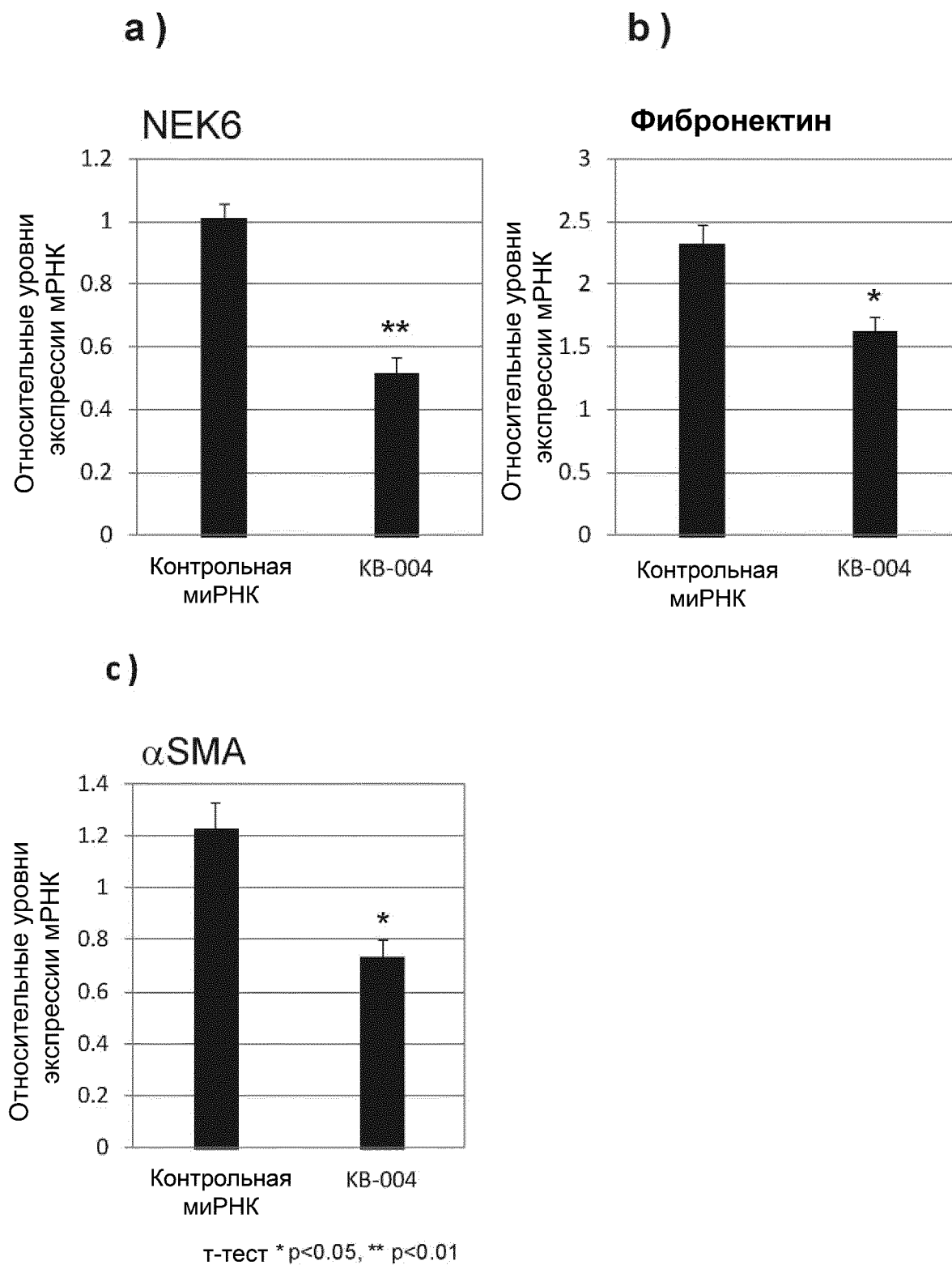
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

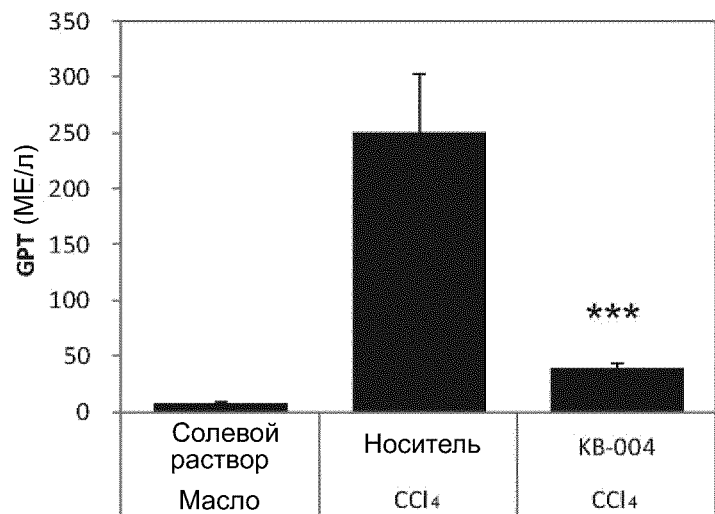




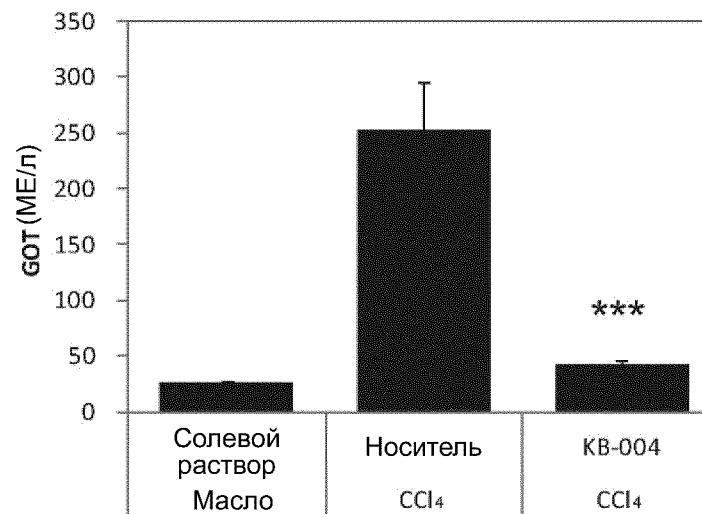
Фиг. 16



a)



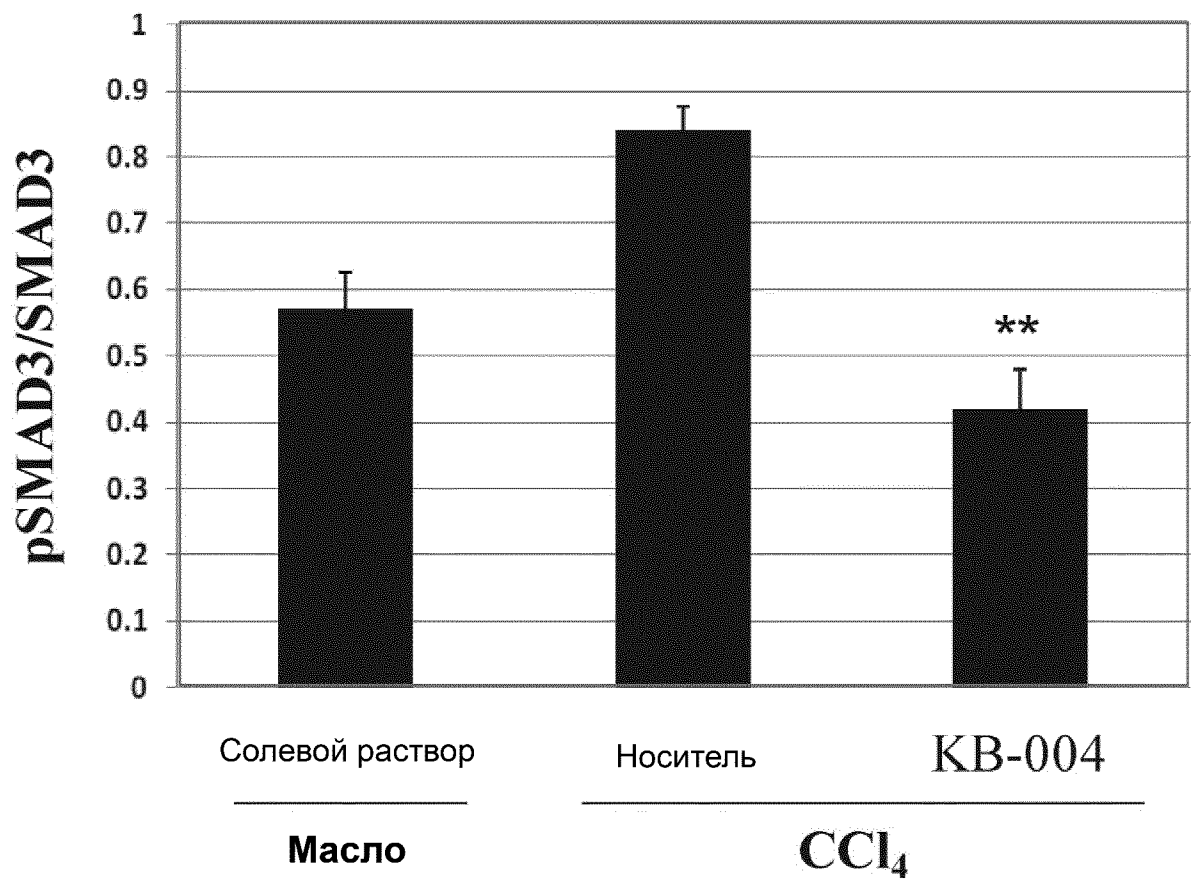
b)



t-тест \*\*\* p<0.001

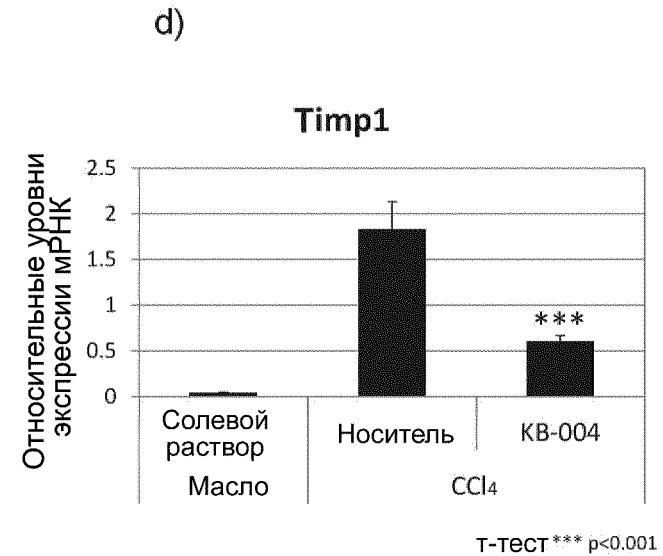
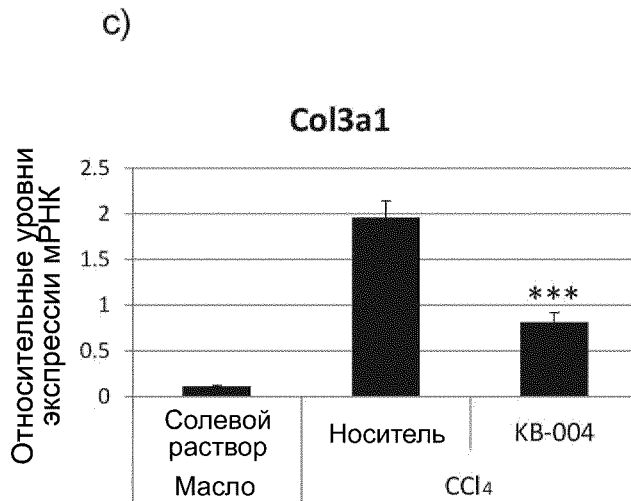
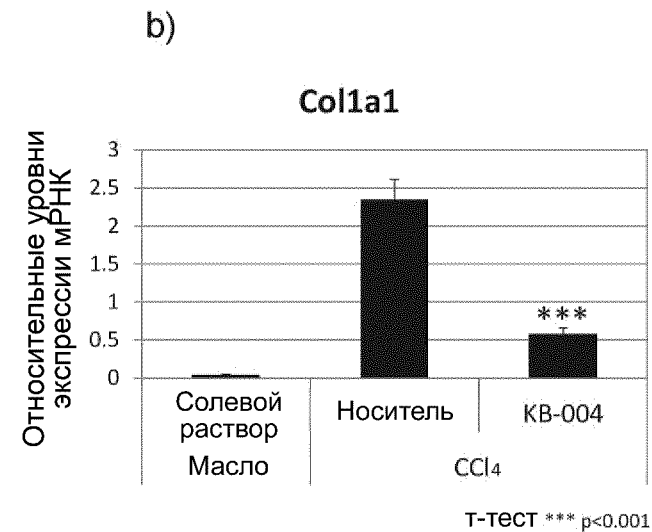
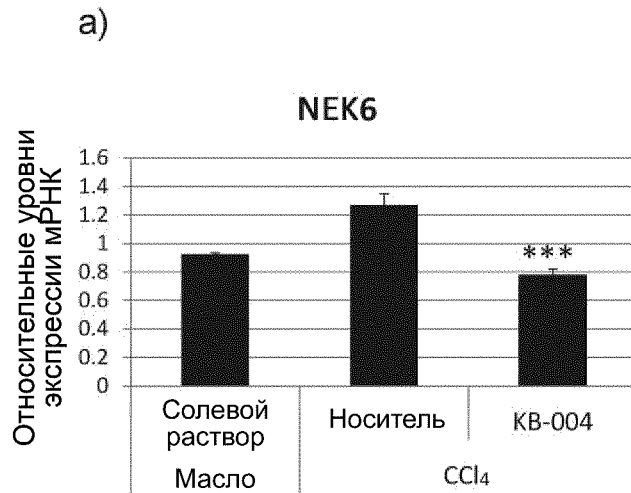
Фиг. 17

Фиг. 18

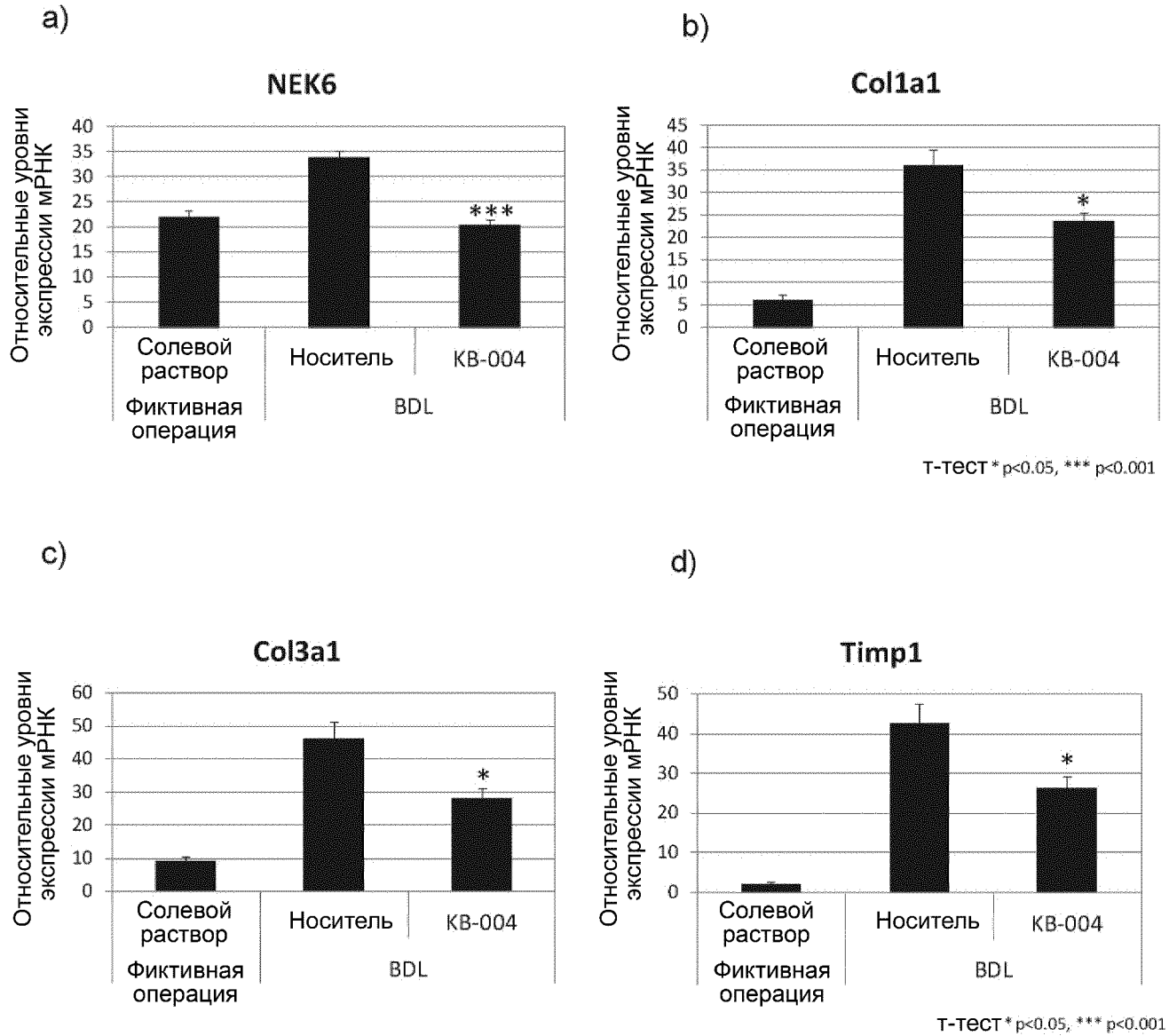


t-тест\*\*  $p < 0.01$

Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

